



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

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO
DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
(DLLME) E GC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Vagner Medeiros Floss
Santa Maria – RS, Brasil**

2015

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
DISPERSIVA (DLLME) E GC-MS/MS

Vagner Medeiros Floss

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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 **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria - RS, Brasil

2015

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

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

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS
EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) E GC-MS/MS**

elaborado por
Vagner Medeiros Floss

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Renato Zanella
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins
Universidade Federal de Rio Grande

Santa Maria, 19 de junho de 2015

*Dedico este trabalho à você,
Boa leitura.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), pela dedicação que empenha na profissão, que serve de exemplo aos seus alunos, e por compartilhar seu conhecimento a cada problema encontrado no dia-a-dia. Obrigado pela confiança, a você, minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela orientação, pela confiança e cobrança, pelo auxílio e aconselhamento, pela amizade e imparcialidade e, também, pela contribuição na minha vida profissional e pessoal. A execução deste projeto só foi possível por tudo que me ensinou. Serei eternamente grato pelo aprendizado que tive neste tempo de convívio. Obrigado pela orientação e pela dedicação que teve para realização deste estudo e desta etapa de minha vida.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, pela co-orientação, dedicação e contribuição a este trabalho, pelo conhecimento compartilhado em aula, pelo exemplo de sucesso e bom humor. Obrigada pelo incentivo!

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins, pelos direcionamentos, sugestões e ensinamentos durante minha formação. Meu obrigado pela amizade, incentivo e ensinamentos nesses anos, colocando-se sempre à disposição.

Aos colegas e integrantes do LARP que se propuseram a me ajudar no decorrer do desenvolvimento do trabalho e também aqueles que não integram mais o grupo, da mesma forma que eu, mas de alguma forma contribuíram para meu crescimento e aprendizado e fazem parte dessa família. Em especial, ao amigo e colega Fábio, que caminhou junto comigo desde a graduação, como também aos colegas e amigos Filipe e Nelson, onde juntos formamos uma excelente equipe.

À Lucila Cendon Ribeiro, pelo companheirismo, pela amizade, e por toda ajuda que me deu durante toda esta etapa da minha formação. Obrigado por participar comigo no desenvolvimento do trabalho, abdicando seu tempo para auxiliar-me nessa tarefa.

À Betina, o meu muito obrigado por estar sempre ao meu lado me ajudando, me incentivando e me dando forças para a elaboração deste trabalho abdicando seu tempo para ajudar-me. Agradeço pela paciência e compreensão nos momentos de minha ausência, como também, por todos esses anos de companheirismo.

Aos meus pais, minha eterna gratidão, por terem se dedicado a mim durante toda a vida, obrigado pela força, carinho, torcida em todos os momentos da minha vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos ensinamentos no decorrer do curso e aos secretários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela simpatia e atenção sempre prestados.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) E GC-MS/MS

Autor: Vagner Medeiros Floss
Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Santa Maria, 19 de junho de 2015

O uso de agrotóxicos se relaciona com a efetividade no controle de pragas, como também com a produtividade na produção de alimentos na agricultura. Porém, o uso dessas substâncias em altas quantidades vem afetando diretamente os recursos hídricos, essenciais para a manutenção da vida humana. No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria 2914, como também, a Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, pela Portaria 320, estipulam valores máximos permitidos (VMPs) para agrotóxicos em água. Dessa forma, métodos analíticos rápidos, sensíveis, eficientes e que geram pequenos volumes de resíduos tóxicos, devem ser desenvolvidos para a determinação de resíduos de agrotóxicos e demais substâncias químicas em água afim de verificar se estão de acordo com as legislações vigentes. Este estudo teve por objetivo otimizar e validar um método analítico visando a extração e determinação de resíduos de 32 agrotóxicos em amostras de água, aplicando a técnica DLLME e quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série com analisador do tipo Triplo Quadrupolo (GC-MS/MS). Foram avaliados diferentes solventes extratores e dispersores, volumes de solventes, adição de sais, variação do pH e tempo de agitação. Os resultados obtidos foram satisfatórios, apresentando valores de recuperação entre 71 e 113 % para os níveis avaliados. Os coeficientes de determinação para as curvas extraídas, apresentaram valores entre 0,99 e 0,9996. Os resultados de precisão da metodologia foram satisfatórios, apresentando valores entre de 1 e 13 %. A precisão intermediária apresentou valores de RSD situados na faixa de 5 e 15 %, com recuperações na faixa de 70 à 101 % para o nível de 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método apresentou limite de quantificação 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. A determinação de resíduos de agrotóxicos em água com alta confiabilidade e segurança. Após a validação do método desenvolvido, o mesmo foi aplicado a amostras reais de água, que indicaram presença de Alacoro, Endossulfan Alfa e 4,4 DDE.

Palavras-chaves: água, agrotóxicos, DLLME, GC-MS/MS

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WATER
USING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION (DLLME)
AND GC-MS/MS**

Author: Vagner Medeiros Floss
Advisor: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Santa Maria, 19th Juny, 2015

The use of pesticides is related to effectiveness in pest control, as well as productivity in food production in agriculture. However, the use of these substances in high amounts is directly affecting water resources, essential for the maintenance of human life. In Brazil, the Ministry of Health through Ordinance 2914, as well as the Secretariat of the Rio Grande do Sul State Health, by Ordinance 320, stipulate maximum permissible values (VMPs) for pesticides in water. Thus, rapid, sensitive, efficient and generate small amounts of toxic waste analytical methods should be developed to determine the presence and concentration of pesticides and other chemicals in water in order to ensure they are in accordance with current legislation. This study aimed to optimize and validate an analytical method aiming at the extraction and determination of residues of 32 pesticides in water samples by applying the DLLME technical and quantification by gas chromatography coupled to Mass Spectrometry in Triple Quadrupole series (GC-MS / MS). We evaluated the different extractor solvents and dispersor, different volumes of solvents, addition salts, pH variation and time of agitation. The results were satisfactory, with recovery values between 71 and 113% for the tested levels. The coefficients of determination for the curves drawn in the matrix, presented values between 0.9900 to 0.9996. Precision data for the methodology were satisfactory, with values between 1 and 13%. The intermediate precision was RSD values in the range of 5 to 15%, with recoveries in the range 70 to 101% for the level of 0.25 ug L⁻¹. The method presented quantification limit of 0.1 ug L⁻¹ providing the determination of water in pesticide residues with high reliability and security. After validation of this methodology, it was applied to real water samples, in order to evaluate the method developed.

Keywords: water, pesticides, DLLME, GC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas do procedimento experimental empregando DLLME.....	34
Figura 2	Cromatograma SRM obtido por GC-MS/MS para (A) amostra branco da matriz e (B) solução analítica no extrato branco da matriz, contendo os 32 agrotóxicos em estudo na concentração de 5 µg L ⁻¹	56
Figura 3	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) quando tetracloreto de carbono, diclorometano e clorofórmio foram utilizados como solventes extratores (n = 3).....	60
Figura 4	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) quando acetona, acetonitrila e metanol foram utilizados como solventes dispersores (n = 3).....	62
Figura 5	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) quando foram utilizados 150, 200, 300 e 400 µL de tetracloreto de carbono como solvente extrator (n = 3).....	63
Figura 6	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) quando foram utilizados 300, 500, 1000, 1500 e 2000 µL de acetona como solvente dispersor (n = 3).....	64
Figura 7	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) para a adição de NaCl, MgSO ₄ , Na ₂ SO ₄ e não adição de sal (n = 3).....	65
Figura 8	Número de compostos com recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%) quando foram utilizados 15, 30 e 60 segundos de agitação após adição da mistura de solvente extrator e dispersor (n = 3).....	67
Figura 9	Procedimento de extração otimizado.....	68
Figura 10	Cromatograma GC-MS/MS do íon total para a amostra de água 4, demonstrando presença de 3 compostos contemplados no método analítico desenvolvido.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	22
Tabela 2	Valores Máximos Permitidos (VMP) para agrotóxicos em água potável de acordo com Portaria 2.914 do Ministério da Saúde.....	27
Tabela 3	Valores Máximos Permitidos (VMP) para agrotóxicos em água potável de acordo com Portaria 320 da Secretaria Estadual de Saúde do RS.....	27
Tabela 4	Aplicações utilizando a técnica DLLME na etapa de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água.....	37
Tabela 5	Aplicações utilizando a técnica DLLME em outras matrizes.....	39
Tabela 6	Condições otimizadas do sistema GC-MS/MS, modo de ionização EI, modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (tR), segmentos de análise, íons precursores e íons produtos para quantificação e confirmação de cada substância.....	58
Tabela 7	Características físico-químicas dos solventes extratores.....	61
Tabela 8	Valores da faixa linear, coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas e equação do modelo para a curva extraída	70
Tabela 9	Avaliação do efeito matriz nos compostos estudados.....	71
Tabela 10	Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos em água.....	73
Tabela 11	Percentuais de RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em água, correspondente a precisão intermediária.....	74
Tabela 12	Resultados da análise das amostras reais de água empregando o método DLLME e GC-MS/MS otimizado e validado neste trabalho.....	75

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

A - Analito

a – Inclinação da curva analítica

A_{aq} – Analito na fase aquosa

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A_{org} – Analito na fase orgânica

b – Interseção com o eixo y

CEP - Extração em ponto de nuvem, do inglês *Cloud Point Extraction*

CC – Corrente Contínua

CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*

CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision-Induced Dissociation*

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

C₁ – Concentração do analito na amostra fortificada

C₂ – Concentração do analito na amostra não fortificada

C₃ – Concentração do analito na amostra fortificada

DAD – Detector de Arranjos de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*

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

E – Enriquecimento

EI – Impacto de Elétrons

EI-MS – Espectrometria de Massas por Impacto de Elétrons

EPA - Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *Environmental Protection Agency*.

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

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

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

HCH alfa – Hexaclorociclohexano alfa

HCH beta – Hexaclorociclohexano beta

HCH gama – Hexaclorociclohexano gama

HLE - Extração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Extraction*

HPA's – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

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

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH – Conferência Internacional em Harmonização

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV - Infravermelho

K_D – Constante de Equilíbrio

K_{oc} – Coeficiente de partição

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água, do inglês *Octanol-Water Partition Coefficient*

LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

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

LOD - Limite de detecção, do inglês *Limit of detection*

LODi - Limite de detecção do Instrumento, do inglês *Instrumental Limit of detection*

LODm – Limite de detecção do Métodos, do inglês *Method Limit of detection*

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

LOQi – Limite de quantificação do Instrumento, do inglês *Instrumental Limit of Quantification*

LOQm – Limite de Quantificação do Método, do inglês *Method Limit of Quantification*

m – Média dos resultados

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Ministério da Saúde

m/z – Massa/carga
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos
PE – Ponto de Ebulição
PF – Ponto de Fusão
PI – Padrão Interno
PS – Padrão de Substituição
PIB – Produto Interno Bruto
pH – Potencial Hidrogeniônico
PTV – Programação de Temperatura de Vaporização
Q1 – Primeiro Quadruplo
Q2 – Câmara de Colisão
Q3 – Terceiro Quadruplo
qMS – Analisador de Massas Quadruplo
QqQ – Analisador Triplo Quadruplo
R – Recuperação
RENACIT – Rede Nacional de Centros de Informação Toxicológica
Rf – Radiofrequências
rpm – Rotação por minuto
RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative standard deviation*
s – Desvio-padrão amostral
SIM – Monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*
S/N – Sinal/ruído
t – Distribuição *student*
TIC – Cromatografia Total de íons, do inglês *Total Ion Chromatography*
VMP – Valor Máximo Permitido
V_{org} – Volume da fase orgânica
V_D – Volume da fase doadora (aquosa)
X – Concentração
Y – Resposta medida

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Nome, grupo químico, classe, massa molecular, solubilidade, ponto fusão, ponto ebulição, log Kow e pressão de vapor dos agrotóxicos estudados.....	93
ANEXO B	Fórmulas estruturais dos agrotóxicos avaliados.....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Água.....	20
2.2	Agrotóxicos.....	21
2.3	Contaminação do meio ambiente por agrotóxicos.....	23
2.4	Legislação e qualidade da água.....	26
2.5	Determinação de resíduos de agrotóxicos em água.....	28
2.5.1	Utilização de métodos cromatográficos para determinação de resíduos agrotóxicos em água.....	29
2.5.2	Métodos de preparo de amostras para determinação de resíduos agrotóxicos em água.....	31
2.5.2.1	Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	32
2.5.2.1.1	Parâmetros que podem influenciar a extração por DLLME.....	34
2.5.2.1.2	Aplicações da DLLME na determinação de resíduos de agrotóxicos.....	36
2.6	Validação de métodos cromatográficos.....	41
2.6.1	Seletividade e sensibilidade.....	41
2.6.2	Curva analítica e faixa linear.....	42
2.6.3	Efeito matriz.....	42
2.6.4	Exatidão.....	43
2.6.5	Precisão.....	44
2.6.6	Limite de detecção e limite de quantificação.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Instrumentação.....	46
3.2	Materiais, reagentes e solvents.....	47
3.3	Amostras “branco”.....	47
3.4	Agrotóxicos Seleccionados.....	48
3.5	Seleção do padrão interno e do padrão de substituição.....	48
3.6	Preparo das soluções analíticas.....	49
3.7	Otimização das condições cromatográficas do sistema GC-MS/MS para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água.....	49
3.8	Otimização do método para análise de resíduos de agrotóxicos em água.....	50
3.8.1	Escolha dos solventes.....	50
3.8.1.1	Seleção do solvente extrator.....	51
3.8.1.2	Seleção do solvente dispersor.....	51
3.8.1.3	Seleção do volume do solvente extrator.....	51
3.8.1.4	Seleção do volume do solvente dispersor.....	51
3.8.2	Efeito da adição de sal.....	52
3.8.3	Efeito do tempo de agitação.....	52
3.8.4	Efeito do pH.....	52
3.9	Validação do método para análise de resíduos de agrotóxicos em água.....	53
3.9.1	Seletividade.....	53
3.9.2	Curva analítica e faixa linear.....	53
3.9.3	Efeito Matriz.....	53
3.9.4	Limites de detecção e quantificação instrumental e do método.....	54
3.9.5	Exatidão.....	54

3.9.6	Precisão.....	55
3.9.7	Aplicação do método em amostras reais.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1	Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos em estudos por GC-MS/MS.....	55
4.2	Seleção das melhores condições para a DLLME.....	57
4.2.1	Seleção do solvente extrator.....	57
4.2.2	Seleção do solvente dispersor.....	61
4.2.3	Seleção do volume do solvente extrator.....	62
4.2.4	Seleção do volume do solvente dispersor.....	64
4.2.5	Efeito da adição de sal.....	65
4.2.6	Efeito do tempo de agitação.....	66
4.2.7	Efeito do pH.....	67
4.2.8	Procedimento otimizado.....	68
4.3	Validação do método DLLME com determinação por GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em água.....	69
4.3.1	Seletividade.....	69
4.3.2	Curva analítica e faixa linear.....	69
4.3.3	Efeito matriz.....	69
4.3.4	Limite de detecção e quantificação do método e do instrumento.....	72
4.3.5	Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade).....	72
4.3.6	Precisão intermediária.....	73
4.4	Aplicação do método otimizado.....	75
5	CONCLUSÕES.....	77
6	ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	79
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXOS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Um dos recursos naturais mais utilizados e de fundamental importância para a existência e manutenção da vida é a água, e por isso, deve estar presente no ambiente em quantidade e qualidade apropriada. Porém, a qualidade da água tem sido afetada por diversos tipos de poluentes. Uma das principais causas da poluição das águas é a aplicação dos agrotóxicos nas culturas agrícolas. No entanto, os agrotóxicos exercem um papel fundamental para obter altas produtividades agrícolas, pois permitem o controle das pragas que atacam a agricultura e prejudicam as plantações (SANCHES *et al.*, 2003).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil destaca-se no panorama mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, sendo responsável por 86% do consumo na América Latina (IBGE, 2010), e conforme os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), no ano de 2011 o consumo médio de ingrediente ativo para hectare foi em torno de 10 kg. As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste caracterizam-se como os maiores consumidores de agrotóxicos do país. Conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) o estado do Rio Grande do Sul destaca-se no cenário nacional como grande produtor agrícola. Assim, há uma grande demanda por agrotóxicos das mais diversas classes químicas e toxicidades tornando o estado responsável por 15% do consumo total de agrotóxicos do país (SINDAG, 2011).

Os agrotóxicos podem ser aplicados de diferentes maneiras, sendo bastante comum a pulverização sobre as plantações, onde são liberados diretamente no meio ambiente, entrando em contato com o solo, água, plantas, etc. As propriedades físico-químicas desses agrotóxicos, como a alta solubilidade em água, baixo valor de coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo (K_{oc}) e elevado tempo de meia vida apresentam tendência de serem lixiviados podendo atingir as águas subterrâneas e conseqüentemente alterar a sua qualidade (ANDREU *et al.*, 2004).

Com a criação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, em 1997, a água passa a ser considerada legalmente como um bem de domínio público. Então, valores máximos permitidos (VMPs) para agrotóxicos em água foram estabelecidos, pelo Ministério da Saúde do governo federal, como também, mais recentemente pelo Secretária da Saúde do Estado do Rio Grande do

Sul, através das Portarias 2914 e 320, respectivamente. Entre os agrotóxicos mais utilizados, podemos citar os herbicidas e os inseticidas, que estão presentes nas formulações dos produtos mais vendidos com ampla atuação na agricultura.

Desta forma, há uma necessidade crescente e constante no desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais e em alimentos, que produzam resultados confiáveis e que atendam aos limites estabelecidos pela legislação.

Em função de suas características físico-químicas, as principais técnicas empregadas para analisar resíduos de agrotóxicos presentes na água são a Cromatografia Líquida (LC) e a Cromatografia Gasosa (GC). Essas técnicas cromatográficas podem ser acopladas a diferentes detectores, sendo o mais utilizado, o Espectrômetro de Massas (MS). Na etapa de preparo de amostra, a técnica mais utilizada é a extração em fase sólida (SPE). Porém, as técnicas de microextração veem ganhando espaço, e entre elas podemos mencionar a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).

Para o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras, principalmente para extração e pré-concentração dos analitos presentes nas amostras, é desejável a miniaturização dos procedimentos, já que reduzem o impacto ambiental causados pelo consumo de grandes volumes de efluentes gerados, como também, pela redução do tempo de procedimento.

O tempo para execução dos procedimentos de extração limita a viabilidade das técnicas de extração, onde temos 7 dias de “validade” das amostras de água, descontando-se o tempo de transporte até o seu armazenamento no laboratório (USEPA, 1996).

O objetivo de qualquer medida analítica é a obtenção de dados consistentes, confiáveis e precisos, neste sentido, a validação de métodos analíticos desempenha um papel importante e deve ser realizado pelo analista que deseja provar que o método analítico desenvolvido é aceitável para a sua finalidade (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012).

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido e eficiente para a determinação simultânea de 32 agrotóxicos em água, empregando a técnica de DLLME e determinação por GC-MS/MS.

Para o desenvolvimento e validação do método analítico foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Otimizar os principais parâmetros que afetam a eficiência da extração por DLLME (seleção de solventes extrator e dispersor; seleção do volume dos volventes extrator e dispersor; tempo de agitação; adição de sal; efeito do pH);
2. Validar o método proposto, avaliando a curva analítica e faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz;
3. Demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido através do uso de diferentes amostras de água, empregando DLLME e GC-MS/MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água

A água é vital para todos os seres vivos, sendo este, um recurso natural intensamente explorado pelo homem. Porém, nas últimas décadas a sua disponibilidade para o consumo humano encontra-se restrita por inúmeros fatores. Entre eles a escassez natural, contaminação biológica e contaminação físico-química. Estas contaminações são derivadas de atividades antrópicas como o destino final do esgoto doméstico e industrial, modernização da agricultura e disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos e industriais. A presença de bactérias patogênicas, parasitas, vírus, contaminantes orgânicos e inorgânicos, são prejudiciais à saúde humana. Desta forma, torna-se necessário e urgente solucionar a escassez da água, bem como melhorar a gestão dos recursos hídricos já existentes, para que a inacessibilidade da água potável não se torne uma realidade para as futuras gerações (FARD, 2007).

O uso da água modifica-se de região para região e varia durante as distintas fases do desenvolvimento regional. Em zonas pouco desenvolvidas, o consumo de água é utilizado principalmente para as práticas da agricultura, produção animal, e das atividades humanas essenciais como higiene e alimentação. Nas regiões de maior desenvolvimento industrial e tecnológico, utiliza-se a água nas aplicações de larga escala como a produção de energia térmica, atividade agrícola intensiva, construção de barragens, produção de energia hidráulica, sistemas de regulação fluvial e em redes de distribuição (MACHADO, 2006; HENRIQUES, 2008).

A água é o meio receptor de diversos efluentes aquosos, conhecidos como águas residuais, urbanas, industriais e agrícolas que são oriundas de fontes localizadas ou difusas. A utilização da água na recepção de efluentes contaminados é uma problemática, pois conforme promove a dispersão desses contaminantes no meio aquático, também requer a sua migração para outros meios receptores como o ar, o solo ou a biota. A poluição dos recursos hídricos contribui para um aumento da deterioração das águas superficiais e subterrâneas que se designam ao consumo humano (WHO, 2006).

2.2 Agrotóxicos

O decreto nº 4.074 de 04/02/2002 que regulamenta a Lei nº 7802 de 11/07/1989, define os agrotóxicos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja modificar a composição da flora ou da fauna, com o objetivo de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos são classificados de diversas maneiras, quanto à finalidade de uso, podemos citar: inseticidas (combatem os insetos), fungicidas (combatem os fungos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), acaricidas (combatem os ácaros) entre outros. (SANCHES *et al.*, 2003; ANVISA, 2005; FERNANDO & DUARTE, 2011). Com relação à função dos agrotóxicos, a maioria apresenta uma ação em comum, a de bloquear os processos metabólicos dos organismos para os quais possuem uma ação tóxica (PEIXOTO, 2007; RIVEROS, 2012).

Quanto à estrutura química os agrotóxicos são divididos em diferentes classes, como por exemplo, carbamatos, cloroacetominas, organoclorados, organofosforados, piretróides, triazinas entre outros (ANVISA, 2005).

Quanto à persistência os agrotóxicos podem ser classificados em relação ao tempo de meia vida de cada composto. Este corresponde ao tempo necessário após a aplicação, para que o composto tenha sua eficácia reduzida à metade. Desta forma, os agrotóxicos podem apresentar uma persistência curta (até 90 dias); média (de 91 a 180 dias) e longa (maior que 180 dias). Porém, o deslocamento dos agrotóxicos no ambiente durante sua meia vida pode ser pequeno (até 20 cm); médio (de 21 a 60 cm) ou grande (maior que 60 cm) (SANCHES *et al.* 2003, & ANVISA, 2005).

A classificação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico está baseada em dados físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos. De acordo com a Tabela 1 a classificação pode variar de I a IV (produtos altamente perigosos ao meio ambiente até produtos poucos perigosos ao meio ambiente) e o rótulo deve apresentar faixa de diferentes colorações (ANVISA, 2005).

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classificação	Cor da Faixa
Classe I Extremamente tóxico	Vermelha
Classe II Altamente tóxico	Amarela
Classe III Moderadamente tóxico	Azul
Classe IV Pouco tóxico	Verde

Fonte: ANVISA, 2005.

No Brasil, o MAPA regulamenta e fiscaliza a produção, venda e utilização de agrotóxicos, em conjunto com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), ANVISA e Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA). A ANVISA controla as ações na área de toxicologia, com o objetivo de analisar, regulamentar, controlar e fiscalizar produtos e serviços que envolvam riscos à saúde. Também é responsável pela coordenação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos (PARA) e pela Rede Nacional de Centros de Informação Toxicológica (Renaciat) e promoção de capacitações na área de toxicologia (ANVISA, 2009). O IBAMA realiza a avaliação do potencial de periculosidade ambiental de todos os agrotóxicos registrados no Brasil (MMA, 2014).

Um dos principais problemas associados ao uso de agrotóxicos é a resistência que as pragas podem apresentar aos diferentes tipos de formulações utilizadas. Isso ocorre quando a aplicação do produto é constante, a praga através de processos de adaptação adquire resistência ao princípio ativo. Com isso, aplicações em doses mais elevadas e com maior frequência são necessárias (VIEIRA *et al.*, 2011).

O registro mais antigo sobre a utilização de agrotóxicos foi a cerca de 1000 a.C., com a queima de enxofre para fumigar os lares gregos (BAIRD, 2002). Desde 1920, com o desenvolvimento da síntese de novos compostos, estes passaram a ser empregados em larga escala na agricultura. A partir dos anos 1950 a “Revolução Verde” disponibilizou diversas mudanças na agricultura, tendo como

base o uso de agrotóxicos, fertilizantes e novos processos de produção o que resultava em aumento da produtividade (RIBAS & MATSUMURA, 2009).

Atualmente, o Brasil é o principal mercado consumidor de agrotóxicos do mundo. A maior utilização ocorre na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura. No Brasil em 2014, o consumo de agrotóxicos presentes em diferentes formulações foi superior a 900 mil toneladas e representou uma receita de mais de US\$ 12 bilhões de dólares. Neste período as classes mais vendidas foram herbicidas (57%), inseticidas (28%), fungicidas (14%) e acaricidas (1%). Os estados de Mato Grosso (193.240 ton), Paraná (117.784 ton), Rio Grande do Sul (108.643 ton) e São Paulo (106.855 ton) foram responsáveis por mais de 50% do consumo de agrotóxicos no país. Associadas com este consumo elevado as intoxicações por estas substâncias vem aumentando entre os trabalhadores rurais e também através da contaminação dos alimentos e meio ambiente (PEIXOTO, 2007; BRASIL, 2010; BOCHNER, 2009; BRASIL, 2015).

No Brasil, o uso de agrotóxicos tem aumentado devido a sua intensa utilização nas atividades agrícolas em diversas regiões do país. O aumento da demanda por alimentos em um primeiro momento levou a intensificação da cultura agrícola em terras mais férteis e após, na expansão das fronteiras agrícolas para áreas menos produtivas. A agricultura exerce grande importância no Produto Interno Bruto (PIB) do país (KUSSUMI, 2007; BRAGA, 2012). Portanto, hoje é caracterizada pelo uso de novas tecnologias e equipamentos, pelo aumento do interesse em pesquisas agrônômicas e pelo uso de uma diversidade de insumos, como agrotóxicos e fertilizantes visando no aumento das taxas de produtividade (PEIXOTO, 2010; BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

2.3 Contaminação do meio ambiente por agrotóxicos

Nos últimos anos ocorreu um aumento da preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por agrotóxicos, em especial em relação à presença destas substâncias em mananciais de água (PINTO *et al.*, 2010). Depois de aplicados, somente cerca de 55% da formulação contendo o agrotóxico atinge o alvo. Há uma dispersão para outros compartimentos ambientais, tais como a água, solo e a atmosfera. Após atingirem o solo, vários

processos químicos, físicos e biológicos definem seu comportamento. A dinâmica dos agrotóxicos é conduzida pelo processo de adsorção, o qual é responsável pela ligação dos agrotóxicos às partículas do solo. Desta forma, influencia na disponibilidade para os demais processos como transformação, degradação e transporte, seja por volatilização, lixiviação e/ou por escoamento superficial (MARTINI *et al.*, 2012).

Conforme Silva (2004), os processos que merecem maior destaque são o transporte entre compartimentos ambientais, escoamento superficial e a lixiviação. O escoamento superficial facilita a contaminação das águas superficiais, através do transporte do agrotóxico, o qual é adsorvido pelo solo ou dissolvido em água. A lixiviação dos agrotóxicos resulta na contaminação das águas subterrâneas, os compostos são lixiviados em solução juntamente com a água que abastasse os aquíferos. As propriedades físico-químicas que determinam a ocorrência da lixiviação dos destes compostos no meio ambiente são a solubilidade em água, coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo (Koc), e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) tanto no solo como na água.

A solubilidade em água é uma característica importante e essencial para os processos ambientais, pois está relacionada com o comportamento, transporte e destino dos agrotóxicos, indicando a tendência que esses compostos apresentam em ser carregados superficialmente no solo até atingir as águas superficiais (SILVA, 2004). Através do coeficiente de adsorção é possível prever a tendência que o agrotóxico possui de ficar adsorvido na matéria orgânica presente no solo. Moléculas altamente solúveis tendem a apresentar valores de Koc relativamente baixos (menores que $150 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), podendo ser ligeiramente biodegradáveis no solo e na água (BARCELÓ, 2006). O tempo de meia vida é um critério utilizado para definir os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos (SILVA, 2004). Segundo Martini e colaboradores (2012), os agrotóxicos que possuem elevada solubilidade em água, baixo valor de Koc, elevado tempo de meia vida, possuem uma tendência de serem lixiviados, como citado anteriormente. O efeito dos agrotóxicos no meio ambiente depende da sua ecotoxicidade frente aos organismos terrestres e aquáticos. Além disso, a sua toxicidade irá depender da

concentração utilizada, que por sua vez, está relacionada com o modo e condições de aplicação.

Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados relatando a presença de agrotóxicos em diferentes compartimentos ambientais como solo (AHUMADA *et al.*, 2013; ARORA *et al.*, 2008), água (RISSATO *et al.*, 2004; OLIVO *et al.*, 2015), ar (HENGEL & LEE, 2014; SANTOS *et al.*, 2011), sedimento (LYYTIKÄINE *et al.*, 2003; VILLAVARDE *et al.*, 2008).

No ano de 2014 a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) apresentou um levantamento sobre a contaminação do meio ambiente por agrotóxicos em diversas regiões do Brasil (EMBRAPA, 2014). Os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná são os que mais apresentam casos de ocorrência de resíduos de agrotóxicos organoclorados em solo e águas subterrâneas. Isto se deve a predominância da cultura do café nestes estados no período em que o uso dos compostos organoclorados ainda era permitido. Nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, há ocorrência em solo e água de resíduos de herbicidas, fungicidas e inseticidas empregados na produção orizícola. Na região Nordeste o cenário é crítico, principalmente devido ao uso intensivo, envolvendo sistemas de produção de frutas para exportação. Toda a região do Vale do Submédio Rio São Francisco está sob esse sistema, com a utilização de pivôs de irrigação. Na região Centro-Oeste, nos estados de Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul as áreas de atividade agrícola intensiva estão em franca expansão, principalmente relacionadas a lavouras de soja, milho e algodão. Resíduos de agrotóxicos relacionados a estas culturas já foram detectados em amostras de solo, águas superficiais e subterrâneas. Na região Amazônica, o comprometimento da qualidade da água e do solo, de uma forma global, está diretamente relacionado à possibilidade do avanço da agricultura com o uso mais intensivo de agrotóxicos, principalmente na cultura da soja. Por outro lado, ainda não existem estudos ou qualquer tipo de monitoramento que evidenciem uma situação preocupante na região. O Brasil possui uma legislação moderna que trata do uso de agrotóxicos, o que possibilita a implantação de diversas iniciativas que poderiam tornar a utilização destas substâncias muito mais seguras para a saúde humana e o meio ambiente, incluindo o solo e a água. Contudo, nota-se que há necessidade de novas medidas regulatórias para o uso de agrotóxicos e o incentivo a pesquisa

para geração de informações sobre o impacto ambiental destes produtos (EMBRAPA, 2014).

2.4 Legislação e qualidade da água

Através da Lei 9.433, de 8 janeiro de 1997 (BRASIL, 1997), a qual constitui a Política Nacional de Recursos Hídricos, e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, a água é considerada legalmente como um bem de domínio público, dotado de valor econômico e cujo uso prioritário em situações de escassez, deve ser o consumo humano e animal.

O padrão de potabilidade vigente no Brasil é estabelecido pela Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano no país. Essa portaria é a quinta versão da norma brasileira para qualidade da água para consumo humano, a qual vem sofrendo revisões desde 1977 (BRASIL, 2011).

Devido às características toxicológicas de cada agrotóxico os Valores Máximos Permitidos (VMP) para estes compostos na água foram definidos em função de avaliações quantitativas de risco químico, onde é possível estimar a concentração limite que pode ser ingerida continuamente ao longo da vida, sem apresentar riscos consideráveis à saúde (BRASIL, 2011). Por sua vez, os padrões de potabilidade, englobam parâmetros microbiológicos, físicos e químicos (BRASIL, 2011). Na Tabela 2 estão listados os agrotóxicos e seus respectivos VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$) monitorados pela Portaria nº 2914.

A fim de ampliar o escopo de agrotóxicos da Portaria 2019 a Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul publicou a Portaria 320 de 28/04/2014. Este documento estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano. Esta norma, inédita no Brasil, determina que os serviços de abastecimento de água passem a analisar a presença dos agrotóxicos mais usados nas lavouras gaúchas, além dos que já constam na Portaria 2.914. Esta ampliação foi realizada considerando as características climáticas, edafológicas e produção agrícola do estado. A Tabela 3 apresenta os agrotóxicos listados na Portaria 320.

Tabela 2. Valores Máximos Permitidos (VMP) para agrotóxicos em água potável de acordo com Portaria 2.914 do Ministério da Saúde.

Agrotóxicos	VMP (ug L ⁻¹)	Agrotóxicos	VMP (ug L ⁻¹)
2,4 D + 2,4,5 T	30	Glifosato + AMPA	500
Alaclor	20	Lindano (gama HCH)	2
Aldicarbe + Aldicarbe Sulfona + Aldicarbe Sulfóxido	10	Mancozebe	180
Aldrin + Dieldrin	0,03	Metamidofós	12
Atrazina	2	Metolacloro	10
Carbendazim + Benomil	120	Molinato	6
Carbofurano	7	Parationa metílica	9
Clordano	0,2	Pendimetalina	20
Clorpirifós + Clorpirifós Oxon	30	Permetrina	20
DDT + DDD + DDE	1	Profenofós	60
Diuron	90	Simazina	2
Endossulfan (α, β e sais)	20	Tebuconazol	180
Endrin	0,6	Terbufós	1,2
		Trifluralina	20

Fonte: MS, Portaria 2.914 (2011)

Tabela 3. Valores Máximos Permitidos (VMP) para agrotóxicos em água potável de acordo com Portaria 320 da Secretaria Estadual de Saúde do RS.

Agrotóxicos	VMP (µg L ⁻¹)	Agrotóxicos	VMP (µg L ⁻¹)
Abamectina	12	Gama-cialotrina	6
Acefato+Metamidofós	4,8	Hidrazida maleica	1800
Bifentrina	120	Imazetapir	1500
Carbaril	18	Imidacloprido	300
Cianamida	12	Indoxacarbe	60
Cipermetrina	300	Iodosulfurom-metílico	180
Ciproconazol	60	Ioxinil octanoato	30
Cletodim	60	Lambda-cialotrina	30
Clorimurom-etílico	120	Mesotriona	30
Clorotalonil	180	Metalaxil-m	480
Cresoxim-metílico	2400	Metamitrona	150
Diazinona	12	Metidationa	6
Difenoconazole	60	Metiram + Mancozebe	180
Diflubenzuron	120	Metsulfuron-metílico	60
Dimetoato	12	Picoxistrobina	258
Ditianona	60	Tembotriona	2,4
Epoxiconazol	18	Tetraconazol	30
Etoxisulfuron	240	Tiametoxam	120

Fenitroiona	30	Tiodicarbe	180
Fenoxaprop-p-etílico	15	Tiofanato-metílico + Carbendazim + Benomil	120
Fentiona	42	Triciclazol	180
Fipronil	1,2		
Flutriafol	60		
Folpet	600		
Fomesafem	18		

Fonte: SES, 2014

As legislações internacionais são bastante rígidas em relação aos VMP de agrotóxicos em água potável. Desde 1980, a Comunidade Europeia, estabelece que o VMP para qualquer agrotóxico em águas que são destinadas para consumo humano é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, o somatório de todos os agrotóxicos presentes não pode ser superior a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (COUNCIL DIRECTIVE, 1980). Os Estados Unidos através da Agencia de Proteção Ambiental (EPA, do inglês Environmental Protection Agency) e a Organização Mundial da Saúde também estabelecem VMPs para agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano (DORES, 2001).

2.5 Determinação de resíduos de agrotóxicos em água

Segundo Caldas e colaboradores (2011) a determinação de resíduos de agrotóxicos em água é uma atividade complexa e difícil de ser executada. Estes compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas e ocorrem em concentrações extremamente baixas na presença de altas concentrações de compostos interferentes. De acordo com Biziuk e Przyjazny (1996) as etapas envolvidas na determinação de agrotóxicos são: amostragem, preparo da amostra, medida e tratamento dos dados. A determinação de resíduos de agrotóxicos é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, em função de sua capacidade de separação, identificação, quantificação dos compostos através de detectores apropriados (GALLI *et al.*, 1996). A determinação de agrotóxicos em água geralmente requer uma etapa de preparo da amostra (BRUZZONITI *et al.*, 2000) pois caso as interferências não sejam removidas poderão afetar a identificação e a quantificação. Esta etapa de preparo da amostra inclui o isolamento e a concentração dos analitos (LANÇAS, 2004).

2.5.1 Utilização de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

Desde os anos 1970 têm-se utilizado a técnica de cromatografia gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*, GC) acoplada a sistemas clássicos de detecção como, por exemplo, detecção por captura de elétrons (do inglês *electron capture detection*, ECD), detecção de nitrogênio e fósforo (do inglês *nitrogen and phosphorus detection*, NPD) e detecção por fotometria de chama (do inglês *flame photometric detection*, FPD) para a determinação de resíduos de agrotóxicos. Porém, muitos agrotóxicos que eram analisados por estes detectores, estão sendo substituídos por outros compostos que possuem, em geral, melhor ação e menor impacto ambiental, entretanto muitos quando analisados por GC, não são detectados ao nível de $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, a cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (do inglês, *liquid chromatography with diode array detection*, LC-DAD) ou acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*, LC-MS) tem permitido atingir sensibilidade e seletividade adequadas para análises de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais e em alimentos (FERNANDEZ-ALBA, 2005). Neste trabalho enfoque especial será dado à utilização da técnica de GC na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de interesse ambiental.

Nos últimos anos, vários avanços na área de instrumentação possibilitaram aos equipamentos um aumento de sensibilidade, sendo possível a identificação e quantificação de analitos em níveis inferiores aos estabelecidos pelos VMPs. Entre estes avanços podemos citar os sistemas de injeção de grandes volumes (do inglês, *large volume injection*, LVI), que permitem a injeção de uma maior quantidade de extrato e conseqüentemente de analitos, promovendo um aumento significativo de sensibilidade. Outro avanço bastante significativo nos sistemas de injeção foi a possibilidade da realização de programação de temperatura de vaporização (do inglês *programmed temperature vaporized*, PTV) que possibilita a obtenção de uma melhor resposta cromatográfica (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Atualmente, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é utilizada com frequência para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras complexas. A facilidade do acoplamento GC-MS, além da disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de

ionização por impacto de elétrons (do inglês *electron ionization*, EI) ajudaram na disseminação da técnica GC-MS (YANG *et al.*, 2010; CAMPÍNS-FALCÓ *et al.*, 2010). Esta técnica é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos por permitir que a quantificação e determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente. Os baixos valores de LODs obtidos são consequência da alta seletividade e sensibilidade promovida pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo de monitoramento do íon selecionado (do inglês *selected ion monitoring*, SIM) que tem sido utilizado para determinar resíduos de pesticidas em amostras de alimentos e de interesse ambiental (FERNANDEZ-ALBA, 2005; MERCER, 2005).

A ionização dos agrotóxicos em GC-MS pode ser realizada utilizando os modos EI e ionização química (do inglês *Chemical Ionization*, CI), positiva ou negativa. As vantagens da utilização do modo EI são a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o grande número de fragmentos característicos que são gerados. Entretanto, o modo CI positivo ou negativo proporciona uma melhor seletividade para muitos pesticidas quando comparado com o modo EI. O modo CI é preferencialmente utilizado para a determinação de organohalogenados, piretróides e organofosforados. Este modo é menos utilizado em métodos multirresíduo, por não ser uma técnica de ionização universal, além de fornecer espectros contendo um pequeno número de fragmentos, oferecendo menos informação qualitativa (DJOZAN *et al.*, 2009). Interferências provenientes da matriz podem influenciar o resultado, e a identificação dos analitos pode ficar comprometida. Recentes avanços em MS propõem um aumento da especificidade, a partir da exclusão dos íons dos interferentes da amostra. Uma maior seletividade também é observada quando se utiliza CI, entretanto, a informação relacionada à estrutura dos compostos que estão sendo analisados também é diminuída (BEGUIN *et al.*; 2006).

Os íons que são formados, tanto por EI como por CI precisam ser separados de acordo com suas razões m/z . Há 4 classes de analisadores que são utilizados para selecionar e filtrar os íons, sendo eles: rádio frequência (tanto quadrupolo quanto trapeamento de íons) (GARRIDO-FRENICH *et al.*, 2005) tempo de voo; transformada de Fourier e setor magnético, sendo que os mais utilizados são a rádio frequência e o tempo de voo (DIEZ *et al.*, 2006).

O uso de GC acoplada à espectrometria de massas em série (do inglês, *tandem mass spectrometry*, MS/MS) promove um aumento de seletividade em conjunto com uma redução do ruído, sem perder a capacidade de identificação, permitindo a análise de resíduos de agrotóxicos ao nível de traços na presença de interferentes provenientes da matriz. O modo de monitoramento de reações selecionadas (do inglês *selected reaction monitoring*, SRM) promove um aumento da detectabilidade, pois o equipamento focaliza apenas o íon precursor e o íon produto para monitoramento (HARRIS, 2001; CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008; STASHENKO & MARTINEZ, 2010). Este modo é bastante utilizado na análise de amostras complexas, uma vez que permite a determinação de diferentes analitos que coeluem (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2002).

2.5.2 Métodos de preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

Os métodos tradicionais de preparo da amostra, tal como a extração líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*, LLE), requerem grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam custo elevado, são de difícil automação e trabalhosos (PICHON, 2000) Nesse sentido, novas técnicas que consomem menos tempo, são mais efetivas e requerem uma menor quantidade de solventes tem sido desenvolvidas e aplicadas para extração de agrotóxicos em amostras aquosas. Dentre estas técnicas, destacam-se a extração em fase sólida (do inglês *solid Phase Extraction*, SPE), a microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction*, SPME), a extração sortiva em barra magnética (do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) e a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME).

Na SPE, introduzida em meados de 1970 (LANÇAS, 2004) os analitos contidos na matriz aquosa são retidos após passarem por um cartucho contendo sorvente e, posteriormente, um solvente orgânico é utilizado para eluir os analitos (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001). É uma técnica muito empregada para concentração de agrotóxicos.

A SPME foi introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990 como uma técnica rápida, simples, com boa capacidade de concentração, sem a necessidade de solvente orgânico e com a conveniência da automação (AHMED, 2001) Nessa técnica, uma fibra de sílica fundida é coberta com a fase estacionária, geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), que é exposta na amostra aquosa ou gasosa por um tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido e depois o analito é desorvido pela fase móvel ou por aquecimento diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (PROSEN & ZUPANCIC-KRALJ, 1999).

A técnica SBSE foi introduzida em 1999 por Baltussen e colaboradores (1999) se baseia no mesmo princípio da SPME, porém possui um volume de fase extratora entre 25 e 125 μL , que é 50 a 250 vezes maior que o volume da fibra de SPME, permitindo a melhor capacidade de extração e, conseqüentemente, recuperações maiores (GIORDANO *et al.*, 2009). A técnica SBSE é baseada na extração sortiva sobre uma camada polimérica, geralmente de PDMS, que reveste uma barra de agitação magnética. A extração é controlada pelo coeficiente de partição dos analitos entre o revestimento polimérico e a matriz e pela relação entre os volumes do material polimérico e da amostra (DAVID & SANDRA, 2007). Estudos recentes correlacionam o coeficiente de partição com o coeficiente de distribuição octanol/água (Kow) (SÁNCHEZ-ROJAS, BOSCH-OJEDA, CANO-PAVÓN, 2009).

A técnica SPE é um exemplo de técnica de preparo de amostra que visa à extração exaustiva dos analitos, ao passo que a SPME e a SBSE são técnicas sortivas baseadas no equilíbrio entre a matriz da amostra e o revestimento polimérico (GIORDANO *et al.*, 2009).

2.5.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi proposta em 2006 por Rezaee e colaboradores, onde há uso de um solvente dispersor, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa). O solvente extrator é imiscível na fase aquosa, sendo baseada em um sistema ternário de solventes como a Extração Líquido-Líquido Homogênea (do inglês, *homogeneous liquid-liquid extraction*, HLLLE) e a Extração em Ponto de Nuvem (do inglês, *cloud point extraction*, CPE). A DLLME é uma técnica de

extração e concentração de amostras que atende aos requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo (ZANELLA *et al.*, 2015).

Como descrito anteriormente, a DLLME baseia-se no processo de partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, a fase aquosa e a fase orgânica. A solubilização dos analitos em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, sendo que os analitos são geralmente apolares, apresentando maior afinidade pela fase orgânica, composta por um solvente orgânico apolar, em comparação com a fase aquosa, que é, por sua vez, altamente polar (ZANELLA *et al.*, 2015).

De acordo com a Figura 1 a execução da técnica se dá pela adição da mistura de solventes em recipiente com a amostra, geralmente em tubos com base cônica, onde ocorre a formação de uma fase turva, provocada pela formação de gotas finas que se dispersam na fase aquosa, onde após mistura e centrifugação, se tem a extração dos analitos no solvente extrator, sedimentado no fundo do tubo (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Economicamente e ambientalmente a DLLME traz vantagens sobre as demais metodologias convencionais de extração com solvente. Sendo que, podemos citar a simplicidade de execução, o baixo tempo de operação, o mínimo consumo de solventes, boas recuperações e a pré-concentração dos analitos. Estes fatores tornam a técnica uma boa escolha para o desenvolvimento de um método analítico visando a determinação de resíduos de agrotóxicos. Além disso, esta técnica é compatível com equipamentos de GC (NAGARAJU & HUANG, 2007; XIONG; HU, 2008) e HPLC (WEI *et al.*, 2007; MELWANK & FUH, 2008).

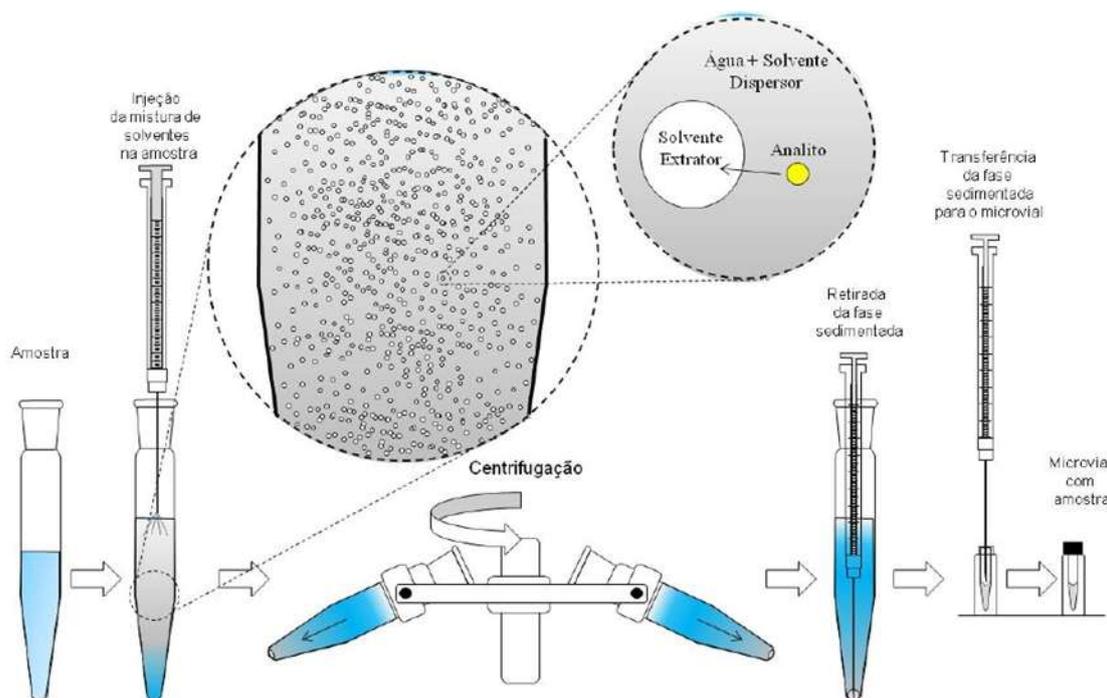


Figura 1- Etapas do procedimento experimental empregando DLLME.
Fonte: MARTINS, 2010.

2.5.2.1.1 Parâmetros que podem influenciar a extração por DLLME

O volume e tipo de solvente extrator e dispersor, tempo de extração, força iônica e pH, são alguns parâmetros que podem influenciar o processo de extração na DLLME (MARTINS *et al.*, 2012).

O solvente extrator deve apresentar maior densidade que a água, ter capacidade de extrair os compostos de interesse e apresentar bom comportamento cromatográfico. A seleção de um solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante na DLLME. Na extração de agrotóxicos em águas por DLLME os solventes extratores que vem sendo mais utilizados são os clorados, como por exemplo, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno. O volume do solvente extrator deve ser suficiente para extrair o analito, sendo escolhido o menor volume em função do fator de concentração e menor uso de solventes (REZZAE *et al.*, 2006).

O solvente dispersor deve ser selecionado em função de sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (REZZAE *et al.*, 2006). Em função destas características os solventes mais empregados são metanol,

acetonitrila, acetona e tetrahidrofurano. A variação no volume de solvente dispersor é outro fator que também influencia no volume de fase sedimentada. Portanto, o volume deste solvente também está relacionado com a eficiência da extração (REZZAE *et al.*, 2006). Os solventes mais utilizados nos estudos com agrotóxicos são a acetonitrila e a acetona, e os volumes variam entre 300 e 2000 μL .

De acordo com Martins e colaboradores (2012), na DLLME o equilíbrio de partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa é atingido muito rapidamente. Define-se como tempo de extração o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação. NAGARAJU & HUANG (2007) avaliaram que nesta técnica, o equilíbrio é atingido imediatamente, e a etapa que consome mais tempo é a centrifugação.

A força iônica também pode influenciar a eficiência da extração, uma vez que auxilia na separação das fases. O aumento na concentração de cloreto de sódio (NaCl), aumenta o volume de fase sedimentada, devido a diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal (BIRJANDI *et al.*, 2008). Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, que é otimizado em função da acidez ou basicidade de alguns compostos. O ajuste do pH do meio permite que os analitos permaneçam na forma neutra, facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator (CALDAS *et al.*, 2011). Compostos ácidos, normalmente requerem uma acidificação da amostra para permanecerem na forma molecular e facilitar a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator. No trabalho desenvolvido por Farhadi e colaboradores (2009) o pH da amostra foi ajustado em 1,5 para extração de herbicidas da classe dos clorofenoxiacéticos em amostras de água. A amostra com pH 1,5 e 10% NaCl foi extraída com 1 mL acetona (dispersor) e 25 μL de clorobenzeno (extrator). Recuperações entre 94 e 102,9% foram obtidas em águas de poço e de torneira, com limite de detecção (LOD) de 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O uso de seringas para inserção da mistura de solvente extrator e dispersor na amostra é recomendada por Rezzae e colaboradores (2006). O ideal é que a mistura de solventes seja injetada de forma simultânea na amostra. Por outro lado, quando solventes dispersor e o extrator são adicionados separadamente na amostra, não observa-se a formação da fase sedimentada.

Para García-López e colaboradores (2007), o uso da centrifugação promove a obtenção duas fases distinguíveis nos tubos de extração. Depois da retirada da fase sedimentada do tubo extrator, a mesma pode ser injetada diretamente no equipamento ou evaporada e redissolvida em um solvente apropriado. Por outro lado, Martins e colaboradores (2014) não observaram efeitos positivos durante a etapa de centrifugação do procedimento de DLLME visando a determinação de resíduos de agrotóxicos e compostos relacionados em água por GC-MS/MS.

Solventes extratores que não apresentam bom comportamento cromatográfico, como por exemplo, alargamento dos picos e/ou aumento do ruído podem ser evaporados e redissolvidos em solvente orgânico adequado. Farajzadeh e colaboradores (2007) observaram que tetracloreto de carbono quando empregado como solvente extrator não apresentou bom comportamento cromatográfico. Assim, evaporou-se o solvente extrator em banho maria, com posterior redissolução em metanol.

2.5.2.1.2 Aplicações da DLLME na determinação de resíduos de agrotóxicos

Desde 2006, a DLLME tem sido aplicada com sucesso nas etapas de extração e concentração de uma grande variedade de compostos orgânicos e íons metálicos. A Tabela 4 apresenta as características de algumas destas aplicações da DLLME para amostras ambientais. Entre os analitos avaliados nestas aplicações destacam-se os agrotóxicos. Como pode ser observado, a DLLME é uma técnica de preparo de amostra bastante versátil, uma vez que os extratos obtidos podem ser empregados com sucesso em distintos métodos de análise.

A DLLME representa uma ferramenta importante para a análise de matrizes relativamente simples como amostras aquosas. Porém, várias publicações já relataram seu uso para análise de alimentos, frutas, vegetais assim como amostras biológicas e ambientais (Tabela 5).

Tabela 4 - Aplicações utilizando a técnica DLLME na etapa de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água.

Classe/Compostos	Solvente Dispersor (Volume)	Solvente Extrator (Volume)	Tempo de Centrifugação (Velocidade)	Acidificação / Força Iônica	Recuperações (%)	RSD (%)	Linearidade (r ²)	Quantificação	Referência
Organoclorados	Acetona (1000 µL)	Tetracloroetileno (10 µL)	3 min (2300 rpm)	-	70 - 120	5 - 15	0,9967 - 0,9999	GC-MS	Cortada et al., 2009
Organofosforados	Acetona (1000 µL)	Clorobenzeno (20 µL)	2 min (5000 rpm)	-	78,9 - 107	1,2 - 5,6	0,9991 - 0,9997	GC-FDP	Berijani et al., 2006
Metil Terc-Butil Éter	Metanol (300 µL)	Tricloroetileno (42 µL)	-	NaCl	100 - 105	2,7 - 3,1	0,9987	GC-MS	Karimi et al., 2010
Bifenilas Policloradas	Acetona (500 µL)	Clorobenzeno (10 µL)	2 min (5000 rpm)	-	92 - 114	4,1 - 11	> 0,996	GC-ECD	Rezaei et al., 2008
Organoclorados	Acetonitrila (1500 uL)	m-Xileno (40 µL)	2 min (200 rpm)	-	75 - 113	3,5 - 10,2	> 0,998	GC-MS	Zacharis et al., 2010
Trihalometanos	Acetona (700 µL)	1-undecanol (50 µL)	10 min (2000 rpm)	-	79 - 113	< 12	> 0,993	GC-ECD	Rodriguez-Cabo et al., 2010
Triazinas	Acetona (1000 µL)	Clorobenzeno (12 µL)	5 min (6000 rpm)	NaCl	85,2 - 119,4	1,36 - 8,67	> 0,9995	GC-MS	Nagaraju et al., 2007
Triclosan/Metiltriclosan	Metanol	1,1,1-Tricloroetano	5 min	-	81,7 - 105,4	3 - 10	> 0,999	GC-MS/MS	Montes et al.,

	(1000 µL)	(40 µL)	(2000 rpm)						2009
Clorofenóis	Acetona (500 µL)	Clorobenzeno (10 µL)	2 min (5000 rpm)	K ₂ CO ₃	83,3 - 101,3	1,7 – 7,1	> 0,9991	GC-ECD	Fattahi et al., 2007
Ésteres de Ftalatos	Acetona (500 µL)	Clorobenzeno (9,5 µL)	2 min (4000 rpm)	-	68,1 - 88,9	< 6,8	0,9901 - 0,9962	GC-MS	Farahani et al., 2007

Tabela 5. Aplicações utilizando a técnica DLLME em outras matrizes

Classe/Compostos	Matriz	Solvente Dispersor (Volume)	Solvente Extrator (Volume)	Tempo de Centrifugação (Velocidade)	Acidificação / Força Iônica	Recuperações (%)	RSD (%)	Linearidade (r ²)	Quantificação	Referência
Triazóis	Suco de Uva	Acetonitrila (400 µL)	n-hexanol/n-hexano 75:25 v/v (20 µL)	-	pH 4 - 6 / NaCl	74 - 99	3,2 - 5	> 0,995	GC-FID / GC-MS	Rarajzadeh et al., 2012
Multiclasse	Urina Humana	Acetona (500 µL)	Triclorometano (750 µL)	-	pH 2 NaCl	94 - 105	2 - 14,9	0,991 - 0,998	GC-MS/MS	Vela-soria et al., 2014
Quinolonas/ β -Lactâmicos	Leite	Acetonitrila (1070 µL)	Triclorometano (570 µL)	10 min (4000 rpm)	pH 3/pH 8	72 - 110	0,2 - 5,3	0,996 - 0,999	UHPLC-MS/MS	Junza et al., 2014
Flavanóides	Mel	Acetonitrila (1500 µL)	Clorofórmio (150 µL)	1 min (3400 rpm)	pH 3 NaCl 1 g	80 - 111	5 - 14	0,995 - 0,998	LC-DAD-ToFMS	Capillo et al., 2014
Bisfenol A e B	Urina Humana	Acetonitrila (1325 µL)	Acetona (125 µL)	2 min (5000 rpm)	pH \geq 10 K ₂ CO ₃	71 - 93	7 - 20	> 0,996	GC-MS	Cunha et al., 2010
Ciproheptadina	Urina Humana	Acetonitrila (900 µL)	Tetracloroeto de Carbono (30 µL)	10 min (4000 rpm)	pH 10 NaCl	91 - 101	4,90	0,9983	HPLC-DAD	Maham et al., 2013

Multiclasse	Suco de Maça	Acetona (400 µL)	Tetracloroeto de Carbono (100 µL)	2 min (5000 rpm)	-	60 - 106	1 - 21	0,995 - 0,999	GC-MS	Cunha et al., 2009
-------------	--------------	------------------	------------------------------------	--------------------	---	----------	--------	---------------	-------	--------------------

2.6 Validação de métodos cromatográficos

Para RIBANI e colaboradores (2004) a validação de métodos analíticos é um processo que começa no planejamento analítico e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. LANCAS (2004) define validação como o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. A validação envolve um conjunto de procedimentos que provam que o método fornece os resultados confiáveis.

Os laboratórios necessitam adotar ferramentas de validação, as quais são estabelecidas por diferentes órgãos. No Brasil a ANVISA (2003), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) entre outros, estabelecem normas e critérios de validação para métodos analíticos. Além destes, há órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), (ISO/EC 17025, 1999), Conferencia Internacional em Harmonização (ICH), que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento dos laboratórios responsáveis pelo desenvolvimento analítico. Usualmente são avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade e sensibilidade, linearidade e curva analítica, exatidão e precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

2.6.1 Seletividade e sensibilidade

A seletividade também conhecida por “especificidade”. É a capacidade do método em determinar exatamente um composto em presença de outros tais, como os componentes da matriz, impurezas e produtos de degradação. Idealmente ela deve ser avaliada para qualquer interferente importante que possa estar presente na amostra (IUPAC, 2002). Na Cromatografia é imprescindível garantir a pureza dos picos, o que pode ser garantido pelo uso de detectores do tipo espectrômetro de massas (ANVISA, 2003).

Para determinar se o método sob desenvolvimento, é seletivo, pode-se comparar a matriz isenta dos analitos (matriz branco) com a matriz adicionada dos analitos de interesse. Não assegurar a seletividade pode comprometer a linearidade, a exatidão e a precisão do método desenvolvido (RIBANI, 2004, IUPAC, 2002).

2.6.2 Curva analítica e faixa linear

A linearidade é expressa pela habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais as concentrações dos analitos nas amostras, correspondentes a uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2007). Tal parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação da curva analítica (BRITO, 2003). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela ANVISA (2003) e pelo INMETRO (2007).

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito. Muitas vezes, essa relação pode ser expressa como uma equação de reta, chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica através de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) (INMETRO, 2010).

$$y=ax+b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (altura ou area do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y .

2.6.3 Efeito matriz

O efeito matriz é observado como um aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (PIZZUTI *et al.*, 2007; PINHO *et al.*, 2009). A observação desse efeito pode ser tratado de forma positiva ou indesejada (SOARES, 2012).

Segundo Krueve *et al.* (2008), a alteração da eficiência de ionização, na presença de outros compostos é denominada efeito matriz. Os compostos que

causam o efeito matriz podem aparecer como picos cromatográficos normais ou como bandas largas. A interferência de um composto que elui como um pico cromatográfico geralmente distorce a forma do pico do analito. Esta influência pode não ser visualmente detectada, sendo mais facilmente identificada por meio de cálculos.

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos e dos componentes da matriz, como tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, entre outras, são os fatores que coordenam o efeito matriz (Hajslová *et al.* 1998; Sanchez-Brunete *et al.* 2005).

O efeito matriz sofre variações ao longo do tempo e varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação em análises de rotina (PRESTES, 2011). A avaliação exata do efeito matriz pode evitar estimativas errôneas das quantidades dos analitos, além de ser mais confiável (RIBANI *et al.*, 2004).

2.6.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a similaridade dos resultados obtidos pelo método que esta sendo desenvolvido em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é avaliada através da tendência/recuperação. Esta pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (INMETRO, 2011).

As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação. A recuperação é calculada de acordo com a Equação 2 (INMETRO, 2011):

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

Onde:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação entre metodologias analíticas, ensaios de recuperação e adição padrão.

2.6.5 Precisão

Para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, que são repetidos em uma única amostra, amostras semelhantes ou mesmo fazendo o uso de padrões analíticos, em condições pré-definidas, fizemos o uso do termo precisão. Como forma de expressá-la, é feito o uso da repetibilidade, precisão intermediária e a reprodutibilidade. A precisão é expressa na forma de desvio padrão relativo (RSD), sendo que são aceitáveis valores de até 20 % para a análise de resíduos de agrotóxicos (RIBANI *et al.*, 2004).

LANÇAS (2004) define que a precisão intermediária da metodologia analítica, se relaciona com as variações utilizadas dentro de um mesmo laboratório. Entre essas variações, podemos citar os diferentes analistas, dias/meses diferentes entre uma análise e outra, como também, o uso de equipamentos diferentes. A precisão intermediária torna possível verificar se teremos os mesmos resultados, em uma determinada metodologia analítica, de um mesmo laboratório. Para a avaliação da precisão intermediária, os ensaios seguem a mesma recomendação da repetibilidade. Essa forma de avaliação analítica é a forma mais representativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório. O objetivo da mesma é verificar se o método utilizado em um mesmo laboratório fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetibilidade, expressa a precisão de um método analítico através de várias medições sucessivas da mesma amostra, utilizando idênticas condições de operação, como por exemplo, método, analista, equipamento, entre outros, em um curto intervalo de tempo. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo

utilizado pelo INMETRO e sinônimo para repetibilidade utilizado pela ANVISA (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.* 2004; CASSIANO *et al.* 2009).

A reprodutibilidade avalia se a precisão do método é constante, através de alterações das condições de operação do procedimento analítico, como por exemplo, realizando análises interlaboratoriais, equipamentos, operadores e condições diferentes de análise (RIBANI *et al.*, 2004).

2.6.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Segundo a ANVISA (2003) o limite de detecção (do inglês, *limit of detection*, LOD) é a menor quantidade de analito passível de ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais e instrumentais estabelecidas.

Por sua vez, o limite de quantificação (do inglês, *limit of quantitation*, LOQ), pode ser definido como a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão em condições experimentais e instrumentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Há muitas formas de calcular o limite de detecção e quantificação, visto que o limite de detecção corresponde à concentração que resulte em uma relação entre o sinal analítico e o ruído, que seja igual a 3 vezes e o de quantificação na relação sinal/ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003). Entre os diferentes métodos para calcular o LOD e o LOQ, que geralmente são expressos em unidades de concentração, pode-se citar três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal/ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A etapa experimental deste trabalho, consistiu no desenvolvimento do método analítico, otimização e validação para a extração de resíduos de agrotóxicos em água, empregando DLLME para posterior quantificação por GC-MS/MS.

Na etapa de validação foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, curva analítica e faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 Instrumentação

A seguinte instrumentação foi utilizada para o desenvolvimento do método analítico:

- ✓ Sistema GC-MS/MS, Varian 1200-MS (EUA) equipado com:
 - ✓ Cromatógrafo a gás CP 3800;
 - ✓ Detector de massas triplo quadrupolo (TQ) 1200;
 - ✓ Amostrador automático CP 8400;
 - ✓ Injetor 1079 com Programação de Temperatura de Vaporização - PTV;
 - ✓ Sistema de aquisição de dados através do Software MS Workstation 6.6 (Varian, EUA);
 - ✓ Coluna capilar VF-5, com 30 m de comprimento x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent Technologies, EUA).
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, France);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX 420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada modelo NT 825 (Novatécnica, Brasil);
- ✓ Sistema de evaporação tipo manifold;

3.2 Materiais, reagentes e solventes

Os reagentes, solventes, gases e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Béquers;
- ✓ Frascos de 2 mL para injetor (Vials);
- ✓ Frascos de vidro
- ✓ Inserts de 200 µL para vials;
- ✓ Microseringas de 250, 500 e 1000 µL;
- ✓ Seringa plástica de 1 mL descartável;
- ✓ Tubo Eppendorf;
- ✓ Tubos de vidro com fundo cônico com volume de 10 mL;
- ✓ Acetona, p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetonitrila (ACN), grau HPLC (J.T. Baker, México);
- ✓ Cloreto de sódio, p.a. (Merck, Alemaha);
- ✓ Clorofórmio, p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ Diclorometano, p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ Extran neutro e alcalino (Merck, Alemanha);
- ✓ Metanol, p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J. T. Baker, México);
- ✓ Sulfato de sódio anidro, p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ Tetracloreto de carbono, extra puro (Merck, Alemanha);
- ✓ Hélio 6.0 (99,9999% de pureza), (AirLiquide, São Paulo);
- ✓ Argônio 5.0 (99,9992% de pureza), (AirLiquide, São Paulo);
- ✓ Padrões de Agrotóxicos, pureza mínima de (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha)
(Conforme Anexo A).

3.3 Amostras branco

As amostras utilizadas no processo de validação do método devem ser isentas dos agrotóxicos que serão avaliados, uma vez que isto pode interferir nas análises, levando a uma quantificação errônea dos compostos de interesse, são denominadas amostras “branco”. O método de extração (DLLME), foi otimizado e validado

utilizando água do próprio laboratório (água ultra-pura para os testes iniciais e água da torneira para validação).

3.4 Agrotóxicos selecionados

Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehresntorfer (Augsburg, Alemanha) e estão listados no Anexo A, juntamente com o grau de pureza, classe, grupo químico e propriedades físico-químicas.

Dos agrotóxicos avaliados neste trabalho fazem parte do escopo da Portaria 2914 de dezembro de 2011 (2,4 DDD; 2,4 DDE; 4,4 DDD; 4,4 DDE, alacloro, aldrin clorpirifós etílico, clorpirifós metílico, endosulfan alfa, endosulfan beta, endosulfan sulfato, paration metílica, pendimetalina, trifluralina). Os compostos cresoxim metílico, epoxiconazole e fenitrotiona fazem parte do escopo da Portaria 320 de 28 abril de 2014.

3.5 Seleção do padrão interno e do padrão de substituição

Estes compostos são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico, como por exemplo, anterior a extração (padrão de substituição, PS) ou no extrato final anterior a injeção (padrão interno, PI) e têm o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra por GC-MS/MS. A adição dos padrões de controle é recomendada em diferentes estágios do procedimento analítico para auxiliar na localização de fontes de erros (SANCO, 2012).

Neste trabalho, utilizou-se como padrão interno para a avaliação do instrumento o composto trifenilfosfato (TPP) na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. No extrato final ($50 \mu\text{L}$) foi adicionado $10 \mu\text{L}$ de uma solução contendo trifenilfosfato na concentração 10mg L^{-1} .

Como padrão de substituição utilizou-se trifluralina d-14. Empregou-se solução analítica com concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, os resultados não foram utilizados para “correção da recuperação” de nenhum analito, apenas para a avaliação do procedimento de extração.

3.6 Preparo das soluções analíticas

Inicialmente preparou-se, individualmente, 10,0 mL da solução estoque 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico em estudo, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesada foi dissolvida em acetonitrila. Estas soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas à temperatura de -10 °C. A partir das soluções de 1000 mg L⁻¹, preparou-se duas soluções de trabalho dos agrotóxicos avaliados, uma com os compostos a serem analisados incluindo em cada solução o padrão de substituição. Foram preparadas soluções na concentração 10,0 mg L⁻¹, em acetonitrila. Estas soluções foram utilizadas para os ensaios de fortificação.

3.7 Otimização das condições cromatográficas do sistema GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

As condições de detecção e separação cromatográfica foram otimizadas de modo a obter melhor detectabilidade para cada composto em estudo. Os parâmetros empregados estão descritos abaixo:

- Volume de injeção: 2 µL;
- Injetor operando no modo PTV: 80 °C (0,1 min); 25 °C min⁻¹ até 300 °C
- Programação da válvula split: 0 min (1:10) – 0,1 min (fechada) – 2 min (1:40)
Programação de temperatura do forno da coluna: 80 °C (1 min); 25 °C min⁻¹ até 180 °C; 5 °C min⁻¹ até 280 °C;
- Gás de arraste hélio (1,3 mL min⁻¹);
- Tempo total de análise: 25 min;
- Temperatura da linha de transferência (transferline): 275 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 230 °C;
- Tempo de delay: 6 min;
- Modo de aquisição: SIM;
- Modo de ionização: EI positivo;
- Corrente da fonte de ionização: 150 mA
- Tensão de operação da eletromultiplicadora: 1200 V

Com a finalidade de se obter as condições ótimas do sistema de detecção, inicialmente, injetaram-se, individualmente, 2 μL de cada composto em uma concentração de 1,0 mg L^{-1} no modo full scan, a fim de se obter os tempos de retenção dos mesmos e adequação das janelas (segmentos) de análise. Juntamente com a identificação dos íons característicos para cada composto (dois ou três) e posterior obtenção das fragmentações características de cada analito. Os íons selecionados foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo (Q3) realizou-se o full scan no íon produto variando as energias de colisão entre 5 e 40 Volts a fim de otimizar as melhores condições de detecção. Com estes parâmetros otimizados, foram avaliadas as transições, no modo de monitoramento de reações selecionadas (MRM) a serem utilizadas para a quantificação e confirmação dos compostos estudados. A transição de maior intensidade foi utilizada para a quantificação do analito e a segunda maior intensidade para a confirmação do mesmo.

3.8 Otimização do método DLLME para análise de resíduos de agrotóxicos em água

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho foi otimizado com base em trabalhos da literatura empregando DLLME para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras aquosas. A seleção das melhores condições baseou-se na avaliação dos resultados obtidos (maior número de compostos) em função dos percentuais de recuperação (70 a 120%) e RSD ($\leq 20\%$).

3.8.1 Escolha dos solventes

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

3.8.1.1 Seleção do solvente extrator

Durante a seleção do solvente extrator, realizaram-se ensaios utilizando os seguintes solventes: clorofórmio, diclorometano e tetracloreto de carbono. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho, e obtendo uma concentração final de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, após etapa de extração. Injetou-se a mistura contendo o solvente extrator ($200 \mu\text{L}$) e solvente dispersor (acetonitrila, $1000 \mu\text{L}$). Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s. Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força $G = 519$).

3.8.1.2 Seleção do solvente dispersor

Na escolha do solvente dispersor, realizaram-se ensaios utilizando os seguintes solventes: acetona, acetonitrila e metanol. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Adicionou-se a mistura contendo o solvente extrator ($200 \mu\text{L}$) e solvente dispersor ($1000 \mu\text{L}$). Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força $G = 519$).

3.8.1.3 Seleção do volume do solvente extrator

Para a etapa do volume de solvente extrator, realizaram-se ensaios utilizando os seguintes volumes de solventes: 150, 200, 300 e $400 \mu\text{L}$. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Adicionou-se a mistura contendo o solvente extrator e solvente dispersor ($1000 \mu\text{L}$), tetracloreto de carbono e acetona, respectivamente. Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força $G = 519$).

3.8.1.4 Seleção do volume do solvente dispersor

Para a etapa do volume do volume de solvente dispersor, realizaram-se ensaios utilizando os seguintes volumes de solventes: 300, 500, 1000, 1500 e $2000 \mu\text{L}$. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução

analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Adicionou-se a mistura contendo o solvente extrator e solvente dispersor, tetracloreto de carbono e acetona, respectivamente. Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força G = 519).

3.8.2 Efeito da adição de sal

Após definidos os tipos e volumes de solventes extrator e dispersor, avaliou-se o efeito na eficiência de extração da adição em separado de 500 mg de NaCl, Na_2SO_4 e MgSO_4 . Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Adicionou-se a mistura contendo o solvente extrator e solvente dispersor, tetracloreto de carbono e acetona, respectivamente. Após, realizou-se agitação em vórtex por 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força G = 519).

3.8.3 Efeito do tempo de agitação

Após definidos os tipos e volumes de solventes extrator e dispersor, avaliou-se o efeito na eficiência de extração da realização de diferentes tempos de agitação. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Adicionou-se a mistura contendo o solvente extrator e solvente dispersor, tetracloreto de carbono e acetona, respectivamente. Após, realizou-se agitação em vórtex por 15, 30 e 60 s e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força G = 519).

3.8.4 Efeito do pH

Após definidos os tipos e volumes de solventes extrator e dispersor, avaliou-se o efeito da acidificação da amostra na eficiência de extração. Neste teste, utilizou-se 5 mL de amostra branco, acidificada com solução aquosa de ácido fosfórico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes valores pH 2,0; 2,5 e 3,0. A amostra foi fortificada com solução analítica $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) contendo os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Injetou-se a mistura contendo o solvente extrator e solvente dispersor, tetracloreto de carbono e acetona, respectivamente. Após, realizou-se agitação em vórtex e centrifugou-se 2000 rpm por 3 min (Força G = 519).

3.9 Validação do método para análise de resíduos de agrotóxicos em água

Após otimizadas as melhores condições para a extração e determinação dos agrotóxicos avaliados neste trabalho, realizou-se a etapa de validação do procedimento. Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária.

3.9.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada injetando-se extratos de amostras branco, sem a presença dos compostos avaliados no estudo, e amostras fortificadas na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ os agrotóxicos avaliados neste trabalho. Comparou-se os cromatogramas a fim de verificar se algum interferente poderia estar coelúindo com os analitos selecionados e se isso afetaria a análise por GC-MS/MS.

3.9.2 Curva analítica e faixa linear

A linearidade do método proposto foi avaliada através da injeção cromatográfica de soluções analíticas nas concentrações de 0,015; 0,030; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em diclorometano e no extrato branco da matriz. Cada solução foi injetada 3 vezes no sistema GC-MS/MS. As curvas analíticas foram obtidas com auxílio do software Varian Worstation 6.9.2. Avaliou-se o melhor modelo de calibração, a equação da curva analítica como também RSD% e o coeficiente de determinação (r^2) para cada um dos compostos avaliados.

3.9.3 Efeito matriz

No desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração. Para isso são

preparadas duas curvas analíticas com os mesmos pontos, sendo uma com solvente e uma com extrato “branco” da matriz.

Na avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as inclinações na curva do solvente e na matriz. Através deste cálculo, verificou-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Foi considerado que a obtenção de valores superiores a 20% indicam que o efeito matriz exerce influência nas análises e, então, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito confirma a ocorrência de efeito matriz (CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008).

3.9.4 Limites de detecção quantificação instrumental e do método

A partir dos dados obtidos da faixa linear das curvas analíticas, determinou-se os limites de detecção e de quantificação do instrumento (LOD_i e LOQ_i) para cada um dos agrotóxicos avaliados neste trabalho. Levou-se em consideração a relação sinal ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente.

Neste trabalho, determinou-se o valor verdadeiro do LOQ_m (em $\mu\text{g L}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, fortificada na amostra branco, apresente resultados de recuperações entre 70 e 120%, com $RSD\%$ menor ou igual a 20% (SANCO, 2013). O LOD_m foi obtido dividindo-se o valor de LOQ_m por 3,33.

3.9.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através dos ensaios de recuperação, fortificando as amostras “branco” em três níveis de concentração (0,1; 0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Foram realizadas 7 réplicas de extração para cada nível de fortificação e a exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com auxílio do software (Varian Workstation 6.9.2) do equipamento.

3.9.6 Precisão

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSDr) foi avaliada efetuando a extração e análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicata (n=7) para cada nível de concentração, injetada uma única vez. A precisão intermediária (RSDpi) do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.9.7 Aplicação do método em amostras reais

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado na determinação de resíduos de agrotóxicos em cinco amostras de água provenientes da Região Centro do RS. As amostras foram coletadas em açudes e sangas interligados a lavouras de soja, arroz junto ao Rio Toropi localizados no município de São Vicente do Sul na região central do estado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos em estudos por GC-MS/MS

As condições cromatográficas utilizadas para GC-MS/MS estão descritas no item 3.5. Através da Figura 12 observa-se: (A) um cromatograma obtido para uma amostra “branco”, e em (B) um cromatograma do ion total dos 32 agrotóxicos determinados por GC-MS/MS na concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ preparado no extrato branco da matriz.

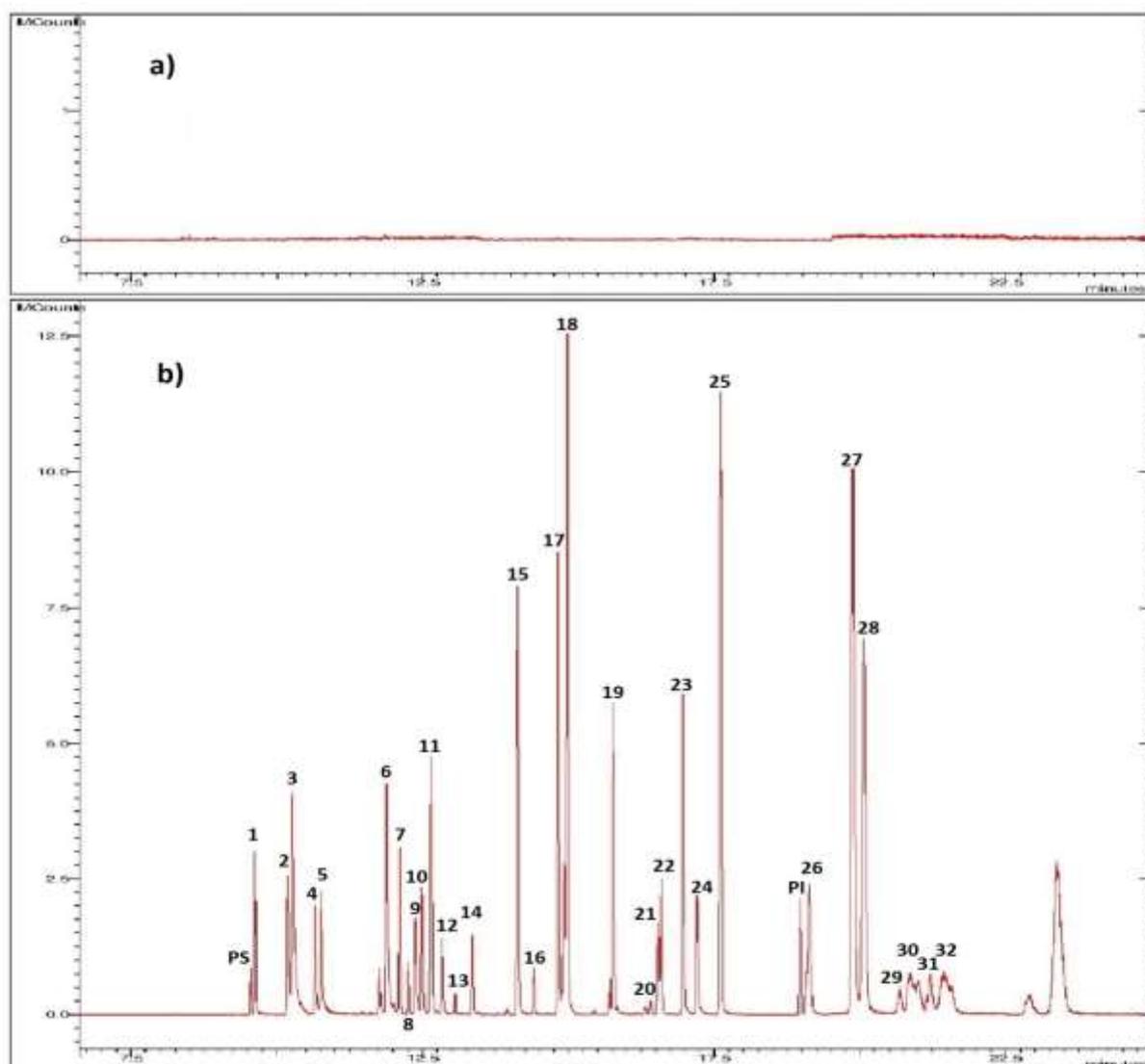


Figura 2. Cromatograma SRM obtido por GC-MS/MS para (A) amostra branco da matriz e (B) solução analítica no extrato branco da matriz, contendo os 32 agrotóxicos em estudo na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Legenda. 1) Trifluralina; 2) HCH alfa; 3) HCH beta; 4) Quintozeno; 5) HCH gama; 6) Alacloro; 7) Parationa metílica; 8) Heptacloro; 9) Pirimifos metílico; 10) Fenitrotiona; 11) Malationa; 12) Clorpirifos metílico; 13) Aldrin; 14) Parationa etílica; 15) Pirimifos metílico; 16) Pendimetalina; 17) 2,4 DDE; 18) Endosulfam alfa; 19) 4,4 DDE; 20) Oxifluorfen; 21) Miclobutanil; 22) Cresoxim metílico; 23) 2,4 DDD; 24) Endosulfam beta; 25) 4,4 DDD; 26) Propiconazol; 27) Endosulfam sulfato; 28) DDT; 29) Epoxiconazole; 30) Bifentrina; 31) Mirex 32) Fenarimol; PI) Trifenilfosfato; PS) Trifluralina d-14

A Tabela 6 apresenta os agrotóxicos determinados por GC-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e íons produtos para quantificação e confirmação de cada substância em estudo.

4.2 Seleção das melhores condições para a DLLME

A otimização da etapa de preparo da amostra é um processo importante para obter uma maior eficiência na extração dos agrotóxicos na água e conseqüentemente obter melhor recuperação. Para a escolha das melhores condições para a DLLME, otimizou-se os seguintes fatores: tipo e volume dos solventes extrator e dispersor, agitação, força iônica e efeito da variação do pH. Buscou-se as melhores condições a fim de extrair de forma simultânea, agrotóxicos com diferentes propriedades. Para avaliar os procedimentos de extração, utilizaram-se amostras “branco” fortificadas na concentração $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.1 Seleção do solvente extrator

Solventes halogenados são os mais utilizados na técnica de DLLME. Entre as vantagens de seu uso, destaca-se a densidade o que permite recolher a fase sedimentada no fundo cônico dos frascos de extração e facilita a separação das fases. Apresentam baixa solubilidade em água, permitindo a obtenção de uma fase orgânica praticamente isenta de água, o que elimina uma etapa adicional de secagem. Por outro lado, esta classe de solventes, apresenta maior toxicidade que solventes não halogenados. Porém, as quantidades utilizadas nos procedimentos de extração são muito pequenas, geralmente, menores que $500 \mu\text{L}$, o que gera um baixo volume de resíduo halogenado. A qualidade da emulsão formada na separação das fases durante a etapa de extração tem relação direta com o solvente utilizado. O procedimento que utilizar solventes que apresentam uma densidade muito superior a da água, terão que utilizar maior quantidade de solvente de dispersor, para que haja emulsificação das fases, enquanto solventes que apresentam densidade aproximada com a densidade da água, formarão uma emulsão estável com menor quantidade de solvente dispersor (ALVES, 2010).

Tabela 6. Condições otimizadas do sistema GC-MS/MS, modo de ionização EI, modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), segmentos de análise, íons precursores e íons produtos para quantificação e confirmação de cada substância

Compostos	t_R (min)	Segmento (min)	Transição de Quantificação			Transição de Confirmação		
			Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (V)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (V)
Trifluralina d-14 (PS)	9,45		315	267	8	315	209	15
Trifluralina	9,63	6,62 - 10,51	306	206	15	306	264	10
HCH alfa	10,19		219	147	20	219	183	10
HCH beta	10,66		219	147	20	219	183	10
Quintozeno	10,68		295	237	10	295	265	10
HCH gama	10,77	10,52 - 12,15	219	147	20	219	183	10
Alacloro	11,88		188	130	40	188	160	10
Parationa metílica	11,92		263	109	25	263	136	10
Heptacloro	12,11		274	237	20	274	239	20
Pirimifos metílico	12,27		290	151	25	290	180	10
Fenitrotiona	12,38		277	109	25	277	260	10
Malationa	12,49		173	99	15	173	127	10
Clorpirifos metílico	12,67		314	258	25	314	286	15
Aldrin	12,83	12,16 - 13,50	263	191	30	263	193	30
Parationa etílica	12,85		291	81	25	291	109	20
Pirimifos metílico	13,05		333	168	25	333	180	5
Pendimetalina	13,36		252	161	15	252	191	10
2,4 DDE	14,14		318	176	25	318	246	25
Endosulfam alfa	14,20		241	170	15	241	206	10
4,4 DDE	14,83		318	176	25	318	246	25
Oxifluorfen	14,90	13,51 - 15,11	300	132	40	300	223	20
Miclobutanil	14,93		179	90	25	179	125	10
Cresoxim metílico	14,94		206	116	10	206	130	18

2,4 DDD	14,99		235	165	20	235	199	20
Endosulfam beta	15,71		241	170	20	241	206	10
4,4 DDD	15,77		235	165	20	235	199	20
Trifenilfosfato (PI)	16,50		325	168	18	325	226	18
Propiconazol	16,54		259	69	10	259	173	15
Endosulfam sulfato	16,54	15,12 - 18,00	272	235	10	272	237	15
DDT	16,59		235	165	20	235	199	20
Epoxiconazole	17,21		192	111	25	192	138	15
Bifentrina	17,60		181	165	20	181	166	10
Mirex	18,98		272	143	40	272	237	10
Fenarimol	19,13	18,01 - 19,51	251	111	35	251	139	20

PI: padrão interno; PS: Padrão de Substituição; t_R: tempo de retenção

Para os diferentes solventes extratores testados o que apresentou melhores resultados foi o tetracloreto de carbono, conforme a Figura 3. Observa-se que dos 32 compostos avaliados este solvente possibilitou uma extração média de 18 agrotóxicos com percentuais de recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$). Diclorometano e clorofórmio possibilitaram uma extração média de 16 e 8 compostos, respectivamente. A Figura 3 também ilustra a dispersão dos valores encontrados em relação à média, através das barras verticais em cada coluna e/ou variável avaliada. Para o diclorometano, quando utilizado como solvente extrator, apresenta grande dispersão nos resultados, sendo que, para o tetracloreto de carbono e clorofórmio a variação é bem menos expressiva.

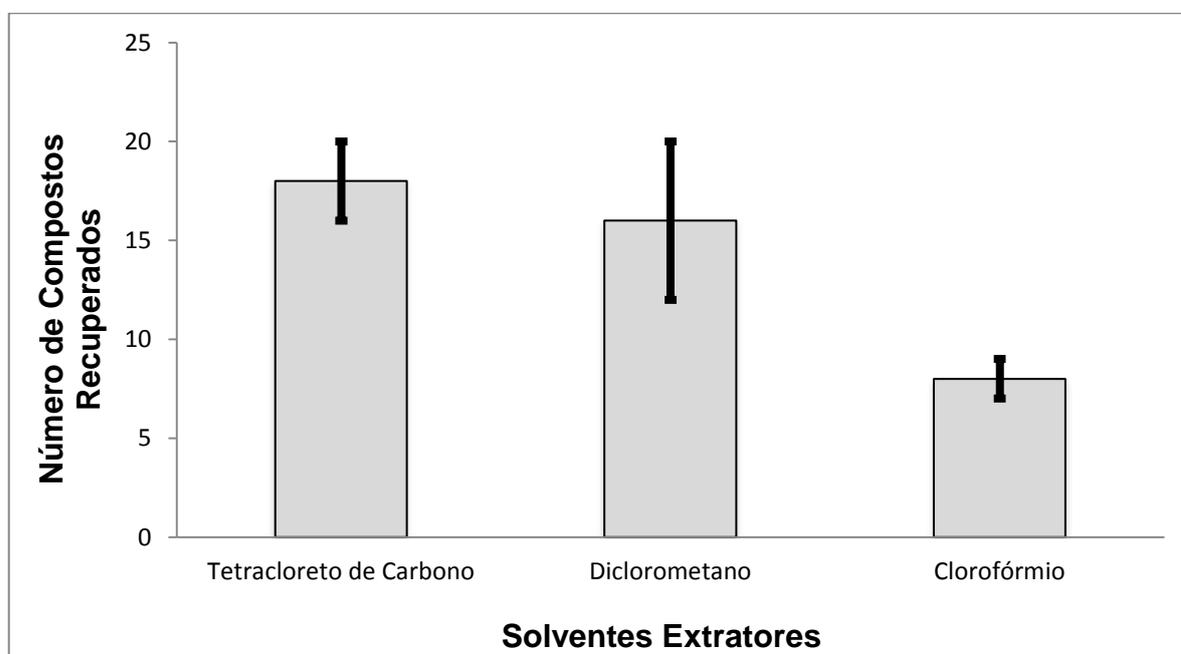


Figura 3. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) quando tetracloreto de carbono, diclorometano e clorofórmio foram utilizados como solventes extratores ($n = 3$).

Neste estudo, os 3 solventes orgânicos avaliados apresentaram a formação de duas fases bem distintas. Porém, clorofórmio e diclorometano apresentaram um volume de fase sedimentada 25% menor, quando comparados com tetracloreto de carbono. A boa eficiência de extração do tetracloreto de carbono pode estar relacionada com sua menor solubilidade em água em relação aos demais solventes testados. A Tabela 7 apresenta as características físico-químicas dos solventes

extratores avaliados. Tetracloreto de carbono, também foi avaliado como melhor solvente de extração por HADJMOHAMMADI *et al.* (2011); CALDAS *et al.* (2010); DANESHFAR *et al.* (2008) visando a determinação de compostos orgânicos em amostras de água ou alimentos.

Tabela 7. Características físico-químicas dos solventes extratores

Solventes Extratores	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em Água (g L ⁻¹ , 20 °C)	PF (°C)	PE (°C)	Densidade (g cm ⁻³ , 20 °C)
Clorofórmio	119,4	8	-63	61	1,47
Diclorometano	84,9	20	-95	40	1,33
Tetracloreto de Carbono	153,8	0,8	-23	76,7	1,59

Durante a avaliação do melhor solvente extrator, observou-se que quando diclorometano foi utilizado, vários compostos apresentaram percentuais de recuperação superiores a 120%, que possivelmente indica perda por volatilização do solvente (Martins, et. al. 2012).

Neste procedimento cada um dos solventes extratores foi injetado no sistema GC-MS/MS. Observou-se um melhor comportamento cromatográfico para os extratos contendo diclorometano como solvente. Assim, após realização do procedimento de extração, evaporou-se o extrato até *secura* sob fluxo lento de nitrogênio. Após, realizou-se ressuspensão do extrato com 50 µL de diclorometano evitando possíveis distorções dos picos cromatográficos.

Após realização dos testes, o tetracloreto de carbono foi escolhido como solvente extrator.

4.2.2 Seleção do solvente dispersor

Entre os solventes dispersores testados, a acetona apresentou melhor resultado cromatográfico e possibilitou um maior número de compostos com percentuais de recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%). Observa-se na Figura 4, que quando este solvente é utilizado, 24 dos 32 compostos avaliados apresentam percentuais de recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%). Acetonitrila e metanol possibilitaram uma extração média de 16 e 6 compostos, respectivamente. Além

disso, quando estes solventes foram utilizados observou-se percentuais de recuperação inferiores a 70%.

Na literatura diversos estudos obtiveram melhores resultados fazendo uso da acetona como solvente dispersor na DLLME. Hadjmohammadi *et. al.*, (2011); Martín *et. al.*, (2011); e Cortada *et. al.*, (2009) empregaram acetona como solvente dispersor durante determinação de resíduos de agrotóxicos em água.

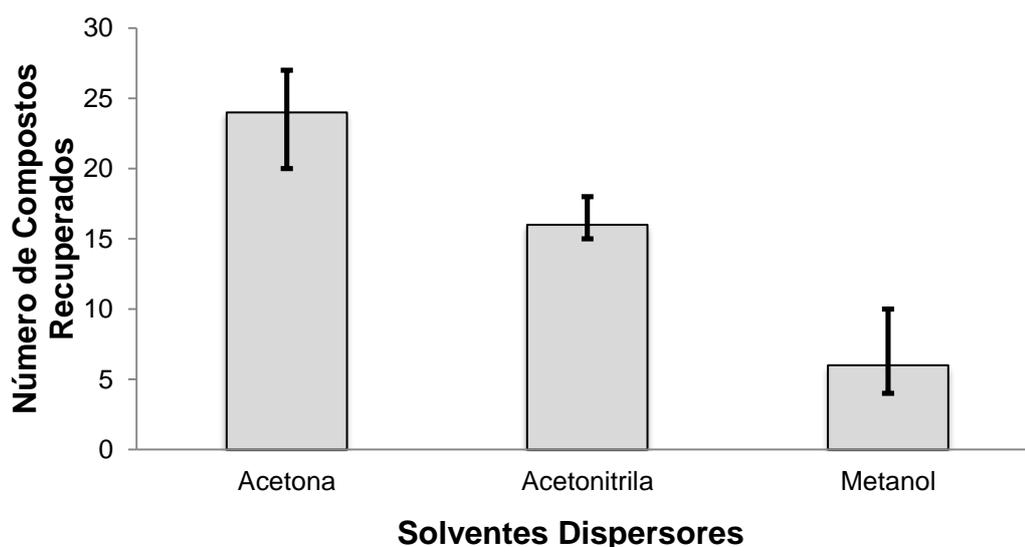


Figura 4. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) quando acetona, acetonitrila e metanol foram utilizados como solventes dispersores ($n = 3$).

Para o uso da acetona como solvente dispersor, é possível verificar que há maior variação entre os resultados quando comparados com acetonitrila e o metanol. Porém, devido ao maior número de compostos recuperados para esse solvente, a acetona foi escolhida como solvente dispersor para a sequência do desenvolvimento do método de extração.

4.2.3 Seleção do volume do solvente extrator

O volume de solvente extrator é determinante na quantidade e no tamanho das microgotas formadas, influenciando diretamente na eficiência de extração (RAZAEI, *et. al.*, 2010). Após o tetracloreto de carbono ser definido como solvente extrator,

foram testados diferentes volumes de tetracloreto de carbono a ser empregado. Os volumes testados foram 150, 200, 300 e 400 μL .

Observa-se na Figura 5 que quando utilizados 150 μL de tetracloreto de carbono, além da pequena quantidade de fase sedimentada formada, há dificuldade na remoção da fase orgânica do tubo cônico. Para este volume, as recuperações encontradas não foram satisfatórias, somente 5 agrotóxicos apresentaram faixa de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$). O volume de gota formado foi menor que os 150 μL iniciais, indicando que parte do solvente orgânico, ainda permanece na fase aquosa, ao final do procedimento, e implica nas baixas recuperações encontradas. Os volumes de 200 e 400 μL de solvente extrator apresentaram 25 e 16 compostos com faixa de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$).

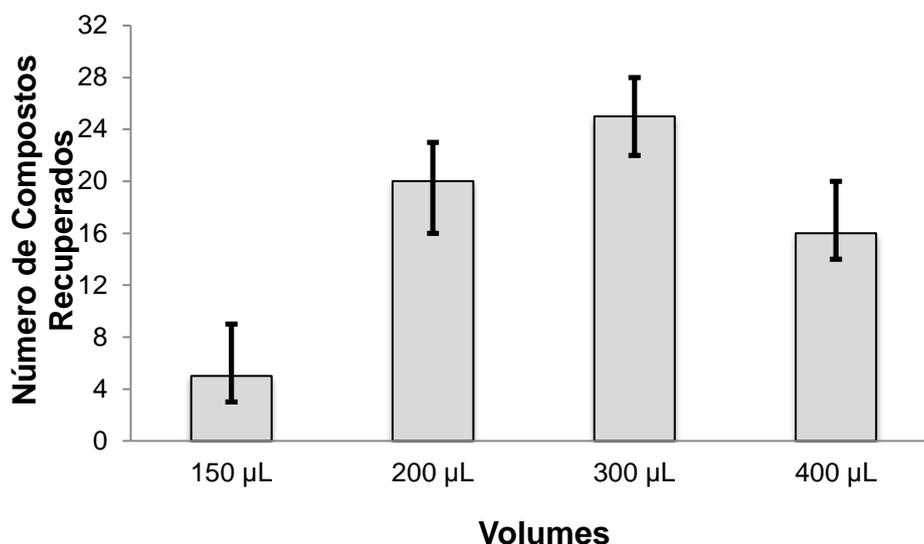


Figura 5. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$) quando foram utilizados 150, 200, 300 e 400 μL de tetracloreto de carbono como solvente extrator ($n = 3$).

A figura 5 demonstra que um maior número de compostos (25) foi extraído na faixa de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$) quando se utilizou um volume de 300 μL de tetracloreto de carbono. Portanto, este foi o volume de solvente extrator selecionado.

4.2.4 Seleção do volume do solvente dispersor

O volume do solvente dispersor afeta diretamente a formação da solução turva com microgotas de água/solvente. Além disso, está relacionado com o grau de dispersão do solvente na fase aquosa e conseqüentemente na eficiência da extração. Conforme a Figura 6 obteve-se os melhores resultados, quando empregou-se 500 μL de acetona como volume de solvente dispersor. Dos 32 agrotóxicos avaliados, 26 apresentaram taxas de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$). Quando utilizou-se 1000 μL de acetona como volume de solvente dispersor, obteve uma média de 24 compostos com taxas de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$). O uso de outros volumes de solvente dispersor como 300; 1500 e 2000 μL resultou em uma pequena eficiência de extração. Assim, estes volumes estão relacionados somente com 9, 14 e 13 compostos com taxas de recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$).

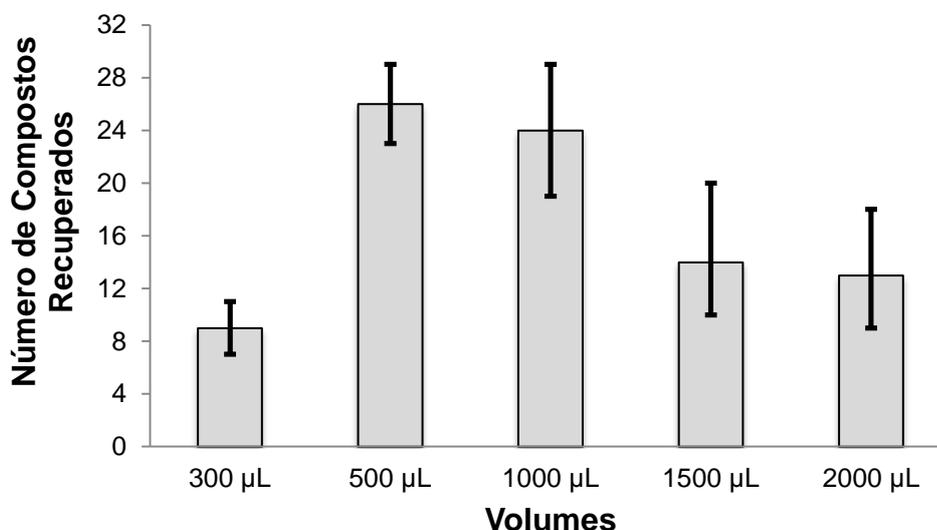


Figura 6. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($\text{RSD} \leq 20\%$) quando foram utilizados 300, 500, 1000, 1500 e 2000 μL de acetona como solvente dispersor ($n = 3$).

Os testes com volumes de 300 e 500 μL de acetona apresentam as menores variações de resultados, quando comparados aos demais volumes testados, conforme a indicação de dispersão nas barras da Figura 6. Todavia, para 500 μL tivemos os melhores resultados em termos de recuperação de compostos, e o

mesmo foi escolhido como volume de acetona para ser usado como solvente dispersor.

4.2.5 Efeito da adição de sal

Visando o aumento da força iônica entre as duas fases, aquosa e orgânica, testou-se a adição de 3 sais que apresentam capacidade de influenciar a separação e conferir melhores recuperações ao procedimento de extração. Os resultados obtidos a partir da adição de 500 mg de NaCl, Na₂SO₄ e MgSO₄ não representaram uma maior quantidade de compostos recuperados. Observou-se um decréscimo no número total de compostos com percentuais de recuperação entre 70-120% (RSD ≤ 20%), para todos os sais testados. Entre estes, NaCl e Na₂SO₄ foram empregados com a mesma finalidade por outros estudos empregando DLLME (ZHAO *et al.*, 2009; NAGARAJU *et al.*, 2007; VELA-SORIA *et al.*, 2014; CAPILLO *et al.*, 2014). ZHAO e colaboradores (2009), também não obtiveram resultados satisfatórios para a adição de NaCl, sendo que essa etapa adicional no procedimento de extração não apresentou ganhos significativos em termos de recuperação.

Outro ponto negativo visualizado no uso de sais neste procedimento foi a observação de recristalização durante a etapa de evaporação do solvente extrator, para posterior redissolução em diclorometano. A partir destes resultados, optou-se por não realizar a adição de sais durante o procedimento de extração.

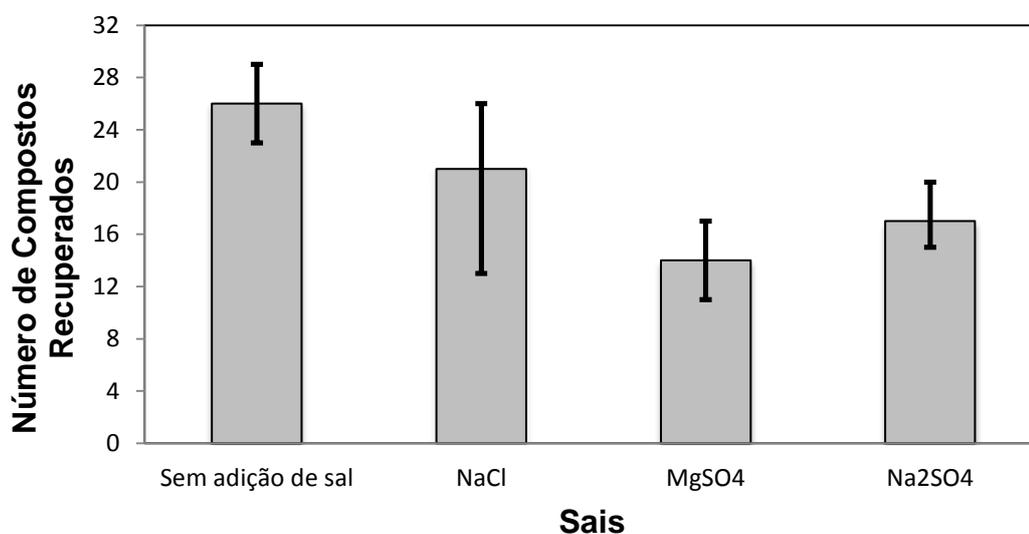


Figura 7. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) para a adição de NaCl, MgSO₄, Na₂SO₄ e não adição de sal (n = 3).

Para o NaCl que apresentou melhores resultados em termos de compostos recuperados, foi obtido também, alta dispersão nos resultados encontrados. Já para o uso do MgSO₄ e Na₂SO₄ foram obtidos baixo número de compostos recuperados.

Após realização dos testes, optou-se pela não adição de sal na etapa de extração.

4.2.6 Efeito do tempo de agitação

Após a adição da mistura dos solventes extrator e dispersor (tetracloreto de carbono e acetona) na amostra fortificada com os agrotóxicos avaliados neste estudo, avaliou-se o tempo agitação do frasco cônico em agitador tipo vortex. De acordo com a Figura 7, a condição que apresentou um maior número de compostos (32) com recuperação na faixa de 70-120% ($RSD \leq 20\%$) foi à utilização de 15 segundos de agitação em vortex. Por outro lado, quando avaliou-se os tempos de 30 e 60 s, o número de compostos recuperados dentro da faixa estabelecida de recuperação foram de 25 e 18, respectivamente.

Também foram realizado testes sem etapa de agitação, porem os resultados encontrados não demonstram eficiência quanto aos percentuais de recuperação para os compostos.

O desvio padrão para os resultados encontrados para 15 segundos, não assumem valores superiores a 32 compostos, sendo que, foram os 32 compostos validados pelo método.

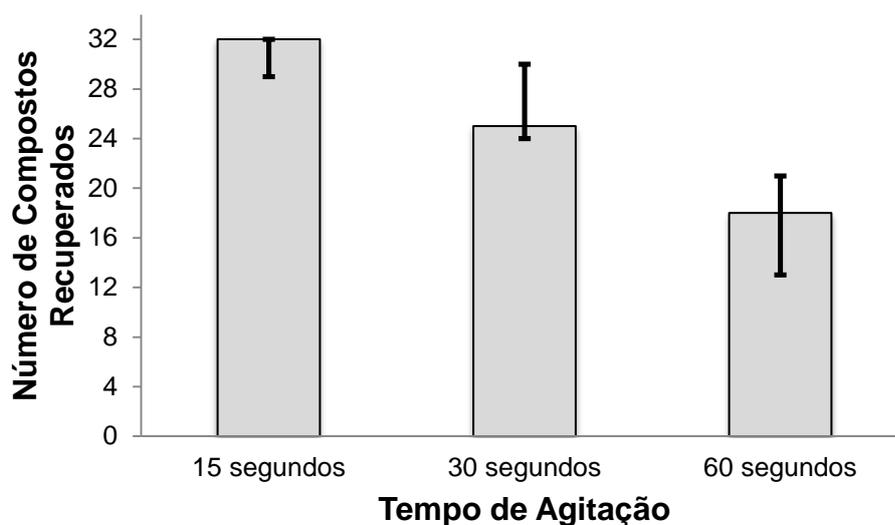


Figura 8. Número de compostos com recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) quando foram utilizados 15, 30 e 60 segundos de agitação após adição da mistura de solvente extrator e dispersor ($n = 3$).

Para a etapa de agitação, foi estabelecido 15 segundos de agitação em vortex, para a validação do método analítico.

4.2.7 Efeito do pH

O efeito da variação do pH também foi avaliado para os compostos em estudo. As amostras tiveram seus pHs modificados (2,0, 2,5 e 3,0) através da adição de uma solução aquosa de ácido fosfórico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, conforme utilizado em outro estudo (MARQUES, 2014). Esta faixa ácida de pH, favorece a partição dos analitos que apresentam características ácidas nas microgotas do tetracloreto de carbono, estes tendem a permanecer na forma neutra e proporcionam melhores eficiências de extração, já que os compostos orgânicos apresentam maior tendência de extração para o solvente orgânico que na forma ionizada (ALVES, 2010; CALDAS, 2009; CALDAS *et. al.*, 2011). Para as condições de pH avaliadas (2, 2,5 e 3) o número de compostos com recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) foi de 13, 16 e 21, respectivamente. Assim, optou-se pela não acidificação das amostras uma vez que os resultados obtidos não promoveram um aumento significativo sobre os percentuais de recuperação dos compostos estudados. Além disso, esta seria uma etapa a mais a ser realizada durante o preparo da amostra.

4.2.8 Procedimento otimizado

O método de DLLME proposto baseia-se na rápida adição, com o auxílio de uma seringa, da mistura de solventes extrator e dispersor (300 μL de tetracloreto de carbono e 500 μL de acetona, respectivamente) em 5 mL de amostra aquosa presente em um tubo de fundo cônico. A seringa contendo a mistura de solventes deve estar com sua agulha em uma posição de $\pm 0,5$ cm acima da superfície da amostra aquosa. Realiza-se a adição de forma rápida, em uma só etapa, proporcionando a formação de um jato. Assim, haverá a formação de uma solução turva/emulsão entre as fases, onde as microgotas do solvente extrator vão estar dispersas na fase aquosa. Após, realiza-se a agitação do tubo em vortex por 15 segundos. Na sequência, efetua-se etapa de centrifugação a 2000 rpm (3 min). Retira-se a fase sedimentada do fundo do tubo cônico e transfere-se para um vial. Evapora-se sob fluxo lento de nitrogênio até secura. Após, realiza-se ressuspensão do extrato com 50 μL de diclorometano. O fator de concentração deste procedimento é de 100 vezes.

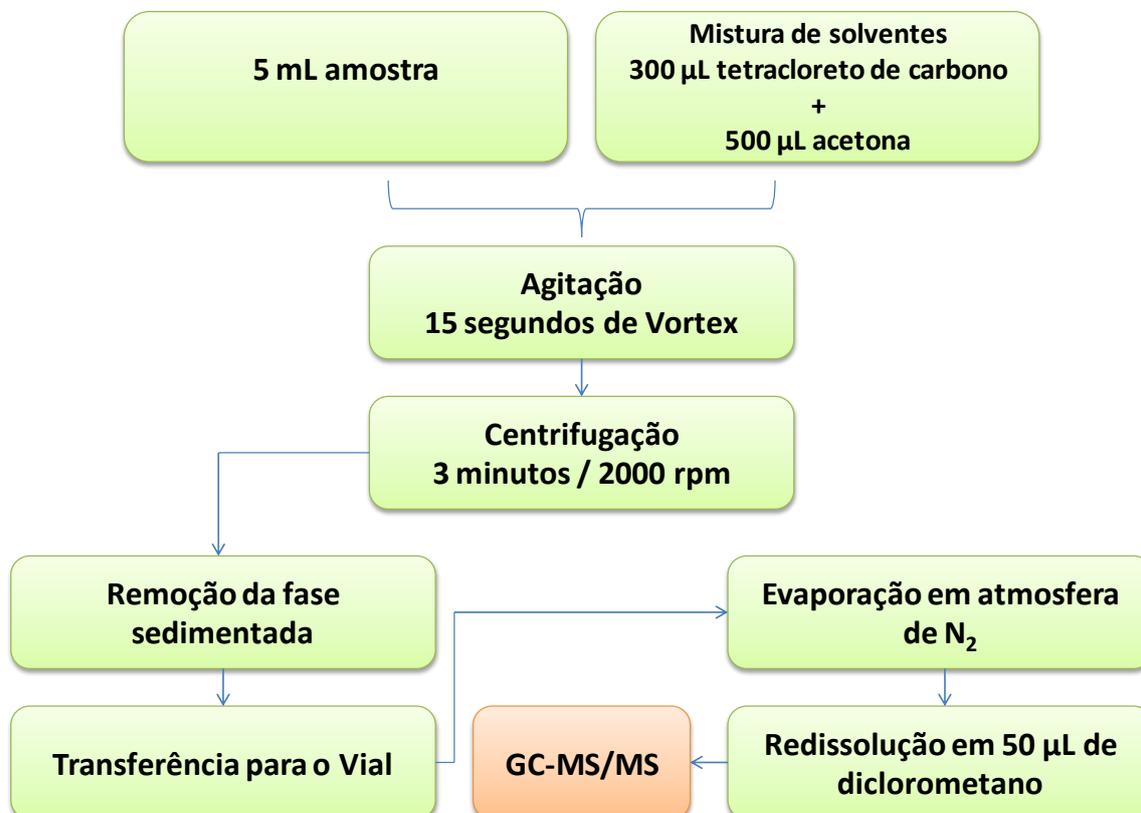


Figura 9 – Procedimento de extração otimizado

4.3 Validação do método DLLME com determinação por GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

A validação do método DLLME foi realizada utilizando GC-MS/MS, seguindo o procedimento descrito no item 4.2.8, na qual foram avaliados os agrotóxicos que constam no Anexo A e Anexo B. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (diclorometano) e no extrato da matriz (água) obtidos a partir de amostras “branco”. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

4.3.1 Seletividade

Observa-se na Figura 2 que a seletividade do método foi assegurada, uma vez que não há interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação nos mesmos tempos de retenção de cada agrotóxico nas amostras “branco”. Na matriz não foi verificada a presença dos analitos em estudo acima do LOD do método, utilizando-se, dessa forma, as amostras avaliadas para confecção da curva analítica e ensaios de fortificação. Ainda, nas análises não foi observada variação da área do padrão interno (PI), trifenilfosfato (TPP), maior de 20%, assegurando os resultados obtidos com o instrumento.

4.3.2 Curva analítica e faixa linear

A Tabela 8 apresenta os valores dos coeficientes de determinação (r^2), para as equações das curvas analíticas, bem como bem como a faixa linear de cada agrotóxico e as equações do modelo matemático de descrição da curva analítica. A faixa linear para os agrotóxicos quando preparados no extrato da matriz foi bastante eficiente visto que para todos os analitos obteve-se um $r^2 \geq 0,9900$.

4.3.3 Efeito matriz

Para Gosetti e colaboradores (2010), efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou supressão significativa (> 20%) do sinal analítico, para um determinado composto presente no extrato da matriz, comparado com o sinal analítico obtido para o mesmo analito em solvente orgânico.

A Tabela 9 apresenta os resultados da avaliação do efeito matriz para os compostos estudados. As curvas foram preparadas em diclorometano e na matriz branco (água). Observa-se que 50% dos compostos avaliados, apresentaram efeito matriz superior a 20%, ou seja, com aumento do sinal analítico. Demonstrando assim, a necessidade de realizar a quantificação dos agrotóxicos empregando curvas analíticas preparadas no extrato da matriz.

Tabela 8. Valores da faixa linear, coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas e equação do modelo para a curva extraída.

Compostos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	r^2
2,4 DDD	0,03 - 1,0	$y = 1\text{E}+07x - 2\text{E}+06$	0,9967
2,4 DDE	0,03 - 1,0	$y = 1\text{E}+07x + 147622$	0,9989
4,4 DDD	0,03 - 1,0	$y = 9\text{E}+06x - 300504$	0,9941
4,4 DDE	0,03 - 1,0	$y = 9\text{E}+06x - 300504$	0,9982
Alacloro	0,05 - 1,0	$y = 2\text{E}+06x + 511515$	0,9912
Aldrin	0,03 - 0,5	$y = 956127x - 41596$	0,9989
Clorpirifos etílico	0,05 - 1,0	$y = 2\text{E}+06x - 78106$	0,9996
Clorpirifos metílico	0,05 - 1,0	$y = 1\text{E}+06x - 72391$	0,9964
Cresoxim metílico	0,05 - 1,0	$y = 2\text{E}+06x + 128700$	0,9938
DDT	0,05 - 0,5	$y = 4\text{E}+06x - 350648$	0,9991
Endosulfam beta	0,03 - 1,0	$y = 190484x + 25927$	0,9900
Endosulfam sulfato	0,03 - 1,0	$y = 403210x + 157880$	0,9915
Endosulfan alfa	0,03 - 1,0	$y = 333131x + 150410$	0,9951
Epoxiconazole	0,03 - 0,5	$y = 3\text{E}+06x + 68844$	0,9925
Fenarimol	0,03 - 0,5	$y = 950913x + 14043$	0,9922
Fenitrotona	0,05 - 1,0	$y = 976761x + 140354$	0,9905
HCH alfa	0,03 - 0,5	$y = 722649x + 45551$	0,9915
HCH beta	0,03 - 0,5	$y = 569859x + 739,96$	0,9929
HCH gama	0,03 - 0,5	$y = 750316x + 18620$	0,9917
Heptacloro	0,05 - 1,0	$y = 746347x + 20145$	0,9945
Malationa	0,03 - 0,5	$y = 2\text{E}+06x + 27768$	0,9927
Miclobutanil	0,03 - 1,0	$y = 1\text{E}+06x - 18134$	0,9994
Mirex	0,05 - 1,0	$y = 341153x - 7401$	0,9977
Oxifluorfen	0,03 - 1,0	$y = 942928x - 41013$	0,9943
Parationa etílica	0,03 - 0,5	$y = 497514x + 31611$	0,9977
Parationa metílica	0,03 - 0,5	$y = 1\text{E}+06x + 248566$	0,9931
Pendimetalina	0,03 - 1,0	$y = 1\text{E}+06x - 8312$	0,9913
Pirimifos etílico	0,03 - 0,5	$y = 370840x + 8421,8$	0,9943
Pirimifos metílico	0,05 - 1,0	$y = 634719x + 44730$	0,9921
Propiconazol	0,03 - 0,5	$y = 305640x + 15543$	0,9976
Quintozeno	0,015 - 0,5	$y = 142030x - 207,53$	0,9921

Trifluralina	0,03 - 0,5	$y = 597753x + 4918,9$	0,9909
--------------	------------	------------------------	--------

A diferença de sensibilidade entre os analitos pode ser explicado pelo fato de ter sido realizado o procedimento de extração na matriz. Também, não se pode descartar a influência do equipamento, que pode gerar diferenças significativas.

O efeito matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes estão presentes em concentrações muito baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. De acordo com Pinho e colaboradores (2009) os interferentes presentes em matrizes aquosas que podem influenciar na análise são: matéria orgânica dissolvida, ácidos húmicos, e sais presentes nas amostras de água.

Tabela 9. Avaliação do efeito matriz nos compostos estudados

Compostos	Efeito Matriz (%)
2,4 DDD	11
2,4 DDE	17
4,4 DDD	24
4,4 DDE	21
Alacloro	-5
Aldrin	4
Clorpirifos etílico	23
Clorpirifos metílico	16
Cresoxim metílico	3
DDT	42
Endosulfam beta	17
Endosulfam sulfato	32
Endosulfan alfa	23
Epoxiconazole	31
Fenarimol	19
Fenitrotiona	10
HCH alfa	35
HCH beta	33
HCH gama	16
Heptacloro	11
Malationa	-26
Miclobutanil	6
Mirex	42
Oxifluorfen	20
Parationa etílica	14
Parationa metílica	18

Pendimetalina	29
Pirimifos etílico	27
Pirimifos metílico	39
Propiconazol	-9
Quintozeno	12
Trifluralina	29

Dos compostos avaliados, três deles apresentam efeito matriz negativo. Para a Malationa, é possível relacionar esse fato ao $pK_a = 7,5$ que indica maior dissociação do composto na fase aquosa. Já, para o Propiconazol que apresenta $pK_a = 1,09$ esse parâmetro não justifica efeito matriz negativo. Para o Alacloro não há valores de pK_a na literatura para essa relação.

4.3.4 Limite de detecção e quantificação do método e do instrumento

Os valores de limite de detecção e quantificação, tanto para o instrumento quanto para o método foram obtidos como descrito no item 3.9.4. Todos os compostos avaliados apresentaram valores de LOQ_i e LOD_i de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os compostos avaliados apresentaram valores de LOQ_m de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOD_m de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores são considerados satisfatórios, pois os limites de quantificação alcançados atingem os valores máximos permitidos (VMP) dos compostos avaliados neste trabalho que são monitorados pela portaria 2914, do Ministério da Saúde e pela portaria 320 da Secretaria Estadual de Saúde do RS.

4.3.5 Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

Na Tabela 10 estão apresentados os valores das médias dos percentuais de recuperação ($n=7$) e RSDr (repetitividade) para os agrotóxicos avaliados em água, nos níveis de concentração de 0,1, 0,25 e $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando o método DLLME otimizado. A recuperação foi calculada utilizando a curva analítica preparada no extrato da matriz, aceitando o critério de recuperação entre 70 e 120% e $RSD \leq 20\%$, conforme a recomendação de validação de métodos cromatográficos (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2013).

Todos os compostos avaliados apresentaram valores de recuperação em três níveis de concentração entre 71 a 113%. A precisão, para todos os analitos nos níveis de concentração avaliados foi satisfatória, com valores de $RSD_r \leq 12\%$.

4.3.6 Precisão intermediária

Na Tabela 11 estão descritos os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada utilizando o método DLLME otimizado, na concentração intermediária de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$. Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação variaram na faixa de 71 a 110% todos os compostos. Uma boa precisão pode ser observada, com valores de $RSD_{pi} \leq 15\%$.

Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos em água.

Compostos	Nível de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	0,1		0,25		0,5	
	R (%)	RSD_r (%)	R (%)	RSD_r (%)	R (%)	RSD_r (%)
2,4 DDD	82	1	91	2	88	2
2,4 DDE	98	3	84	3	102	4
4,4 DDD	99	1	86	1	82	1
4,4 DDE	102	6	92	5	95	7
Alacloro	73	5	76	3	75	4
Aldrin	80	7	82	7	91	5
Clorpirifos etílico	88	2	80	3	76	2
Clorpirifos metílico	77	6	75	5	86	4
Cresoxim metílico	103	1	92	4	87	1
DDT	113	3	92	6	98	7
Endosulfam beta	93	3	84	4	96	4
Endosulfam sulfato	82	6	80	6	74	5
Endosulfam alfa	92	6	80	4	89	7
Epoxiconazole	79	5	71	7	77	8
Fenarimol	83	5	71	10	85	9
Fenitrotiona	93	3	83	6	77	5
HCH alfa	100	1	89	3	96	5
HCH beta	92	2	78	6	75	8
HCH gama	91	3	82	4	80	6
Heptacloro	77	5	84	13	86	11
Malationa	85	6	102	8	98	8
Miclobutanil	77	8	80	8	95	9
Mirex	82	3	75	6	78	2

Oxifluorfen	103	5	95	6	80	8
Parationa etílica	72	7	83	5	78	8
Parationa metílica	107	4	95	7	91	4
Pendimetalina	93	1	79	2	78	3
Pirimifos etílico	88	3	80	4	84	3
Pirimifos metílico	71	4	84	6	78	4
Propiconazol	80	4	77	8	95	9
Quintozeno	96	6	75	12	78	9
Trifluralina	102	7	95	7	86	3

Os testes foram realizados em 7 replicatas ($n=7$), e para todos os níveis testados, foram obtidos baixíssimos valores de RSD %. A etapa de evaporação e redissolução do extrato deve ser o ponto chave para os resultados obtidos, visto que, essas etapas de padronização do extrato final, promovem o ajuste do volume para todas as replicatas.

Tabela 11. Percentuais de RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em água, correspondente a precisão intermediária.

Compostos	Nível de Fortificação ($0,25 \mu\text{g L}^{-1}$)	
	R(%)	RSD_{pi} (%)
2,4 DDD	90	5
2,4 DDE	84	7
4,4 DDD	78	5
4,4 DDE	74	9
Alacloro	71	9
Aldrin	75	11
Clorpirifos etílico	71	7
Clorpirifos metílico	75	13
Cresoxim metílico	77	10
DDT	78	9
Endosulfam beta	83	8
Endosulfam sulfato	87	13
Endosulfan alfa	72	14
Epoconazole	74	12
Fenarimol	80	13
Fenitrotiona	110	7
HCH alfa	80	6
HCH beta	77	7
HCH gama	108	8
Heptacloro	75	15
Malationa	110	12
Miclobutanil	80	10

Mirex	82	6
Oxifluorfen	74	9
Parationa etílica	73	9
Parationa metílica	74	7
Pendimetalina	77	5
Pirimifos etílico	78	8
Pirimifos metílico	73	10
Propiconazol	73	10
Quintozeno	72	12
Trifluralina	74	10

4.4 Aplicação do método otimizado

Amostras reais de água foram utilizadas para a aplicação da metodologia analítica desenvolvida. A mesma demonstrou ótimo desempenho, sendo que foram preparados de acordo a metodologia validada conforme a Figura 19.

Todas as 5 amostras analisadas apresentaram algum resíduo de agrotóxico, sendo que, foi encontrado resíduo para 3 pesticidas diferentes entre essas amostras. Um dos resíduos encontrados em todas as amostras foi o 4,4 DDE, porém, em apenas uma delas apresentou concentração superior ao limite de quantificação. Outro composto encontrado em todas as 5 amostras foi o alacloro, onde em 3 dessas 5 amostras, a concentração encontrada foi acima do limite de quantificação, sendo possível determinar a concentração encontrada. O endosulfan alfa foi determinado em uma única amostra, estando presente em $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$, acima do limite de quantificação para o composto. Abaixo, segue a Tabela 12 com o resumo dos resultados obtidos:

Tabela 12 - Resultados da análise das amostras reais de água empregando o método DLLME e GC-MS/MS otimizado e validado neste trabalho.

Compostos	Amostra 1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra 2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra 3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra 4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra 5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VMP 2914 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
4,4 DDE	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,141	<LOQ	1

Alacloro	0,593	0,883	<LOQ	1,137	<LOQ	20
Endossulfan alfa	nd	nd	nd	<LOQ	nd	20

A Portaria 2914 estabelece VMP para o endossulfan alfa, em $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A amostra que apresenta resíduo desse composto está abaixo do valor máximo. Para o composto 4,4 DDE encontrado nas amostras, a regulamentação pela portaria 2914, o VMP para o composto é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Todas as amostras com presença do composto apresentam concentração abaixo do limite estipulado.

No caso do alacloro, um conhecido herbicida utilizado em culturas de soja, milho, algodão, café e cana-de-açúcar o VMP fica em $20 \mu\text{g L}^{-1}$, e como os demais compostos abrangidos pela portaria, também está dentro da faixa permitida.

Na figura 20 é possível visualizar o cromatograma do íon total para a amostra 4, onde há presença de 3 compostos contemplados no método desenvolvido, 4,4 DDE, alacloro e endossulfan alfa.

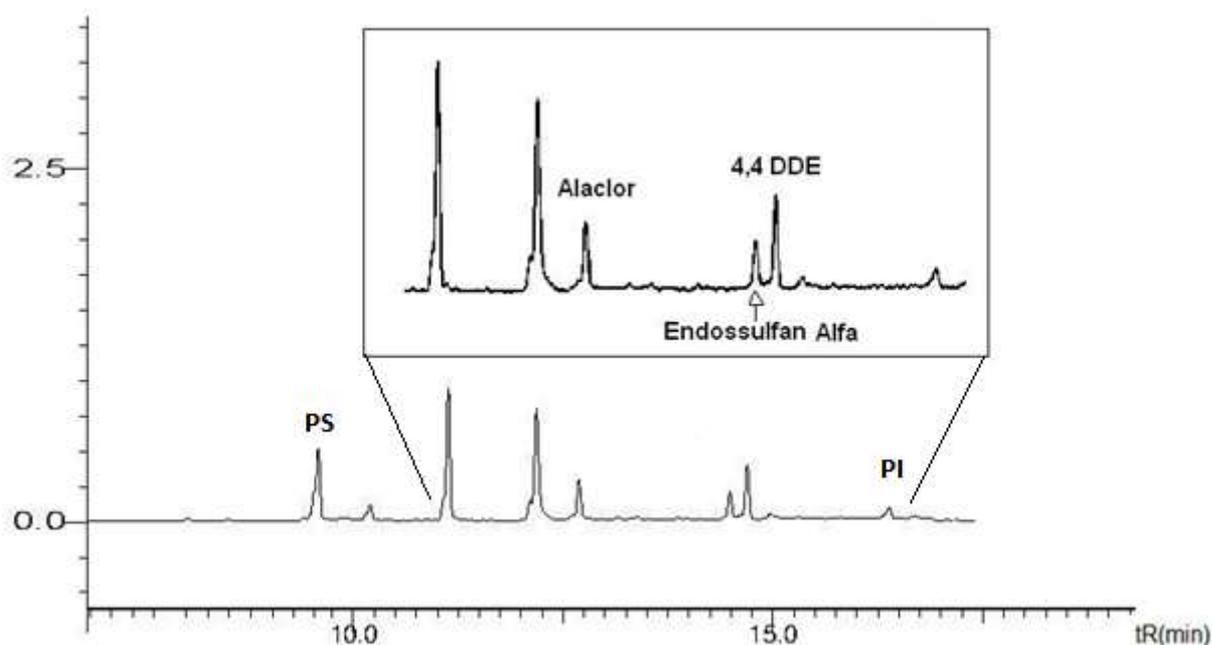


Figura 10 - Cromatograma GC-MS/MS do íon total para a amostra de água 4, demonstrando presença de 3 compostos contemplados no método analítico desenvolvido

5 CONCLUSÕES

O método de extração DLLME otimizado demonstrou ser simples, de fácil e rápida execução, com baixo custo, e apta para a preparação de amostras reais. Outro ponto favorável é a necessidade de baixos volumes de amostra, sendo utilizado 5 mL de amostra por ensaio. Os materiais necessários para a execução da extração são de fácil acesso e de baixo custo. Onde foram utilizados tubos Eppendorf para preparo da mistura de solventes, tubo cônico de vidro para realização da extração e seringa de 1 mL descartável.

O ponto crítico do procedimento proposto está focalizado na etapa de evaporação em fluxo lento de N_2 . Essa etapa deve ser realizada com cuidado, para que não haja perda de analito devido a vigorosa evaporação, afetando as recuperações e o procedimento de extração como um todo. A etapa de evaporação também pode ser uma opção para solventes de extração que não apresentam satisfatórios comportamentos cromatográficos. Porém, essa etapa pode ser demorada, aumentando o tempo total do procedimento de extração.

O método é robusto, visto que, por mais que sejam manuseados pequenos volumes de solvente extrator, e que por ventura ainda haja presença da fase aquosa, a fase sedimentada passa por evaporação e redissolução em solvente, o que acarreta em um comportamento cromatográfico satisfatório, como também a integridade do equipamento no momento da injeção e corrida cromatográfica.

Fatores que influenciam a técnica DLLME como adição de sais e variação do pH inicial da amostra não apresentaram resultados satisfatórios e não foram validados na técnica.

A linearidade da faixa de trabalho para os compostos estudados esta entre 0,015 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, considerando o fator de enriquecimento da técnica de 100 vezes. Também foram obtidos coeficientes de determinação (r^2) na faixa de 0,9900 a 0,9996, que são adequados conforme ANVISA (2003) e INMETRO (2010).

O método apresentou limite de quantificação de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que proporciona alcançar os limites máximos permitidos (VMPs) pelas legislações vigentes, como também determinar os resíduos de pesticidas em água com alta confiabilidade e segurança. Porém, para o Aldrin há VMP de 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, e há necessidade de trabalhar com um maior fator de enriquecimento.

O método também demonstrou adequados valores de recuperação sendo que a faixa ficou entre 71 e 113 % para amostra de água da torneira fortificadas. Para as mesmas amostras, também foram obtidos excelentes valores de precisão, quando comparados com os valores sugeridos pela literatura ($RSD \% < 20$), sendo encontrados valores na faixa de 1 – 13 %. A precisão intermediária por sua vez, foi realizada por diferentes analistas e extraídas em um intervalo de 7 dias, apresentando resultados de $RSD \%$ entre 5 e 15. Os bons resultados de precisão alcançados demonstram que o método é robusto. Essa característica é possível através das etapas de evaporação e redissolução da técnica desenvolvida, que padronizam todos os ensaios.

Para a aplicação do método, foram analisadas 5 amostras reais de água, das quais, todas apresentaram 4,4 DDE e alacloro. Ainda, a amostra número 4, apresentou endossulfan alfa acima do limite de quantificação. Esses valores salientam a importância da contínua busca por métodos analíticos que sejam eficientes para a determinação destes agrotóxicos.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho, tanto líquidos como sólidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

As seringas descartáveis foram colocados em sacos plásticos. Já os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos e separados nas seguintes classes: halogenados, não halogenados, e resíduos de álcool e acetona que são utilizados para limpeza do material de laboratório. Todos foram devidamente identificados e encaminhados ao almoxarifado.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar outros volumes e tipos de amostras (Alimentos);
- Avaliar maiores volumes de amostra (maior fator de enriquecimento);
- Avaliar outras quantidades de solventes extrator e dispersor;
- Avaliar o comparativo de técnicas de microextração visando a análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de interesse ambiental;
- Aumentar o escopo de atuação do método desenvolvido (maior número de compostos);
- Trabalhar com demais legislações vigentes (Européia; Americana; CONAMA);
- Utilização de solventes menos tóxicos para diminuição do impacto ambiental da técnica DLLME.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAN, J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 157 -168, 1999.

AHMED, F. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, 2001.

AHUMADA, D. A.; ARIAS, L. A.; BOJACÁ, C. R. Multiresidue determination and uncertainty analysis of pesticides in soil by ultrafast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 7, p. 1188-1197, 2013.

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

ALMEIDA, C., FERNANDES, J., CUNHA, S. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, p. 380-388, 2012.

ALSHANA, U., ERTAS, N., GÖGER, N. G. Determination of parabens in human milk and other food samples by capillary electrophoresis after dispersive liquid-liquid microextraction with back-extraction. **Food Chemistry**, v. 181, p. 1-8, 2015.

ALVES, A. C. H. **Determinação de pesticidas em águas por microextração em fase líquida associada á cromatografia gasosa e espectrometria de massa**. 2010. f. 156. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

ANDREU, V. PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 772-789, 2004.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Agrotóxicos e Toxicologia**, 2009. Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>>. Acesso em: março 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Classificação e Rotulagem de agrotóxicos**, 2005. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso>>. Acesso em: 22 agosto 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ARORA, S.; MUKHERJEE, I.; TRIVEDI, T. P. Determination of Pesticide Residue in Soil, Water and Grain from IPM and Non-IPM Field Trials of Rice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 4, p. 373-376, 2008.

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

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 622, 2002.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stil bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and Principles. **Journal of Microcolumn Separation**, v. 11, p. 737, 1999.

BARCELÓ, D., HENNION, M.C. *Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water*. 2ª ed., Elsevier: Amsterdam, 2006.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE) e Micro Extração em Fase Sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, V. 24, N. 2, p. 172-175, 2001.

BEGUIN, S.; JADAS-HÉCART, A.; TABEL, J. C. Protocols for optimizing MS/MS parameters with an ion-trap GC-MS instrument. **Journal Mass Spectrometry**. V.41, p. 1304–1314, 2006.

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

BIRJANDI, A. P., BIDARI, A., REZAEI, F., HOSSEINI, M. R., ASSADI, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1193, p. 19–25, 2008.

BJERGAARD S.P., RASMUSSEN K.E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal Chromatography A**, v.1184, p.132-142, 2008.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 12, n.1, p. 73-89, 2007.

BRAGA, I. F. A. **Alterações tireoidianas em Pacientes Expostos a Organofosforados**. 2012. f. 120. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Coletiva, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BRAIBANTE, M. E. F., ZAPPE, J. A. A Química dos agrotóxicos. **Química e Sociedade: Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 jan 2002. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=2848>> Acesso em 4 março 2015.

BRASIL. Lei nº. 9.433 de 8 de janeiro de 1997. *Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil , Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/l9433.htm>. Acesso em 4 março de 2015.

BRASIL. *Ministério da Saúde. Portaria n° 2914, de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e da outras providências.* Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011.

BRASIL. *Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.* Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília: Ibama, 2010.

BRASIL, *Ministério do Meio Ambiente, Agrotóxicos.* Disponível em: <www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em 4 de junho de 2015.

CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea.** 2009. F. Dissertação (Mestrado em Química)- Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

CALDAS, S.S., COSTA, F. P., PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid liquid microextraction with liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**; V.32, P.55-62, 2010.

CALDAS, S. S., GONÇALVES, F. F., PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**; v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMPILLO, N., VIÑAS, P., FÉREZ-MELGAREJO, G., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v.131, p.185–191, 2015.

CAMPILLO, N., VIÑAS, P., CACHO J. I., PEÑALVER, R., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 7323–7330, 2010.

CAMPÍNS-FALCÓ, P.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; SEVILLANO-CABEZA, A.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; MOLINS-LEGUA, C., MOLINER-MARTINEZ, Y. In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. Review Article. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2695-2702, 2010.

CARDOSO, M. H. W. M., NÓBREGA, A. W., ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. **Revista Analítica**. V. 34, p. 48-5, 2008.

CASSIANO, M. N., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

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

COELHO, C. N. O princípio do desenvolvimento sustentado na agricultura brasileira. **Revista de política agrícola: CONAB**, trimestral, v. 2, p. 58-66, 1998.

COLLINS, C., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. 1ª ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2009. 279 p.

COLLINS, C., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7ª ed. Campinas: Ed Unicamp, 1997. 279 p.

CORTADA, C., VIDAL, L., PASTOR, R., SANTIAGO, N., CANALS, A. Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 218-221, 2009.

COUNCIL DIRECTIVE. *Relating to the quality of water intended for human consumption*. European Communities, 1980. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food_Legislation_Links/Water/EU_Directive_98_83_EC.pdf>. Acesso em: Março de 2015.

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

CUNHA, S. C., FERNANDES, J. O. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS). **Talanta**, v. 83, p. 117-125, 2010.

DANESHFAR, A., KHEZELI, T., LOTFI, H. J. Determination of liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 456-460, 2009.

DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal Chromatography A*, v. 1152, p. 54, 2007.

DIEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

DJOZAN, D.; EBRAHIMI, B. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: Application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. **Analytica chimica acta**, v. 616, p. 152-159, 2008.

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.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2014. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. Marco Antonio Ferreira Gomes; Robson Rolland Monticelli Barizon. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=E> N. Acesso em: 20/09/2014.

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

FARAJZADEH, M.A. *et al.* Development of a new dispersive liquid-liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 713, p. 70–78, 2012.

FARAJZADEHA, M. A., KHORRAMA, P., GHORBANPOURBA, H. Simultaneous derivatization and solid-based disperser liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of some antidepressants and an antiarrhythmic agent in urine and plasma samples followed by GC-FID. **Journal of Chromatography B**, v. 983–984, p. 55–61, 2015.

FARD, E. M. G. P. **Avaliação da Qualidade da Água Mineral e do Processo de Envase em Duas Fontes Comerciais**. 2007. f. 130. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná.

FATTAHI, N., ASSADI, Y., HOSSEINI, M. R. M., JAHROMI, E. Z. Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography -electron- capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 23-29, 2007.

FERNANDO, A. L., DUARTE, M. P. *Uso de Pesticida em Portugal*. Lisboa: Faculdade de ciências e tecnologia, 2011. Disponível em: http://www.ipq.pt/backfiles/evento_cs04_20111012/FCT_analuisafernando.pdf Acesso em: 12 de dezembro de 2014.

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

GARP (ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS). *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*, 1999.

GARRIDO-FRENICH, A.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, I.; ARREBOLA, F. J.; MARINEZ-VIDAL, J. L. Potentiality of Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticide Residues in Vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 4640–4648, 2005.

GIORDANO, A.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; RUIZ, M.; FONT, G.; PICÓ, Y. Pesticide residue determination in surface waters by stir bar sorptive extraction and liquid

chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1733, 2009.

GOSETTI, F., MAZZUCCO, E., ZAMPIERI, D., GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 3929- 2933, 2010.

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

HADJMOHAMMADI, M. R., GHOREISHI, S. S. Determination Liquid Liquid Microextraction and High Performance Liquid Chromatography. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p. 765-771, 2011.

Hajslová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P., Kempny, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **J. Chromatogr. A**, v. 800, p. 283, 1998.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, p 886, 2012.

Hengel, M.; Lee, P. Community air monitoring for pesticides—part 2: multiresidue determination of pesticides in air by gas chromatography, gas chromatography–mass spectrometry, and liquid chromatography–mass spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 3, p.1343-1353, 2014.

HENRIQUES, M. L. G. S. **Hormonas Naturais e de Síntese, Bisfenol A, Octifenol e Nonilfenol em Águas para Consumo Humano: Otimização do Método de Análise por SPE-LC-ESI- MS/MS**. Dissertação (Tese de Mestrado) Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Portugal. 2008.

HO, T. S., VASSKOG, T., ANDERSSON, T., JENSEN E., RASMUSSEN, K. E., BJERGAARD, S. P. 25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 592, p.1-8, 2007.

HOLLER, F. J., SKOOG D. A., CROUCH S. R. *Princípios de Análise instrumental*. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, p. 1055, 2009.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE- 008, revisão 04, 2011.

INMETRO (Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) DOQ-CGCRE-008: *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. Revisão 03 - Brasília, p.20, 2010.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION). *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 1996.

ISO (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION). *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/EC 17025, 1999.

JAMES, A. T., MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochemical Journal**, n. 50, 679-690, 1952.

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

JUNZA, A., DORIVAL-GARCIA, N., ZAFRA-GOMES, A., BARRON, D., BALLESTEROS, O., BARBOSA, J., NAVALON, A. Multiclass method for the determination of quinolones and B-lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 1-13, 2014.

KARIMI, M. SERESHTI, H., SAMADI, S., PARASTAR, H. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction and improvement of detection limit of methyl tert-butyl ether in water with the aid of chemometrics. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.7017-7023, 2010.

KHANI, R., SHEMIRANI, F., MAJIDI, B. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry for preconcentration and determination of copper in water samples. **Desalination**, v. 266, p. 238-243, 2011.

KITSON F.G., LARSEN, B.S., MCEWEN, C.N. Signal suppression/ enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 1996.

KRUVE, A., KÜNNAPAS, A., HERODES, K., LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Chromatogr. A**, v. 1187, p. 58-66, 2008

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas Benzimidazóis, Carbamatos e Triazinas em Milho por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem e sua Certificação**. 2007. f.142. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Nuclear - Materiais, Universidade de São Paulo.

KUSTER, M., ALDA, M. L., BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 900-914, 2006.

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

LANCAS, F. M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. 4 ed., São Carlos: RiMa, 2004.

LOPES, A.; MOTA, C. G. *História do Brasil: uma interpretação*. São Paulo: Senac, p. 1059, 2008.

LÓPEZ-NOGUEROLLES, M., CHISVERT, A., SALVADOR, A. Determination of atranol and chloroatranol in perfumes using simultaneous derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 28–34, 2014.

LYYTIKÄINEN, M.; KUKKONEN, J. V. K.; LYDY, M. J. Analysis of Pesticides in Water and Sediment Under Different Storage Conditions Using Gas Chromatography. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 0437-0444, 2003.

MACHADO, M.D.S.F. **Uso Sustentável da Água: Atividades Experimentais para a Promoção e Educação Ambiental no Ensino Básico**. 2006. f. 98. Dissertação (Tese de Mestrado) Universidade do Minho, Braga, Portugal.

MAHAM, M., KIAROSTAMI, V., HUSAIN, S. W., AZAR, P. A., TEHRANI, M. S., SHARIFABADI, M. K., AFROUZI, H., SHAPOURI, M., OSBOO, R. K. Extraction and determination of cyproheptane in human urine by DLLME-HPLC Method. Iranian **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 311-318, 2013.

MAIRESSE, L. A. S., COSTA, E. C. *Contaminação ambiental pela agricultura e as novas perspectivas com a moderna biotecnologia*. 1 ed, Santa Maria - RS: Orium, p. 162, 2009.

MALASPINA, O., SOUZA, T.F., ZACARIN, E.C.M.S., CRUZ, A.S., JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. Pp. 41-48. In: **Anais do VIII Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, 2008, p. 763.

MARASCHIN, L. **Avaliação do Grau de Contaminação por Pesticidas nas Águas dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Departamento de Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MARQUES, T. V. **Desenvolvimento e validação de método analítico empregando DLLME e HPLC/UV para determinação de benzodiazepínicos em amostra de água**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2014.

MARTÍN, J., BUCHBERGER, W., ALONSO, E., HIMMELSBACH, M., APARICIO, I. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. **Talanta**, v.85, p. 607-615, 2011.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SANCHEZ, M. Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrometry**, v. 16, p. 1106-1115, 2002.

MARTINI, L. F. D.; CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; BUNDT, A. D. C.; PRIMEL, E. G.; AVILA, L. A. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.42, n.10, p.1715-1721, 2012.

MARTINS, M. L. **Determinação de resíduos de compostos orgânicos em água por micro extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e GC-(TQ)MS/MS**. 2010. f. 161. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MARTINS, M. L., PRIMEL, E. G., CALDAS, S. S., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R.; Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 35-51, 2012.

MELWANKI, M. B., FUH, M. Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction an approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 24-28, 2008.

MERCER, G. E. Determination of 112 halogenated pesticides using gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1452-62, 2005.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). CONAMA, Resolução n° 357, 17 de março de 2005.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). *Agrotóxicos*. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acessado em: março de 2015.

MONIRUZZAMAN, M., RODRÍGUEZA, I., RODRÍGUEZ-CABOA, T., CELAA, R., SULAIMANB, S. A., GANCA S. H. Assessment of dispersive liquid-liquid microextraction conditions for gas chromatography time-of-flight mass spectrometry identification of organic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, v.1368, p. 26–36, 2014.

MONTES, R., RODRIGUEZ, I., RUBI, E., CELA, R. Dispersive liquid-liquid microextraction applied to the simultaneous derivation and concentration of triclosan and methyltriclosan in water sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 205-210, 2009.

MOREIRA, B. J., YOKOYA, J. M. C., GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

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

NETO, F. R. A., NUNES, D. S. S. *Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas Afins*. 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, p.187, 2003.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A., VILLAR-NAVARRO, M., RAMOS-PAYÁN, M., FERNÁNDEZ-TORRES, R., BELLO-LÓPEZ, M. A. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p. 1–15, 2015.

OLIVEIRA, A. R. M., MAGALHÃES, I.R.S., SANTANA, F. J. M., BONATO, P. S. Microextração em Fase Líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n 3, p. 637-644, 2008.

OLIVO, V. E.; TANSINI, A.; CARASEK, F.; CORDENUZZI, D.; FERNANDES, S.; FIORI, M. A.; FRAGOSO, A.; MAGRO, J. D. Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, p. 286-297, 2015.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Validacao de Metodos Cromatograficos para a Determinacao de Residuos de Medicamentos Veterinarios em Alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. *Introdução à Espectroscopia*. 4 ed. São Paulo- SP: Cengage Learning, 2010.

PEITOXO, S.C. **Estudo de Estabilidade a Campo de Pesticidas Carbofurano e Quincloraque em Água de Lavoura de Arroz Irrigado empregando SPE e HPLC-DAD**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química,

Departamento de Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.

PEIXOTO, S. C. **Validação e aplicação de método empregando QuEChRES modificado e GC-ECD para determinação de resíduos de pesticidas em grão e casca de arroz.** 2010. Tese (Doutorado em Química) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.

PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: a critical review, **Analytical Chimica Acta**, v. 669, p. 1-16, 2010.

PICÓ, Y., BLASCO, C., FONT, G. Environmental and food applications of LC – tandem Mass Spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45. 2004.

PICHON, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. **Journal Chromatography A.**, v. 885, n.1-2, p.195-215, 2000.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-998, 2009.

PINTO, M. I., SONTAG, G., BERNARDINO, R. J., NORONHA, J. P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. **Microchemical Journal**, p. 1-13, 2010.

PIZZUTTI, I. R., KOK, A., ZANELLA, R., ADAIME, M. B., HIEMSTRA, M., WICKERT, C., PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, p. 123, 2007.

PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean up dispersivo e GC-MS(NCI).** 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria.

PRESTES, O. **Método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS.** 2011. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Santa Maria.

PROSEN, H.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **Trends in analytical chemistry**, v. 18, n. 4, 1999.

RAMBLA-ALEGRE, M., ESTEVE-ROMERO, J., CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

REEMTSMA, T. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 477–501, 2003.

REIFSCHNEIDER, J. B. *Novos ângulos da história da história da agricultura no Brasil*. 2 ed, Brasília- DF: EMBRAPA, 116 p , 2012.

REZAEI, M., ASSADI, Y., HOSSEINI, M. R. M., AGHAEI, E., AHMADI, F., BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

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

REZAEI, F.; BIDARI, A.; BIRJANDI, A. P.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 621-627, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, p. 149-158, 2009.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

RIVEROS, A. C. G. Análise de Pesticidas por Espectrometria de Massas Acoplada a Cromatografia Gasosa (CG - EM). Goiânia, Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 15, p.2008-2018, 2012.

RODRIGUEZ-CABO, T., RAMIL, M., RODRIGUES, I., CELA, R. Dispersive liquid-liquid microextraction with non-halogenated extractants for trihalomethanes determination in tap and swimming pool water. **Talanta**, v.99, p. 846-852, 2012.

RODRÍGUEZ-CABO, T., RODRÍGUEZ, I., RAMIL M., CELA, R. Dispersive liquid–liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography–mass spectrometry determination of fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6603– 6611, 2011.

SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X., VIEIRA, E. M. Pesticidas. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.53-58, 2003.

SANCHEZ-BRUNETE, C., ALBERO, B., MARTÍN. G., TADEO, J. L. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Science**, v. 21, n. 11, p. 1291-1296, 2005.

SÁNCHEZ-ROJAS, F.; BOSCH-OJEDA, C.; CANO-PAVÓN, J. M. A Review of Stir Bar Sorptive Extraction. **Chromatographia**, v. 69, p. 79, 2009.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, Documento N° SANCO/12571/2013, 19 November 2013 rev. 0, Bruxelas, Bélgica, 2013.

SANTOS, L. G. D., LOURENCETTI, C.; PINTO, A. A.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. F. G. C. Validation and application of an analytical method for determining pesticides in the gas phase of ambient air. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 46, n. 2, p. 150-62, 2011.

SES - Secretária Estadual da Saúde, Portaria n° 320, 2014. Disponível em: < www.saude.rs.gov.br/upload/1399301406_Portaria%20Agrotoxicos%20320%202014.pdf > . Acesso em: Março de 2015.

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

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 999, 2008.

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

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, p. 262, 2009.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

SOARES, L. C. T., SANTOS-NETO, A. J. S. Protetores de analitos e efeito de matriz em GC. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.2, p. 139-152, 2012.

SPADOTTO, C.A., GOMES, M.A.F., LUCHINI, L.C., ANDRÉA, M.M. *Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 29, 2004.

SPARKMAN, O.D., WATSON, J.T. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. 4 ed, West Sussex - UK: John Wiley & Sons, 2007.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 25-33, 2010.

TREVISAN, L. R. P. **Resíduos de acefato, de seu metabólico metamidofós e de clorotalonil em cultura protegida de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de campo**. Tese (Doutor em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

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

VELA-SORIA, F., BALLESTEROS, O., ZAFRA-GOMES, A., BALLESTEROS, L., NAVALON, A. A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine

sample. Sample treatment by dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 129, p. 209-218, 2014.

VIEIRA, F. P., FERNANDES, F. L., GENTIL, F.H., SILVA, L. O. D., DINIZ, J. F. S., ALVES, F. M. Histórico da aplicação de inseticidas para controle no alto Paraíba visando estudos de resistência de *Leucoptera coffeella*. In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2011, Minas Gerais. **Anais Brasília: EMBRAPA**, 2011, p. 1-5.

VILLAVERDE, J.; HILDEBRANDT, A.; MARTÍNEZ, E.; LACORTE, S.; MORILLO, E.; MAQUEDA, C.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 2–3, p.507–513, 2008.

VIÑAS, P., CAMPILLO, N., LÓPEZ-GARCÍA, I., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 2067-2099, 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking-water quality*. 3 ed. Genève: (2006).

WEI, G., LI, Y., WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of methomyl in natural waters. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3089-3324, 2007.

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

XIONG, J., HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1193, p. 7-18, 2008.

YANG, T.; LEE, M. Electrically assisted solid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry for determination of parathion in water. **Talanta**, v. 82, p. 766–770, 2010.

ZACHARIS, C. K., ROTSIAS, I., ZACHARIADIS, P. G., ZOTOS, A.; Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1665–1672, 2012.

ZACHARIS, C. K., TZANAVARAS, P. D., ROUBOS, K., DHIMA, K. Solvent- based de emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography - mass spectrometry for determination of tarce organochlorine pesticides in environmental water sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5896-5900, 2010.

ZGOLA-GRESKOWIAK, A., GRESKOWIAK, T.; Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1382-1399, 2011.

ZHAO, X., FU, L., HU, J., LI, J., WANG, H., HUANG, C., WANG, X.; Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME combined with LC-Fluorescence Detection. **Chromatographia**, v. 2, p. 5470-5484, 2009.

ZANELLA, R., ADAIME, M. B., MARTINS, M. L., PRESTES, O. D.; Microextração líquido-líquido dispersiva. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Cap. 14, Ed. LTC, 2015.

ANEXOS

ANEXO A. Nome, grupo químico, classe, massa molecular, solubilidade, ponto fusão, ponto ebulição, log Kow, pressão vapor dos agrotóxicos estudados

Nome	Grupo Químico	Classe	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	Log P ou		pka
							Log Kow	PV (mPa)	
2,4 DDE	Organoclorado	Inseticida	318	0,14	89	336	6,5	7,99 x 10 ⁻¹	-
2,4 DDD	Organoclorado	Inseticida	320	0,05	78	193	6,91	2,58 x 10 ⁻¹	-
4,4 DDD	Organoclorado	Inseticida	354,49	1	109	193	9,6	2,53 X 10 ⁻⁵	-
4,4 DDE	Organoclorado	Inseticida	318,03	0,09	109,5	350	6,02	1,35 X 10 ⁻⁶	-
Alacloro	Cloroacetamida	Herbicida	269,7	240	41	100	3,09	2,9	-
Aldrin	Ciclodienos	Inseticida	364,9	0,027	104	145	6,5	3	-
Clorpirifós etílico	Organofosforado	Inseticida	350,9	1,05	41,5	-	4,7	1,43	-
Clorpirifós metílico	Organofosforado	Inseticida, Acaricida	322,5	2,74	46	-	4	3	-
Crisoxim metílico	Estrobilurinas	Fungicida	313,35	2	102	-	3,4	2,30 x 10 ⁻³	4,2
DDT (o,p' - DDT + p,p' DDT)	Organoclorado	Inseticida	354,5	< 10	109	187	-	0,025	-
Endossulfan alfa	Organoclorado	Inseticida, Acaricida	406,9	0,32	109,2	401,3	4,74	6,22 x 10 ⁻⁶	-
Endossulfan beta	Organoclorado	Inseticida, Acaricida	406,9	0,32	80	-	4,75	0,83	-
Endossulfan sulfato	Organoclorado	Inseticida	422,9	0,48	-	-	3,66	-	-
Epoxiconazol	Organoclorado	Fungicida	329,76	7,1	136,7	-	3,3	1,00 x 10 ⁻²	-
Fenarimol	Pirimidina	Fungicida	331,2	13,7	119	240	-	-	-
Fenitrotiona	Organofosfato	Inseticida	277,2	14000	1	-	3,43	0,67	-
HCH - alfa	Organoclorado	Inseticida	290,83	2	159	288	3,82	5,99	-
HCH - beta	Organoclorado	Inseticida	290,82	5	314	60	3,78	3,6 x 10 ⁻⁷	-
HCH - gama (Lindano)	Organofosforado	Inseticida, Acaricida	290,8	-	113	323	3,17	5,6 x 10 ⁻⁵	-
Heptacloro	Organoclorado	Inseticida	373,32	0,056	95	-	5,44	-	-
Malationa	Organofosforado	Inseticida, Acaricida	330,3	148	-20	-	2,75	3,1	7,5
Miclobutanil	Triazol	Funficida	288,78	132	70,9	390,8	2,89	0,198	-

Mirex	Organoclorado	Inseticida	545,54	0,0001	485	-	5,28	-	-
Oxifluorfem	Difenil éter	Herbicida	361,7	0,116	85-90	358,2	4,47	0,0267	-
Parationa Etílica	Organofosforado	Inseticida, Acaricida	291,26	12,4	6,1	375	3,83	0,89	7,14
Parationa Metílica	Organofosforado	Inseticida	263,2	55	35-36	154	3,83	0,2	7,15
Pendimetalina	Dinitroanilina	Herbicida	281,3	0,33	54-58	-	5,2	4×10^{-3}	-
Pirimifós Etílico	Oranofosforados	Inseticida	305,34	2,3	15-18	-	4,8	$2,9 \times 10^{-4}$	4,3
Pirimifós Metílico	Organofosforados	Inseticida	305,33	5	15-18	-	4,12	1×10^{-4}	4,3
Propiconazol	Triazol	Fungicida	342,2	100	-23	99,9	3,72	$2,7 \times 10^{-2}$	1,09
Quintozeno	Clorofenil	Fungicida	295,3	0,44	143	328	4,46	12,7	1,09
Trifluralina	Dinitroanilina	Herbicida	335,5	0,221	49	-	4,83	$1,33 \times 10^{-4}$	-

Legenda:

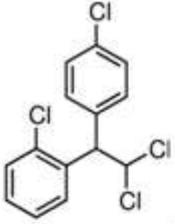
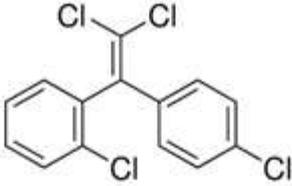
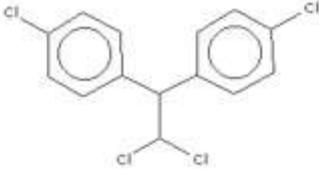
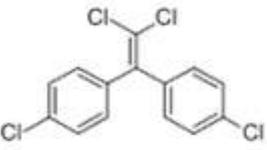
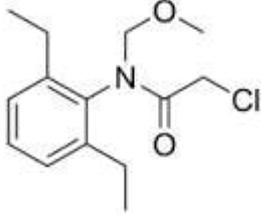
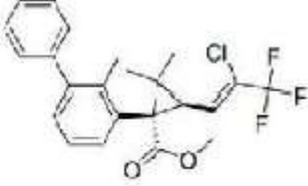
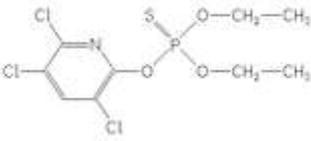
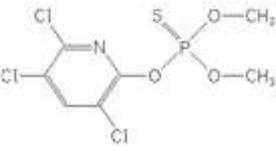
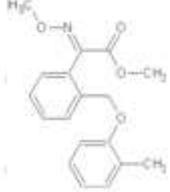
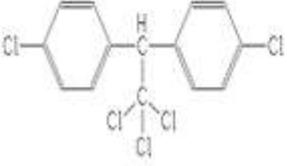
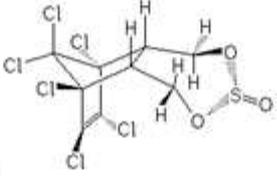
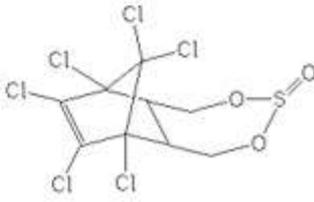
PF (°C). Ponto de Fusão

PE (°C). Ponto de Ebulição

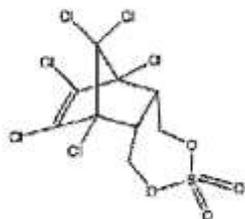
Log P ou Log Kow. Constantes de Partição Octanol/Água

PV. Pressão de Vapor

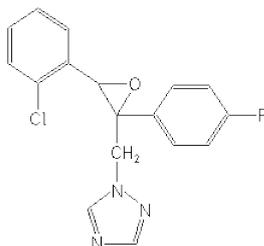
Anexo B. Fórmulas estruturais dos agrotóxicos avaliados

<p>2,4 DDD</p> 	<p>2,4 DDE</p> 	<p>4,4 DDD</p> 
<p>4,4 DDE</p> 	<p>Alacloro</p> 	<p>Bifentrina</p> 
<p>Clorpirifos etílico</p> 	<p>Clorpirifos metílico</p> 	<p>Cresoxim metílico</p> 
<p>DDT</p> 	<p>Endosulfan Alfa</p> 	<p>Endosulfan Beta</p> 

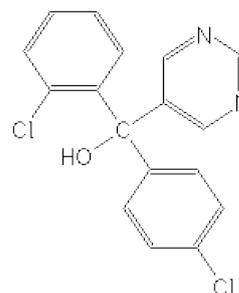
Endosulfan Sulfato



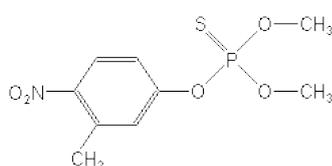
Epoxiconazole



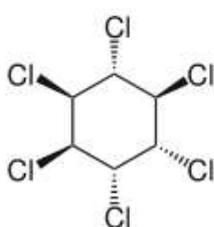
Fenarimol



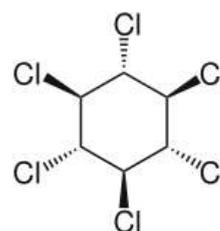
Fenitrotiona



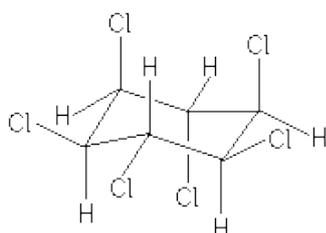
HCH Alfa



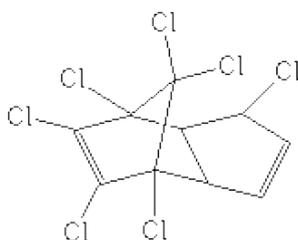
HCH Beta



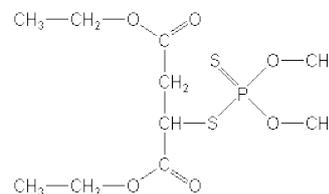
HCH Gama



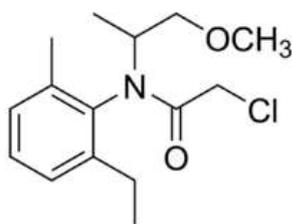
Heptacloro



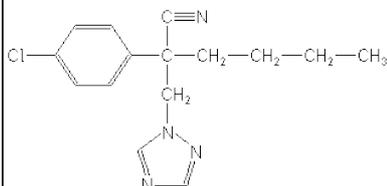
Malationa



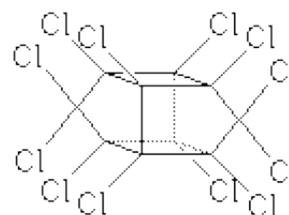
Metaloclor



Miclobutanil



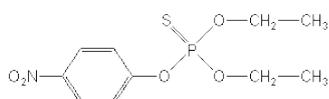
Mirex



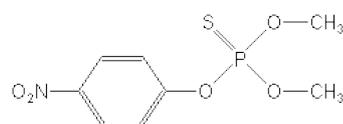
Oxifluorfen



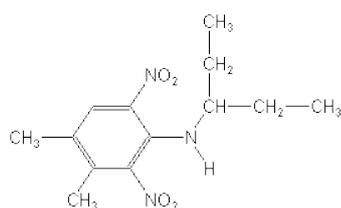
Parationa etílica



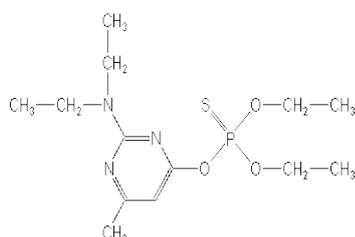
Parationa metílica



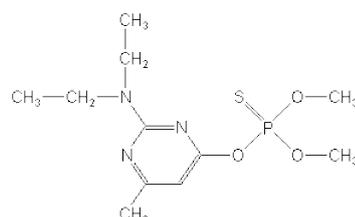
Pendimetalina



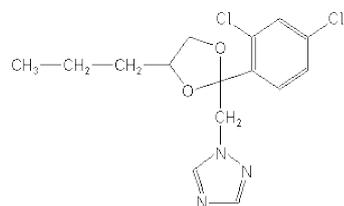
Pirimifos etílico



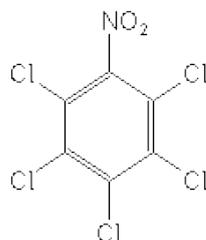
Pirimifos metílico



Propiconazol



Quintozeno



Trifluralina

