



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

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POTÁVEL  
USANDO SPE E DETERMINAÇÃO RÁPIDA POR  
LC-MS/MS E GC-MS/MS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Filipe Fagan Donato**

**Santa Maria - RS, Brasil  
2012**

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POTÁVEL  
USANDO SPE E DETERMINAÇÃO RÁPIDA POR  
LC-MS/MS E GC-MS/MS**

**Filipe Fagan Donato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal  
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do  
grau de  
**MESTRE EM QUÍMICA**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella**

**Santa Maria - RS, Brasil  
2012**

**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

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POTÁVEL USANDO SPE  
E DETERMINAÇÃO RÁPIDA POR LC-MS/MS E GC-MS/MS**

elaborada por

**Filipe Fagan Donato**

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

**Comissão Examinadora**

---

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

---

**Prof. Dr. Osmar Damian Prestes** (UNIPAMPA)

---

**Dr. Manoel Leonardo Martins** (UFSM)

Santa Maria, 31 de agosto de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
que me apoiam em todos os momentos da minha vida,  
aos meus irmãos que sempre torceram e torcem pela minha felicidade e  
ao meu amor Luana por ser tão especial para mim.  
AMO MUITO VOCÊS!!

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço pela orientação, pelo aprendizado, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), por ter acreditado em mim. Obrigado pela amizade construída durante estes anos de convivência. A você, minha gratidão e admiração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação, pelo aprendizado, participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa deste trabalho. Obrigado pela amizade e carinho desde quando comecei a fazer parte da família LARP, como costumamos dizer. A você, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes pela participação na defesa da dissertação, pelas excelentes sugestões e contribuições engrandecendo este trabalho. Obrigado pela amizade, pelos ensinamentos e atenção que me foram dedicados.

Ao Dr. Manoel Leonardo Martins pelas valiosas sugestões e comentários tanto no desenvolvimento, quanto no exame de qualificação e na defesa deste trabalho. Obrigado pela amizade, parceria, incentivo e ensinamentos nesses anos, colocando-se sempre à disposição para me ajudar.

À Luana, meu amor, muito obrigado por estar sempre ao meu lado me ajudando, me incentivando e me dando forças para vencer cada etapa. Agradeço pela paciência e compreensão nos momentos de minha ausência, pelo amor e carinho a mim dedicados. Obrigado por ser parte essencial em minha vida. Amo muito você!!!

Ao meu pai Darci e minha mãe Lenita pelo amor incondicional, pela força, carinho e torcida em todos os momentos da minha vida. Não tenho palavras para agradecer o quanto sou grato por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim, que Deus abençoe suas vidas. Vocês são a luz da minha vida, amo muito vocês!!!

A minha irmã Gabriela (carinhosamente chamada de “GG”) e meu cunhado Clever pelo amor, respeito, carinho, torcida, força e amizade. Vocês são muito especiais, obrigado por tudo, amo-os de paixão!!!

Ao meu irmão Diogo, minha cunhada Dani e meu amado sobrinho Davi, obrigado por fazerem parte de minha vida, pela torcida, amor, carinho, respeito e paixão. Meu irmão você sempre será uma referência para mim de honestidade, esforço e perseverança. Obrigado por tudo, amo muito vocês!!!

Aos meus sogros José e Elaide, juntamente com sua família agradeço pela torcida, apoio e carinho recebido nesses anos de convivência, a vocês muito obrigado!

A todos os meus colegas do LARP pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho. Em especial, às colegas Lucila e Magali pela ajuda que sempre me deram. Às colegas Giovana e Juliana minha gratidão pela amizade, incentivo e dedicação desde a realização dos primeiros ensaios de extração até a participação da “prévia” realizada dias antes da defesa. Obrigado pelo carinho e amizade por todos estes anos. Podem sempre contar comigo!

Aos meus amigos e colegas de graduação Leonardo (batata), Luis Felipe (anzol), Thiago Castro e Vitor Bolzan que mesmo distantes estão sempre torcendo pela felicidade e o sucesso de nós todos. Sucesso para nós!

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

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

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

A Deus, que tanto me ajudou e me ajuda, dando-me força, proteção, paciência e guiando-me os meus passos para eu realizar os meus sonhos, mostrando-me que tudo é possível, basta ter fé e acreditar.

## RESUMO

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

### RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POTÁVEL USANDO SPE E DETERMINAÇÃO RÁPIDA POR LC-MS/MS E GC-MS/MS

AUTOR: FILIPE FAGAN DONATO

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: 31 de agosto de 2012, Santa Maria.

O uso de agrotóxicos sempre esteve associado à efetividade no controle de pragas ou plantas invasoras para aumentar a produção de alimentos. No entanto, o uso indiscriminado dessas substâncias vem causando a degradação dos recursos hídricos. No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria 2914 define diversos parâmetros de potabilidade, entre eles, os limites máximos permitidos para alguns agrotóxicos. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método para a determinação de resíduos de 70 agrotóxicos em água potável, utilizando Extração em Fase Sólida (SPE) para o preparo de amostra e determinação por Cromatografia Gasosa e Líquida, acopladas à Espectrometria de Massas sequencial, com analisador triplo quadrupolo (GC-(TQ)MS/MS e LC-(TQ)MS/MS). Foram avaliados diferentes volumes de amostra, sorventes e solventes de eluição. Os melhores resultados foram obtidos com 100 mL de amostra acidificada em pH 2,5, cartucho SPE Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg/3 mL e diclorometano/metanol como eluente. As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 10 e 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com valores de  $r^2$  maiores que 0,99 para todos os compostos. Os valores de LOQ do método foram 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  para aldrin, dieldrin e clordano e de 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais compostos. Para avaliação da exatidão as amostras “branco” foram fortificadas em 0,5, 1,5 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e um nível extra em 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os compostos aldrin, dieldrin e clordano. O método apresentou boa precisão, com valores de RSD inferiores a 20% e boa exatidão, com recuperações entre 70 e 120%. Apenas os compostos metamidofós, aldicarbe, benfuracarbe, terbufós, benomil e tiofanato metílico não foram recuperados de forma adequada. O efeito matriz foi avaliado, mostrando-se superior a 10% para a maioria dos compostos. A fim de compensar este efeito, utilizou-se curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. O método validado foi aplicado em 12 amostras de água potável de diferentes características (rio, vertente, poço e água tratada), sendo que apenas uma das amostras de água de rio apresentou resíduos de lambda-cialotrina. Os resultados indicam que o método proposto é adequado à análise de resíduos de agrotóxicos em água potável, visto que todos os parâmetros de validação atenderam os limites e parâmetros sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras-chave: Agrotóxicos, SPE, água, LC-MS/MS, GC-MS/MS.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Chemistry Post-Graduate Program  
Federal University of Santa Maria

### PESTICIDE RESIDUES IN DRINKING WATER USING SPE AND RAPID DETERMINATION BY GC-MS/MS AND LC-MS/MS

AUTHOR: FILIPE FAGAN DONATO  
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Date and Place of Defense: Santa Maria, August 31<sup>th</sup>, 2012.

The use of pesticides always has been associated with the effective control of pests or invasive weeds to ensure an increase in the food production. However, the indiscriminate use of these substances has caused the degradation of water resources. In Brazil, the Ministry of Health through Ordinance 2914 defines several parameters of potability, among them, the maximum limits allowed for some pesticides. In this work it was developed and validated a method for the determination of residues of 70 pesticides in drinking water using (SPE) for sample preparation and determination by Gas and Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry, triple quadrupole analyzer (GC-(TQ)MS/MS and LC-(TQ)MS/MS). It was evaluated different sample volume, sorbents and solvent of elution. The best results were obtained using 100 mL sample acidified at pH 2.5, Oasis<sup>®</sup> SPE cartridge HLB 60 mg/3 mL and dichloromethane/methanol as eluent. Analytical curves were linear between 10 and 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ , with  $r^2$  values greater than 0.99 for all compounds. The values of method LOQ were 0.02  $\mu\text{g L}^{-1}$  for aldrin, dieldrin and chlordane and 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the other compounds. To evaluate accuracy the "blank" samples were fortified at 0.5, 1.5 and 4.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  and an extra level at 0.02  $\mu\text{g L}^{-1}$  for aldrin, dieldrin and chlordane. The method showed good precision, with RSD values below to 20% and good accuracy, with recoveries between 70 and 120%. Only the compounds methamidophos, aldicarb, benfuracarb, terbufos, benomyl and thiophanate methyl were not recovered adequately. The matrix effect was evaluated, showing upper 10% for the most compounds. In order to compensate this effect, analytical curves were obtained with standarts prepared in "blank" extracts of the matrix. The validated method was applied to 12 samples of drinking water of different characteristics (river, shed, well and treated water), and just one of the river samples presented residues of lambda-cyhalothrin. The results indicate that the proposed method is suitable for analysis of pesticides residues in drinking water, since all the validation parameters met the suggested limits and parameters for validation of chromatographic methods.

Keywords: Pesticides, SPE, water, LC-MS/MS, GC-MS/MS



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Agricultura do tipo “coivara”, praticada pelos indígenas. Fonte: REIFSCHNEIDER et al., 2012. ....	4
Figura 2 –	Participação dos estados brasileiros na produção nacional de grãos. Fonte: Adaptado de IBGE, 2012. ....	6
Figura 3 –	Ilustração de um cartucho típico empregado em SPE (adaptado de de VICARI, 2009).....	25
Figura 4 –	Etapas envolvidas na SPE: 1) condicionamento do adsorvente; 2) adição da amostra; 3) lavagem com água para remoção dos interferentes e 4) eluição do analito (adaptado de CALDAS et al., 2011).....	26
Figura 5 –	Esquema das principais partes de um Espectrômetro de Massas. (Adaptado de SKOOG, 2008). ....	36
Figura 6 –	Esquema de um analisador de massas, do tipo quadrupolo (Adaptado de SKOOG, 2008). ....	37
Figura 7 –	Esquema de um analisador de massas, do tipo Triplo Quadrupolo (TQ). Fonte: MARTINS (2010). ....	38
Figura 8 –	Esquema prático da fonte de ionização ESI (CHROMEDIA, 2011).....	43
Figura 9 –	Esquema prático da fonte de ionização APCI (CHROMEDIA, 2011).....	44
Figura 10 –	Esquema prático da fonte de ionização APPI (CHROMEDIA, 2011).....	45
Figura 11 –	Foto ilustrativa do sistema SPE utilizado para a concentração das amostras de água.....	69
Figura 12 –	Cromatograma do íon total obtido por GC-MS/MS para (A) amostra branco da matriz e (B) solução analítica no extrato da matriz, contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 75 µg L <sup>-1</sup> .....	81
Figura 13 –	Cromatograma MRM obtido por GC-MS/MS, com ionização EI, para uma solução analítica (100 µg L <sup>-1</sup> ) preparada em extrato da matriz (água de torneira) e suas respectivas transições de quantificação dos agrotóxicos: (A) parationa metílica; (B) aldrin; e (C) endossulfan alfa. ....	82

Figura 14 –	Cromatograma do íon total (A) da amostra “branco” da matriz e (B) da solução analítica no extrato da matriz na concentração $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , ambos obtidos por LC-MS/MS nas condições descritas no item 3.8.1. ....	85
Figura 15 –	Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM, de uma solução analítica ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), preparada no extrato da matriz e seus respectivos íons de quantificação e confirmação: A) 2,4 D; B) carbofurano; C) atrazina e D) 2,4,5 T. ....	87
Figura 16 –	Número de agrotóxicos recuperados em três diferentes faixas de recuperação para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5 e 6. ....	91
Figura 17 –	Número de agrotóxicos recuperados em três diferentes faixas de recuperação para os ensaios 7 e 8. ....	92
Figura 18 –	Números de agrotóxicos extraídos em três faixas de percentagem de recuperação e determinados por LC e GC nos ensaios 9, 10 e 11. ....	93
Figura 19 –	Quantidade de compostos recuperados no LC e no GC para os ensaios 12 e 13. ....	94
Figura 20 –	Percentagem de recuperação dos compostos extraídos nos ensaios 14, 15 e 16 determinados por LC e no GC. ....	95
Figura 21 –	Resultados obtidos nos ensaios 17, 18 e 19 considerando a quantidade de agrotóxicos extraídos em três diferentes faixas de percentagem de recuperação. ....	96
Figura 22 –	Número de compostos para cada faixa de recuperação, considerando a determinação por LC ou GC, para o ensaio 20. ....	97
Figura 23 –	Representação esquemática do procedimento de extração em fase sólida (SPE), utilizado na extração dos agrotóxicos em água. ....	99
Figura 24 –	Curvas analíticas para os agrotóxicos: (A) alaclor determinado por GC-MS/MS e (B) tebuconazol determinado por LC-MS/MS, ambos preparados tanto em solvente quanto no extrato da matriz. ....	120

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Classificação quanto à classe toxicológica dos agrotóxicos. ....	14
Tabela 2 –	Agrotóxicos e VMP listados na Portaria 2914 .....	16
Tabela 3 –	Guia para escolha de uma fase sólida adequada. ....	29
Tabela 4 –	Aplicação da extração em fase sólida na determinação de substâncias químicas em água. ....	30
Tabela 5 –	Compostos selecionados neste estudo, grau de pureza (%), grupo químico, classe e propriedades físico-químico. ....	58
Tabela 6 –	Gradiente utilizado para eluição dos compostos.....	66
Tabela 7 –	Ensaio realizado para a otimização do preparo de amostra utilizando SPE.....	71
Tabela 8 –	Agrotóxicos determinados por GC-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo MRM com seus respectivos segmentos de análises, tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação. ....	83
Tabela 9 –	Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção ( $t_R$ ), modo de ionização ESI (+/-), íons precursores e produtos e energias de colisão. ....	88
Tabela 10 –	Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) preparados no extrato da matriz para todos os agrotóxicos determinados por LC e GC. ....	101
Tabela 11 –	Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método.....	105
Tabela 12 –	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração dos 72 agrotóxicos, nos níveis de concentração de 0,5, 1,5 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	106
Tabela 13 –	Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método SPE, no nível de fortificação de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 3) .....	112
Tabela 14 –	Efeito matriz dos agrotóxicos avaliados por LC-(ESI)MS/MS e GC-(EI)MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e na matriz branco. ....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4,5-T	– Triclorofenoxiacético
2,4-D	– Ácido diclorofenoxiacético
a	– Coeficiente angular
A	– Acaricida
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	– Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	– Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric pressure Photoionization</i>
b	– Coeficiente linear
C <sub>18</sub>	– Sílica modificada com hidrocarboneto linear C <sub>18</sub> , octadecilsilano
CEPEA	– Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CI	– Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CONAMA	– Conselho Nacional de Meio Ambiente
d.i	– Diâmetro interno
DDD	– Diclorodifenildicloroetano
DDE	– Diclorodifeniletileno
DDT	– Diclorodifeniltricloroetano
DL 50	– Dose Letal para 50% dos organismos testes
DQ	– Departamento de Química
EI	– Ionização por Elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI's	– Equipamento de Proteção Individuais

ESI	– Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
ESI(+)	– Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês <i>Electrospray Ionization Positive Mode</i>
ESI(-)	– Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês <i>Electrospray Ionization Negative Mode</i>
eV	– Elétrons volt
F	– Fungicida
FAO	– Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GC	– Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC-MS/MS	– Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Tandem Mass</i>
H	– Herbicida
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	– Inseticida
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
$K_H$	– Constante da Lei de Henry
$K_{oc}$	– Coeficiente de adsorção a matéria orgânica do solo
$K_{ow}$	– Coeficiente de partição octanol água
LARP	– Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC	– Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	– Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
LOD	– Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
$LOD_i$	– Limite de Detecção do instrumento, do inglês <i>Limit of Detection of the Instrument</i>

LOD <sub>m</sub>	– Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Detection of the method</i>
LOQ	– Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQ <sub>i</sub>	– Limite de Quantificação do instrumento, do inglês <i>Limit of Quantification of the Instrument</i>
LOQ <sub>m</sub>	– Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Quantification of the method</i>
M.M	– Massa molar
m/z	– Razão massa carga
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	– Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	– Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	– Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Mass Spectrometry in tandem</i>
n	– Número de replicatas
N <sub>2</sub>	– Nitrogênio
PE	– Ponto de ebulição
PF	– Ponto de Fusão
pH	– Potencial hidrogeniônico
PI	– Padrão Interno
PIB	– Produto Interno Bruto
pKa	– Constante de dissociação ácida
pKb	– Constante de dissociação básica
PS	– Padrão de Substituição
PTFE	– Politetrafluoretileno
PV	– Pressão de Vapor
r	– Coeficiente de Correlação
r <sup>2</sup>	– coeficiente de determinação
rec	– Recuperação
RSD	– Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD <sub>PI</sub>	– Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
S/R	– Relação sinal ruído

SANCO	– Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>
SIM	– Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SINDAG	– Sindicato Nacional da Indústria de defensivos Agrícolas
SINITOX	– Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas
SPE	– Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
TPP	– Trifenilfosfato
TQ	– Triplo quadrupolo
$t_R$	– tempo de retenção
UFSM	– Universidade Federal de Santa Maria
v/v	– Volume por volume
VMP	– Valor Máximo Permitido

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Estruturas dos solventes avaliados neste trabalho.....	139
Anexo II – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados nesse trabalho.....	140



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>A evolução da Agricultura no Brasil.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Produtividade agrícola atual no Brasil .....	5
<b>2.2</b>	<b>Definição dos Agrotóxicos .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Histórico e uso dos Agrotóxicos .....	8
2.2.2	Classificação dos Agrotóxicos .....	10
2.2.3	Toxicidade dos Agrotóxicos.....	14
<b>2.3</b>	<b>Legislações relacionadas ao uso e qualidade das águas: .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Contaminação Ambiental por Resíduos de Agrotóxicos.....</b>	<b>18</b>
2.4.1	Contaminação das águas por resíduos de agrotóxicos:.....	19
2.4.2	Ocorrência de resíduos de agrotóxicos em água superficiais .....	21
<b>2.5</b>	<b>Preparo de amostra empregando SPE para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água.....</b>	<b>24</b>
2.5.1	Procedimento de Extração em Fase Sólida.....	25
2.5.1.1	Condicionamento do cartucho .....	27
2.5.1.2	Introdução da amostra.....	27
2.5.1.3	Limpeza ( <i>Clean-up</i> ) do cartucho de SPE .....	27
2.5.1.4	Eluição dos analitos adsorvidos .....	28
2.5.2	Fase Sólida ou Sorventes.....	28
2.5.3	Utilização da SPE na extração de resíduos agrotóxicos em água .....	29
<b>2.6</b>	<b>Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de agrotóxicos em água.....</b>	<b>34</b>
2.6.1	Analísadores de Massas .....	36
2.6.2	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	40
2.6.3	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas .....	41
2.6.4	Padrão Interno e Padrão de Substituição ( <i>surrogate</i> ) .....	45
<b>2.7</b>	<b>VALIDAÇÃO DE MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
2.7.1	Seletividade .....	47
2.7.2	Exatidão.....	48
2.7.3	Precisão.....	48
2.7.4	Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ) .....	50
2.7.5	Curva analítica e linearidade .....	50
2.7.6	Efeito Matriz.....	52
2.7.6.1	Efeito Matriz em Cromatografia Líquida .....	52
2.7.6.2	Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa.....	53
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Instrumentação.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Gases Utilizados.....</b>	<b>55</b>

<b>3.3</b>	<b>Reagentes, solventes e materiais utilizados.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4</b>	<b>Amostras Branco.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Agrotóxicos Seleccionados.....</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Seleção do padrão interno e do padrão de substituição .....</b>	<b>64</b>
<b>3.7</b>	<b>Preparo dos padrões analíticos utilizados.....</b>	<b>64</b>
<b>3.8</b>	<b>Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS e GC-MS/MS para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água.....</b>	<b>65</b>
3.8.1	Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS.....	66
3.8.1.1	Escolha da fase móvel .....	66
3.8.1.2	Condições do sistema de detecção.....	66
3.8.2	Otimização do Sistema Cromatográfico GC-MS/MS.....	67
3.8.2.1	Condições cromatográficas .....	67
3.8.2.2	Otimização do sistema de detecção.....	67
<b>3.9</b>	<b>Otimização do sistema de Extração em Fase Sólida (SPE) para a análise de resíduos de agrotóxicos em água .....</b>	<b>68</b>
3.9.1	Escolha do cartucho (sorvente) para a etapa de concentração.....	69
3.9.2	Escolha do solvente de eluição dos agrotóxicos de interesse.....	69
<b>3.10</b>	<b>Validação do método SPE para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água.....</b>	<b>75</b>
3.10.1	Seletividade .....	75
3.10.2	Linearidade e Curvas Analíticas .....	75
3.10.3	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	76
3.10.4	Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão .....	76
3.10.5	Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária .....	77
3.10.6	Avaliação do Efeito Matriz .....	78
<b>3.11</b>	<b>Aplicação do método desenvolvido em amostras reais .....</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos em estudos por GC-MS/MS .....</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>Otimização do sistema LC-MS/MS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>Seleção das melhores condições para a SPE.....</b>	<b>90</b>
4.3.1	Otimização do método SPE.....	96
<b>4.4</b>	<b>Método de extração otimizado .....</b>	<b>97</b>
<b>4.5</b>	<b>Validação do método SPE com análise por LC-MS/MS e GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em água .....</b>	<b>100</b>
4.5.1	Seletividade do método .....	100
4.5.2	Curva analítica e Linearidade.....	100
4.5.3	Determinação dos valores de LOD e LOQ, do método e do instrumento.....	104
4.5.4	Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade).....	105
4.5.5	Precisão Intermediária.....	112
4.5.6	Avaliação do efeito matriz.....	115
<b>4.6</b>	<b>Aplicação do Método .....</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento econômico do Brasil sempre esteve atrelado à agricultura, atualmente este setor gera empregos para 22% da população, além de que 20% das exportações são de produtos agrícolas e 15% do PIB (Produto Interno Bruto) são representados pela agricultura. No primeiro semestre de 2012 o Brasil obteve uma produção da ordem de 165,9 milhões de toneladas de cereais, leguminosas e oleaginosas, isto em 50,8 milhões de hectares de área plantada (IBGE, 2012).

Este cenário é favorecido por diversos fatores, entre eles, o clima favorável, típico de país tropical, que possibilita duas ou mais safras por ano; a disponibilidade de recursos hídricos, possuindo a maior reserva de água doce do planeta; a demanda mundial por alimentos em contínuo crescimento; o alto potencial para consumo interno, com aumento de renda da população; além de avanços consideráveis em pesquisa e desenvolvimento ao longo das últimas décadas (LONDRES, 2011).

Neste sentido, o país demonstra seu protagonismo agrícola que não só o impulsiona a novos patamares como também impõe desafios cada vez maiores à cadeia produtiva. O grande sucesso de toda essa produtividade está diretamente associado aos avanços tecnológicos, juntamente com o uso de fertilizantes químicos, que enriquecem a terra e recuperam os solos empobrecidos pela constante utilização, bem como o uso de agrotóxicos que permite controlar diversas pragas, potencializando o cultivo (LONDRES, 2011).

Entretanto, o uso frequente e muitas vezes incorreto dessas substâncias químicas pode causar grandes danos ambientais, principalmente quanto à contaminação dos sistemas hídricos superficiais e subterrâneos (SPADOTTO, 2004). Atento a isso, o Ministério da Saúde editou a Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011). Estabelecendo e regulamentando, entre outros parâmetros, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos permitidos em águas destinadas ao consumo humano.

Desta forma, é de suma importância o desenvolvimento de métodos que apresentem elevada detectabilidade e seletividade, rapidez e alto nível de confiabilidade analítica para que possam ser utilizados no monitoramento destes compostos.

Neste sentido, a técnica de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é uma das mais indicadas, por apresentar altas porcentagens de recuperação do analito, boa robustez e aumentar a concentração dos compostos (REZAEI *et al.*, 2010). Assim como, a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*), que são técnicas de separação dos constituintes de uma matriz complexa, cuja aplicação permite boa seletividade, possibilitando separações de um grande número de compostos em tempos de análise adequados (LANÇAS, 2009).

Somado a isso, o acoplamento da cromatografia com a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) tem se destacado pela sua versatilidade de uso em ambas as técnicas (GC e LC), além de apresentar aumento da seletividade e obtenção de informações estruturais dos compostos (LANÇAS, 2009).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para a determinação de resíduos de 70 agrotóxicos em água potável, utilizando SPE para o preparo de amostra e determinação por GC-MS/MS e LC-MS/MS, e aplicá-lo em amostras reais de diferentes características (água de rio, vertente, lago, poço, etc.).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A evolução da Agricultura no Brasil

A agricultura no Brasil foi registrada desde a era primitiva e é considerada, historicamente, um dos pilares da economia no país. Observa-se sua evolução no cenário nacional, desde a cultura agrícola primordial praticada pelos indígenas ao mais incrementado processo do agronegócio. Neste sentido, o Brasil vem expandindo sua vocação agrícola, sobretudo pela melhoria da qualidade produtiva.

Durante muito tempo, os indígenas praticaram uma agricultura de subsistência diversificada, do tipo "coivara", um regime agrícola rudimentar tradicional, no qual se iniciava o plantio com a derrubada da mata nativa seguida pela queima da vegetação para converter a biomassa vegetal em cinzas, ricas em nutrientes para o solo (Figura 1). Nessas áreas cultivavam mandioca, milho, feijão, abóbora, batata-doce, amendoim, etc. (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2012).

As técnicas de preparo e uso do solo existentes eram muito rudimentares e exigiam geralmente o emprego de "queimadas", o ciclo de fertilidade do solo era bastante curto, o que contribuía para estimular o lado destruidor desse modelo, resultando na exploração temporária de trechos da floresta. Exaurida aquela porção de terra, a comunidade procurava, então, outro trecho para desbravar, causando a derrubada de grandes áreas de mata nativa (LOPES & MOTA, 2008).

Com o passar dos tempos foram se desenvolvendo novas maneiras de manejo e reaproveitamento do solo, possibilitando a obtenção da produtividade em áreas anteriormente utilizadas, agregando vegetais da própria cultura como adubo orgânico, para enriquecer o solo e torná-lo novamente fértil (MAIRESSE & COSTA, 2009).



Figura 1 – Agricultura do tipo “coivara”, praticada pelos indígenas. Fonte: REIFSCHNEIDER et al., 2012.

Aliado a isto, a agricultura brasileira teve um grande avanço com a chegada dos colonizadores, que trouxeram diversidades de espécies animais e vegetais e que, souberam juntamente com os povos aqui existentes desenvolver uma riquíssima atividade agroprodutiva nesta região tropical (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2012).

A partir de 1532 com o início do ciclo da cana-de-açúcar somado a outras culturas existentes na época, como algodão e cacau, o Brasil começa a ganhar mais expressividade na agricultura, com o aumento das exportações de açúcar de cana para a Europa (MAIRESSE & COSTA, 2009).

Após longo período de grande produtividade, houve uma queda nas exportações de algodão, açúcar e cacau, com isso o café tornou-se o principal produto de exportação brasileiro, sendo também muito consumido no mercado interno. Fato este, que impulsionou o crescimento agrícola em 1800 até 1930, quando a produção do café, deixa de ser preferencialmente litorânea e começa a adentrar no país, principalmente em regiões como São Paulo e Rio de Janeiro (MAIRESSE & COSTA, 2009; BAER, 2002).

Com o processo de urbanização em plena evolução, e a incapacidade do modelo de exploração agrícola tradicional de gerar excedentes suficientes para alimentar os centros urbanos, o governo decidiu adotar uma ampla reformulação da política agrícola existente para promover a expansão e modernização da produção de grãos em escala nacional. (COELHO, 1998).

Este objetivo foi alcançado e essa fase caracterizou-se pelo notável crescimento da produção, induzido pelo uso intensivo de alguns instrumentos de Política Agrícola, como o Crédito Rural e a Política de Garantia de Preços Mínimos. Assim, pretendia-se passar de uma agricultura tradicional, totalmente dependente da natureza e praticada por meio de técnicas rudimentares, para uma agricultura mecanizada (COELHO, 1998).

Observou-se então uma nova era na agricultura com os resultados de uma política agrícola baseada na mecanização e modernização, em cultivares de alto potencial de rendimento, em técnicas de irrigação e, no uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos) visando a elevação da produtividade (TREVISAN, 2002). Dada a crescente importância universal de alguns parâmetros tecnológicos, ambientais e mesmo de mercado, pode-se dizer que o Brasil vem aumentando suas plantações e elevando sua produtividade.

### 2.1.1 Produtividade agrícola atual no Brasil

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2012) o Brasil obteve uma produção de 165,9 milhões de toneladas de cereais, leguminosas e oleaginosas. Isto tudo em uma área de 50,3 milhões de hectares. As principais culturas, que somadas representam 90,7% de toda produção são o arroz, o milho e a soja, que respondem 83,1% da área a ser colhida, com uma previsão de 119,5 milhões de toneladas na produção para esse grupo de grãos em 2012.

Entre as grandes regiões, esse volume da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas apresenta a seguinte distribuição: região Centro-Oeste, 60,3 milhões; Sul 57,9 milhões; Sudeste, 18,3 milhões; Nordeste 16,7 milhões e Norte 4,3 milhões de toneladas (IBGE, 2012).

Observa-se, na Figura 2, que o estado do Mato Grosso, lidera como maior produtor nacional de grãos, no primeiro semestre de 2012, com uma participação de 22,3%, seguido pelo Paraná, com 19,2% e Rio Grande do Sul, com 13,4%, estados estes que somados representam 54,9% do total nacional (IBGE, 2012).

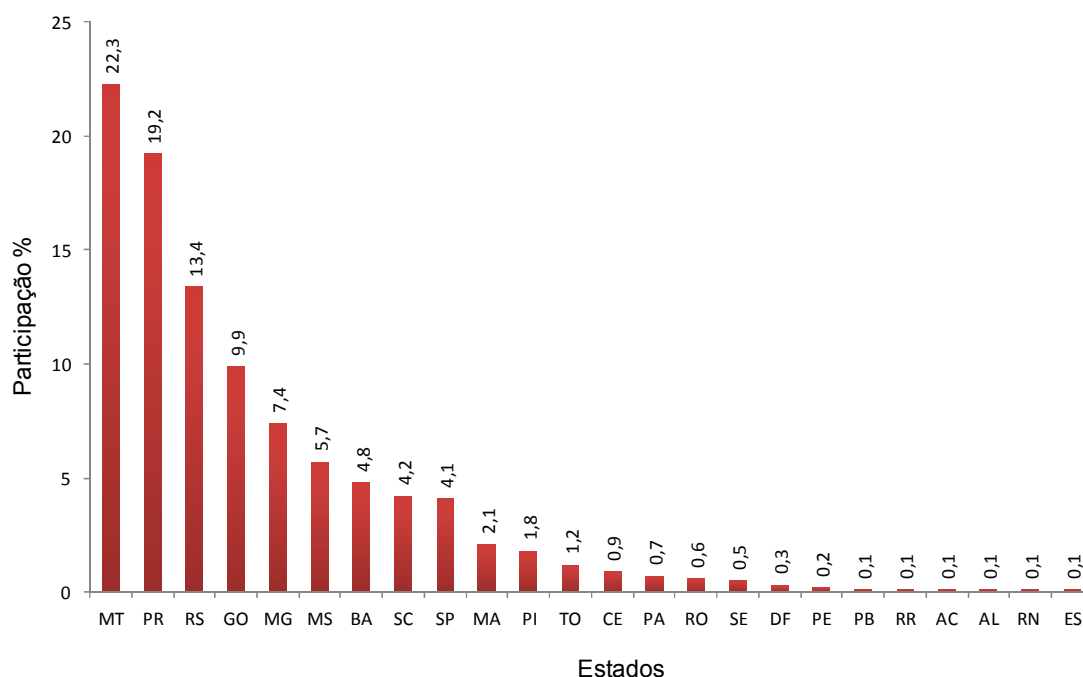


Figura 2 – Participação dos estados brasileiros na produção nacional de grãos. Fonte: Adaptado de IBGE, 2012.

No que se refere à cultura de arroz irrigado o maior produtor é o estado do Rio Grande do Sul, com uma participação de 65,3% da produção nacional. Diferentemente da soja na qual o estado ocupa o quarto lugar na produção nacional com 11,3% na safra de 2012, apresentando uma redução na produtividade de 6,1% em relação à safra de 2011. Isto pode ser explicado pelas consequências das adversidades climáticas ocorridas durante o ciclo da cultura como a estiagem. A região Centro-Oeste, maior produtora do Brasil, é responsável por 51,7% da produção neste ano e tendo como maior produtor nacional o estado do Mato Grosso com uma produção de 22 milhões de toneladas.

No Brasil o agronegócio (agricultura + pecuária) foi responsável em 2011 por 22,15% do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro, sendo que, sozinha a agricultura participou com 15,42% e a pecuária com 6,73%. A receita bruta esperada para a agricultura nacional para o ano de 2012 é ainda maior, podendo chegar a aproximadamente 239,1 bilhões de reais, com alta de 3% sobre a de 2011 (CEPEA, 2012).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2011) em 2020, a produção de grãos (soja, milho, trigo, arroz e feijão) deverá



passar de 142,9 milhões de toneladas em 2010/2011 para 175,8 milhões em 2020/2021. O que significa um acréscimo de 33 milhões de toneladas à produção nacional.

No entanto, só é possível obter toda esta produtividade com um importante conjunto de inovações tecnológicas disponíveis nos últimos anos, juntamente com a utilização de agrotóxicos e fertilizantes químicos, resultando em um impacto positivo e crescente no desenvolvimento agrícola e na economia do Brasil.

Conforme o IBGE (2012) na safra de 2011 no Brasil foi plantado 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana-de-açúcar e algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos). O que corresponde a cerca de 853 milhões de litros de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas.

Ainda cabe ressaltar que a soja foi o cultivo que mais demandou agrotóxicos na sua produção, cerca de 40% do volume total de herbicidas, inseticidas e acaricidas. Em segundo lugar no ranking de consumo está o milho com 15%, seguido pela cana e o algodão com 10%, depois os cítricos com 7%, e o café, trigo e arroz com 3% cada (ANVISA, 2011).

A necessidade do uso de agrotóxicos sempre esteve associada à efetividade no controle de pragas, doenças e plantas invasoras, com a finalidade de obter melhores rendimentos na agricultura e garantir um aumento no volume de produção de alimentos (VEIGA *et al.*, 2006). Além de auxiliar a suprir a demanda por alimentos de uma população de aproximadamente seis bilhões de pessoas esses compostos também proporcionam um incremento econômico aos países em desenvolvimento.

Porém, o uso intensivo e, muitas vezes, incorreto provoca o acúmulo dessas substâncias nos alimentos, no solo, na água (rios, lagos, lençol freático) e no ar, causando danos irreparáveis à saúde humana e ao meio ambiente.

## **2.2 Definição dos Agrotóxicos**

Os termos agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e até biocidas são denominações dadas às substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas ao controle de pragas e doenças de plantas.

A Lei Federal n. 7.802, de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto n°. 4.074, de 04/01/2002, em seu artigo 2°, inciso I, define o termo “agrotóxico” como sendo:

Os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2001), agrotóxico significa qualquer substância utilizada para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que devam estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos e rações animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante a estocagem e transporte. São excluídos desse conceito os fertilizantes, nutrientes animais e/ou vegetais, aditivos alimentares e medicamentos de uso veterinário (FAO, 2005).

Para SPADOTTO *et al.*, (2004), agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar. Estes processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos, assim, o efeito pode então atingir não só o organismos que se espera controlar, como também outros seres que possam afetar a produtividade.

### 2.2.1 Histórico e uso dos Agrotóxicos

O uso de agrotóxicos para controle de pragas é tão antigo quanto à própria agricultura. Desde as antigas civilizações gregas, romanas e chinesas já conheciam

há três mil anos atrás, a capacidade do pó de enxofre em controlar insetos e do sal (NaCl) para matar ervas daninhas (COUTINHO *et al.*, 2006).

Há mais de 2 mil anos os agricultores utilizavam substâncias para prevenir os danos causados por pragas. A qualidade da produção agrícola sempre foi e ainda é intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas. Desta forma, torna-se necessária a utilização de agrotóxicos de diversas classes químicas (PRESTES, 2009).

A utilização dos agrotóxicos na agricultura inicia-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológicos (OPAS, 1996). No início dos anos 50, ocorreu a introdução de inseticidas organofosforados, tais como: parationa metílica, metamidofós, entre outros (FENIK; MACIEJ & BIZIUK, 2011).

No mundo, o uso de agrotóxicos sintéticos para o controle de pragas, iniciou-se a partir do ano de 1939, quando Paul Muller descobriu as propriedades inseticidas do DDT, sintetizado em 1874 pelo químico alemão Zeidler (MARICONE, 1977).

A partir daí, nas décadas de 40 e 50 as indústrias químicas produziram vários outros princípios ativos utilizados principalmente como inseticidas, sendo na sua maioria agrotóxicos organoclorados (SHMITZ, 1996). As culturas do café e algodão foram as responsáveis pela introdução no Brasil dos chamados inseticidas sintéticos. A demanda para esses produtos levou ao aparecimento da indústria brasileira de formulações, em 1948, que importava os ingredientes ativos e os misturavam a inertes para adequar a sua aplicação no campo (LARA & BATISTA, 1992).

O uso excessivo dos agrotóxicos está diretamente relacionado com a política agrícola do país, que foi adotada a partir da década de 1960. Com a chamada Revolução Verde, que representou uma mudança tecnológica e química no modo de produção agrícola, o campo passou por uma “modernização” que impulsionou o aumento da produção, mas de forma extremamente dependente do uso dos pacotes agroquímicos – adubos, sementes melhoradas e agrotóxicos (COELHO, 1998).

No Brasil, a década de 70 foi a época da grande expansão da produção e do uso de agrotóxicos, em razão dos incentivos para a produção agrícola e da política de exportação. Nesta fase a elevação do custo da mão-de-obra no setor agrícola e o êxodo rural estimularam o controle químico na eliminação das plantas daninhas e os herbicidas passaram a ser cada vez mais empregados (LARA & BATISTA, 1992).

O Brasil é um dos países com maior evolução no consumo de agrotóxicos. Segundo EMBRAPA (2012) o que faz do Brasil um grande consumidor de agrotóxicos é o fato de ser um país tropical e com isso, o país faz duas safras por ano, o que não é possível nos países frios.

No ano de 2011 as indústrias obtiveram vendas recordes de agrotóxicos somando 14,1 bilhões de reais, um aumento de 11% em relação ao ano de 2010 (SINDAG, 2011).

No início dos anos 2000 o uso de agrotóxicos na agricultura passou por um processo de mudanças, os herbicidas representavam 50% do uso de agrotóxicos nas lavouras, onze anos depois o percentual caiu para 33%. A utilização de fungicidas, no entanto, subiu de 16% para 27% no período, principalmente devido o aparecimento de novas doenças, como por exemplo, a ferrugem da soja (SINDAG, 2011).

Segundo pesquisas mais recentes publicadas pelo SINDAG (2012) – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, os produtores rurais brasileiros estão usando mais agrotóxicos em suas lavouras. Apesar do expressivo crescimento da área cultivada com sementes transgênicas, tecnologia que promete reduzir o uso de agrotóxicos na produção agrícola, as vendas desses produtos aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012 – de 480,1 mil para 826,7 mil toneladas. As vendas de agrotóxicos movimentaram quase US\$ 8,5 bilhões no Brasil em 2011, representando o dobro do apurado em 2005. Trata-se do segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (SINDAG, 2012).

### 2.2.2 Classificação dos Agrotóxicos

O Decreto nº 4.074/02 (BRASIL, 1989) determina que os agrotóxicos devam ser divididos em classes, com o intuito de diferenciá-los em função de sua utilização, seu modo de ação e seu potencial. De acordo com BARBOSA (2004), os agrotóxicos podem ser classificados por finalidade de uso ou ao organismo que eliminam ou controlam, como:

**Inseticidas:** controle de insetos.

**Fungicidas:** controle de fungos.

**Herbicidas:** controle de plantas daninhas.

**Acaricidas:** controle de ácaros.

**Bactericidas:** controle de bactérias.

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto à sua persistência, avaliada pelo tempo de meia vida, que é o tempo necessário, após aplicação, para que tenha sua eficácia reduzida em 50%. Considera-se persistência curta (até 90 dias); média (de 91 a 180 dias) e longa (maior que 180 dias). O deslocamento dos agrotóxicos no meio ambiente durante sua meia vida pode ser pequeno (até 20 cm); médio (21 a 60 cm) ou grande (maior que 60 cm) (SANCHES, 2003 & ANVISA, 2005).

As principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos são: solubilidade em água, coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico ( $K_{oc}$ ), constante de dissociação ácida do composto (pKa), pressão de vapor (PV), constante da lei de Henry ( $K_H$ ), coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) no solo e na água (CABRERA *et al.*, 2008).

Segundo SILVA & FAY (2004), a solubilidade em água é uma propriedade importante nos processos ambientais, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do agrotóxico em ser carregado junto com as águas de escoamento superficiais e assim atingir os rios ou mesmo percolando pela coluna do solo e contaminando as águas subterrâneas. Agrotóxicos com valores de solubilidade menor ou igual que  $50 \text{ mg L}^{-1}$  apresentam baixa solubilidade; valores entre 50 e  $500 \text{ mg L}^{-1}$  solubilidade moderada e valores acima que  $500 \text{ mg L}^{-1}$  agrotóxicos com alta solubilidade (SABIN, 2007).

Através do coeficiente de adsorção ( $K_{oc}$ ) é possível prever se o agrotóxico possui tendência de ficar adsorvido na matéria orgânica do solo. O valor  $K_{oc}$  mede a tendência que um composto químico tem de sofrer partição entre a fase sólida e a solução do solo no sistema solo-água (BARCELÓ & HENNION, 2003). Este parâmetro possui grande relevância ambiental, pois através do valor  $K_{oc}$  pode-se avaliar a possível lixiviação dos compostos até as águas subterrâneas (CALDAS; ZANELLA; PRIMEL, 2011). Agrotóxicos com valores inferiores a  $15 \text{ mL g}^{-1}$  são considerados altamente móveis; valores entre 15 e  $75 \text{ mL g}^{-1}$  móvel; valores entre 500 e  $4000 \text{ mL g}^{-1}$  levemente móveis e valores acima de 4000 agrotóxicos não-móveis (SABIN, 2007).

Os valores de constantes de dissociação ácida (pKa) têm efeito sobre a solubilidade do agrotóxico e, através do pKa da substância e do pH do solo, é

possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um agrotóxico ácido e a mesma relação pode ser obtida usando  $pK_b$  (constante de dissociação básica) para agrotóxicos básicos (BARCELÓ & HENNION, 2003). Os agrotóxicos iônicos se comportam diferentemente dos agrotóxicos não-iônicos. Por isso, é importante saber quais agrotóxicos são susceptíveis de ionização, dentro de uma faixa normal de pH de 5-8 no solo e água. Uma vez que os solos têm uma tendência a serem carregados negativamente, os compostos aniônicos poderão sofrer facilmente o processo de lixiviação, e os compostos catiônicos serão fortemente retidos. Este conhecimento também é importante para realizar análises de resíduos de agrotóxicos em água, porque é mais fácil extrair um composto não-iônico do que um iônico. Um simples ajuste de pH pode ajudar muito na recuperação na etapa de extração, o que requer um conhecimento do valor da constante de ionização. A solubilidade em água de uma espécie iônica é sempre muito maior do que a da sua forma não-iônica. Quanto maior seu valor de  $pK_a$ , mais fraco é o ácido e a tendência para ser ionizado (CALDAS; ZANELLA; PRIMEL, 2001).

Já a constante da Lei de Henry ( $K_H$ ), que também é chamada de coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (PV) mostra a tendência do agrotóxico a volatilizar ou permanecer na fase aquosa dependendo da temperatura (SILVA & FAY, 2004). Quando a constante de Henry for maior que 100, mostra que a substância é volátil, quando apresentar um valor menor que 0,1 é não-volátil e quando o valor estiver entre estes dois diz-se que a substância é moderadamente volátil. Os agrotóxicos que possuem pressão de vapor (20 °C) menor que  $1 \times 10^{-6}$  Pascal (Pa), não são voláteis; valores entre  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-6}$  Pa, indicam volatilidade moderada e os que possuem valores maiores que  $1 \times 10^{-4}$  Pa são considerados voláteis (SABIN, 2007).

O coeficiente de partição octanol-água, geralmente expresso como  $\text{Log } K_{ow}$  ou  $\text{Log } P$ , relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando a tendência à bioconcentração de uma substância química, sendo usado na identificação dos agrotóxicos que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ & HENNION, 2003). Geralmente é considerado que as substâncias com valor de  $\text{Log } K_{ow}$  superior a 3 podem se bioacumular (CALDAS; ZANELLA; PRIMEL, 2001). Ainda pode ser classificado como: valores menores que 2,7 baixa bioacumulação e entre 2,7 e 3,0, bioacumulação moderada (SABIN, 2007).

Do ponto de vista da composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural, porém muitos deles apresentam alguma característica em comum, sendo assim, classificados dentro de um mesmo grupo. Os grupos mais conhecidos são representados pelos organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Estas denominações estão relacionadas com as características estruturais dos compostos, ou seja, com a natureza dos elementos químicos presentes em sua composição (BARBOSA, 2004).

**Organoclorados:** São os pioneiros dos agrotóxicos sintéticos. De acordo com a estrutura molecular, correspondem a hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano e/ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido. Possuem solubilidade muito baixa em água, a não ser que oxigênio ou nitrogênio encontrem-se também nas moléculas (BAIRD, 2002).

**Organofosforados:** Estes foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistências. Quanto a sua estrutura molecular, são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo. São compostos biodegradáveis e, portanto apresentam curta persistência no solo. A hidrólise sob condição de alcalinidade é o principal meio de degradação no ambiente (JOKANOVIC, 2001).

**Carbamatos:** São agrotóxicos orgânicos derivados do ácido carbâmico e podem ser inseticidas, herbicidas ou fungicidas. Geralmente são compostos instáveis e vários fatores influenciam a degradação, como por exemplo, umidade, temperatura, luminosidade e volatilidade (BARBOSA, 2004).

**Piretróides:** São compostos sistêmicos, análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo. Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob a luz e a temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por micro-organismos do ambiente (ANVISA, 2005).

### 2.2.3 Toxicidade dos Agrotóxicos

A classificação e a avaliação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico são baseadas em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológico. Portanto, um agrotóxico pode ser classificado quanto à periculosidade ambiental conforme demonstrado na Tabela 1 (ANVISA, 2005). As classes dos agrotóxicos variam de I a IV, esta classificação permite a interpretação do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, facilitando a identificação e a dimensão do risco na utilização destes produtos (LEVIGARD, 2001).

Tabela 1– Classificação quanto à classe toxicológica dos agrotóxicos.

<b>Classificação</b>	<b>Cor da faixa</b>	<b>DL 50 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Dosagem capaz de matar um adulto</b>
Classe I: extremamente tóxico	Vermelha	0 - 50	Algumas gotas
Classe II: altamente tóxico	Amarela	50 – 500	Algumas gotas/ 1 colher de chá
Classe III: mediantemente tóxico	Azul	500 – 5000	1 colher de chá/ 2 colheres de sopa
Classe IV: pouco tóxico	Verde	> 5000	2 colheres de sopa/ 1 copo

DL 50: Dosagem letal para 50% dos organismos. Fonte: ANVISA, 2005.

É importante ressaltar que dentre as substâncias da classe I encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (LEVIGARD, 2001). Desta forma, é de extrema importância que os indivíduos que forem manipular estas substâncias, como por exemplo, os agricultores, utilizem equipamentos de segurança os chamados Equipamentos de Proteção Individuais (EPI's), tornando-os menos vulneráveis aos agrotóxicos e conseqüentemente às intoxicações agudas e crônicas por eles causados.



Segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas – SINITOX (2009) foram registrados 5253 casos de intoxicação por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil e 2868 casos por agrotóxicos de uso doméstico.

O Estado do Rio Grande do Sul notificou no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, 133 casos de intoxicação por agrotóxicos no ano de 2010, correspondendo a 8% dos casos notificados da região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

### **2.3 Legislações relacionadas ao uso e qualidade das águas:**

A Lei 9.433, de 8 janeiro de 1997 (BRASIL, 1997), institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. A água passa então, a ser 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.

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) 357/2005 substituiu a Resolução 20/1986, que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Em dezembro de 2011, o Ministério da Saúde publicou a portaria n° 2914, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Esta nova portaria é a quinta versão da norma brasileira de qualidade da água para consumo que, desde 1977, vem passando por revisões periódicas. Esta Portaria é resultado de um amplo processo de discussão da última Portaria MS n° 518/2004, realizado no período de 2009 a 2011 (BRASIL, 2011).

Uma das modificações foi a retirada de substâncias químicas que faziam parte do padrão de potabilidade. Segundo a Equipe de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano do Ministério da Saúde, a justificativa é que, com o conhecimento atual, tais substâncias não apresentam toxicidade preocupante e, ou a exposição via consumo de água não é relevante. Raciocínio semelhante justifica eventual flexibilização de valores máximos permitidos para determinadas substâncias, e raciocínio inverso justifica a inclusão de novas substâncias no padrão

de potabilidade ou maior rigor no estabelecimento de valor máximo permitido na água (SABESP, 2012). Os valores máximos permitidos (VPM) de cada substância na água foram definidos com base na abordagem de avaliação quantitativa de risco químico, que permite estimar a concentração limite que, em tese, poderia ser ingerida continuamente ao longo de toda a vida sem risco considerável a saúde. Estimativa esta feita com fatores de segurança.

Os padrões de potabilidade abrangem uma série de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos. No artigo 37 da nova portaria, a norma relaciona um conjunto de substâncias químicas que representam risco à saúde humana. A tabela 2 mostra o conjunto de agrotóxicos e seus valores máximos permitidos – VMP, previstos pela Portaria 2914 (BRASIL, 2011).

Tabela 2 – Agrotóxicos e VMP listados na Portaria 2914

<b>Agrotóxicos</b>	<b>Valor Máximo Permitido (VMP), <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
2,4 D + 2,4,5 T	30
Alaclor	20
Aldicarbe + Aldicarbe sulfona + Aldicarbe sulfóxido	10
Aldrin + Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Carbendazim + benomil	120
Carbofurano	7
Clordano	0,2
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	30
DDT + DDD + DDE	1
Diuron	90
Endossulfan ( $\alpha$ , $\beta$ e sais)	20
Endrin	0,6
Glifosato + AMPA	500
Lindano (gama HCH)	2
Mancozebe	180
Metamidofós	12
Metolacloro	10
Molinato	6

(continuação)

<b>Agrotóxicos</b>	<b>Valor Máximo Permitido (VMP), <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
Parationa metílica	9
Pendimetalina	20
Permetrina	20
Profenofós	60
Simazina	2
Tebuconazol	180
Terbufós	1,2
Trifluralina	20

Fonte: MS, Portaria 2.914 (2011)

A Comunidade Europeia por meio da COUNCIL DIRECTIVE (1980) estabeleceu em  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico em águas destinadas para consumo humano e em  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para o total de resíduos, sem deixar claro que se deve, ou não, considerar também produtos de transformação. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) e a Organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para agrotóxicos individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES, 2001).

Devido a estes níveis de concentração baixos, presentes no meio ambiente, e da complexidade das matrizes ambientais analisadas, é necessário que se desenvolvam métodos analíticos capazes de determinar e quantificar estas substâncias, eliminando interferências que possam intervir erroneamente no resultado final (DUJAKOVÍC *et al.*, 2010).

Além disso, em nosso país há carência de dados sobre os níveis de contaminação por agrotóxicos em alimentos e no meio ambiente, bem como existem dificuldades técnicas na implementação da Portaria 2914, haja visto o grande número de medições.

Portanto, métodos analíticos rápidos, sensíveis e eficientes têm de ser desenvolvidos para verificar se os níveis de concentração dos resíduos de agrotóxicos e outras substâncias químicas em amostras de água estão de acordo

com os estabelecidos pela legislação, a fim de resguardar a saúde do consumidor e a integridade do meio ambiente.

## **2.4 Contaminação Ambiental por Resíduos de Agrotóxicos**

A agricultura, um dos principais componentes da economia mundial, contribui de forma cada vez mais acentuada para a degradação da qualidade da água. O lançamento, mesmo que indireto, de poluentes na água, como agrotóxicos, sedimentos, fertilizantes, adubo animal e outras fontes de matéria orgânica e inorgânica. Muitos destes poluentes atingem as fontes de água superficial e subterrânea durante o processo de escoamento e percolação, chamadas de fontes não pontuais de poluição (BEIGI *et al.*, 2011).

A procura por maior produtividade agrícola sem o aumento da área plantada tem levado ao consumo descontrolado e inadequado de produtos químicos, como agrotóxicos e fertilizantes, implicando em sérios problemas para o meio ambiente e para a saúde humana (TELLES, 2002; MILHOME *et al.*, 2009).

O crescimento da população mundial levou ao aumento de demandas de produção de alimentos e a diminuição da população (MENEZES, 2005). Para satisfazer à demanda cada vez maior de alimentos, chamada “revolução verde”, datada da década de 1960, levou a agricultura a se caracterizar como monoculturas extensivas e de grande utilização de fertilizantes químicos e agrotóxicos (MENEZES, 2005).

Apesar da utilização dessas substâncias ter contribuído para o aumento da produção agrícola, trouxe também muitos males. O uso incorreto e indiscriminado durante várias décadas levou ao acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, contaminação das águas e do solo, intoxicação de produtores rurais, aparecimento de pragas resistentes e a interrupção do controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos-pragas, entre muitos outros problemas (KIM *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004; MENEZES, 2005)

Mesmo que os agrotóxicos sejam utilizados adequadamente, acabam por acarretar diversos problemas. Causam desequilíbrios biológicos, favorecendo o aparecimento de novas pragas (insetos, ácaros, fungos, ervas daninhas e outros) ou

surtos de pragas secundárias, além de efeitos deletérios, por exemplo, a morte de insetos polinizadores (MAIRESSE & COSTA, 2009).

A EMBRAPA (2006) apresenta um estudo de “deriva técnica”, em que os atuais equipamentos de pulverização, mesmo com calibração, temperatura e ventos ideais, deixam cerca de 32% dos agrotóxicos pulverizados retidos nas plantas, 49% vão para o solo e 19% vão pelo ar para outras áreas circunvizinhas da aplicação.

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

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

#### 2.4.1 Contaminação das águas por resíduos de agrotóxicos:

A água é um recurso indispensável para a sobrevivência humana e de todas as espécies vivas. Além de ser um importante insumo para a grande maioria das atividades econômicas, nomeadamente da agricultura e da indústria, exerce uma influência decisiva na qualidade de vida das populações, especialmente ao referir-se a área do abastecimento, o qual tem forte impacto sobre a saúde pública (NETO & FERREIRA, 2007).

Em todo o planeta terra existe aproximadamente 1,4 bilhão de quilômetros cúbicos de água, porém 97,5% deste total correspondem às águas dos oceanos, restando apenas 2,5% de água doce. Destes 2,5% de água doce 69% estão em

geleiras e neves, 30% em águas subterrâneas, 0,7% em outras situações, tais como umidade do solo, pantanais e solos congelados, restando apenas 0,3% em rios e lagoas. O Brasil é um país privilegiado no que diz respeito à quantidade de água. Tem a maior reserva de água doce do planeta, ou seja, 8% do total mundial e também abriga o maior rio em extensão e volume do planeta, o Amazonas (de FREITAS, 1999).

O intenso crescimento populacional observado nas últimas décadas tem aumentado a geração de esgotos e a maior demanda de alimentos, o que por sua vez, implica numa crescente utilização de agrotóxicos e fertilizantes nas lavouras agrícolas, agentes poluidores de grande magnitude (BRASIL, 2006).

O uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura é motivo de constante preocupação com o meio ambiente, em particular com a contaminação das águas superficiais. Entretanto, o uso constante, sem critérios técnicos adequados, ou mesmo desnecessário, pode causar a contaminação do ambiente afetando o solo, o ar e as águas superficiais e subterrâneas.

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos pode ocorrer por via direta e ou indireta. A contaminação direta ocorre através da aplicação de agrotóxicos no controle de algas e insetos, lançamento de efluentes industriais e domésticos sem prévio tratamento. A contaminação por via indireta pode ser através da lixiviação do biocida pelo solo, pelo escoamento superficial ou pela precipitação (MARASCHIN, 2003).

O escoamento superficial descreve a movimentação do agrotóxico ao longo da superfície do solo, devido às chuvas intensas ou irrigações excessivas, até a superfície da água dos rios, lagos e solos de terrenos de menor declividade (SILVA, 2004).

A lixiviação é a principal forma de transporte no solo de moléculas não voláteis e solúveis em água. Tais moléculas deslocam-se através do perfil do solo, acompanhando o fluxo d'água. Desta forma, quando uma molécula orgânica é lixiviada, esta pode vir a atingir zonas superficiais do perfil e, em alguns casos, pode até mesmo alcançar o lençol freático (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003).

Esses dois processos são intensificados na agricultura quando a mesma necessita de irrigação para sua produção. A agricultura irrigada é uma forma de uso consuntivo da água, isto é, parte da água utilizada para este fim não retorna ao seu curso original, havendo redução efetiva da disponibilidade do manancial. Além disso,

nos usos consuntivos, normalmente a água que retorna aos mananciais tem qualidade inferior à que foi captada ocasionando assim, a contaminação dos recursos hídricos (LIMA & CHAVES, 2008)

A contaminação de um corpo d'água por agrotóxico ocorre principalmente de forma difusa, o que evidentemente dificulta a adoção de medidas que impeçam sua chegada aos rios e lagos. A única forma de combate ao problema é por meio de uma racionalização no uso de agrotóxicos, envolvendo campanhas esclarecedoras e utilização de mecanismos institucionais e legais para limitação de seu emprego (BRASIL, 2006).

A presença dessas substâncias na água destinada ao consumo humano está ligada a elevados custos de tratamentos, possíveis incidências toxicológicas e proibição de seu uso. Assim, estudos de monitoramento são necessários para avaliar a presença de agrotóxicos na água, a fim, de proteger a qualidade das águas superficiais e conseqüentemente da saúde humana.

#### 2.4.2 Ocorrência de resíduos de agrotóxicos em água superficiais

ALVES e colaboradores (2010) monitoraram a presença de agrotóxicos organoclorados em recursos hídricos do Estado de Goiás. Foram coletadas 174 amostras dos mananciais, correspondente a 167 municípios entre maio de 2005 e janeiro de 2006. Deste total de amostras, 63 apresentaram níveis de agrotóxicos organoclorados acima da concentração máxima permitida pela resolução 357 do CONAMA. Os agrotóxicos aldrin e mirex foram os mais detectados aparecendo em mais da metade dos municípios.

No norte da Grécia GOLFINOPOULOS *et al.* (2003) monitoraram nos anos de 1996 a 1998 a presença de agrotóxicos organoclorados nas águas superficiais e encontraram em concentrações acima da estabelecida pela União Europeia resíduos de aldrin ( $0,101 \mu\text{g L}^{-1}$ , maio de 1997), dieldrin ( $0,039 \mu\text{g L}^{-1}$ , julho de 1996), endossulfan sulfato ( $0,058 \mu\text{g L}^{-1}$ , junho de 1996) e isômeros de hexaclorociclohexano ( $0,421 \mu\text{g L}^{-1}$ , março de 1998).

MARCHESAN *et al.* 2010 determinaram resíduos dos herbicidas clomazona, quincloraque, propanil, bentazona, 2,4-D e imazetapir e dos inseticidas carbofurano e fipronil nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, situados na Depressão Central do Rio

Grande do Sul nas safras de 2003/04 a 2007/08 (cultivo de arroz). Nos três primeiros anos de monitoramento os autores relataram a presença dos agrotóxicos clomazona, 2,4-D e propanil com mais frequência nas amostras coletadas, com uma concentração média de 1,0; 0,7 e 0,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

Em 2009 SILVA *et al.* encontraram resíduos dos agrotóxicos clomazona, quincloraque, penoxulam, imazetapir, imazapique, carbofurano, 3-OH-carbofuran, fipronil e tebuconazol nos mananciais hídricos da Depressão Central e Planície Costeira Externa à Lagoa dos Patos, associada ao cultivo de arroz irrigado. As coletas foram realizadas antes do cultivo de arroz, durante o cultivo de arroz e após a drenagem das lavouras. O inseticida fipronil foi encontrado em todas as amostras com concentração mínima de 0,058  $\mu\text{g L}^{-1}$  e máxima de 3,45  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Estudos realizados na Microbacia do Córrego do Cintra, em São Paulo, detectaram a presença de inseticidas organoclorados e piretróides (cipermetrina e deltametrina). A concentração encontrada neste estudo foi 0,003 a 0,11  $\text{mg L}^{-1}$  (BELLUTA & SILVA, 2008).

SANKARARAMAKRISHNAM *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa no rio Ganges em Kanpur, norte da Índia e demonstraram a presença de agrotóxicos organoclorados e organofosforados em suas águas. Entre os vários agrotóxicos analisados, foram encontrados  $\gamma$ -HCH (0,259  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), malationa (2,618  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e dieldrin (1,707  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

GAO *et al.* (2008) realizaram um estudo, a fim de mapear a distribuição de agrotóxicos organoclorados (lindano- $\gamma$ -HCH, p,p'-DDT e heptacloro epóxido) nas águas superficiais em toda a China. Foram coletadas amostras de mais de 600 locais em sete bacias principais durante 2003 e 2004. Em geral o composto mais frequentemente detectado foi o agrotóxico lindano, presente em 83,9% das amostras em uma concentração média de 31,3  $\text{ng L}^{-1}$ . O composto p,p'-DDT foi detectado em 63,1% das amostras numa concentração média de 14,6  $\text{ng L}^{-1}$  e o heptacloro epóxido em 9,3% das amostras coletadas com 10  $\text{ng L}^{-1}$  em média de concentração.

QUINTANA *et al.* (2001) avaliaram a contaminação de 22 agrotóxicos de diferentes classes das águas da região de Barcelona, norte da Espanha, e verificaram a presença de simazina e atrazina em dois rios desta região, em concentrações que variaram entre 0,025 e 0,084  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

COSTA *et al.* (2008) detectaram a presença de alaclor (0,14 a 0,72  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e propanil (0,02 a 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em amostras de água coletadas de mananciais, que



são a principal fonte de abastecimento de água potável dos municípios de Turvo e Meleiro, na região sul do Estado de Santa Catarina – SC.

DUJAKOVIĆ *et al.* (2010) monitoraram 14 agrotóxicos de diferentes classes nos rios da Sérvia, em regiões de intensa atividade agrícola, ao total foram coletadas 15 amostras. Os agrotóxicos mais frequentemente detectados foram carbendazim, dimetoato, corbofurano e propazina.

VARCA (2012) realizou um monitoramento dos agrotóxicos malationa, profenofós, lambda-cialotrina, beta-ciflutrina, clorpirifós e deltametrina no rio Lucban e Salasad Creek na bacia Pagsanjan-Lumban de Laguna de Bay, Filipinas. No rio Lucban foi detectado a presença de malationa ao longo do período de monitoramento (2007-2009) em concentrações que variaram de 0,005 a 3,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Já no rio Salasad Creek foi detectado a presença de profenofós em concentrações de 0,5 a 15,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Com este estudo o autor concluiu que as aplicações de agrotóxicos nas plantações perto dos corpos d'água, que é uma prática comum nas Filipinas, sendo responsáveis pela contaminação direta dos rios e lagos.

DONATO *et al.* (2012) analisaram duas amostras do rio Jacuí coletadas na cidade de Ernestina-RS, monitorando 81 agrotóxico e 6 antibióticos. Em ambas as amostras foram detectados os agrotóxicos propoxur (27,2 e 51,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), clomazona (59,7 e 23,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), buprofezina (17,1 e 104,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em uma das amostras foi detectado resíduo de simazina (77,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A ocorrência destes resíduos em altas concentrações pode ser explicada pelo fato da região possuir intensa atividade agrícola ao entorno do rio Jacuí e o período da coleta das amostras coincidir com a época de aplicação de agrotóxicos nas lavouras.

## 2.5 Preparo de amostra empregando SPE para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água

O preparo de amostra é a etapa crucial em um método analítico, quando se tratam de amostras aquosas, sólidas ou semi-sólidas, tais como amostras ambientais e de alimentos, as quais geralmente não podem ser analisadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra, devido aos baixos níveis de concentração em que os analitos estão presentes nestas matrizes e a presença de interferentes (KRISTENSON *et al.*, 2006).

A escolha adequada de uma técnica de preparo de amostra é um fator chave na obtenção de resultados confiáveis e exatos, portanto a seleção da técnica e das condições experimentais deve ser conduzida cuidadosamente (JARDIM, 2010).

Idealmente, o método de preparo de amostra deve ser tão simples quanto possível, não somente porque reduz o tempo de análise, mas também porque um número grande de etapas aumenta a possibilidade de introdução de erros, o ideal é que ele seja: seletivo, ou seja, eliminando o maior número possível de interferentes, proporcionando maior detectabilidade; rápido; empregue instrumentação de baixo custo; permita a automação e inclua, quando necessário, uma etapa de concentração do analito a fim de obter uma concentração adequada para atingir o nível de detecção do instrumento utilizado (JARDIM, 2010).

Para determinação de resíduos de agrotóxicos em nível de traços, é necessária uma etapa de extração e concentração (XIA *et al.*, 2008).

Uma técnica de extração bastante utilizada atualmente é a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) que utiliza uma quantidade menor de solvente orgânico em relação à Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*). A SPE pode ser de fácil automação, apresenta altas porcentagens de recuperação do analito e é capaz de aumentar seletivamente a concentração do analito, se comparada com a LLE (REZAEI *et al.*, 2010). Outra vantagem adicional é que a extração de analitos em amostras de água pode ser feita no próprio local da coleta (no campo), usando aparatos simples. Os cartuchos utilizados na extração podem ser estocados e transportados mais facilmente até o laboratório (QUEIROZ *et al.*, 2006).

O formato mais popular em SPE é o de cartuchos. Para tal, usualmente emprega-se o corpo de uma seringa plástica (polipropileno) dentro do qual o material

de empacotamento (sorvente) fica retido entre dois discos (“fritas”) de polietileno (Figura 3). Um cartucho típico é constituído por um tubo de polipropileno contendo cerca de 30 a 500 mg de sorvente, com 40 a 60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 µm (LANÇAS, 2004).

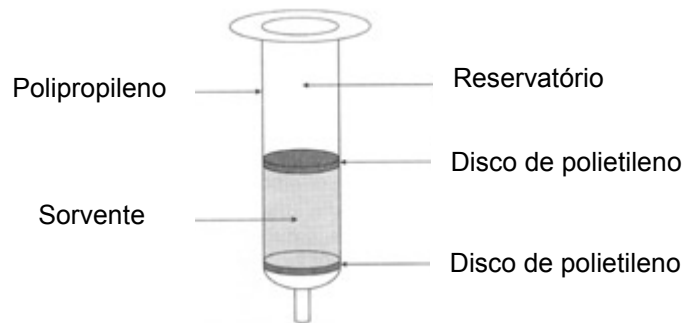


Figura 3 – Ilustração de um cartucho típico empregado em SPE (adaptado de de VICARI, 2009)

A SPE apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise, os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada. Além disso, os cartuchos são utilizados uma única vez e, geralmente, há baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho (NOVÁKOVÁ & VLCKOVÁ, 2009).

A SPE é uma das técnicas mais empregadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia gasosa GC, do inglês *Gas Chromatography* (QUEIROZ *et al.*, 2006).

### 2.5.1 Procedimento de Extração em Fase Sólida

Para o isolamento e concentração de agrotóxicos em amostras aquosas, a mesma é percolada por um cartucho contendo o sorvente, no qual os analitos são

retidos para posterior eluição com uma pequena quantidade de solvente orgânico adequado (CALDAS *et al.*, 2011).

Em geral, a SPE pode ser usada para três importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Assim, o primeiro propósito refere-se aos analitos que ficam retidos na fase sólida para posterior eluição, e o segundo, aos que são eluídos diretamente, enquanto as substâncias interferentes ficam retidas, sendo que nesse caso, tem-se a limpeza (*clean-up*) da amostra e não a concentração do analito (JARDIM, 2010).

Em geral, os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas, conforme ilustradas na figura 4: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito (LANÇAS, 2004).

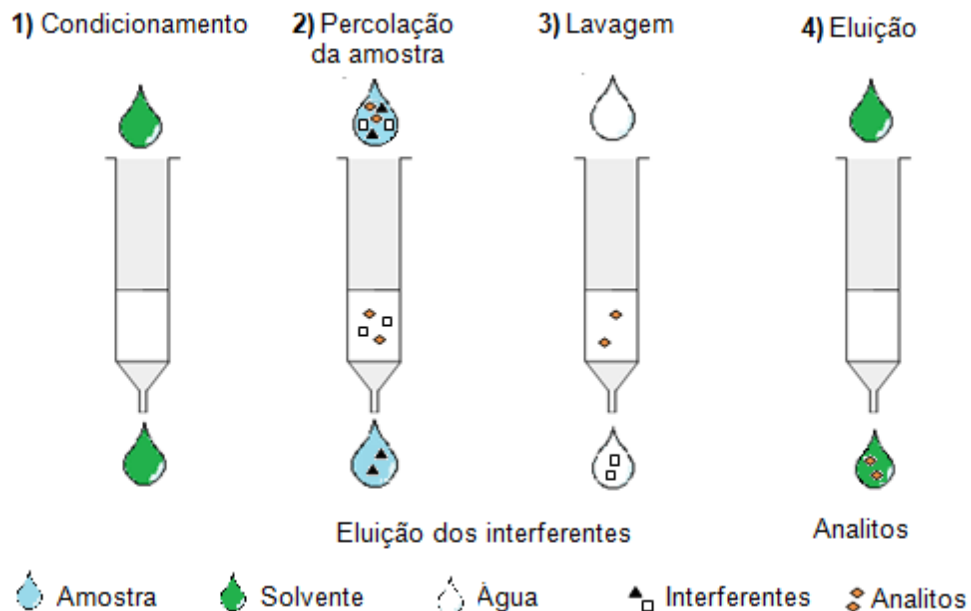


Figura 4 – Etapas envolvidas na SPE: 1) condicionamento do adsorvente; 2) adição da amostra; 3) lavagem com água para remoção dos interferentes e 4) eluição do analito (adaptado de CALDAS *et al.*, 2011).

### 2.5.1.1 Condicionamento do cartucho

A etapa de condicionamento destina-se a ativar o sorvente, e o solvente a ser utilizado nessa etapa dependerá principalmente do material a ser ativado (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, ciano, sílica, amino, entre outros). Esta etapa também pode servir para eluir alguma impureza do cartucho (CALDAS *et al.*, 2011).

### 2.5.1.2 Introdução da amostra

Nessa etapa, os analitos se distribuem entre a amostra líquida e a superfície do sorvente, por mais simples adsorção à superfície ou através da penetração na superfície, e um equilíbrio é estabelecido (LANÇAS, 2004). O pH da amostra pode ser crítico para obtenção de uma retenção adequada dos agrotóxicos no sorvente. Por isso, em alguns casos, o ajuste do pH da amostra é necessário para estabilizar os agrotóxicos e aumentar sua retenção na fase sólida (VEGA *et al.*, 2005; BORTOLUZZI *et al.*, 2007)

A velocidade de aplicação da amostra é importante e pode ser ajustada, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada no processo. Para pequenos volumes de amostras, esta etapa pode ser realizada somente com o auxílio da gravidade (LANÇAS, 2004).

### 2.5.1.3 Limpeza (*Clean-up*) do cartucho de SPE

A limpeza do cartucho é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz, que possam interferir no método analítico. Podem-se utilizar solventes com força de eluição intermediária para eluir as impurezas antes que o analito de interesse seja eluído (LANÇAS, 2004). Esses solventes são denominados “solventes de lavagem” (*wash solvent*). Diversos solventes de lavagem podem ser usados, mas quando se trata da extração de agrotóxicos em amostras aquosas, usa-se principalmente água ultrapura (CALDAS *et al.*, 2011).

#### 2.5.1.4 Eluição dos analitos adsorvidos

A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está relacionada com a polaridade do agrotóxico e o sorvente usado na SPE. O eluente deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no sorvente (JARDIM, 2010). Entre os solventes mais utilizados estão acetonitrila, metanol, acetona, acetato de etila, diclorometano e as misturas de metanol-acetonitrila, acetato de etila-diclorometano, metanol-acetona, entre outros.

#### 2.5.2 Fase Sólida ou Sorventes

Os materiais usados como fase sólida ou sorventes em SPE são similares àqueles empregados como fase estacionária em HPLC. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos, como C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, fenil, cianopropil, aminopropil (NH<sub>2</sub>), ligados quimicamente à sílica (LANÇAS, 2004).

O primeiro critério a ser considerado refere-se à estrutura química do analito, às propriedades do sorvente e à composição da matriz da amostra. Isso definirá o mecanismo a ser empregado e, conseqüentemente, ajudará na seleção da fase sólida (JARDIM, 2010). A tabela 3 apresenta um guia para escolha de uma fase sólida apropriada para analitos orgânicos.

Os sorventes poliméricos metacrilato entrecruzado, copolímero poliestireno divinilbenzeno, destacam-se por apresentar área superficial específica elevada (700 a 1200 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), estabilidade na faixa de pH 1 – 14 e maior capacidade de retenção de compostos polares que as fases C<sub>18</sub> que apresentam área superficial específica de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> (JARDIM, 2010).

Tabela 3 – Guia para escolha de uma fase sólida adequada.

Mecanismo	Sorvente	Tipo de analito	Tipo de matriz	Eluente do analito
Apolar (fase reversa) partição e adsorção	C <sub>18</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>2</sub> , feni, cianopropil, polimérico	Grupos funcionais apolares como alquilas, aromáticos e outras	Soluções polares	Solventes polares como: metanol, acetonitrila e água com ajuste de pH
Polar (fase normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	Grupos funcionais como aminas hidroxilas	Solventes apolares, óleos	Solventes apolares como hexano e diclorometano
Troca cationica	Forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	Grupos funcionais carregados positivamente como aminas	Aquosa, força iônica baixa	Tampões acetato, citrato e fosfato
Troca aniônica	Forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	Grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos	Aquosa, força iônica baixa	Tampões fosfato e acetato

Fonte: Adaptado de JARDIM, 2010.

### 2.5.3 Utilização da SPE na extração de resíduos agrotóxicos em água

A extração em fase sólida é muito utilizada no preparo de amostras de água. Com esta técnica é possível alcançar fatores de concentração altos, essenciais para atingir baixos níveis de concentrações de contaminantes em água. Na tabela 4, são apresentadas aplicações da extração em fase sólida utilizada na determinação de agrotóxicos e de outras substâncias químicas em amostras de água.

Tabela 4 – Aplicação da extração em fase sólida na determinação de substâncias químicas em água.

Agrotóxicos	Adsorvente	Preparo da amostra / Condicionamento do cartucho	Eluição	Técnica de determinação	Referência
81 Agrotóxicos e 6 Antibióticos	Strata-X <sup>®</sup> polimérico	250 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 3 mL metanol / 3 mL água ultrapura / 3 mL	Mistura acetonitrila/metanol (1:1; v/v) acidificada 1% com ácido acético e 1:1 (v/v) na fase móvel	LC-MS/MS	Donato <i>et al.</i> , (2012)
Clorpirifós, Imidacloprido, Atrazina, Simazina, Clomazona, Flumetralina, Iprodiona,	Strata C <sub>18</sub>	100 mL de amostra pH 3,0 (ácido fosfórico). <b>Condicionamento:</b> 3 mL metanol / 3 mL água ultrapura / 3 mL água ultrapura pH 3,0	<u>HPLC</u> : 1,5 mL (0,5 + 0,5 + 0,5 mL) de metanol, evaporado e redissolvido em 0,5 mL de metanol <u>GC</u> : 1,5 mL de acetato de etila	HPLC-DAD e GC-ECD	Bortoluzzi <i>et al.</i> , (2007)
20 Agrotóxicos	Strata-X <sup>®</sup> polimérico	200 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 6 mL metanol / 6 mL água ultrapura	2 mL (1 + 1 mL) de diclorometano, evaporado em banho maria à 55° C e redissolvido em 0,5 mL de acetato	GC-MS (SIM)	Sabin <i>et al.</i> , (2009)
Clomazona, Carbofurano, Tebuconazol, 2,4-D	Strata C <sub>18</sub>	250 mL de amostra pH 3,0 (ácido fosfórico) <b>Condicionamento:</b> 3 mL de metanol / 3 mL água ultrapura / 3 mL água ultrapura pH 3,0)	1 mL (0,5 + 0,5 mL) de metanol	HPLC-DAD e LC-MS/MS	Caldas <i>et al.</i> , (2010)
18 Agrotóxicos e 2 Metabólitos	C <sub>18</sub>	250 mL de amostra pH 3,0 (ácido fosfórico) <b>Condicionamento:</b> 3 mL de metanol / 3 mL água ultrapura / 3 mL água ultrapura pH 3,0)	1 mL (0,5 + 0,5 mL) de metanol	LC-MS/MS	Demoliner <i>et al.</i> , (2010)



(continuação)

Agrotóxicos	Adsorvente	Preparo da amostra / Condicionamento do cartucho	Eluição	Técnica de determinação	Referência
Agrotóxicos organoclorados, PCBs e PAHs	Oasis HLB®	1000 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 10 mL de hexano / 10 mL de diclorometano / 15 mL de água	10 mL de uma mistura diclorometano:hexano (50:50; v/v), com mais 10 mL de uma mistura diclorometano/acetona (50:50; v/v), evaporado e redissolvido em 100 µL de acetato de etila	GC-MS/MS	Avila et al., (2011)
62 Agrotóxicos	C <sub>18</sub>	250 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 6 mL de metanol / 3 mL água ultrapura	2 mL de uma mistura isoctano:acetona (50:50, v/v)	GC-MS/MS	Pereira (2012)
Pesticidas e compostos relacionados	Absolut® (Nexus)	100 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> não necessita etapa de pré-condicionamento, apenas uma etapa de limpeza (6 mL de acetona e 6 mL de água ultrapura)	1 mL de diclorometano (0,5 + 0,5 mL)	GC-MS/MS	Martins (2004)
14 Agrotóxicos	Oasis HLB®	250 mL de amostra pH 6,0 (ácido fosfórico) <b>Condicionamento:</b> 5 mL de uma mistura metanol:diclorometano (1:1) / 10 mL água ultrapura	10 mL de uma mistura metanol:diclorometano (50:50, v/v), evaporado e redissolvido em 1 mL de metanol	LC-MS/MS	Dujaković <i>et al.</i> , (2010)

(continuação)

Agrotóxicos	Adsorvente	Preparo da amostra / Condicionamento do cartucho	Eluição	Técnica de determinação	Referência
10 Agrotóxicos	Oasis HLB®	200 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 6 mL de acetato de etila / 6 mL de metanol / 1 mL de água ultrapura	5 mL de uma mistura acetato de etila:metanol (1:1, v/v) + 4 mL de acetato de etila, evaporado e redissolvido em 250 µL	GC-MS	Hildebrandt <i>et al.</i> , (2008)
Molinato, malationa, Pendimetalina, Parationa metilica Fenitrotona, Clorpirifós, Triazofós	C <sub>18</sub>	250 de amostra <b>Condicionamento:</b> 10 mL de uma mistura metanol:água (80:20, v/v) / 10 mL de metanol (30% v/v)	1 mL acetato de etila	GC-NPD	Milhorne <i>et al.</i> , (2011)
11 Agrotóxicos triazínicos e metabólicos	Oasis HLB®	100 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 5 mL de metanol / 5 mL de acetona / 5 mL de metanol / 5 mL de água ultrapura	5 mL acetona, evaporado por N <sub>2</sub> e redissolvido em 1 mL acetonitrila:água (10:90, v/v)	UHPLC-MS/MS	Benvenuto <i>et al.</i> , (2010)
28 Agrotóxicos multiclasse	Oasis HLB®	500 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 3 mL de metanol / 3 mL de água ultrapura	6 mL de metanol, evaporado com N <sub>2</sub> e redissolvido em 500 µL acetato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> /metanol (90:10, v/v)	LC-MS	Carvalho <i>et al.</i> , (2008)
23 Agrotóxico, 8 HPAs, 5 disruptores endócrinos	Strata-X®	500 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 4 mL de acetonitrila / 4 mL de metanol:isopropanol:acetonitrila (1:1:1, v/v/v) / 20 mL de água ultrapura	4 mL de uma mistura metanol:isopropanol:acetonitrila (1:1:1, v/v)	LC-FLD-MS/MS e GC-MS	Barrek <i>et al.</i> , (2009)

(continuação)

Agrotóxicos	Adsorvente	Preparo da amostra / Condicionamento do cartucho	Eluição	Técnica de determinação	Referência
11 Agrotóxico multiclasse	C <sub>18</sub>	10 mL de amostra <b>Condicionamento:</b> 3 mL de metanol / 6 mL de água ultrapura	5 mL de metanol, evaporado com N <sub>2</sub> e redissolvido em 10 mL água:metanol (90:10, v/v)	LC-MS/MS	Cahill <i>et al.</i> , (2011)

## 2.6 Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

Em meio a enorme abundância de poluentes que estão presentes na água, estão os agrotóxicos. As concentrações de agrotóxicos no meio ambiente são extremamente baixas, assim como os níveis máximos permitidos pelas agências regulamentadoras, o que demanda métodos analíticos com sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevada para determinação quantitativa dessas substâncias.

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos, poluentes de rios e outras. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas.

A cromatografia é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidades nas quais são transportados através de uma fase estacionária (coluna cromatográfica) por uma fase móvel líquida (cromatografia líquida) ou gasosa (cromatografia gasosa). Um detector é posicionado ao final da coluna cromatográfica para registrar o sinal do analito, eluído da coluna para análise qualitativa e quantitativa deste composto (SKOOG *et al.*, 2008).

Dentre os detectores que podem ser utilizados na cromatografia líquida e na gasosa, a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) tem apresentado grande destaque pela sua versatilidade de uso em ambas as técnicas, além disso, a combinação destas duas técnicas tem como vantagens a alta seletividade e separação eficiente, proveniente da cromatografia, e informações estruturais e aumento da seletividade oriundo da espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

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

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

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

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

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

O princípio básico da Espectrometria de Massas é a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos e separação através da razão  $m/z$  (massa/carga), seguida da detecção qualitativa e quantitativa da respectiva  $m/z$  e abundância.

A figura 5 ilustra um esquema genérico e simplificado de um espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador ou separador de massas e um detector, sendo que os dois últimos são operados sob condições de alto vácuo. A fonte de íons não necessariamente estará sob vácuo, podendo ficar em pressão atmosférica (GROSS, 2004).

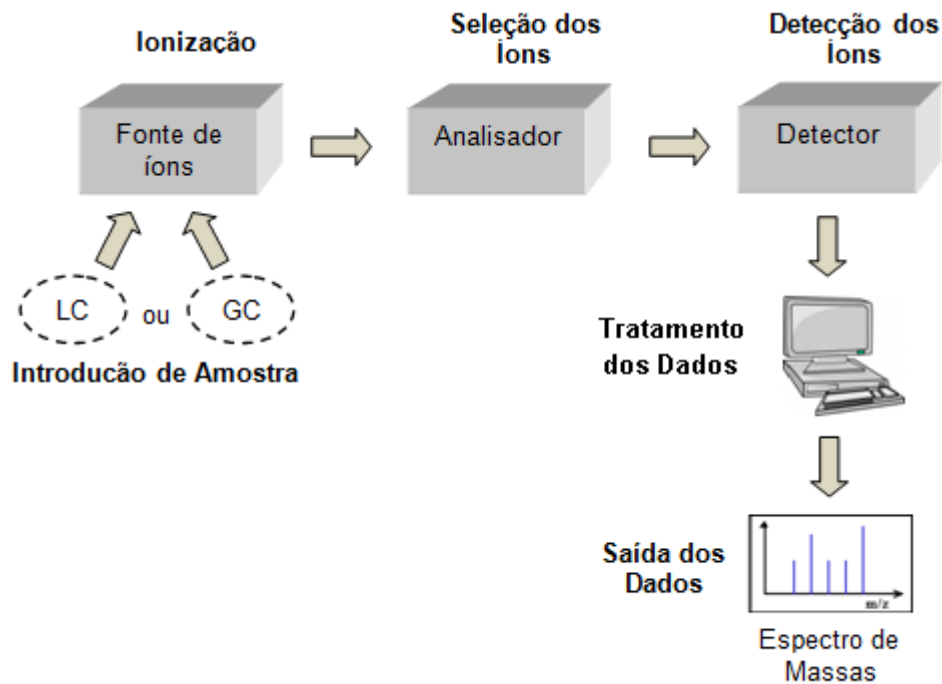


Figura 5 – Esquema das principais partes de um Espectrômetro de Massas. (Adaptado de SKOOG, 2008).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento da Espectrometria de Massas, a amostra era introduzida pela vaporização direta da mesma; com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas tornou-se bastante comum o uso de um cromatógrafo como fonte de introdução da amostra no MS (LANÇAS, 2009).

### 2.6.1 Analisadores de Massas

Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão  $m/z$ . As características de construção e operação diferem de um para outro assim como seus benefícios e limitações. A escolha do mais apropriado deve ser efetuada considerando-se a aplicação (exemplo, faixa de massa desejada), desempenho (resolução) bem como o custo (LANÇAS, 2009). Alguns exemplos são: quadrupolo e, triplo quadrupolo, *ion trap*, tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo, dentre os quais estão descritos abaixo o quadrupolo e o triplo quadrupolo.

Quadrupolo (qMS): É o analisador de massas mais utilizado atualmente devido, principalmente, à sua simplicidade, preço relativamente baixo e boa linearidade em análises quantitativas. É composto de quatro barras, usualmente feitas de metal, dispostas em dois pares. Um destes pares é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto que o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras. Ajustando-se apropriadamente as voltagens (DC e Rf), uma trajetória estável é criada para que os íons de certa razão  $m/z$  passem através do analisador e sejam detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e ou serão eliminados pela bomba de vácuo, conforme figura 6 (LANÇAS, 2009; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; SKOOG *et al.*, 2008).

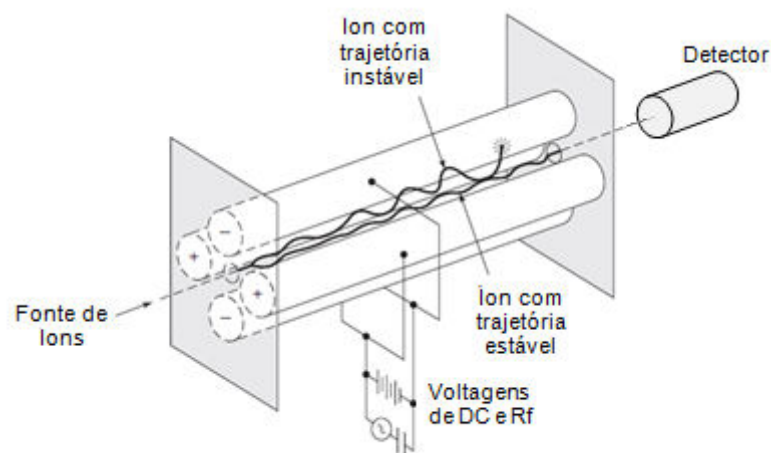


Figura 6 – Esquema de um analisador de massas, do tipo quadrupolo (Adaptado de SKOOG, 2008).

Triplo quadrupolo (TQ): Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (q ou cela de colisão) não é utilizado para separar íons de mesma razão  $m/z$ , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1 ou MS1) geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), sendo também empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3 ou MS2) conforme apresentado na

figura 7 (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), tem como vantagem a certeza sobre a origem dos fragmentos, uma vez que o íon precursor é selecionado antes da colisão (KUSTER *et al.*, 2006; PÍCO *et al.*, 2004).

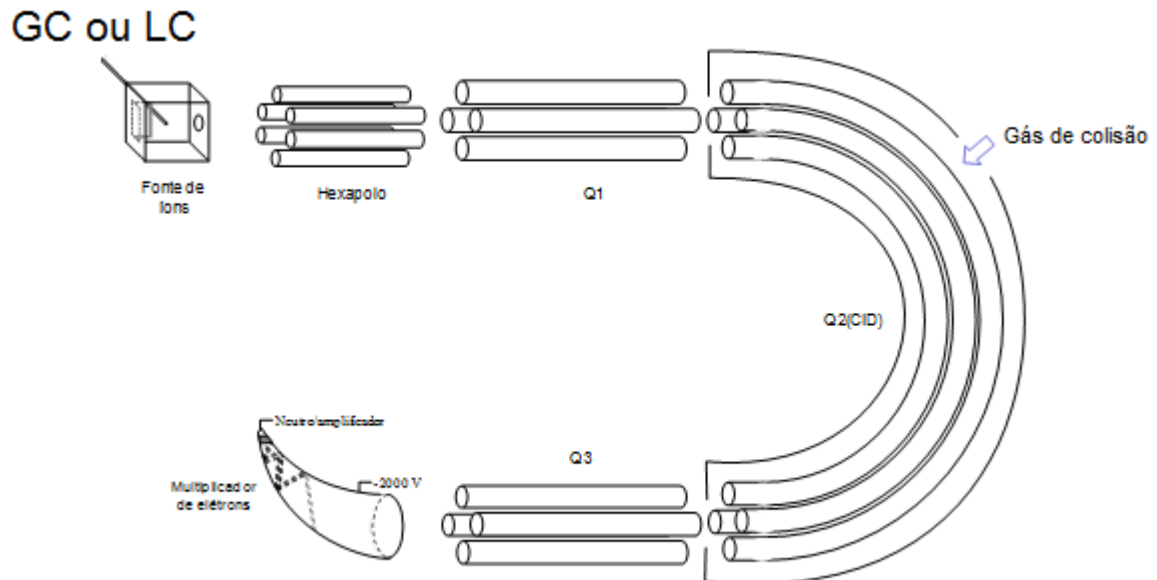


Figura 7 – Esquema de um analisador de massas, do tipo Triplo Quadrupolo (TQ).  
Fonte: MARTINS (2010).

Em seguida, serão descritos os modos de operação, ou seja, de que forma o espectrômetro de massas pode ser programado para aquisição dos dados:

**a) Full Scan:** Neste modo é programado para analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de  $m/z$  (VÉKEY, 2001). Isto é muito comum quando se tem um único quadrupolo, mas quando se tem um sistema MS/MS pode-se utilizá-lo também, utilizando somente o Q1, desse modo realizando a varredura completa da amostra em uma faixa ampla de  $m/z$ , durante a corrida cromatográfica. O cromatograma nessa condição é conhecido como cromatograma de íon total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

**b) Monitoramento do Íon Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*):** Neste modo de operação, o espectrômetro faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade uma vez que os íons



correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector (VÉKEY, 2001). Quando operado no modo SIM pode-se escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse, que estão presentes em uma mistura complexa. Neste caso, o q2 e o Q3 servem somente para transmitir os íons filtrados no Q1 (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

**c) Monitoramento de Reação Múltipla (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*):** Neste espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados (SIM) e estes íons são fragmentados novamente (MS/MS). Este modo de operação depende do tipo de espectrômetro de massas, requer uma instrumentação diferente que é o caso do Triplo Quadrupolo. Uma mistura de íons entra no primeiro quadrupolo (Q1), que deixa passar somente uma determinada massa para o segundo estágio, Q2. O segundo estágio é chamado célula de colisão induzida (CID, do inglês: *Collision Induced Cell*) preenchido com N<sub>2</sub> ou Ar a uma pressão de 0,1 Pa. O íon precursor selecionado em Q1 colide com o N<sub>2</sub> ou Ar com energia suficiente para se quebrar em fragmentos chamados de produtos. O quadrupolo Q3 seleciona apenas um tipo de íon produto para passar para o detector (HARRIS, 2001). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). A ausência da varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, que é associado a um aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

O detector é o último módulo de um espectrômetro de massas. Assim como o analisador é considerado o coração de um espectrômetro de massas, o detector pode ser entendido como seus olhos. Existe atualmente uma grande variedade de detectores para MS, os mais empregados são Chapas Fotográficas, Detector de Faraday e os detectores baseados na multiplicação de elétrons (EM, do inglês *Electron Multiplier*), sendo que, este último é o mais utilizado atualmente para detecção de íons, por apresentar uma boa razão entre custo e benefício (LANÇAS, 2009).

As multiplicadoras de elétrons utilizam como catodo um metal, óxido metálico ou liga que apresenta facilidade em perder elétrons quando atingida por íon, assim, quando um íon atinge o metal e como consequência remove elétrons e estes são direcionados para outro eletrodo por diferença de potencial retirando outros elétrons (cada elétron gera entre 1 a 3 novos elétrons, em média) e assim sucessivamente,

até que ao final do processo é coletado um elevado número de elétrons, oriundo de cada íon, com um fator de ampliação bastante eficiente (LANÇAS, 2009).

A GC-MS é uma ferramenta analítica poderosa, utilizada usualmente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa. Isto limita a técnica à análise de compostos voláteis e semi-voláteis, de baixa polaridade e baixa massa molecular. Dificuldade esta, que é superada pelo acoplamento entre Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas (LC-MS) que consegue analisar compostos com maior massa molecular e/ou maior polaridade.

### 2.6.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A combinação da Cromatografia Gasosa com a Espectrometria de Massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas e, além disso, quando são utilizadas colunas capilares em GC é possível conectar a sua saída diretamente à fonte de ionização do espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Devido a esta facilidade do acoplamento GC-MS e o uso de fontes de ionização apropriadas, a técnica vem sendo utilizada com frequência para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água.

As formas de ionização que tiveram maior sucesso, e por isso são as mais empregadas no acoplamento GC-MS, são a ionização por elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*) tanto no modo positivo quanto negativo. (LANÇAS, 2009).

Dentre estas formas de ionização a EI é a mais popular, uma vez que usualmente fornece um grande número de íons os quais permitem a identificação da substância em estudo. Quando se trata de EI, não existe equilíbrio térmico porque os íons são gerados na fase gasosa e sob vácuo, geralmente de  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  torr. Sob esse vácuo é improvável ocorrer interações entre íons depois que estes são formados. Logo o espectro de massas de EI é reprodutível, pois se trata de um método físico de ionização, não ocorrendo reações químicas ou colisões dentro da fonte de íons (BENASSI, 2009).

Entretanto, o modo CI positivo ou negativo proporciona uma melhor seletividade para muitos agrotóxicos quando comparado com o modo EI. O modo CI é preferencialmente utilizado para a determinação de organo-halogenados, 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 (ALDER *et al.*, 2006).

Neste trabalho utilizou-se o acoplamento GC-(TQ)MS/MS com ionização por elétrons, operando no modo MRM, que permite identificar e quantificar os compostos (analitos-alvo) através do monitoramento de duas transições, uma para a quantificação e a outra para a confirmação.

### 2.6.3 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

O acoplamento da Cromatografia Líquida com a Espectrometria de Massas foi um processo demorado, devido à incompatibilidade entre as vazões relativamente altas empregadas em HPLC que impossibilitava a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para o interior da fonte de ionização do espectrômetro, que opera em condições de alto vácuo (HARRIS, 2001; FERNADEZ-ALBA, 2005). A potencialidade do acoplamento entre LC e MS já havia sido reconhecida há várias décadas, porém incompatibilidades relacionadas com a interface e à vazão do eluente com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas fez com que a utilização desta técnica em análises de rotina ocorresse recentemente (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Mas depois que as deficiências com as interfaces foram parcialmente superadas, a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) vem sendo cada vez mais utilizada (ALDER *et al.*, 2006).

A LC-MS é, sem dúvida, uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para a determinação de compostos orgânicos polares e baixa volatilidade (ARDREY, 2003). Além disso, o acoplamento da Cromatografia Líquida com a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) permite um aumento de seletividade e sensibilidade proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos em uma

única análise. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, eles apresentam uma série de vantagens entre elas alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez (PRESTES *et al.*, 2009). Outras vantagens dessa técnica são o fornecimento da massa molar, informação estrutural e análise quantitativa exata do analito (SKOOG *et al.*, 2008).

A interface é um dispositivo colocado entre o LC e o MS com o objetivo de remover o solvente e transferir a amostra para o espectrômetro de massas. A principal interface utilizada na análise de agrotóxicos polares é baseada na ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) e engloba a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por Eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), os quais estão brevemente descritos a seguir.

Ionização por Eletronebulização (ESI): O líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N<sub>2</sub>). À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização, como na figura 8 (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). O emprego de LC/MS utilizando ESI como fonte de ionização é ideal para análise de moléculas mais polares, de maior massa molecular. Ainda, LC-ESI-MS é muito aplicada para determinações de proteínas,

aminoácidos, e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009).

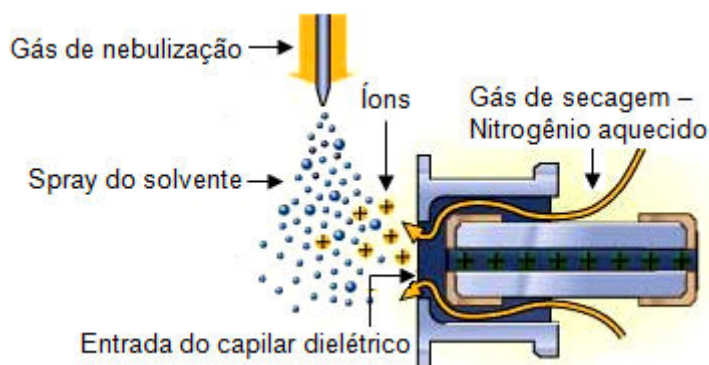


Figura 8 – Esquema prático da fonte de ionização ESI (CHROMEDIA, 2011).

Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI): O eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (Figura 9). Pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa e também porque é aplicável a vazões de eluente maiores que as suportadas por ESI.

Ocorre a denominada ionização suave, isto é, são formadas moléculas carregadas intactas,  $[M+H]^+$  no modo positivo ou  $[M-H]^-$  no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito. Pode também ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $HCOO^-$  e  $CH_3COO^-$ , que são espécies iônicas presentes na fase móvel proveniente dos modificadores adicionados a elas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009). A formação de adutos favorece a melhora na sensibilidade de detecção, sendo sua

formação principalmente observada utilizando o modo de ionização positivo (GAO; ZHANG; KARNES, 2005).

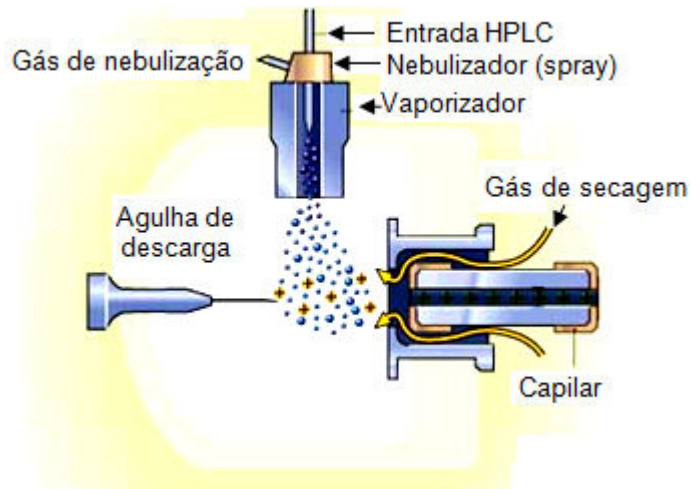


Figura 9 – Esquema prático da fonte de ionização APCI (CHROMEDIA, 2011).

Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI): É uma técnica de ionização relativamente nova, que pode ser considerada complementar às outras técnicas de ionização à pressão atmosférica, uma vez que certos grupos de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, só podem ser analisados por LC/MS quando se aplica a fotoionização. Se assemelha muito com a APCI e no lugar da corona de descarga possui uma lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ocasionar a ionização das moléculas do analito presentes nas gotículas do *spray* (Figura 10). Esta fonte de ionização é menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente.

Sua teoria baseia-se na formação de um íon molecular radical a partir da absorção de um fóton por uma molécula, seguida da ejeção de um elétron. Isto só é possível quando a energia do fóton irradiador é maior que o potencial de ionização da molécula, este processo é denominado fotoionização direta. APPI não é limitada ao modo positivo de ionização, a formação de íons negativos é iniciada pela formação de elétrons térmicos durante a fotoionização do solvente e do gás oxigênio

por meio da transferência de próton ou troca de carga, por captura de elétrons, ou reações de substituição (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009).

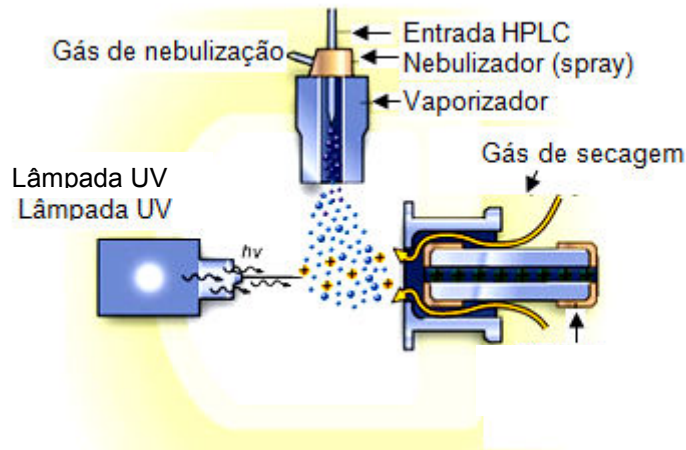


Figura 10 – Esquema prático da fonte de ionização APPI (CHROMEDIA, 2011).

Neste trabalho utilizou-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com ionização por electronebulização operando pelo modo de monitoramento seletivo de íons (MS/MS).

#### 2.6.4 Padrão Interno e Padrão de Substituição (*surrogate*)

A seleção de um padrão interno (PI) deve ser idealmente, uma substância similar à substância a ser quantificada, bem como ter tempo de retenção próximo a essas substâncias, não fazer parte da amostra, não reagir com a substância ou outro componente da matriz e, quando separada por Cromatografia não co-eluir com os agrotóxicos em estudo na amostra. Quando a detecção é feita por espectrometria de massas, este último requisito não é necessário, pois, cada composto produz um espectro característico. O método de padronização interna é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna e tamanho da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

O Padrão de Substituição (PS) ou de controle, do inglês *surrogate*, é definido como um composto puro adicionado ao material de análise, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa. É chamado de padrão de substituição porque este é transferido para a amostra e pode não estar efetivamente no mesmo equilíbrio que se encontra na forma nativa, portanto a determinação da recuperação do padrão de substituição realiza-se fazendo uma “correção de recuperação” para a substância de interesse (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI *et al.*, 2004). Idealmente podem-se utilizar compostos isotopicamente modificados, pois os mesmos não são encontrados na natureza nesta forma, e são quimicamente idênticos aos analitos não deuterados. Assim, utilizando Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida eles apresentaram tempos de retenção próximos e utilizando Espectrometria de Massas são identificados pela diferença de massas entre o padrão isotópico e o analito (AHMADKHANIHA *et al.*, 2010).

## 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Para assegurar a qualidade dos resultados analíticos que empregam técnicas cromatográficas, os métodos de análise devem ser validados a fim de garantir a confiabilidade do procedimento definido, ou seja, um novo método analítico para gerar informações confiáveis e legíveis sobre a amostra, sofrer uma avaliação denominada validação.

Segundo RIBANI *et al.* (2004) a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Já para LANÇAS 2004, validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

No Brasil, há guias de validação tais como o da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, bem como do INMETRO com o DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011 (INMETRO, 2011). Os órgãos internacionais também dispõem de guias como a



Conferência Internacional em Harmonização (ICH, 2005), União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e SANCO (2009).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sugere que seja feito planejamento da validação levando em consideração os seguintes itens: definição da aplicação, objetivo e escopo do método; definição dos parâmetros de validação e critérios de aceitação; verificação das características de desempenho do equipamento, se as mesmas estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificação dos materiais (por exemplo, reagentes); planejamento dos experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e execução dos experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica e linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e de quantificação.

### 2.7.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas e corresponde à capacidade de um método em determinar, com exatidão, o analito de interesse, na presença de interferentes existentes na amostra (LANÇAS, 2004). Pode-se também dizer que é a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de derivação, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2009).

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### 2.7.2 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al.*, 2002).

A exatidão pode ser obtida mediante uso de materiais de referência certificado (MRC), comparação de métodos ou, ensaio de recuperação (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que para este último valores aceitos de recuperação para a análise de substâncias a nível de traços é entre a faixa de 70 a 120% (SANCO, 2009). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$ .

### 2.7.3 Precisão

A precisão correspondente ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD do inglês *Relative Standard Deviation*) ou coeficiente de variação (CV) (THOMPSON *et al.*, 2002).

Geralmente determinada para circunstâncias específicas de medição, as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e RSD (INMETRO, 2011).

Segundo LANÇAS (2004) a precisão expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de ensaios múltiplos para uma mesma amostra, podendo ser estabelecida através da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária, ou seja, nas mesmas condições operacionais e mudando um ou mais fatores, respectivamente.

A precisão pode ser numericamente expressa em termos de estimativa do RSD (Equação 1):

$$RSD\% = \frac{S}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;  $x_m$  = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

A reprodutibilidade é o grau de aceitação entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos). Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, e diferentes dias de análise (INMETRO, 2011).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão pode ser expressa através da estimativa do RSD (RIBANI *et al.*, 2004). Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 2.7.4 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Em análises onde são realizadas determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos é imprescindível que, medidas sejam feitas na região do limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e do limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) (RIBANI *et al.*, 2004). O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011). O LOQ é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOQ como a menor concentração da curva analítica (INMETRO, 2011).

Estes limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração, e podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). O LOD e o LOQ foram estabelecidos de forma que o LOD corresponda a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponda à concentração que produz uma relação sinal:ruído superior a 10.

#### 2.7.5 Curva analítica e linearidade

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

A linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007). A equação de regressão linear (Equação 2) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (2)}$$

sendo:

$y$  = resposta medida (área do pico);

$x$  = concentração;

$a$  = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade;

$b$  = coeficiente linear - interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

Será mais sensível o método que resultar em maior variação na resposta, resultante de pequenas variações de concentração, ou seja, maior inclinação ( $a$ ). O número mínimo de pontos geralmente aceitos nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos, (ANVISA, 2003) ou mais que 6 (INMETRO, 2011). Além dos coeficientes  $a$  e  $b$ , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação  $r$ , o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida (CHUI *et al.*, 2001). A partir dos pontos experimentais calcula-se o coeficiente de correlação ( $r$ ), parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa, podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). É aceito pela ANVISA um coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2003). Pode-se também utilizar do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) o qual é a porcentagem da variação da variável dependente ( $y$ ) explicada pela variável independente ( $x$ ), por exemplo, quando  $r^2=0,99$  indica que as variáveis dependentes explicam 99% da variação da variável independente.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (MUNARETTO, 2011). Dentro da faixa de trabalho existe uma faixa de resposta linear, desse modo,

a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

#### 2.7.6 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 (PINHO *et al.*, 2009).

##### 2.7.6.1 Efeito Matriz em Cromatografia Líquida

A interferência da matriz representa uma desvantagem de praticamente todas as técnicas instrumentais, inclusive quando utiliza-se Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Na espectrometria de massas os efeitos de interferência ocorrem em maior frequência, como os fenômenos de supressão de íons, induzidos pela presença na matriz de compostos voláteis ou capazes de mudar a eficiência de formação de gotículas do analito. Ou ainda, a quantidade de íons formados na fase gasosa que atingem o detector (GOSETTI *et al.*, 2010).

Diferentes espécies podem ser capazes de provocar a supressão iônica, tais como espécies presentes como componentes da amostras (e ainda presentes, mesmo com etapas de purificação), por exemplo: espécies iônicas, compostos polares e moléculas orgânicas. Co-extrativos podem também afetar a intensidade do sinal do analito quando formam adutos ou reagem com o analito na interface do LC/MS. Outro fator são os reagentes adicionados na fase móvel, a fim de melhorar o formato do pico cromatográfico, tais como sais, pares iônicos, tampões e ácidos orgânicos. Nesse caso, cabe ressaltar que a introdução contínua desses aditivos, através da fase móvel, para dentro da interface resulta na supressão do sinal durante toda a corrida cromatográfica (GOSETTI *et al.*, 2010).

A fim de minimizar os efeitos de matriz gerados na interface do sistema de LC/MS, algumas ações podem ser tomadas, como mudanças nas condições do espectrômetro de massas; otimização do pré-tratamento e processamento da amostra; bem como modificações nas condições cromatográficas. A escolha da estratégia de calibração é interessante, com o uso de padrão interno isotópico (de preferência), com o intuito de compensar os efeitos de matriz; assim como o preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (GOSETTI *et al.*, 2010).

#### 2.7.6.2 Efeito Matriz em Cromatografia Gasosa

O efeito matriz pode acarretar outras alterações na análise cromatográfica, como: a) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas do analito no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta; b) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema pode ser evitado quando, se consegue o acoplamento do cromatógrafo com um espectrômetro de massas; c) aumento do sinal no detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção do analito (PINHO *et al.*, 2009).

Somado ao efeito matriz pronunciado nas análises de amostras complexas, devem ser consideradas as condições cromatográficas no injetor, na coluna cromatográfica e no detector. Dentre estes, o sistema de injeção se destaca, devido os sítios ativos do insersor (*liner*) estarem disponíveis para a retenção dos analitos e, assim, uma menor quantidade é transferida para a coluna e conseqüentemente detectada (PINHO *et al.*, 2009). Portanto, a fim de minimizar a influência da matriz sobre os resultados obtidos, deve-se preparar as soluções padrões no extrato da matriz, desse modo mascarando os sítios ativos presentes no insersor (FRENICH *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2009).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental consistiu na otimização e validação de um método de Extração em Fase Sólida (SPE) para a extração de agrotóxicos em amostras de água de rio, seguida, pela quantificação dos agrotóxicos extraídos por GC-MS/MS e por LC-MS/MS.

Os parâmetros analíticos avaliados durante a validação foram: linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e quantificação e efeito matriz.

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

#### 3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Bomba à vácuo (Tecnal, Brasil);
- ✓ Sistema de manifold SPE (Varian, EUA);
- ✓ pHmetro modelo pH 500 series Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, EUA);
- ✓ Sistema GC-MS/MS: cromatógrafo a gás Varian 1200-MS equipado com:
  - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);



- Coluna capilar VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), com 30 m de comprimento x 0,25 mm de d.i; 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme (Varian, EUA);
- Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA);
- Detector de massas triplo quadrupolo (TQ) 1200, atuando no modo MRM (Varian, EUA);
- Injetor 1079 com Programação de Temperatura de Vaporização - PTV (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do Software MS Workstation 6.6 (Varian, EUA);
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Varian 320-MS, equipado com:
  - Detector MS, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) *Mass Spectrometer* com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA);
  - Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação (Varian, EUA);
  - Coluna analítica Pursuit UPS C<sub>18</sub>, (50 x 3,0 mm d.i) e 2,4  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula (Varian, EUA);
  - Sistema de aquisição de dados através do *Software MS Workstation Version 6.9.2* (Varian, EUA);
  - Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra)

### 3.2 Gases Utilizados

- ✓ Gás de arraste: Hélio 99,999% de pureza (White Martins e Air Products, Brasil);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS e GC-MS/MS (White Martins e Air Products, Brasil);
- ✓ Gás nitrogênio comum usado para evaporação dos solventes de eluição (White Martins e Air Products, Brasil).

### 3.3 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3<sup>®</sup> (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL;
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Extran<sup>®</sup> neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Diclorometano, P.A. (Merck, Alemanha);
- ✓ Seringas de volume de 50, 100 e 1000 µL (Hamilton, Suíça);
- ✓ Ácido fosfórico P.A. 85% (Merck, Brasil);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA)
- ✓ Cartuchos para SPE Strata C<sub>18</sub> 500 mg/3 mL (Phenomenex, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Oasis 60 mg/3 mL (Waters, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Strata X 200 mg/3 mL (Phenomenex, EUA);
- ✓ Cartucho para SPE Strata X 60 mg/3 mL (Phenomenex, EUA);
- ✓ Vidraria comum de laboratório analítico.

### 3.4 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” (INMETRO, 2012; FRIGGI, 2012). O método de extração (SPE), foi otimizado e validado utilizando água de torneira do próprio laboratório.

### **3.5 Agrotóxicos Seleccionados**

Os agrotóxicos avaliados neste trabalho foram selecionados com base na Portaria N° 2914 de dezembro de 2011 que dispõe sobre parâmetros de potabilidade da água e estabelecem os Valores Máximos Permitidos (VMP) que podem estar presentes nas águas destinadas ao consumo humano. Apenas os agrotóxicos glifosato, ampa e mancozebe que fazem parte da Portaria não foram incluídos no desenvolvimento deste trabalho. Devido estes necessitarem de uma extração mais específica e uma determinação adequada, o que não é possível quando se quer uma etapa de extração unificada dos compostos avaliados.

Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehresntorfer (Ausburg, Alemanha) e estão listados na tabela 5, juntamente com o grau de pureza, classe, grupo químico e propriedades físico-químicas.

Tabela 5 – Compostos selecionados neste estudo, grau de pureza (%), grupo químico, classe e propriedades físico-químico.

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
2,4 D	99,0	Ácidos fenoxialquílicos	H	221,04	2,87	139	-	23180	-0,83	1,9x10 <sup>-2</sup>	88,4
2,4 DDD	97,5	Organoclorado	I	320,0		78	193	0,05	6,91	2,58 x 10 <sup>-1</sup>	
2,4 DDE	98,5	Organoclorado	I	318,0		89	336	0,14	6,5	7,99 x 10 <sup>-1</sup>	
2,4,5 T	99,5	Ácidos fenoxialquílicos	H	255,48	2,88	156	-	0,268	4	0,01	-
Alacloro	99,5	Cloroacetamida	H	269,7	-	41	100	240	3,09	2,9	124
Aldicarbe	99,2	carbamato	I, A, N	190,3	-	100	-	4930	1,15	3,87	36
Aldicarbe sulfona	98,0	Carbamato	I, N	222,3		142		10000		12	
Aldicarbe sulfóxido	98,0	Carbamato	I, N								
Aldrin	99,0	Ciclodienos	I	364,9	-	104	145	0,027	6,5	3	17500
Atrazina	98,0	Triazina	H	215,7	1,7	175,8	205,0	33	2,5	3,8 x 10 <sup>-2</sup>	24
Azimssulfuron	99,5	Sulfonil uréia	H	424,4	3,6	170	-	1050	-1,4	4,0 x 10 <sup>-6</sup>	73,8
Azoxistrobina	92,0	Estrobilurina	F	403,4	-	116	360	6,7	2,5	1,10 x 10 <sup>-7</sup>	482

(continuação)

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
Benfuracarbe	98,0	Carbamato	I	410,5	-	-	>190	8,4	4,22	<1 x 10 <sup>-2</sup>	9100
Benomil	98,5	Benzimidazol	F	290,3	4,48	140	-	3,6	1,37	<5,0 x 10 <sup>-3</sup>	1900
Bentazona	95,5	Benzotiazidinona	H	240,3	3,3	138	-	570	0,77	0,17	55,3
Bifentrina	99,0	Piretróide	I, A	422,9	-	69,3	-	0,001	7,3	1,78 x 10 <sup>-2</sup>	236610
Bispiribaque sódico	97,5	Ácido pirimidiniloxibenzóico	H	452,4	3,05	224	-	73300	1,0	5,0 x 10 <sup>-6</sup>	-
Carbaril	99,0	Carbamato	I	201,2	10,4	142	-	120	1,85	4,1 x 10 <sup>-2</sup>	300
Carbendazim	97,0	Benzimidazol	F	191,2	4,2	307	-	8	1,51	0,09	-
Carbofurano	99,0	Metilcarbamato de benzofuralina	I	221,3	-	154	-	320	1,52	0,031-0,072	22
Cialofope butílico	98,0	Ácido ariloxifenoxipropiônio	H	357	-	47,5	-	0,5	3,3	5,3 x 10 <sup>-2</sup>	5247
Cialotrina lambda	99,0	Piretróide	I	449,9	-	49,2	-	0,005	6,9	2 x 10 <sup>-4</sup>	-
Ciflutrina	92,0	Piretróide	I	434,3	-	93,5	-	0,0012	5,9	5,6 x 10 <sup>-5</sup>	64300
Cipermetrina	98,5	Piretróide	I	416,3	-	41,2	-	0,009	5,3	2,3 x 10 <sup>-4</sup>	85572

(continuação)

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
Clomazona	99,5	Isoxazolidinona	A, H	239,7	-	33,9	281,7	19,2	2,5	19	300
Clordano	97,0	Ciclodieno	I	409,8	-	105	175	0,1	2,78	1,3	20000
Clorpirifós etílico	97,5	Organofosforado	I	350,9	-	41,5	-	1,05	4,7	1,43	8151
Clorpirifós metílico	98,0	Organofosforado	I, A	322,5	-	46	-	2,74	4,0	3,0	4645
Clorpirifós oxon	98,5	Organofosforado	I		-						
DDT	99,0	Organoclorado	I	354,5	-	109	187	< 10	-	0,025	-
Deltametrina	97,5	Piretróide	I	505,2	-	101	-	0,0002	4,6	1,24 x 10 <sup>-5</sup>	10240000
Dieldrin	97,5	Organoclorado	I	380,9	-	177	385	0,14	3,7	0,024	12000
Dlifenconazol	97,5	Triazol	F	406,26	1,1	82,5	101	15	4,36	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	-
Diuron	96,0	Uréia	H	233,1	-	159	-	36,4	2,85	1,1 x 10 <sup>-3</sup>	813
Endossulfan alfa	98,0	Organoclorado	I, A	406,9	-	109,2	401,3	0,32	4,74	6,22 x 10 <sup>-6</sup>	11500
Endossulfan beta	99,5	Organoclorado	I, A	406,9	-	80	-	0,32	4,75	0,83	11500

(continuação)

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
Endossulfan sulfato	99,5	Organoclorado	I	422,9	-	-	-	0,48	3,66	-	5194
Endrin	99,0	Organoclorado	I	380,9	-	200	-	0,24	3,2	0,09	10000
Etoxisulfuron	97,5	Sulfoniluréia	H	398,4	5,28	144-147	-	1353	0,004	6,6 x 10 <sup>-2</sup>	134
Fenitrotona	99,0	Organofosfato	I	277,2	-	1	-	14000	3,43	0,67	2000
Fipronil	99,0	Pirazol	I	437,2	-	201	-	1,9	4,0	4 x 10 <sup>-4</sup>	1248
Imazapique	99,0	Imidazolina	H	275,3	3,9	205	-	2150	0,393	<1 x 10 <sup>-2</sup>	137
Imazapir	99,0	Imidazolina	H	261,3	1,9	171	-	9740	0,11	<0,013	-
Imazetapir	98,5	Imidazolina	H	289,3	2,1	173	-	1400	1,49	<0,013	52
Imidacloprido	99,0	Neonicotinoide	I	255,7	-	144	-	610	0,57	4 x 10 <sup>-7</sup>	-
Lindano (gama HCH)	99,0	Organofosforado	I, A	290,8	-	113	323	-	3,17	5,6 x 10 <sup>-5</sup>	22,1
Malationa	99,0	Organofosforado	I, A	330,3	-	-20	-	148	2,75	3,1	217
Metamidofós	97,0	Organofosforado	I, A	141,1	-	45	-	>200000	-0,8	2,3	1

(continuação)

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
Metolaclo	99,0	Cloacetamida	H	283,8	-	-62,1	100	488	2,9	4,2	120
Metsulfurometílico	96,4	Sulfoniluréia	H	381,4	3,8	162	-	2,79	0,02	3 x 10 <sup>-7</sup>	35
Molinato	97,5	Tiocarbamato	H	187,3	-	-25	278	1100	2,9	500	190
Oxifluorfen	98,5	Difenil éter	H	361,7	-	85-90	358,2	0,116	4,47	0,0267	-
Parationa metílica	97,0	Organofosforado	I	263,2	-	35-36	154	55	3,83	0,2	236
Pendimetalina	94,0	Dinitroanilina	H	281,3	2,8	54-58	-	0,33	5,2	4 x 10 <sup>-3</sup>	311
Permetrina	98,5	Piretróide	I	391,3	-	34,5	200	0,2	6,1	0,002	100000
Pirazossulfuro m	98,0	Sulfonil uréia	H	414,4	3,7	179,5	-	9,76	3,2	4 x 10 <sup>-5</sup>	154
Profenofós	99,5	Organofosforado	I, A	373,6	-	-	100	28	4,44	1.24 x 10 <sup>-1</sup>	2016
Propanil	96,7	Anilida	H	218,1	19,1	91,5	351	95	2,29	3 x 10 <sup>-5</sup>	152
Propiconazol	98,1	Triazol	F	342,2	1,09	-23	99,9	100	3,72	2.7 x 10 <sup>-2</sup>	1221
Quincloraque	98,5	Ácido Carboxílico Quinolínico	H	242,1	4,3	274	-	0,065	1	<1x10 <sup>-2</sup>	36



(continuação)

Nome do composto	Pureza (%)	Grupo químico	Classe	M. M. (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	P. F (°C)	P.E (°C)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log P ou Log K <sub>ow</sub>	PV (mPa)	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
Simazina	98,0	Triazina	H	201,7	1,62	227	-	5,76	2,1	2.94 x 10 <sup>-3</sup>	130
Tebuconazol	94,0	Triazole	F	307,8	-	105	-	36	3,7	1,7 x 10 <sup>-3</sup>	-
Terbufós	98,0	Organofosforado	I, N	288,4	-	-29,2	-	4,5	2,77	34,6	500
Tetraconazol	98,5	Triazole	F	372,1	0,65	6	240	156	3,56	0,18	-
Tiabendazol	99,7	Benzimidazol	F	201,3	4,73	298	-	30	2,39	4.6 x 10 <sup>-4</sup>	7344
Tiametoxan	99,0	Organofosforado	I	291,7	-	139,1	-	4,1	-0,13	6,6 x 10 <sup>-6</sup>	-
Tiofanato metílico	98,0	Benzimidazol	F	342,39	7,28	172	-	20	1,45	0,0095	-
Triciclazol	99,0	Inibidor da biossíntese de melanina: redutase	F	189,2	-	187,2	275	596	1,42	5.86 x 10 <sup>-4</sup>	169
Trifloxistrobina	97,5	Estrobilurina	F	408,4	-	72,9	-	0,610	4,5	3.4 x 10 <sup>-3</sup>	-
Trifluralina		Dinitroanilina	H	335,5	-	49	-	0,221	4,83	1,33 x 10 <sup>-4</sup>	4400-40000

Onde: I = Inseticida; F = Fungicida; H = Herbicida; A = Acaricida; PF = Ponto de Fusão; PE = Ponto de Ebulição; M.M = Massa molar; PV = Pressão de Vapor; K<sub>ow</sub> = Coeficiente de partição octanol água; K<sub>oc</sub> = Coeficiente de adsorção a matéria orgânica do solo. Fonte: Pesticide Manual (2000–2001); FOOTPRINT Pesticide Properties Database (2012).

### 3.6 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 tanto por LC-MS/MS quanto 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  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , tanto para os compostos analisados por LC quanto para GC e não foram utilizados para os cálculos. No extrato final (1 mL) foi adicionado  $10 \mu\text{L}$  de uma solução contendo trifenilfosfato na concentração  $10 \text{mg L}^{-1}$ .

Como padrão de substituição utilizou-se linuron d-6 para cromatografia líquida e trifluralina d-14 para cromatografia gasosa. Para todas as amostras de água (100 mL) foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  dos padrões de substituição de uma solução com concentração de  $1 \text{mg L}^{-1}$ , no que resulta em uma concentração final de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , os resultados não foram utilizados para “correção da recuperação” de nenhum analito, apenas para a avaliação do procedimento de extração.

### 3.7 Preparo dos padrões analíticos utilizados

Inicialmente preparou-se, individualmente,  $10,0 \text{mL}$  da solução estoque  $1000,0 \text{mg L}^{-1}$  de cada agrotóxico em estudo, considerando a pureza dos padrões sólidos (RIBANI, 2004). A massa do padrão sólido pesada foi dissolvida em metanol ou acetonitrila grau HPLC. Apenas para o composto carbendazim a massa pesada foi dissolvida em acetonitrila com adição de 8% de uma solução de HCl  $0,1 \text{mol L}^{-1}$ , uma vez que a adição de HCl leva à solubilização do carbendazim, o qual não é totalmente solúvel apenas em acetonitrila ou metanol (CHIARADIA, 2009). Estas soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas à temperatura de  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A partir das soluções de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , preparou-se duas soluções de trabalho dos agrotóxicos avaliados, uma com os compostos a serem analisados por HPLC e a outra por GC, incluindo, em cada solução o padrão de substituição. Foram preparadas 25 mL de cada solução na concentração  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , em metanol grau HPLC para os compostos avaliados por Cromatografia Líquida e em acetonitrila grau HPLC para os compostos analisados por Cromatografia Gasosa. Estas soluções foram utilizadas para os ensaios de fortificação.

Para avaliar a linearidade do método foi preparada uma mistura das duas soluções com todos os compostos em estudos, na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir dessa solução foram preparadas as soluções analíticas de trabalho, nas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 200,0 e  $250,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , tanto para avaliar a linearidade no LC quanto no GC.

### **3.8 Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS e GC-MS/MS para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água**

Neste trabalho, as análises foram realizadas empregando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas e a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, ambas em série (MS/MS) no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês Multiple Reaction Monitoring). O uso da Espectrometria de Massas é bastante interessante, visto que, proporciona maior detectabilidade e seletividade que detectores clássicos utilizados em cromatografia, uma vez que, é possível a identificação e quantificação dos agrotóxicos de forma inequívoca. Ao mesmo tempo, o acoplamento LC-MS/MS e GC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimizar o problema de co-eluição de substâncias encontradas, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para análise e confirmação dos analitos de interesse em baixas concentrações. A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS e GC-MS/MS que foram otimizados para a determinação dos agrotóxicos em estudo.

### 3.8.1 Otimização do Sistema Cromatográfico LC-MS/MS

#### 3.8.1.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel baseou-se nas condições utilizadas frequentemente no LARP-UFSM onde foi realizado este estudo e através de revisão bibliográfica do assunto (PRESTES 2011; FRIGGI, 2012; DONATO, 2012). A fase móvel empregada neste trabalho foi solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> (solvente A) e metanol (solvente B) a uma vazão de 150 µL min<sup>-1</sup>, resultando em um tempo total de análise de 15 minutos, conforme gradiente descrito na tabela 6.

Tabela 6 – Gradiente utilizado para eluição dos compostos

	<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>Gradiente</b>	0,0	90	10
	3,0	90	10
	4,0	50	50
	8,0	5	95
	11,0	2	98
	13,0	2	98
	14,0	90	10
	15,0	90	10

% A: Solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>

% B: Metanol

#### 3.8.1.2 Condições do sistema de detecção

A fim de otimizar as condições do espectrômetro de massas foram realizadas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 1,0 mg L<sup>-1</sup> de cada composto individualmente. A partir das infusões foi selecionado o modo de ionização da fonte (eletronebulização positiva ou eletronebulização negativa), voltagem do capilar, energias de colisão para

fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Após a escolha destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos agrotóxicos estudados.

### 3.8.2 Otimização do Sistema Cromatográfico GC-MS/MS

#### 3.8.2.1 Condições cromatográficas

A escolha das condições cromatográficas baseou-se nas condições utilizadas frequentemente no LARP-UFSM. Abaixo estão descritas as condições utilizadas para o sistema GC-MS/MS, para análise dos agrotóxicos em amostras de água.

- Temperatura do injetor: 280 °C;
- Volume de injeção 2,0 µL (splitless)
- Programação da temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C (1,0 min), com incremento de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C (4,17 min); logo após um incremento de 20 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C;
- Vazão do gás de arraste (Hélio) constante em 1,2 mL min<sup>-1</sup>;
- Tempo total de corrida: 15 min.

Para o espectrômetro de massas, modo de ionização EI positivo:

- Temperatura de *transfer line*: 250 °C
- Temperatura da fonte de ionização: 210 °C
- Modo de aquisição MS/MS
- Modo de ionização EI positivo, com argônio a pressão de 2 mtorr.

#### 3.8.2.2 Otimização do sistema de detecção

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<sup>-1</sup> 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) para

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 acima otimizados, foram avaliadas as transições, no modo de monitoramento de reações múltiplas (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.

### **3.9 Otimização do sistema de Extração em Fase Sólida (SPE) para a análise de resíduos de agrotóxicos em água**

O sistema SPE utilizado para a concentração dos agrotóxicos em amostras de água é simples (Figura 11). No sistema comercial utiliza-se um dispositivo *manifold*, que é composto por uma caixa de vácuo com espaço para a utilização de 12 cartuchos SPE simultaneamente.

As amostras de água, depois de filtradas em membranas 0,45  $\mu\text{m}$ , são colocadas em balões volumétricos e em seguida, são transferidas para cartuchos SPE através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). Esta transferência ocorre por sucção em função da utilização de uma bomba de vácuo e é controlada individualmente para cada cartucho através de válvulas. Adotou-se uma vazão de percolação na faixa de 2,0 a 5,0 mL L<sup>-1</sup> para a concentração das amostras.

Por se tratar de um estudo de determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de água (rio, poço, potável), sabe-se que as concentrações dos compostos presentes, bem como os valores máximos permitidos pelas legislações são baixas. Portanto, existe a necessidade de uma etapa de concentração de um determinado volume de amostra, para que seja possível fazer quantificação destes compostos. Os volumes de amostras estudados foram 250 e 100 mL, contendo uma mistura de todos os analitos estudados, conforme tabela 7.

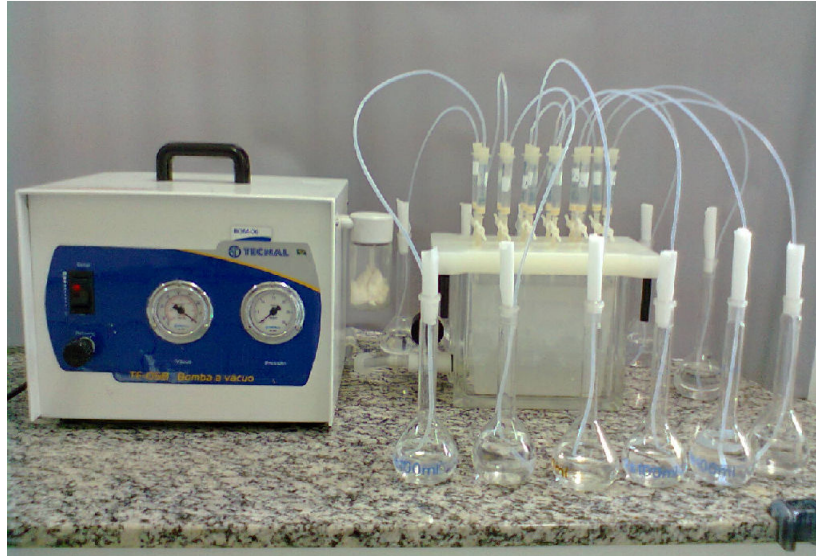


Figura 11 – Foto ilustrativa do sistema SPE utilizado para a concentração das amostras de água.

### 3.9.1 Escolha do cartucho (sorvente) para a etapa de concentração

Em uma avaliação inicial do procedimento de extração em fase sólida foram escolhidos quatro tipos de cartuchos disponíveis comercialmente: Strata-X<sup>®</sup> 200 mg, Strata- X<sup>®</sup> 60 mg, Strata C<sub>18</sub> 500 mg, Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg. As amostras foram fortificadas na concentração de 1 µg L<sup>-1</sup> em triplicadas. O cartucho mais adequado para a extração dos compostos em estudos foi escolhido em função do tipo e da quantidade de fase estacionária. Fatores como: porcentagem de recuperação, necessidade de ajuste de pH e secagem (MARTINS, 2004).

Para o condicionamento dos cartuchos utilizou-se um volume de metanol em função da solubilidade em água na etapa de equilíbrio, e um volume de água ultrapura antes da percolação da amostra (DONATO, 2012; SABIN, 2007).

### 3.9.2 Escolha do solvente de eluição dos agrotóxicos de interesse

A escolha do solvente deve permitir a eluição dos analitos de forma eficiente, mantendo retidos no cartucho os interferentes contidos na amostra. O ideal é eluir-se os analitos de interesses em um pequeno volume de solvente apropriado, de forma que os compostos estejam em concentração apropriada para análise.

O solvente de eluição deve ter maior força de eluição que o solvente usado na etapa anterior, limpeza do cartucho, o que é obtido aumentando a quantidade de solvente orgânico ou ainda alterando o pH da solução de eluição. O solvente adequado está diretamente relacionado com a polaridade dos compostos extraídos e o ideal é eluir com um solvente de mesma polaridade dos compostos (JARDIM, 2010).

Na tabela 7, estão listados os solventes de eluição testados, bem como, os ensaios realizados para a seleção da melhor condição para a extração em fase sólida, com diferentes volumes de amostras e solventes utilizados.



Tabela 7 – Ensaios realizados para a otimização do preparo de amostra utilizando SPE.

<b>Ensaio</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Acidificação da amostra (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1 v/v)</b>	<b>Eluição</b>	<b>Tipo de adsorvente</b>
Ensaio 1	250	sem acidificar (pH 5,2 a 6,5)	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Strata-X <sup>®</sup> 200 mg
Ensaio 2	250	sem acidificar (pH 5,2 a 6,5)	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Strata C <sub>18</sub> 500 mg
Ensaio 3	250	sem acidificar (pH 5,2 a 6,5)	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Oasis <sup>®</sup> HLB 60 mg
Ensaio 4	250	pH 2,5	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Strata-X <sup>®</sup> 200 mg
Ensaio 5	250	pH 2,5	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Strata C <sub>18</sub> 500 mg
Ensaio 6	250	pH 2,5	5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético	Oasis <sup>®</sup> HLB 60 mg

(continuação)

<b>Ensaio</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Acidificação da amostra (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1 v/v)</b>	<b>Eluição</b>	<b>Tipo de adsorvente</b>
Ensaio 7	250	sem acidificar (pH 5,2 a 6,5)	2,5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético + 2,5 mL metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Strata-X® 200 mg
Ensaio 8	250	sem acidificar (pH 5,2 a 6,5)	2,5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético + 2,5 mL metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Oasis® HLB 60 mg
Ensaio 9	250	pH 2,5	5 mL de metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Strata-X® 200 mg
Ensaio 10	250	pH 2,5	5 mL de metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Strata C <sub>18</sub> 500 mg

(continuação)

<b>Ensaio</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Acidificação da amostra (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1 v/v)</b>	<b>Eluição</b>	<b>Tipo de adsorvente</b>
Ensaio 11	250	pH 2,5	5 mL de metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Oasis <sup>®</sup> HLB 60 mg
Ensaio 12	250	pH 2,5	2,5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético + 2,5 mL metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Strata-X <sup>®</sup> 200 mg
Ensaio 13	250	pH 2,5	2,5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila acidificado com 1% (v/v) ácido acético + 2,5 mL metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)	Oasis <sup>®</sup> HLB 60 mg
Ensaio 14	100	pH 2,5	2,5 mL de diclorometano + 2,5 mL de metanol, para o LC foi evaporado 1mL e redissolvido em 1 mL de fase móvel	Strata-X <sup>®</sup> 200 mg

(continuação)

<b>Ensaio</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Acidificação da amostra (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1 v/v)</b>	<b>Eluição</b>	<b>Tipo de adsorvente</b>
Ensaio 15	100	pH 2,5	2,5 mL de diclorometano + 2,5 mL de metanol, para o LC foi evaporado 1mL e redissolvido em 1 mL de fase móvel	Strata-X® 60 mg
Ensaio 16	100	pH 2,5	2,5 mL de diclorometano + 2,5 mL de metanol, para o LC foi evaporado 1mL e redissolvido em 1 mL de fase móvel	Oasis® HLB 60 mg
Ensaio 17	100	pH 2,5	2,5 mL de acetona + 2,5 mL de metanol	Oasis® HLB 60 mg
Ensaio 18	100	pH 2,5	2 mL de acetonitrila à 40 °C	Oasis® HLB 60 mg
Ensaio 19	100	pH 2,5	2 mL metanol	Oasis® HLB 60 mg
Ensaio 20	100	pH 2,5	2 x de 500 µL de diclorometano + 2 x de 500 µL de metanol, para o LC foi evaporado 1mL e redissolvido em 1 mL de fase móvel	Oasis® HLB 60 mg

### **3.10 Validação do método SPE para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água**

Definidas as melhores condições para o procedimento de extração e separação cromatográfica, realizou-se a validação do método analítico.

No presente trabalho, com o intuito de validar o método desenvolvido para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água foi avaliado os parâmetros de: seletividade, linearidade e curva analítica, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária, além da avaliação do efeito matriz.

#### **3.10.1 Seletividade**

Para avaliar e comprovar a seletividade do método comparou-se uma injeção no sistema cromatógrafo de uma amostra “branco” (água da torneira), ou seja, sem a presença dos agrotóxicos em estudo e uma amostra fortificada na concentração  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ . A seletividade do método foi assegurada pela ausência dos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos da amostra “branco”.

#### **3.10.2 Linearidade e Curvas Analíticas**

A linearidade das curvas analíticas foi realizada através da injeção das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.7, nas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 200,0 e 250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estas foram preparadas em solvente orgânico (1:1 (v/v) diclorometano:metanol) para GC e na própria fase móvel para LC, e também foram preparadas no extrato da matriz (água da torneira). As curvas preparadas em extratos da matriz foram injetadas 3 vezes, enquanto a curva no solvente foi injetada apenas uma vez no sistema cromatográfico.

Após, realizou-se a confecção das curvas analíticas para cada composto em estudo analisado por GC-MS/MS ou LC-MS/MS, obtendo-se os cálculos da média das áreas de cada analito e em seguida foi obtida a regressão linear, bem como o

coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Obtiveram-se as curvas analíticas com o auxílio do programa Microsoft Office® Excel 2010.

### 3.10.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ foram estabelecidos com base no sinal do analito pelo ruído analítico, conforme descrito na revisão bibliográfica. O LOD é definido como a concentração do analito que resulta um sinal três vezes maior que o ruído da linha base, nas proximidades do sinal do analito ( $\text{LOD} = 3 \text{ S/R}$ ). O LOQ é determinado como a concentração do analito que resulta um sinal dez vezes maior que o ruído ( $\text{LOQ} = 10 \text{ S/R}$ ).

Devido o método SPE proposto apresentar uma etapa de concentração os limites adotados referentes aos instrumentos são diferentes dos adotados pelo método. O  $\text{LOD}_i$  e  $\text{LOQ}_i$  instrumentais, são expressos em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Já o limite de detecção e quantificação do método,  $\text{LOD}_m$  e  $\text{LOQ}_m$  respectivamente, são obtidos dividindo-se o valor de  $\text{LOD}_i$  e  $\text{LOQ}_i$  pelo fator obtido pelo método de extração, obtendo-se os valores de  $\text{LOD}_m$  e  $\text{LOQ}_m$  em  $\mu\text{g L}^{-1}$  (RIBANI, 2004).

### 3.10.4 Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão

A exatidão foi determinada conforme o estudo de recuperação. As amostras “branco” foram fortificadas em três níveis de concentração: 0,5, 1,5 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , seguindo o método de extração otimizado. Para os compostos dieldrin, aldrin e clordano, além desses três níveis de fortificação, foi realizado um nível extra na concentração 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a fim de atingir o limite máximo de resíduos permitido em água potável, pela legislação vigente. Foram realizadas 6 réplicas de extração para cada nível e a recuperação foi calculada de acordo com a equação 3, seguindo o guia de validação do INMETRO (2011).

$$\text{recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

$C_1$  = Concentração determinada na amostra fortificada;

$C_2$  = Concentração determinada na amostra não fortificada;

$C_3$  = Concentração usada para fortificação.

### 3.10.5 Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária

Para avaliar a precisão do instrumento (repetitividade ou desvio padrão relativo) foi realizada a extração e análise de seis réplicas de cada nível de concentração ( $n=6$ ), sendo que cada réplica foi injetada uma única vez. A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), conforme a equação 4.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

$s$  = estimativa de desvio padrão absoluto;

$$s = \left\{ \frac{\sum (x_i - \bar{x}_m)^2}{n-1} \right\}^{1/2};$$

$x_i$  = valores individuais;

$\bar{X}$  = média das medidas em replicatas;

$n$  = número de medidas.

A precisão intermediária ( $RSD_{PI}$ ) foi avaliada fazendo a injeção da solução analítica dos agrotóxicos (curva analítica) e das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo estas realizadas em dia diferente da avaliação da repetitividade.

### 3.10.6 Avaliação do Efeito Matriz

Para a avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e aquelas preparadas no extrato “branco” da matriz. O solvente usado para a confecção da curva foi 1:1 (v/v) diclorometano:metanol para o GC e para o LC utilizou-se como solvente a própria fase móvel (1:1 (v/v) formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> metanol). O cálculo foi efetuado através da equação 5.

$$Efeito\ matriz = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

X<sub>1</sub> = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz (água);

X<sub>2</sub> = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.

### 3.11 Aplicação do método desenvolvido em amostras reais

O método foi aplicado em 12 amostras reais coletadas em quatro cidades da região Centro do Estado do Rio Grande do Sul, no mês de julho/2012. A escolha das cidades abrangidas deu-se pelo fato, da agricultura ser a principal atividade econômica da região.

A amostragem teve por objetivo abranger amostras de águas de diferentes características de forma a representar fontes de abastecimento como, por exemplo, arroios, rios, vertentes e poços artesianos, visando avaliar o desempenho do método desenvolvido.

Desse modo, foram coletadas 3 amostras de água do sistema público de abastecimento (tratada), 4 de poço, 2 de vertente e 3 de água de rio. Destas, apenas as amostras de água de rio não são utilizadas para o consumo da população das cidades onde se realizaram as coletas.



As coletas foram realizadas em frascos âmbar, armazenadas em local protegido da luz e em temperaturas entre 4 e 10 °C, evitando assim o congelamento da amostra e possível degradação dos compostos a serem analisados.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Para a determinação dos resíduos de agrotóxicos com diferentes classes foi utilizada neste estudo a Cromatografia Líquida e a Cromatografia Gasosa, ambas acopladas à Espectrometria de Massas em série, empregando analisador triplo quadrupolo. As condições cromatográficas estabelecidas para este trabalho foram estabelecidas de acordo com trabalhos realizados no LARP e estudos desenvolvidos por Martins (2010), Friggi (2012) e Prestes (2011).

### **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 3.8.2. Através da figura 12 observa-se: (A) um cromatograma obtido para uma amostra “branco” na matriz, onde nota-se a ausência de compostos que possam interferir na análise dos agrotóxicos em estudo, e em (B) um cromatograma total dos 25 compostos determinados por GC na concentração  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , que equivale uma  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  no nível de fortificação, alcançado por meio das condições cromatográficas descritas no item 3.8.2.

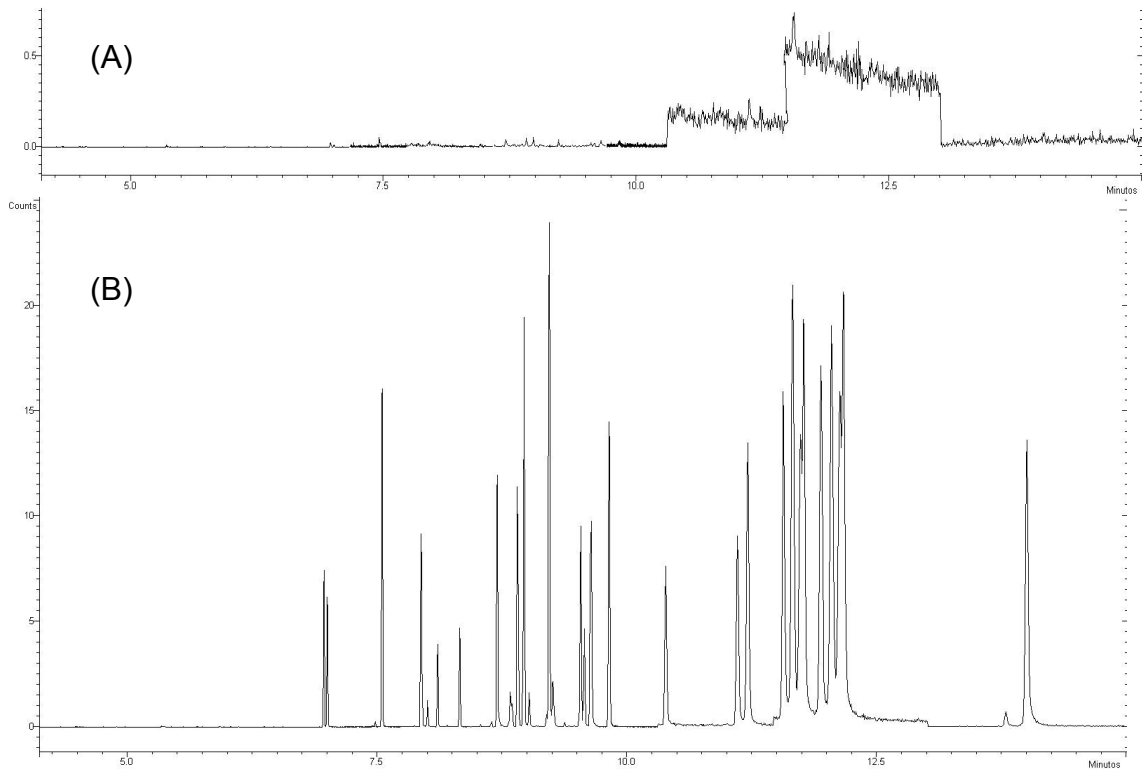


Figura 12 – Cromatograma do íon total obtido por GC-MS/MS para (A) amostra branco da matriz e (B) solução analítica no extrato da matriz, contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A tabela 8 apresenta os 25 agrotóxicos determinados por GC-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo de aquisição MRM 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.

A figura 13 destaca o cromatograma da solução analítica preparada no extrato da matriz na concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  com suas respectivas transições de quantificação utilizadas para os compostos: parationa metílica, aldrin e endossulfan alfa. Observa-se a seletividade da técnica empregando MS/MS no modo MRM

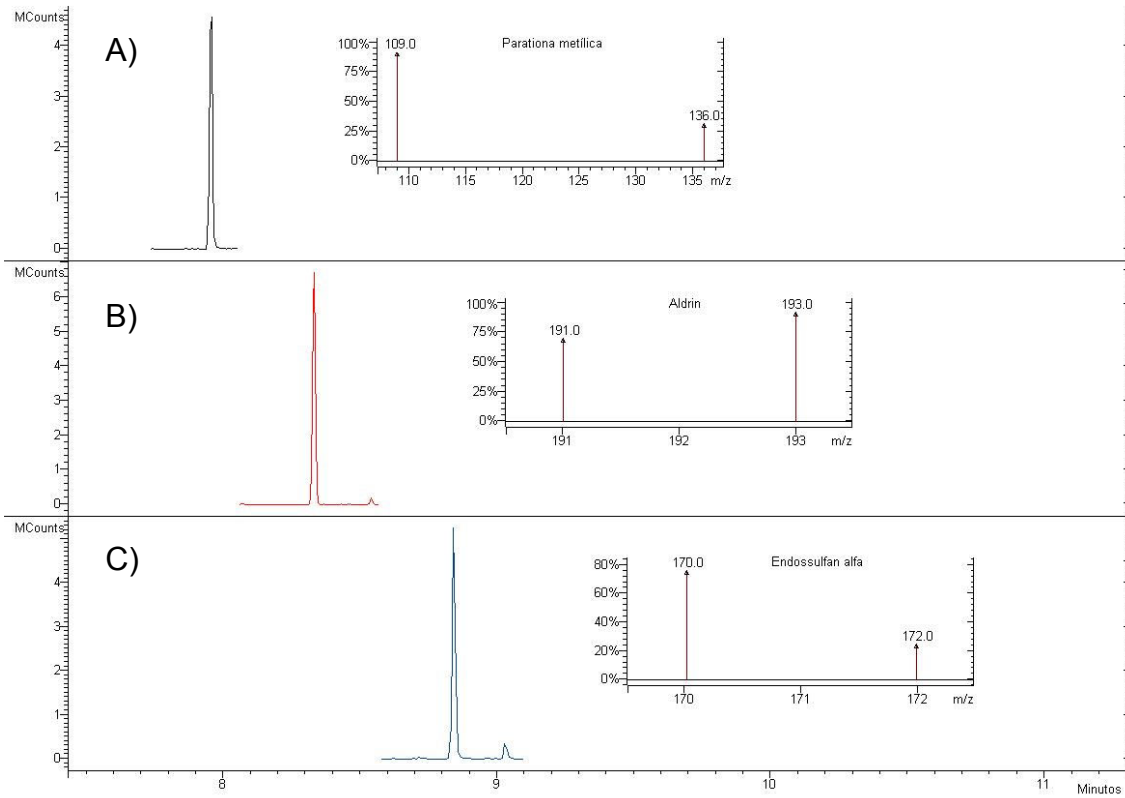


Figura 13 – Cromatograma MRM obtido por GC-MS/MS, com ionização EI, para uma solução analítica ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada em extrato da matriz (água de torneira) e suas respectivas transições de quantificação dos agrotóxicos: (A) parationa metilica; (B) aldrin; e (C) endossulfan alfa.

Tabela 8 – Agrotóxicos determinados por GC-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, no modo MRM com seus respectivos segmentos de análises, tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação.

Segmento	$t_R$ (min)	Compostos	1ª Transição - quantificação			2ª Transição - confirmação		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
1	7,05	Trifluralina d-14 (PS)	315,0	267,0	8	315,0	209,0	10
	7,08	Trifluralina	306,0	264,0	10	306,0	159,0	30
2	7,64	Lindano	219,0	147,0	20	219,0	183,0	10
3	7,95	Metolaclor	162,0	132,5,	20	162,0	118,0	20
	8,02	Alaclor	188,0	130,0	40	188,0	160,0	10
	8,04	Parationa metílica	263,0	109,0	25	263,0	136,0	10
4	8,19	Fenitrotiona	277,0	109,0	25	277,0	260,0	10
	8,41	Aldrin	263,0	193,0	30	263,0	191,0	30
5	8,82	Chlordano	375,0	266,0	10	375,0	303,0	10
	8,92	Endossulfan alfa	241,0	170,0	15	241,0	172,0	15
	8,95	Oxifluorfen	300,0	223,0	20	300,0	132,0	40
6	9,95	2,4 DDE	246,0	176,0	25	318,0	246,0	25
	9,05	2,4 DDD	235,0	199,0	20	235,0	165,0	20
	9,11	Dieldrin	277,0	170,0	40	277,0	206,0	15

(continuação)

Segmento	t <sub>R</sub> (min)	Compostos	1ª Transição - quantificação			2ª Transição - confirmação		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
7	9,30	Endrin	263,0	193,0	30	263,0	191,0	30
	9,32	DDT	235,0	165,0	20	235,0	199,0	20
	9,38	Endossulfan beta	241,0	206,0	10	241,0	170,0	20
8	9,69	Endossulfan sulfato	272,0	237,0	15	272,0	235,0	10
	9,77	Trifenilfosfato (PI)	325,0	169,0	18	325,0	226,0	18
	9,81	Bifentrina	181,0	165,0	20	181,0	166,0	10
9	10,30	Permetrina	165,0	91,0	10	165,0	127,0	5
	10,43	Cialotrina lambda	197,0	141,0	10	197,0	161,0	5
10	11,79	Ciflutrina	164,0	91,0	15	164,0	127,0	5
	12,29	Cipermetrina	164,0	91,0	15	164,0	127,0	5
11	14,22	Deltametrina	253,0	174,0	10	253,0	172,0	5

PS: Padrão de substituição; PI: Padrão interno; t<sub>R</sub>: Tempo de retenção.

## 4.2 Otimização do sistema LC-MS/MS

No presente trabalho foi utilizada Cromatografia Líquida com eluição em fase reversa utilizando uma coluna Pursuit UPS (C<sub>18</sub>, 50 x 3,0 mm d.i), com 2,4 µm de tamanho de partícula, sem pré-coluna. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> (solvente A) e metanol (solvente B) a uma vazão de 150 µL min<sup>-1</sup>, com tempo total de análise de 15 min, conforme condições descritas no item 3.8.1. Na figura 14 estão apresentados os cromatogramas da amostra “branco” da matriz da solução analítica no extrato da matriz na concentração 50 µg L<sup>-1</sup>, que corresponde a 1,0 µg L<sup>-1</sup> na amostra de água, ambos obtidos por LC-MS/MS nas condições descritas no item 3.8.1.

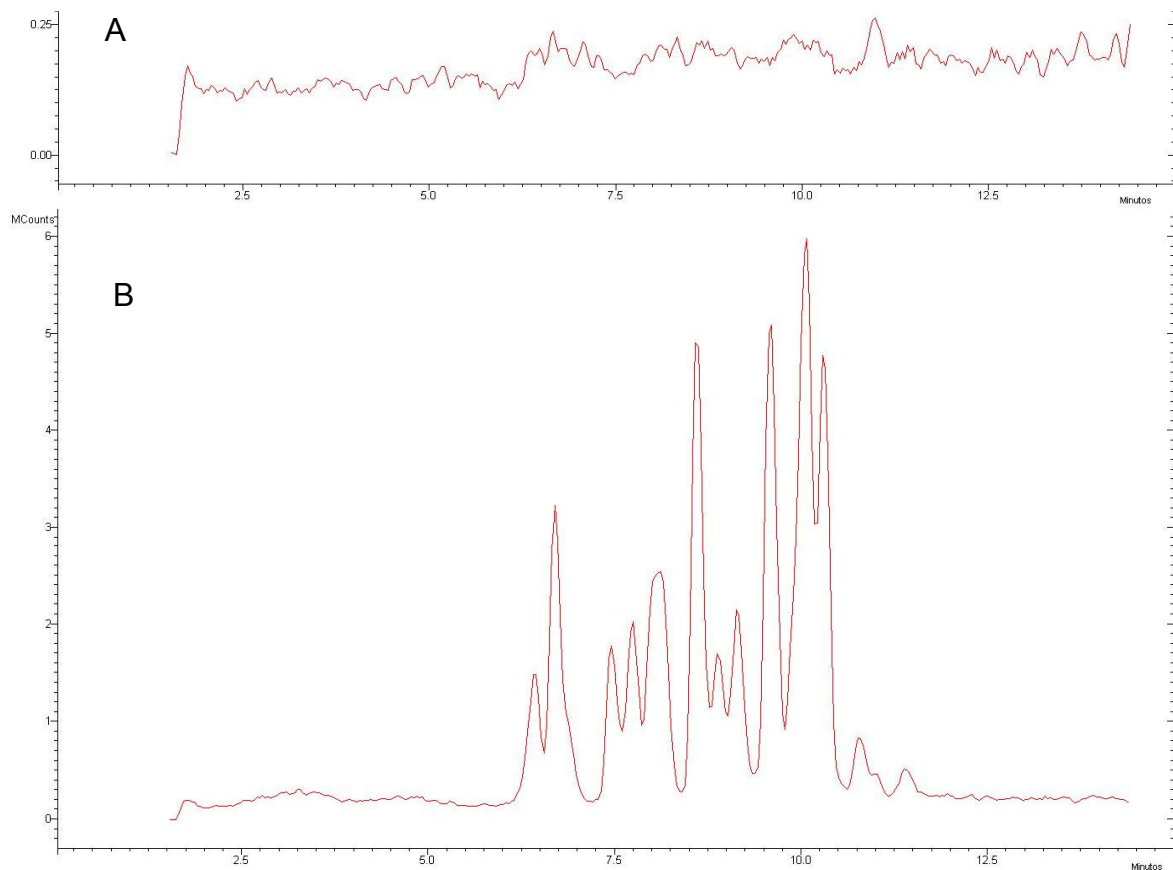


Figura 14 – Cromatograma do íon total (A) da amostra “branco” da matriz e (B) da solução analítica no extrato da matriz na concentração 50 µg L<sup>-1</sup>, ambos obtidos por LC-MS/MS nas condições descritas no item 3.8.1.

Observa-se na figura 14 B que nos primeiros e últimos minutos da corrida cromatográfica, nenhum composto possui tempo de retenção. Isto é explicado, pois nos primeiros minutos as condições utilizadas no gradiente de eluição servem para eliminar substâncias polares solúveis em água, como por exemplo, os sais presentes da matriz. Já nos últimos minutos as condições de eluição favorecem a eliminação de substâncias apolares solúveis em metanol, como por exemplo, matéria orgânica da matriz e também servir para condicionar a coluna cromatográfica para a próxima injeção.

Através da figura 14 (B) pode-se notar, que a maioria dos compostos apresentou tempo de retenção muito semelhante e em alguns casos houve co-eluição, por isso não foi possível segmentar o tempo de corrida. Entretanto isto não prejudicou a determinação por LC-MS/MS.

Neste estudo foi empregado o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), utilizando uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI).

A partir da realização da infusão direta no espectrômetro de massas de cada um dos compostos na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  em fase móvel (1:1 (v,v) de metanol:formiato de amônio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram obtidas as condições de análise por MS/MS para cada um dos mesmos. As condições de análise foram: temperatura da fonte:  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura do gás de dessolvatação ( $\text{N}_2$ ):  $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a pressão do gás de dessolvatação: 40 psi e a pressão do gás de secagem: 20 psi. Argônio foi utilizado como gás de colisão à pressão de 1,8 mTorr. As voltagens do *shield* e da agulha foram 600 e 5000 V, respectivamente.

Pode-se visualizar na tabela 9 os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS, o tempo de retenção, o modo de ionização ESI (+/-), a energia de colisão das transições monitoradas, juntamente com os íons precursores e produtos. Foram selecionadas duas transições características para cada analito, sendo que, a transição mais intensa foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos. Para os compostos pendimentalina, 2,4 D e tetraconazole foi utilizada a mesma transição para confirmação e quantificação por não apresentarem uma segunda transição com intensidade adequada.

Na figura 15 está apresentado o cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM, de uma solução analítica na concentração de  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , preparada no



extrato da matriz, juntamente com seus íons de quantificação e confirmação: 2,4 D, carbofurano, atrazina e 2,4,5 T.

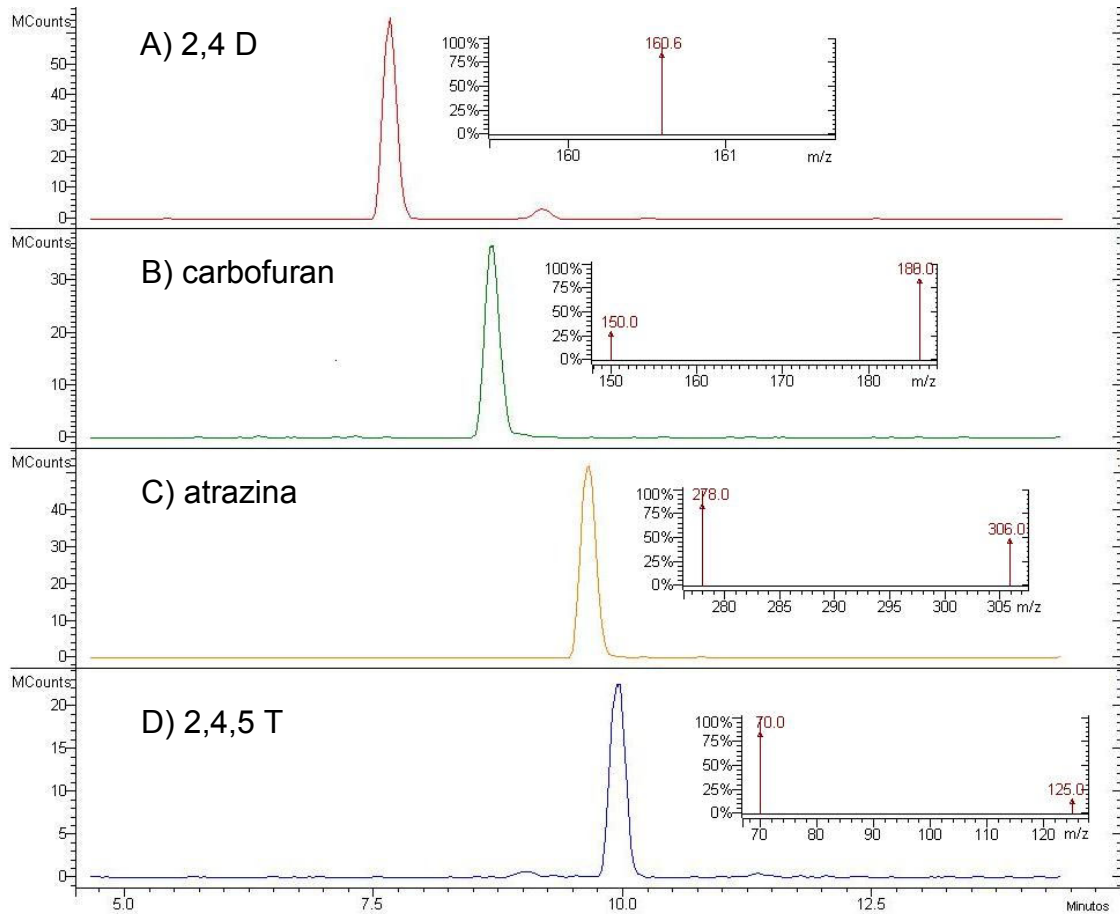


Figura 15 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo MRM, de uma solução analítica ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), preparada no extrato da matriz e seus respectivos íons de quantificação e confirmação: A) 2,4 D; B) carbofurano; C) atrazina e D) 2,4,5 T.

Tabela 9 – Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção ( $t_R$ ), modo de ionização ESI (+/-), íons precursores e produtos e energias de colisão.

$t_R$ (min)	Compostos	ESI (+/-)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
5,60	Metamidofós	+	142,0	93,8	12,5	124,8	12,5
7,13	Imazapir	+	262,0	217,0	19,0	220,0	17,0
7,41	Aldicarbe sulfóxido	+	207,0	105,0	10,0	132,0	5,0
7,45	Aldicarbe sulfona	+	240,0	223,0	7,5	166,0	11,0
7,47	Imazapique	+	276,0	231,0	18,0	234,0	16,5
7,65	Metsulfurom metílico	+	382,0	167,5	12,0	198,9	19,5
7,76	Imazetapir	+	290,0	245,0	19,0	248	17,0
7,79	Tiametoxan	+	292,0	210,0	11,0	181,0	19,5
7,83	Bentazona	-	239,0	131,7	25,5	196,6	19,0
7,92	Quincloraque	+	242,0	223,8	13,0	160,9	37,0
7,97	Azinssulfuron	+	425,0	182,0	12,5	156,0	40,0
8,05	Imidacloprido	+	256,1	209,0	14,0	175,0	17,0
8,72	Triciclazole	+	190,0	136,0	25,5	109,0	31,5
8,84	Carbendazin	+	192,0	160,0	15,0	131,9	27,0
8,95	Pirazossulfuron	+	415,0	182,0	15,5	139,0	39,0
8,99	2,4 D	-	219,0	160,6	11,5	-	-
8,99	Aldicarbe	+	208,0	116,0	5,0	89,0	15,0
9,15	Tiofanato metílico	+	243,0	151,0	15,5	160,0	23,0
9,16	Etoxissulfuron	+	399,0	261,0	12,5	218,0	21,0
9,27	Tiabendazol	+	202,0	175,0	19,5	131,0	27,0
9,44	Carbofurano	+	222,0	165,0	7,5	122,9	16,5
9,55	Bispiribaque sódico	+	453,0	296,6	18,5	179,0	18,5
9,56	2,4,5 T	-	252,8	158,6	28,0	194,5	11,0
9,57	Simazina	+	202,0	131,9	19,5	123,9	18,0
9,59	Carbaril	+	202,0	114,9	8,0	126,9	26,5
9,89	Azoxistrobina	+	404,0	372,0	14,5	328,9	30,0

(continuação)

$t_R$ (min)	Compostos	ESI (+/-)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
9,98	Pendimetalina	+	282,0	194,0	15,5	-	-
9,99	Atrazina	+	216,0	173,0	13,5	103,8	24,5
10,10	Diuron	-	231,0	150,0	24,0	186,0	16,0
10,28	Clomazona	+	240,0	124,9	18,0	88,9	39,5
10,48	Malationa	+	331,0	284,9	8,0	126,9	9,0
10,54	Propanil	+	218,0	162,0	15,0	127,0	25,0
10,59	Linuron d-6 (PS)	+	255,0	159,9	15,5	185,0	15,5
10,79	Tetraconazol	+	372,0	158,9	24,0	-	-
10,80	Fipronil	-	435,0	329,7	15,5	249,6	26,5
10,99	Molinato	+	188,0	126,0	20,0	160,0	12,0
11,10	Trifenilfosfato (PI)	+	327,0	152,0	29,0	214,9	20,5
11,19	Tebuconazol	+	308,0	69,9	14,0	124,9	33,0
11,35	Propiconazole	+	342,0	158,9	25,5	69,0	14,0
11,36	Clorpirifós oxon	+	334,5	306,0	10,0	278,0	15,0
11,47	Cialofope butílico	+	375,0	256,0	15,0	358,0	6,5
11,50	Trifloxistrobina	+	409,0	186,0	14,0	206,0	11,0
11,59	Difenoconazol	+	406,0	250,9	24,0	336,9	15,5
11,83	Benfuracarbe	+	411,0	252,0	12,0	158,0	7,0
11,93	Clorpirifós metílico	+	322,0	124,8	15,0	289,7	14,5
12,12	Profenofós	+	375,0	304,7	19,5	346,7	12,0
12,33	Terbufós	+	288,9	102,9	5,0	232,9	5,0
12,34	Benomil	+	293,0	219,0	6,5	101,0	16,0
13,14	Clorpirifós etílico	+	349,9	197,8	16,0	321,7	10,5

PS: Padrão de substituição; PI: Padrão interno;  $t_R$ : Tempo de retenção.

### 4.3 Seleção das melhores condições para a SPE

A otimização no preparo da amostra é um processo importante para alcançar uma maior eficiência na extração dos agrotóxicos na água e conseqüentemente obter melhor recuperação. Para a escolha das melhores condições para a SPE, buscou-se uma etapa unificada, onde, em apenas uma extração, conseguisse extrair ao mesmo tempo, agrotóxicos com diferentes propriedades, como por exemplo, compostos polares juntamente com compostos apolares. Foram otimizados os parâmetros: volume de amostra, tipo de sorvente em combinação com diferentes tipo e quantidades de solventes de eluição. Para avaliar os procedimentos de extração realizados neste estudo, utilizaram-se amostras “branco” (água de torneira) fortificadas na concentração  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Foram realizados 20 ensaios conforme descrito na tabela 7, a fim de selecionar a melhor condição para extrair em uma única etapa os agrotóxicos a serem determinados por GC e LC.

Nos seis primeiros testes foram testados três diferentes cartuchos (Strata-X<sup>®</sup> 200 mg, Strata C<sub>18</sub> 500 mg e Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg) com volume de amostra de 250 mL com e sem acidificação da amostra. A eluição foi realizada utilizando 5 mL metanol:acetonitrila acidificada 1:1 (v/v) contendo 1% (v/v) de ácido acético (DONATO *et al.*, 2012).

Pode-se observar na figura 16 que os ensaios 1, 2, 3 apresentaram menor número de compostos recuperados na faixa aceitável de recuperação (70 – 120%) (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2010), tanto para os compostos determinados por LC quanto por GC, quando comparando com os testes 4, 5, 6, efetuados com acidificação da amostra (pH = 2,5). Portanto, conclui-se que um maior número de compostos é extraído quando é feita acidificação da amostra pH 2,5.

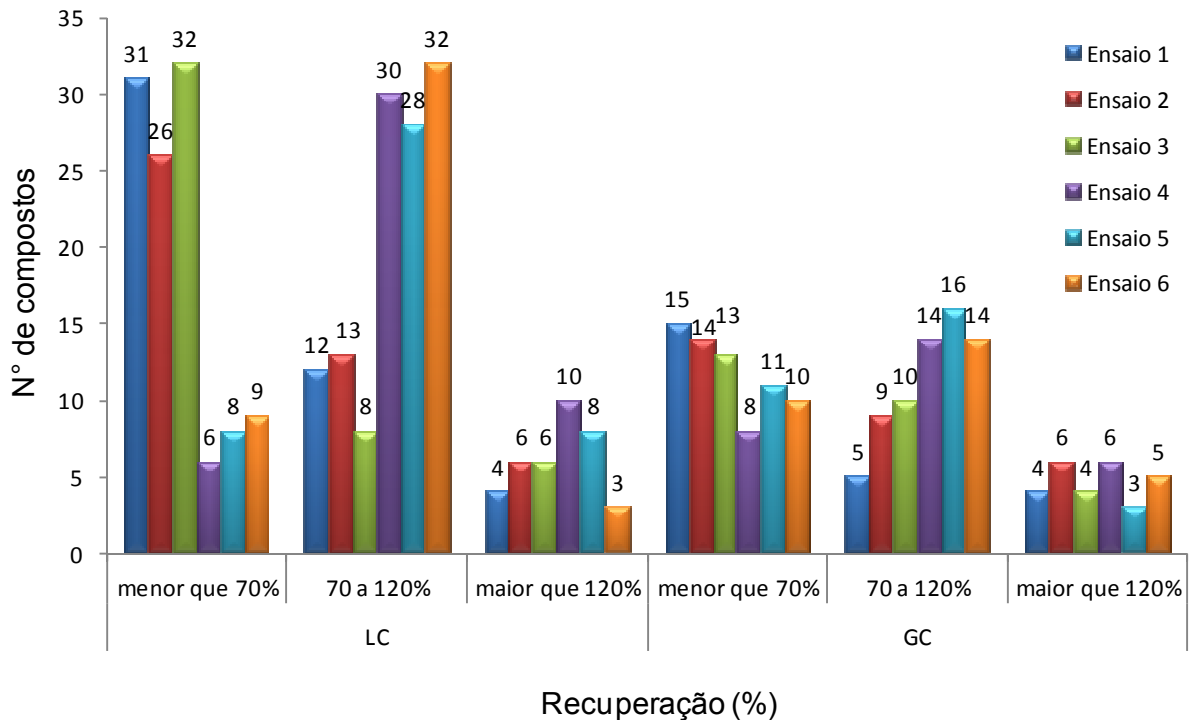


Figura 16 – Número de agrotóxicos recuperados em três diferentes faixas de recuperação para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Neste mesmo sentido, para avaliar o efeito do pH da amostra na recuperação dos agrotóxicos foram realizados dois testes (ensaios 7 e 8) sem acidificar a amostra, porém modificando a solução de eluição que foi 2,5 mL 1:1 (v/v) metanol:acetonitrila 1:1 (v/v) acidificado com 1% (v/v) ácido acético + 2,5 mL metanol:acetonitrila 1:1 (v/v). Na figura 17 pode ser visualizado que a maioria dos agrotóxicos apresenta recuperação fora da faixa de aceitação, mesmo modificando a solução de eluição. Desse modo, observa-se que a má recuperação desses analitos não está relacionada com a solução de eluição dos mesmos.

Com isso, optou-se pela acidificação da amostra para se obter melhores resultados. Esta necessidade de acidificar a amostra é atribuído aos valores baixos da constante de dissociação ácida (pKa) da maioria dos agrotóxicos selecionados, como destacado na tabela 5. Existem ainda neste grupo compostos que não se dissociam e, portanto, não são influenciados pelo pH do meio. Os agrotóxicos ionizáveis podem estar na forma neutra ou como íons, dependendo se o pH da água está acima ou abaixo da sua constante de ionização. Teoricamente, formas iônicas e neutras estarão presentes em igual quantidade quando o pH for igual ao pKa do

agrotóxico (SPADOTTO *et al.*, 2010). Portanto, pode-se observar que uma melhor interação dos agrotóxicos com os sorventes ocorre quando os agrotóxicos estão na forma neutra.

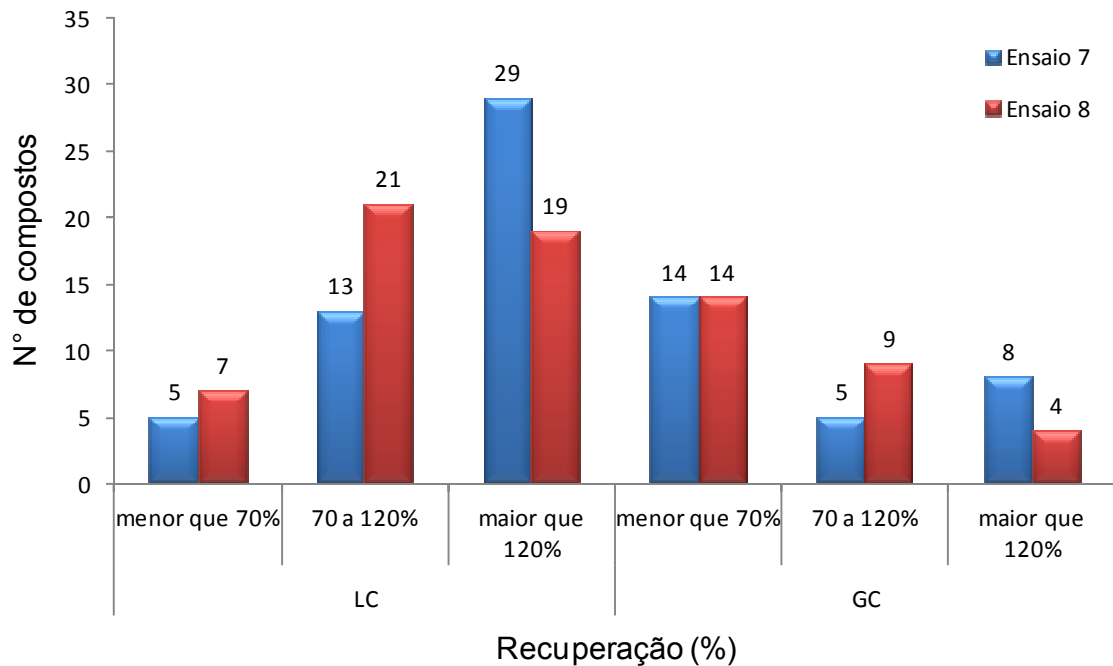


Figura 17 – Número de agrotóxicos recuperados em três diferentes faixas de recuperação para os ensaios 7 e 8.

Após observar a necessidade de acidificação da amostra, realizou-se outros 3 testes (ensaio 9, 10 e 11), a fim de obter melhores resultados, ou seja, um maior número de agrotóxicos recuperados entre 70 e 120%. Para isto, testou-se os cartuchos Strata-X<sup>®</sup> 200 mg, Strata C<sub>18</sub> 500 mg e Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg utilizando uma nova solução de eluição (5 mL de metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)), mantendo o volume de amostra de 250 mL acidificada pH 2,5.

Os resultados obtidos nestas condições não foram satisfatórios, para os três cartuchos avaliados, conforme mostra a figura 18. Pode-se observar, também, que o sorvente Strata C<sub>18</sub> 500 mg apresentou resultados ainda insatisfatórios, em comparação com os cartuchos poliméricos, para este estudo. Os cartuchos poliméricos são sólidos rígidos microporosos ou apresentam uma mistura de microporos ou mesoporos e, em contraste com a sílica, são estáveis numa faixa de

pH de 1 a 13. A retenção ocorre por adsorção dos analitos, permitindo uma dessorção mais fácil (SUCHARA, 2008; FARIA, 2004). Os cartuchos Strata X<sup>®</sup> e Oasis<sup>®</sup> com sorventes poliméricos tem uma superfície modificada com divinilbenzeno (não polar) e com um grupo N-vinilpirrolidona (polar), o que facilita a extração de agrotóxicos de diferentes polaridades em uma única etapa de extração. Estes sorventes são recomendados para extração de substâncias ácidas, básicas e neutras com média à alta polaridade (CARDOZO, 2011; BROUSMICHE *et al.*, 2008). As estruturas dos sorventes utilizados neste estudo estão no Anexo I.

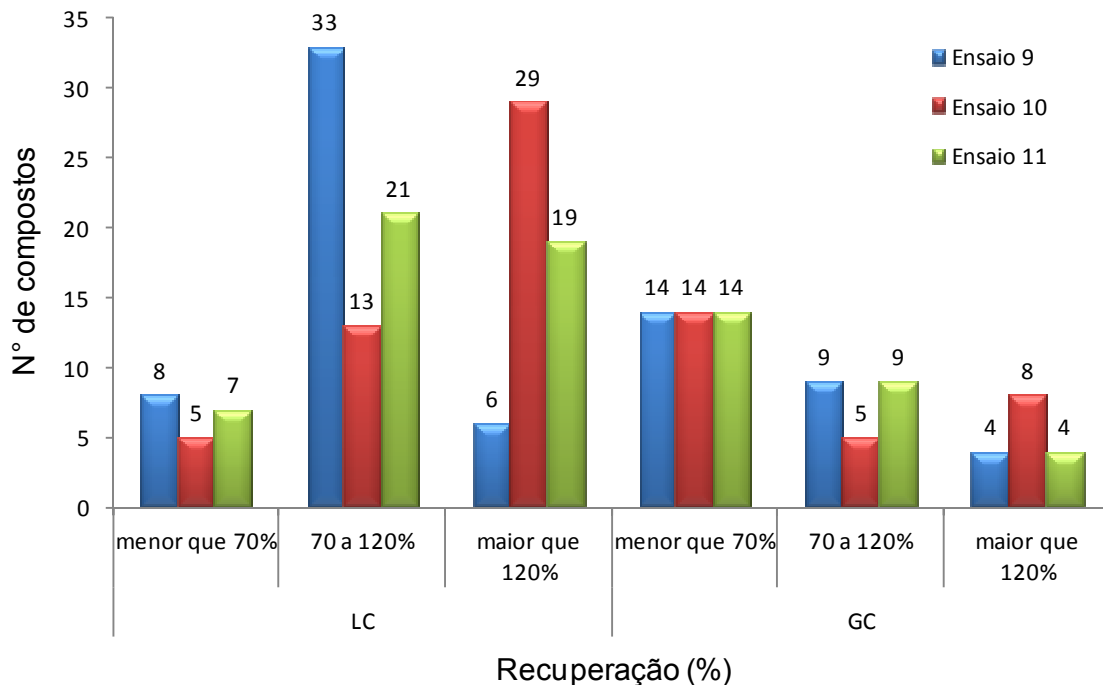


Figura 18 – Números de agrotóxicos extraídos em três faixas de percentagem de recuperação e determinados por LC e GC nos ensaios 9, 10 e 11.

Neste sentido, a fim de melhor avaliar a eficiência dos cartuchos poliméricos realizou-se dois testes (ensaio 12 e 13), semelhantes aos ensaios 7 e 8, porém acidificando a amostra (pH 2,5). Na figura 19, observa-se que as recuperações obtidas no ensaio 13 (Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg) foram satisfatórias (70 – 120%) para a maioria dos compostos determinados por LC. No entanto, não obteve-se recuperações adequadas para alguns dos compostos determinados por GC. Para proporcionar a eluição desses compostos dos cartuchos é necessária uma

polaridade diferente daquela utilizada na eluição dos analitos determinados por LC. Isso pode ser alcançado utilizando-se um solvente orgânico menos polar. Segundo JARDIM (2010) o solvente adequado está diretamente relacionado com a polaridade dos compostos extraídos, o ideal é efetuar a eluição com um solvente de polaridade semelhante a dos compostos.

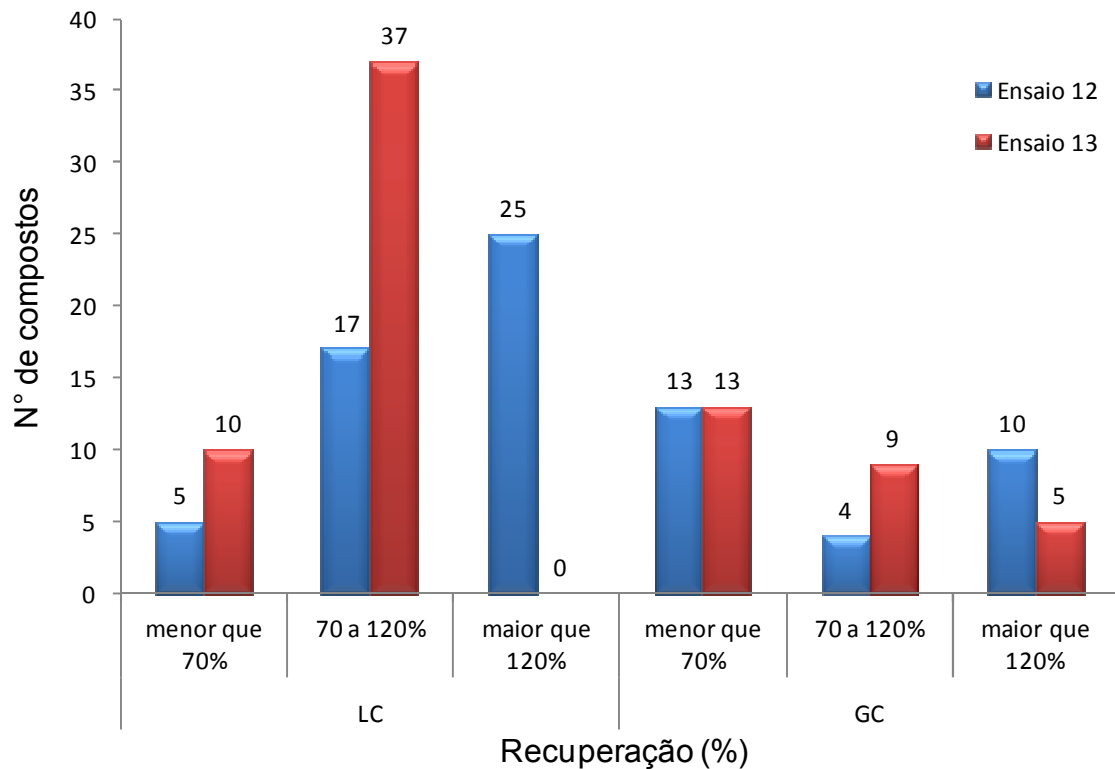


Figura 19 – Quantidade de compostos recuperados no LC e no GC para os ensaios 12 e 13.

Dessa forma, utilizaram-se nos ensaios 14, 15 e 16 dois solventes de eluição com polaridades diferentes. A eluição se deu com 5 mL de diclorometano:metanol (2,5 mL de diclorometano + 2,5 mL de metanol). Para injeção no LC foi evaporado 1 mL do eluato e redissolvido em 1 mL em fase móvel. Esta condição foi avaliada para os sorventes Strata-X<sup>®</sup> 200 mg, Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg e Strata-X<sup>®</sup> 60 mg. O volume de amostra avaliado foi de 100 mL (pH 2,5), esta diminuição deu-se pelo fato de que a fase estacionária do cartucho poderia estar saturando devido ao maior volume de amostra e assim interferir diretamente na recuperação dos analitos.



Os resultados destes ensaios estão apresentados na figura 20. Nos três tipos de cartuchos obteve-se uma maior percentagem de compostos com recuperação dentro da faixa de aceitação (70 a 120%) tanto para os compostos de LC quanto para os de GC. No entanto, nota-se que o cartucho Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg (ensaio 16) obteve melhores resultados, com maior número de compostos extraídos entre 70 a 120% para este estudo. Portanto, optou-se pela escolha do adsorvente Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg para a extração dos resíduos de agrotóxicos em água potável.

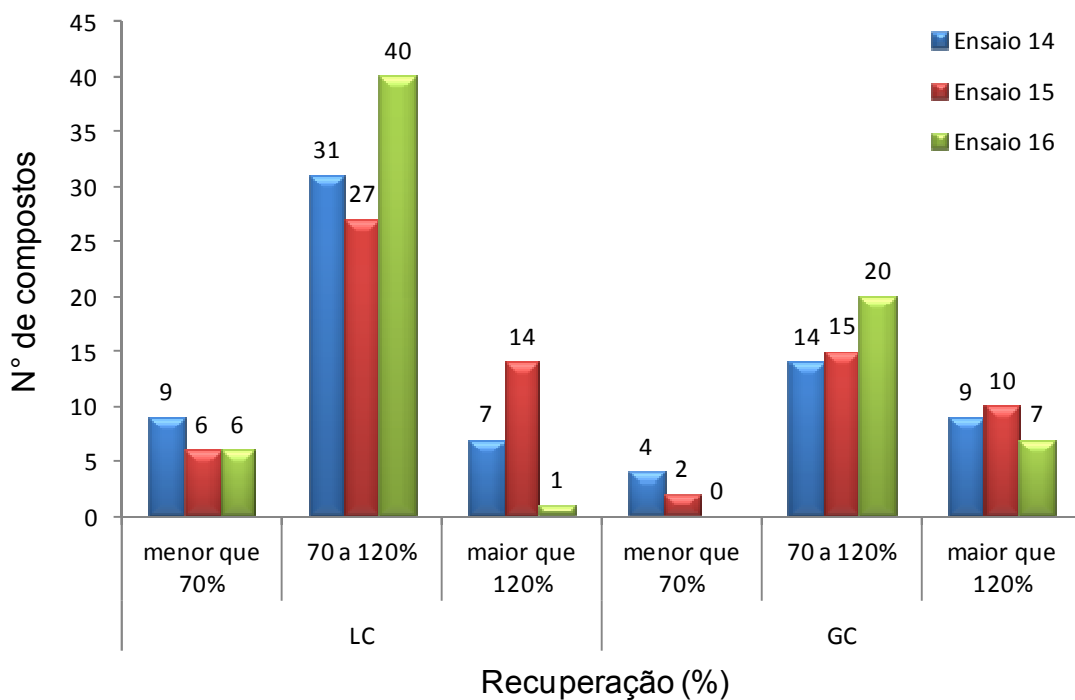


Figura 20 – Percentagem de recuperação dos compostos extraídos nos ensaios 14, 15 e 16 determinados por LC e no GC.

Considerando que o ensaio 16 apresentou os melhores resultados até o momento, porém requer uma etapa de evaporação de parte do extrato para determinação por LC, tornando o método um pouco mais demorado, foram realizados mais três testes, com diferentes soluções de eluição, a fim de eliminar esta etapa. As soluções de eluição dos ensaios 17, 18 e 19 foram 2,5 mL de acetona + 2,5 mL de metanol, 2 mL de acetonitrila à 40 °C e 2 mL metanol, respectivamente, manteve-se um volume de amostra de 100 mL (pH 2,5).

Na figura 21 nota-se que os resultados dos ensaios 17, 18 e 19 são satisfatórios para os compostos polares determinados por LC, já para os compostos apolares determinados por GC à recuperação foi baixa. Para os compostos do GC os eluentes não possuem polaridade adequada para extraí-los do cartucho SPE. Os resultados indicam a necessidade de se usar um solvente de caráter polar em conjunto com um apolar, a fim de proporcionar a eluição de todos os agrotóxicos de uma só vez.

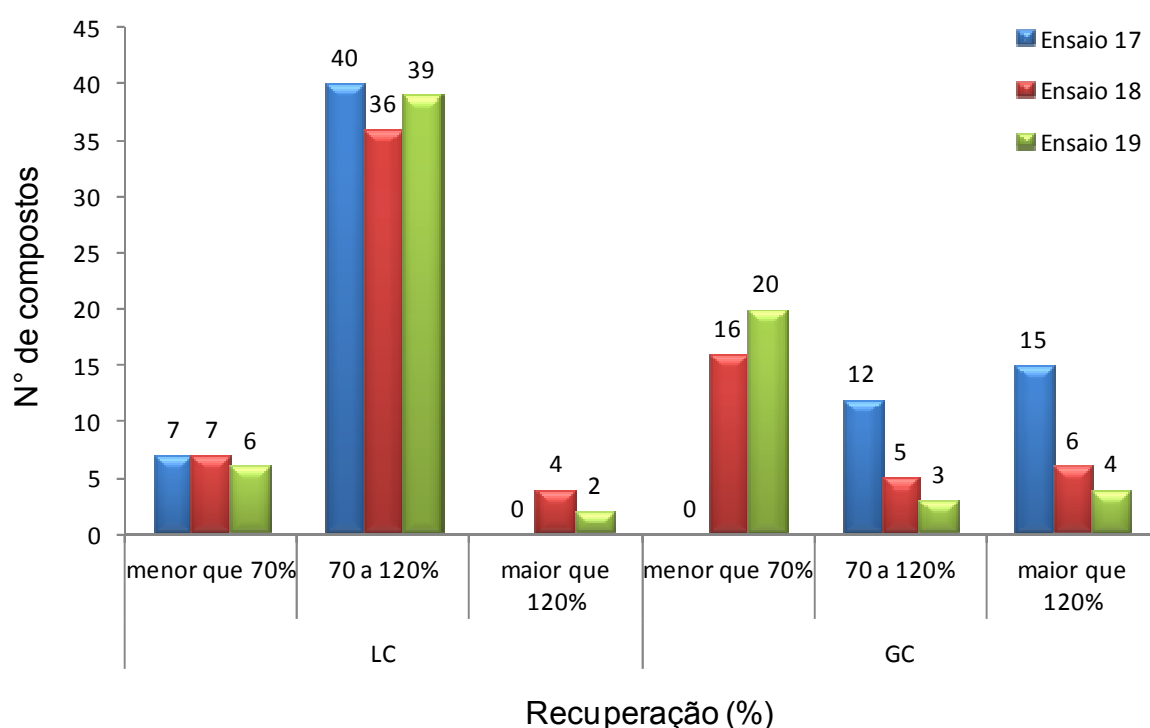


Figura 21 – Resultados obtidos nos ensaio 17, 18 e 19 considerando a quantidade de agrotóxicos extraídos em três diferentes faixas de percentagem de recuperação.

#### 4.3.1 Otimização do método SPE

Tendo em vista que o ensaio 16 foi o que apresentou os melhores resultados para a maioria os agrotóxicos avaliados neste estudo. Realizou-se um ensaio, com as mesmas condições do mesmo, apenas diminuindo o volume de solvente de eluição. O solvente de eluição para o ensaio 20 foi 2 mL de diclorometano:metanol (2 x de 500 µL de diclorometano + 2 x de 500 µL de metanol), para os compostos

determinados por LC foi evaporado 1 mL (com N<sub>2</sub>) e redissolvido em 1 mL de fase móvel. Na figura 22 pode-se observar que o resultado para os 70 agrotóxicos incluindo os dois padrões de substituição foi ainda melhor nesta condição, utilizando um volume de eluição menor.

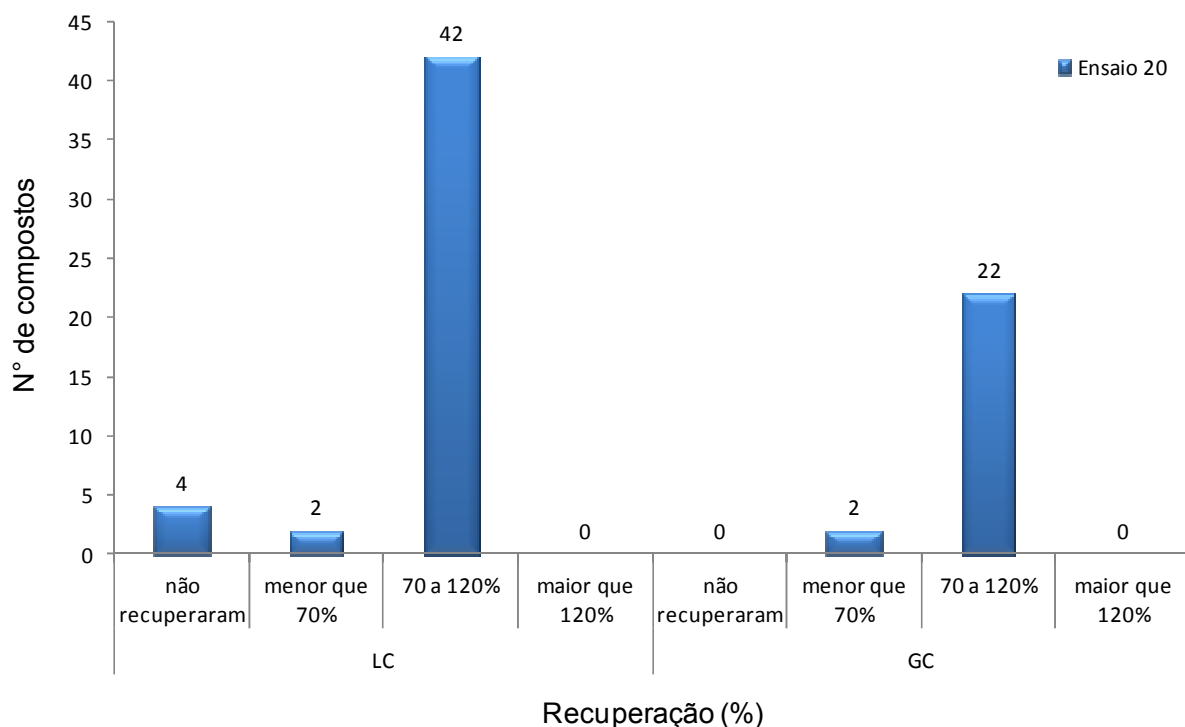


Figura 22 – Número de compostos para cada faixa de recuperação, considerando a determinação por LC ou GC, para o ensaio 20.

#### 4.4 Método de extração otimizado

A partir dos dados apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado para a maioria dos agrotóxicos estudados neste trabalho. Este método foi utilizado para a validação e para a determinação destes compostos em amostras de água.

A figura 23 mostra o procedimento de extração otimizado realizado em uma etapa SPE, utilizando um cartucho polimérico Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg. A amostra foi previamente filtrada com membrana de 0,45 µm. O condicionamento do cartucho foi obtido pela passagem de 3 mL de metanol, 3 mL de água ultrapura e 3 mL de água

ultrapura pH 2,5, mesmo pH adotado para as amostras. O volume de amostra utilizado foi de 100 mL, acidificada pH 2,5 com ácido fosfórico (1:1; (v/v)). A eluição dos agrotóxicos foi proporcionada com 2 mL de diclorometano:metanol (2 x 500 µL de diclorometano + 2 x 500 µL de metanol), deixando dois minutos o solvente em contato com o sorvente antes da eluição. Desses 2000 µL eluídos, 1000 µL foram evaporados em fluxo suave de nitrogênio e redissolvidos em 1000 µL de fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> e metanol, 1:1, v/v), sem etapa de concentração, apenas para fazer a troca de solvente, para os compostos serem determinados por LC-MS/MS, conforme o “procedimento A” da figura 23. Dos 1000 µL que restaram da etapa de eluição, 100 µL foram transferidos para *inserts* e analisado por GC-MS/MS, como se observa no “procedimento B” da figura 23 e 900 µL foram evaporados em fluxo suave de nitrogênio e redissolvidos em 100 µL de metanol, como mostra o “procedimento C”. O “procedimento C” é realizado apenas para a determinação dos agrotóxicos aldrin, dieldrin e clordano. Através do “procedimento C” consegue-se alcançar um fator de concentração de 450 vezes, necessário para atingir os baixos limites exigidos pela legislação que é de 0,03 µg L<sup>-1</sup> para os compostos aldrin e dieldrin e de 0,2 µg L<sup>-1</sup> para o composto clordano. Os demais agrotóxicos obtiveram um fator de concentração de 50 vezes, pelos “procedimentos A” e “B”.

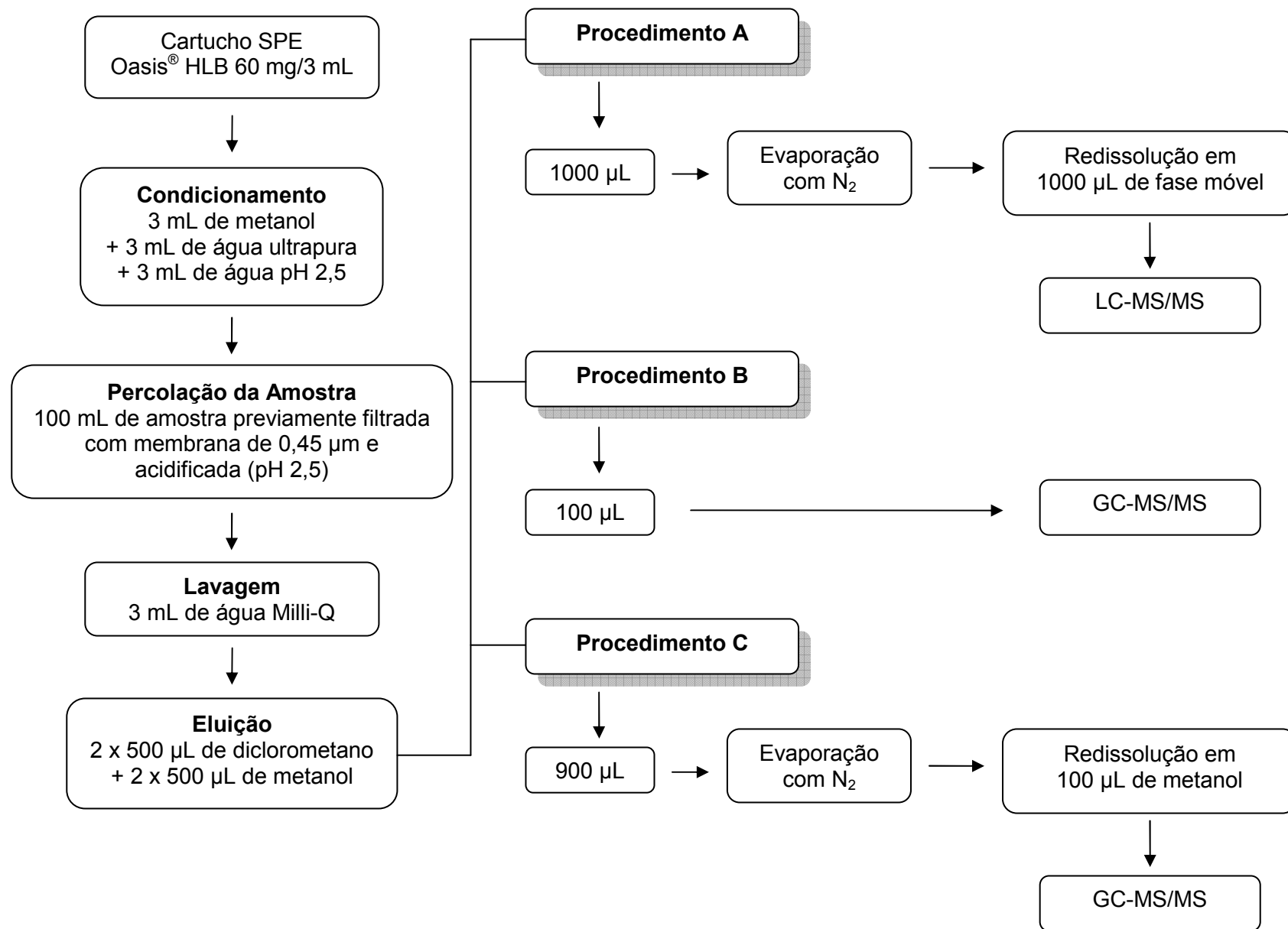


Figura 23 – Representação esquemática do procedimento de extração em fase sólida (SPE), utilizado na extração dos agrotóxicos em água.

#### 4.5 Validação do método SPE com análise por LC-MS/MS e GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em água

Para a validação do método utilizado neste trabalho, utilizou-se o procedimento de extração descrito na figura 23 seguida pela determinação por GC-MS/MS e LC-MS/MS. Foram utilizadas amostras “branco” (água da torneira) e realizadas fortificações em 3 níveis (0,5; 1,5 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo o preparo de amostra realizado pelos “procedimentos A” e “B”. Para os compostos aldrin, dieldrin e clordano foi realizado 1 nível de fortificação extra na concentração 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  e efetuado o preparo de amostra de acordo com o “procedimento C” da figura 23. Tanto para a determinação por GC quanto para LC foram preparadas duas curvas analíticas, uma em extrato da matriz “branco” e outra em solvente. Para os compostos determinados por GC utilizou-se como solvente uma mistura de diclorometano:metanol (1:1; v/v) e para os compostos determinados por LC o solvente utilizado foi a própria fase móvel (formiato de amônio aquoso 5  $\text{mmol L}^{-1}$ :metanol (1:1; v/v)). Através dessas curvas foram avaliados parâmetros como: LOD<sub>i</sub> e LOQ<sub>i</sub>, linearidade das curvas analíticas e efeito matriz.

##### 4.5.1 Seletividade do método

A seletividade do método foi assegurada tanto no GC quanto no LC. Pode-se observar através da figura 12 (B) que nos compostos determinados por GC-MS/MS não foi detectada a presença de qualquer pico nos tempos de retenção dos compostos em estudo. Neste mesmo sentido, nota-se na figura 14 (A) que não há interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada agrotóxico determinado por LC-MS/MS.

##### 4.5.2 Curva analítica e Linearidade

As curvas analíticas foram construídas utilizando-se a média das áreas da triplicata de injeções de cada ponto que compõem a curva. Segundo o INMETRO (2011), a curva analítica deve possuir no mínimo cinco pontos (não incluindo o ponto

zero). Para este estudo foram utilizados sete pontos para a confecção da curva analítica, tanto no GC quanto para o LC, sendo eles: 10, 25, 50, 75, 100, 200 e 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ , preparadas no extrato da matriz. Todos os compostos apresentaram faixa linear entre 10 e 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A tabela 10 apresenta as equações da curva analítica e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) preparados no extrato da matriz de todos os agrotóxicos em estudo.

Tabela 10 – Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) preparados no extrato da matriz para todos os agrotóxicos determinados por LC e GC.

Compostos	Determinação	Equação da curva	$r^2$
2,4 D	LC	$y = 5,2 \times 10^6 x + 1,3 \times 10^7$	0,998
2,4 DDD	GC	$y = 2,4 \times 10^8 x + 1,1 \times 10^8$	0,999
2,4 DDE	GC	$y = 7,7 \times 10^8 x + 8,2 \times 10^6$	0,999
2,4,5 T	LC	$y = 2,2 \times 10^6 x - 4,0 \times 10^7$	0,997
Alaclor	GC	$y = 9,8 \times 10^7 x - 4,1 \times 10^8$	0,998
Aldicarbe	LC	$y = 1,4 \times 10^6 x + 7,5 \times 10^8$	0,998
Aldicarbe sulfona	LC	$y = 5,5 \times 10^6 x + 1,3 \times 10^8$	0,999
Aldicarbe sulfóxido	LC	$y = 1,6 \times 10^6 x + 1,2 \times 10^7$	0,999
Aldrin	GC	$y = 5,2 \times 10^7 x - 1,2 \times 10^8$	0,997
Atrazina	LC	$y = 5,3 \times 10^6 x + 3,8 \times 10^7$	0,998
Azinssulfuron	LC	$y = 1,5 \times 10^6 x + 4,7 \times 10^6$	0,999
Azoxistrobina	LC	$y = 2,4 \times 10^7 x + 3,5 \times 10^7$	0,999
Benfuracarbe	LC	$y = 6,3 \times 10^4 x + 2,0 \times 10^6$	0,992
Benomil	LC	$Y = 1,5 \times 10^6 x + 2,9 \times 10^6$	0,994
Bentazona	LC	$y = 5,9 \times 10^6 x + 1,3 \times 10^8$	0,990
Bifentrina	GC	$y = 2,4 \times 10^8 x - 7,7 \times 10^8$	0,999
Bispiribaque sódico	LC	$y = 3,5 \times 10^5 x - 9,9 \times 10^4$	0,998
Carbaril	LC	$y = 9,1 \times 10^6 x + 3,9 \times 10^7$	0,996
Carbendazim	LC	$y = 8,0 \times 10^6 x + 1,1 \times 10^7$	0,999
Carbofurano	LC	$y = 7,8 \times 10^6 x + 2,6 \times 10^7$	0,997

(continuação)

<b>Compostos</b>	<b>Determinação</b>	<b>Equação da curva</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
Cialofope butílico	LC	$y = 1,2 \times 10^6 x - 5,5 \times 10^6$	0,995
Cialotrina lambda	GC	$y = 2,5 \times 10^8 x - 6,8 \times 10^8$	0,999
Ciflutrina	GC	$y = 1,4 \times 10^9 x - 1,0 \times 10^{10}$	0,998
Cipermetrina	GC	$y = 1,6 \times 10^9 x - 1,3 \times 10^{10}$	0,998
Clomazona	LC	$y = 1,2 \times 10^7 x + 1,2 \times 10^7$	0,999
Clordano	GC	$y = 1,9 \times 10^7 x - 2,7 \times 10^8$	0,995
Clorpirifós etílico	LC	$y = 1,5 \times 10^6 x + 2,6 \times 10^5$	0,998
Clorpirifós metílico	LC	$y = 2,9 \times 10^5 x + 1,7 \times 10^6$	0,995
Clorpirifós oxon	LC	$y = 4,9 \times 10^6 x + 4,1 \times 10^6$	0,992
DDT	GC	$y = 8,1 \times 10^8 x - 1,0 \times 10^9$	0,999
Deltametrina	GC	$y = 3,0 \times 10^8 x - 3,3 \times 10^9$	0,996
Dieldrin	GC	$y = 2,5 \times 10^7 x - 2,7 \times 10^8$	0,993
Dlifenconazol	LC	$y = 7,8 \times 10^6 x - 7,3 \times 10^6$	0,999
Diuron	LC	$y = 3,3 \times 10^6 x + 1,6 \times 10^7$	0,998
Endossulfan alfa	GC	$y = 4,4 \times 10^7 x - 2,1 \times 10^8$	0,999
Endossulfan beta	GC	$y = 2,2 \times 10^7 x - 3,1 \times 10^8$	0,995
Endossulfan sulfato	GC	$y = 1,4 \times 10^8 x - 8,2 \times 10^8$	0,999
Endrin	GC	$y = 1,3 \times 10^7 x - 2,8 \times 10^8$	0,990
Etoxissulfuron	LC	$y = 2,0 \times 10^6 x + 4,7 \times 10^6$	0,995
Fenitrotiona	GC	$y = 4,5 \times 10^7 x - 5,7 \times 10^8$	0,997
Fipronil	LC	$y = 2,1 \times 10^7 x + 3,3 \times 10^8$	0,992
Imazapique	LC	$y = 2,1 \times 10^6 x + 1,3 \times 10^7$	0,996
Imazapir	LC	$y = 2,2 \times 10^6 x + 3,0 \times 10^7$	0,995
Imazetapir	LC	$y = 2,3 \times 10^6 x + 5,1 \times 10^6$	0,996
Imidacloprido	LC	$y = 2,1 \times 10^6 x + 7,9 \times 10^6$	0,996
Lindano	GC	$y = 1,9 \times 10^8 x - 2,6 \times 10^8$	0,995
Linuron d-6 <sup>(1)</sup>	LC	$y = 2,2 \times 10^6 x + 1,3 \times 10^7$	0,995
Malationa	LC	$y = 5,6 \times 10^6 x + 6,2 \times 10^6$	0,998
Metamidofós	LC	$y = 6,3 \times 10^6 x + 3,5 \times 10^5$	0,997



(continuação)

Compostos	Determinação	Equação da curva	r <sup>2</sup>
Metolaclo-ro	GC	$y = 2,6 \times 10^7 x + 1,8 \times 10^9$	0,997
Metsulfurom metílico	LC	$y = 1,8 \times 10^6 x + 4,5 \times 10^6$	0,998
Molinato	LC	$y = 2,7 \times 10^6 x + 1,2 \times 10^7$	0,998
Oxifluorfen	GC	$y = 5,1 \times 10^7 x - 8,5 \times 10^5$	0,997
Parationa metílica	GC	$y = 5,4 \times 10^7 x - 6,7 \times 10^8$	0,998
Pendimetalina	LC	$y = 2,5 \times 10^5 x + 1,3 \times 10^6$	0,994
Permetrina	GC	$y = 8,7 \times 10^8 x - 3,1 \times 10^9$	0,999
Pirazossulfuron	LC	$y = 2,8 \times 10^6 x - 1,6 \times 10^6$	0,999
Profenofós	LC	$y = 3,7 \times 10^6 x + 3,4 \times 10^6$	0,998
Propanil	LC	$y = 1,3 \times 10^6 x + 7,5 \times 10^6$	0,992
Propiconazole	LC	$y = 3,0 \times 10^7 x + 2,9 \times 10^8$	0,994
Quincloraque	LC	$y = 5,5 \times 10^5 x + 1,5 \times 10^7$	0,998
Simazina	LC	$y = 1,5 \times 10^6 x + 1,2 \times 10^7$	0,997
Tebuconazol	LC	$y = 2,1 \times 10^6 x + 1,9 \times 10^7$	0,998
Terbufós	LC	$Y = 2,3 \times 10^5 x - 3,1 \times 10^5$	0,998
Tetraconazol	LC	$y = 3,8 \times 10^6 x + 1,1 \times 10^6$	0,997
Tiabendazol	LC	$y = 5,5 \times 10^6 x + 8,0 \times 10^6$	0,998
Tiametoxan	LC	$y = 2,2 \times 10^6 x + 8,6 \times 10^6$	0,991
Tiofanato metílico	LC	$y = 2,1 \times 10^6 x + 3,5 \times 10^6$	0,997
Triciclazole	LC	$y = 2,6 \times 10^6 x + 1,9 \times 10^6$	0,998
Trifloxistrobina	LC	$y = 1,8 \times 10^7 x + 6,5 \times 10^7$	0,999
Trifluralina	GC	$y = 1,1 \times 10^8 x - 9,5 \times 10^8$	0,999
Trifluralina d-14 <sup>(2)</sup>	GC	$y = 1,3 \times 10^8 x - 1,1 \times 10^9$	0,999

LC: Cromatografia Líquida; GC: Cromatografia Gasosa; <sup>(1)</sup> Padrão de substituição usado no LC; <sup>(2)</sup> Padrão de substituição usado no GC.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os modelos (LC e GC) são lineares e adequados, visto que todos os agrotóxicos apresentam coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) maior ou igual que 0,99, para LC e GC, estando de acordo com as orientações do INMETRO e da ANVISA.

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

Os valores alcançados para os limites de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído. Para a determinação desses valores foi injetado no LC e no GC uma mistura dos agrotóxicos nas concentrações 5, 10 e 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , preparadas no extrato da matriz. Após averiguou-se os cromatogramas obtidos, e verificou-se qual delas forneceu uma relação sinal ruído superior a 10 ( $\text{LOQ} = 10\text{S/R}$ ) definido como Limite de Quantificação do instrumento ( $\text{LOQ}_i$ ). O valor do  $\text{LOQ}_i$  foi de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os compostos aldrin, dieldrin e clordano já para o demais agrotóxicos o  $\text{LOQ}_i$  foi de 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O Limite de Detecção do instrumento foi obtido dividindo o  $\text{LOQ}_i$  por 3,33, sendo assim, o  $\text{LOD}_i$  foi de 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para aldrin, dieldrin e clordano e 7,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais.

Para a obtenção do Limite de Detecção ( $\text{LOD}_m$ ) e o do Limite de Quantificação do método ( $\text{LOQ}_m$ ), dividiu-se o  $\text{LOD}_i$  e o  $\text{LOQ}_i$  pelo fator de concentração, proveniente do método de extração SPE. Sendo assim, os compostos extraídos conforme os “procedimentos A” e “B” (fator = 50) apresentaram valores de  $\text{LOD}_m$  e  $\text{LOQ}_m$  de 0,15 e 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Para os compostos aldrin, dieldrin e clordano (“procedimento C”) com fator igual a 450, obtiveram valores de  $\text{LOD}_m$  e  $\text{LOQ}_m$  de 0,006 e 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, conforme mostra a tabela 11.

Estes valores são considerados satisfatórios, pois com os limites de quantificação alcançados, consegue-se atingir aos valores máximos permitidos (VMP) permitidos para os agrotóxicos em água potável, estabelecidos pela portaria 2914, de 14 de dezembro de 2011, do ministério da saúde.

Tabela 11 – Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método

	LOD <sub>i</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ <sub>i</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	LOD <sub>m</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ <sub>m</sub> (µg L <sup>-1</sup> )
Agrotóxicos determinados por LC	7,5	25	0,15	0,5
Agrotóxicos determinados por GC	7,5	25	0,15	0,5
Aldrin, dieldrin e clordano	3,0	10	0,006	0,02

#### 4.5.4 Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

A tabela 12 apresenta os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e o RSD% para os 72 agrotóxicos determinados por LC e GC. Estes foram fortificados em 100 mL de água, nos níveis de 0,5, 1,5 e 4,0 µg L<sup>-1</sup>, e extraídos pelo método SPE. Para os compostos dieldrin, aldrin e clordano realizou-se um nível de fortificação extra, na concentração 0,02 µg L<sup>-1</sup>, com o intuito de alcançar os baixos limites exigidos pela legislação vigente.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Neste trabalho seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com RSD ≤ 20% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2012).

Tabela 12 – Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração dos 72 agrotóxicos, nos níveis de concentração de 0,5, 1,5 e 4,0 µg L<sup>-1</sup>.

Compostos	Técnica	Níveis de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )					
		0,5		1,5		4,0	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
2,4 D	LC	95,4	6,3	89,9	2,0	80,8	6,4
2,4 DDD	GC	58,5	8,9	60,5	4,9	59,8	4,5
2,4 DDE	GC	55,0	10,4	52,9	3,0	57,8	3,6
2,4,5 T	LC	108,4	13,9	93,6	4,9	81,0	4,8
Alaclor	GC	86,9	11,4	82,0	3,1	79,4	3,5
Aldicarbe sulfona	LC	94,9	5,7	93,2	7,8	89,3	6,1
Aldicarbe sulfóxido	LC	88,1	1,2	73,2	1,6	97,0	5,3
Aldicarbe	LC	-	-	-	-	-	-
Aldrin	GC	58,0	5,7	75,1	4,6	85,9	2,3
Atrazina	LC	97,4	12,3	103,5	2,7	81,8	6,6
Azinssulfuron	LC	83,5	14,5	87,3	11,2	81,9	4,8
Azoxistrobina	LC	86,9	8,7	95,0	3,0	83,6	7,6
Benfuracarbe	LC	-	-	-	-	-	-
Benomil	LC	-	-	-	-	-	-
Bentazona	LC	73,4	6,1	111,1	0,7	80,6	5,6
Bifentrina	GC	73,3	10,3	85,4	1,9	103,1	0,9
Bispiribaque sódico	LC	111,6	12,6	89,3	15,9	89,7	9,6
Carbaril	LC	85,8	9,2	103,6	5,1	83,5	10,4
Carbendazin	LC	85,4	4,7	70,0	2,5	79,4	9,5
Carbofurano	LC	89,6	10,0	102,8	3,3	92,3	7,9
Cialofope butílico	LC	100,7	19,0	70,4	18,6	73,1	19,7
Cialotrina lambda	GC	76,7	8,5	86,1	2,2	97,6	3,9
Ciflutrina	GC	75,3	6,3	85,7	5,3	117,3	3,0
Cipermetrina	GC	74,3	5,3	82,6	4,5	114,5	3,1
Clomazona	LC	97,1	7,9	98,5	6,8	87,0	9,2
Clordano	GC	74,5	19,2	82,4	8,2	88,1	4,4

(continuação)

Compostos	Técnica	Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		0,5		1,5		4,0	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
Clorpirifós etílico	LC	82,2	9,6	87,8	4,2	71,7	7,9
Clorpirifós metílico	LC	106,6	13,0	84,8	7,0	78,7	5,7
Clorpirifós oxon	LC	96,9	6,2	98,4	8,7	82,9	17,5
DDT	GC	84,6	9,8	92,0	2,9	97,8	3,5
Deltametrina	GC	92,1	5,9	74,3	4,7	85,7	5,8
Dieldrin	GC	71,5	12,3	89,7	5,0	90,5	6,1
Difenoconazol	LC	91,7	3,4	88,0	6,0	74,8	6,5
Diuron	LC	88,1	6,6	99,4	8,5	79,1	9,7
Endossulfan alfa	GC	75,7	11,7	81,1	5,1	84,3	4,8
Endossulfan beta	GC	71,7	12,3	84,8	6,0	85,6	4,8
Endossulfan sulfato	GC	91,0	8,8	77,2	2,1	87,3	3,7
Endrin	GC	89,3	12,0	96,3	4,6	83,3	3,6
Etoxissulfuron	LC	95,0	5,7	91,8	3,1	94,0	11,4
Fenitrotiona	GC	85,4	3,4	93,4	3,7	106,9	5,2
Fipronil	LC	77,6	5,5	102,6	4,8	78,8	6,4
Imazapique	LC	86,7	8,1	100,4	5,0	85,9	10,0
Imazapir	LC	75,7	3,9	105,0	8,6	84,3	14,3
Imazetapir	LC	103,5	13,5	95,8	4,5	81,8	6,4
Imidacloprido	LC	91,5	7,2	96,9	6,8	86,7	7,1
Lindano (gama HCH)	GC	80,3	8,0	83,7	9,1	89,1	10,0
Linuron d-6 <sup>(1)</sup>	LC	98,1	6,8	95,8	9,7	93,4	10,3
Malationa	LC	102,1	10,0	101,2	6,6	79,5	9,9
Metamidofós	LC	34,6	65,4	12,4	49,1	26,1	35,1
Metolacloro	GC	113,3	5,8	114,1	6,9	93,5	6,5
Metsulfurom metílico	LC	89,2	11,8	90,7	8,7	94,5	10,9
Molinato	LC	77,2	18,3	71,8	8,5	78,8	6,7
Oxifluorfen	GC	82,0	8,8	89,0	6,4	102,9	4,7

(continuação)

Compostos	Técnica	Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
		0,5		1,5		4,0	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
Parationa metílica	GC	73,5	7,7	79,2	2,8	115,2	3,9
Pendimetalina	LC	78,8	12,4	101,0	9,9	70,3	8,4
Permetrina	GC	79,7	7,2	76,3	5,0	80,1	3,8
Pirazossulfuron	LC	94,6	17,1	93,1	7,9	80,7	9,1
Profenofós	LC	83,1	16,5	88,2	4,5	103,7	7,8
Propanil	LC	102,2	8,4	111,7	1,3	101,7	12,0
Propiconazole	LC	77,5	8,1	96,4	4,0	83,9	7,4
Quincloraque	LC	83,1	10,2	99,5	6,5	82,7	7,7
Simazina	LC	94,0	4,3	99,4	2,1	86,3	5,9
Tebuconazol	LC	91,0	9,0	106,4	5,8	82,5	4,6
Terbufós	LC	4,6	30,6	2,5	37,5	3,8	40,2
Tetraconazol	LC	100,2	12,7	92,5	10,7	81,8	16,6
Tiabendazol	LC	86,4	11,2	93,0	5,5	92,2	6,3
Tiametoxan	LC	85,4	7,3	107,9	7,9	85,0	4,5
Tiofanato metílico	LC	-	-	-	-	-	-
Triciclazole	LC	97,6	7,4	86,5	10,7	79,5	6,9
Trifloxistrobina	LC	77,1	12,8	86,5	7,1	73,2	6,0
Trifluralina	GC	83,7	7,7	74,0	4,4	75,4	4,8
Trifluralina d-14 <sup>(2)</sup>	GC	85,7	11,0	74,2	3,0	87,6	4,3

rec: recuperação; LC: Cromatografia Líquida; GC: Cromatografia Gasosa; <sup>(1)</sup> Padrão de substituição usado no LC; <sup>(2)</sup> Padrão de substituição usado no GC.

A tabela 12 mostra que 88,9% dos compostos determinados por LC e GC obtiveram percentuais de recuperação entre 70 e 120%. Os resultados da precisão do método para esses compostos foram satisfatórios, uma vez que, apresentaram  $\text{RSD} \leq 20\%$ .

O uso dos padrões de substituição proporcionou avaliar o procedimento de extração, julgando se o mesmo apresentaria resultados satisfatórios nos três níveis

avaliados. Fixando-se a sua concentração, podem-se comparar os resultados obtidos nos diferentes níveis de concentração dos analitos. Observa-se que as recuperações médias dos PS (linuron d-6 e trifluralina d-14) mantiveram-se praticamente constante nos três níveis, indicando que a execução do procedimento de extração foi adequada. A utilização de padrões deuterados apresentam vantagens como: são substâncias que não são utilizadas na agricultura e, portanto, não estão presentes nas amostras ambientais e apresentam o mesmo comportamento cromatográfico e seletividade dos agrotóxicos não deuterados.

Pode-se observar também na tabela 12 que o composto aldrin obteve recuperação abaixo de 70% no nível de concentração mais baixo, porém com valor de RSD menor do que 20%, resultado semelhante foi encontrado no nível de fortificação extra, na concentração  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ . Isto pode ser explicado devido à molécula de aldrin sofrer prontamente degradação em dieldrin, no meio ambiente. Isto ocorre pela ação da luz solar ou ação das bactérias (CARVALHO, 2010; BANDEIRA, 2008). Nota-se que o aldrin obteve recuperação baixa apenas nos níveis de fortificações mais baixos, nos outros níveis por estar em concentração mais alta a recuperação foi satisfatória, mesmo ocorrendo uma possível degradação em dieldrin. Sendo assim, manteve-se o LOQ<sub>m</sub> em  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  para o agrotóxico aldrin.

Dentre os 11,1% dos agrotóxicos que não recuperaram ou que tiveram recuperações abaixo de 70%, 6 são compostos determinados por LC e apenas 2 são compostos do GC. Na análise por GC o 2,4 DDD e o 2,4 DDE apresentaram recuperações abaixo de 70% nos três níveis de fortificação avaliados. No entanto, exibiram precisão satisfatória, ou seja, menor do que 20%, sendo assim, estes foram mantidos para quantificação. Resultados semelhantes de recuperações baixas para estes analitos foram encontrados por Pereira (2012) utilizando SPE, com sorvente do tipo C<sub>18</sub> 500 mg e determinação por GC. Já os seis compostos determinados por LC que apresentaram problemas de recuperação foram: metamidofós, tiofanato metílico, benomil, terbufós benfuracarbe e aldicarbe. Esses não puderam ser quantificados neste método, devido aos resultados de recuperação e precisão terem sido insatisfatórios. Além disso, o sinal analítico desses compostos não é muito bom, o que requer um desenvolvimento de métodos de determinação específico.

Os resultados de recuperação (%) e RSD (%) para os agrotóxicos aldrin, dieldrin e clordano foram de 88,5 e 1,4%; 52,5 e 9,6%; 118,3 e 19,5%,

respectivamente. Observa-se que apenas o composto aldrin obteve recuperação abaixo da faixa de aceitação (70 a 120%), no entanto apresentou valor de RSD menor que 20%.

Para o composto metamidofós que não apresentou bons resultados em nenhum dos testes realizados, pode ser entendido que, visto que se trata de uma molécula altamente polar com elevada solubilidade em água, sua extração em matrizes aquosas é de extrema dificuldade. Segundo GEIB & GEBERT (2006), a eficiência da extração utilizando-se materiais derivados da sílica (extração em fase sólida), é fortemente dependente do Log  $K_{ow}$  (o composto metamidofós apresenta Log  $K_{ow}$  igual a -0,8), sendo que somente compostos com valores superiores a zero podem ser eficientemente extraídos. Ainda, GEIB & GEBERT, em 2006, avaliaram vinte e um diferentes sorventes de SPE para a extração de substâncias altamente polares, incluído o metamidofós. O volume de amostra utilizado foi de 100 mL e o nível de fortificação avaliado foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os sorventes contendo octadecilsilano ( $C_{18}$ ) não se mostraram adequados para extrair o metamidofós. Os sorventes poliméricos apresentaram recuperações bastante variadas, indo de praticamente 0% até no máximo 60% de recuperação.

Na mesma linha, LIU, em 2006, realizou um estudo com determinados agrotóxicos polares, incluindo o metamidofós, a fim de determinar e comparar a eficiência da extração líquido-líquido e da extração em fase sólida (cartuchos Oasis HLB e Chromabond HR-P). Os resultados de recuperação foram 4,6% para a extração líquido-líquido e 5,2% para a SPE, utilizando 500 mL de amostra fortificada na concentração  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Porém, quando testou uma menor quantidade de amostra (5 mL) e simultaneamente com fortificação em níveis mais altos ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a recuperação na SPE foi 93,6%. Entretanto, estas condições inviabilizam a adoção de métodos multirresíduos, mas confirma a influência da solubilidade em água.

O agrotóxico terbufós apresentou baixa recuperação, isso pode ter ocorrido devido à perda deste analito na etapa de vaporização. Observa-se na tabela 5 que este composto possui pressão de vapor igual a 34,6 mPa, o que caracteriza um analito volátil, por apresentar um valor maior que 0,1 mPa. Fato que também pode ser explicado para o analito aldicarbe, o qual também é classificado como volátil por sua pressão de vapor (3,87 mPa). Resultado satisfatório para o composto terbufós foi encontrado por Donato *et al.*, em 2012, utilizando-se sorvente polimérico Strata X<sup>®</sup> 200 mg e eluindo-se com acetonitrila/metanol (1:1; v/v) acidificada 1% com ácido



acético (v:v), mesmas condições utilizadas no ensaio 1 deste trabalho. A boa recuperação obtida pode ser justificada pelo fato desse teste não possuir a etapa evaporação.

A não recuperação do analito benomil e do tiofanato metílico pode ser atribuída a uma possível degradação desses compostos em seu produto secundário o carbendazim. O fungicida benomil é rapidamente convertido à carbendazim no meio ambiente, com tempo de meia-vida de 2 e 19 horas em água e solo, respectivamente (CHIARA, 2009; COUTINHO, 2006). Já para o composto tiofanato metílico a transformação em carbendazim ocorre em meio alcalino. Este composto apresenta pKa de 7,28 (ácido fraco), de forma que se torna estável em meio ácido (pH 2-5), mas é instável em meio alcalino, permanecendo não degradado por cerca de 46 dias em soluções aquosas em pH 7 à 22 °C e por apenas 4 minutos em pH 9 à 65 °C (CHIARA, 2009). Resultado satisfatório para o agrotóxico tiofanato metílico foi obtido através do ensaio 1, quando se utilizou o adsorvente polimérico Strata X 200 mg em combinação com uma solução de eluição de metanol:acetonitrila (1:1; v/v) acidificada com 1% de ácido acético. O fato da solução de eluição possuir caráter ácido pode ter favorecido a eluição deste composto.

O agrotóxico benfuracarbe não apresentou recuperação satisfatória no método proposto. Observou-se que quando realizado o ensaio 2, obteve-se recuperação dentro da faixa aceitável (70 a 120%). No ensaio 2 foi utilizado sorvente C<sub>18</sub> 500 mg para extração e a amostra não foi acidificada. O fato da amostra não ser acidificada não oferece melhores condições para a extração deste composto, visto que seu valor de pKa é nulo, ou seja, é um composto não dissociável e portanto o pH da amostra não estaria diretamente ligado na interação com o sorvente. No entanto, o fato de usar um sorvente C<sub>18</sub> pode ter favorecido a extração do analito benfuracarbe, uma vez que esse analito possui um Coeficiente de Partição de Carbono Orgânico (K<sub>oc</sub>) igual a 9100, o que caracteriza uma forte tendência à ligação com compostos orgânicos, por exemplo, C<sub>18</sub>. O mesmo não ocorreu com o sorvente polimérico selecionado para este estudo.

#### 4.5.5 Precisão Intermediária

A precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para os agrotóxicos estudados foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Na tabela 13 podem ser visualizados os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada, na concentração  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação para a maioria dos compostos variaram na faixa de 70,0 a 118,6%, com  $RSD_{pi}$  menores que 20%, o que demonstra ter boa precisão. Os padrões de substituição mantiveram-se constante, quando comparados com os resultados da avaliação da repetitividade.

Os compostos 2,4 DDD e 2,4 DDE, determinados por GC, continuaram a apresentar valores de recuperação inferiores ao recomendado (entre 70 e 120%), porém com RSD menores a 20%. Neste mesmo sentido, os compostos metamidofós, aldicarbe, tiofanato metílico, benfuracarbe, benomil e terbufós repetiram seus resultados obtidos na avaliação da repetitividade.

Segundo SANCO (2012), a precisão depende da matriz avaliada, da concentração do analito e da técnica de análise, devem ser  $< 20\%$ . Para a maioria dos agrotóxicos determinados, os resultados obtidos estão dentro do limite sugerido.

Tabela 13 – Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método SPE, no nível de fortificação de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  (n = 3)

Compostos	Determinação	$1,5 \mu\text{g L}^{-1}$	
		Recuperação (%)	$RSD_{pi}$ (%)
2,4 D	LC	82,0	6,3
2,4 DDD	GC	63,2	6,7
2,4 DDE	GC	65,3	5,6
2,4,5 T	LC	88,4	8,7
Alaclor	GC	89,6	2,8
Aldicarbe	LC	-	-
Aldicarbe sulfona	LC	93,9	5,2

(continuação)

Compostos	Determinação	1,5 µg L <sup>-1</sup>	
		Recuperação (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Aldicarbe sulfóxido	LC	70,0	8,1
Aldrin	GC	76,3	7,2
Atrazina	LC	85,5	7,0
Azinssulfuron	LC	89,7	5,6
Azoxistrobina	LC	86,5	4,4
Benfuracarbe	LC	-	-
Benomil	LC	-	-
Bentazona	LC	88,3	3,8
Bifentrina	GC	81,8	7,5
Bispiribaque sódico	LC	89,3	12,9
Carbaril	LC	88,8	3,2
Carbendazin	LC	77,4	9,9
Carbofurano	LC	87,0	6,8
Cialofope butílico	LC	81,4	13,3
Cialotrina lambda	GC	96,1	7,3
Ciflutrina	GC	97,3	10,2
Cipermetrina	GC	94,5	9,5
Clomazona	LC	81,4	8,4
Clordano	GC	74,4	8,9
Clorpirifós etílico	LC	71,8	4,8
Clorpirifós metílico	LC	95,4	15,3
Clorpirifós oxon	LC	90,5	3,0
DDT	GC	81,0	7,8
Deltametrina	GC	102,3	8,8
Dieldrin	GC	75,6	6,5

(continuação)

Compostos	Determinação	1,5 µg L <sup>-1</sup>	
		Recuperação (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Dlifenconazol	LC	86,3	6,0
Diuron	LC	81,5	5,3
Endossulfan alfa	GC	83,0	11,1
Endossulfan beta	GC	78,2	8,2
Endossulfan sulfato	GC	106,3	8,8
Endrin	GC	91,7	9,6
Etoxissulfuron	LC	91,8	1,4
Fenitrotiona	GC	95,5	5,6
Fipronil	LC	87,0	3,3
Imazapique	LC	91,8	6,2
Imazapir	LC	96,9	5,5
Imazetapir	LC	96,2	8,8
Imidacloprido	LC	87,1	6,4
Lindano (gama HCH)	GC	82,4	8,3
Linuron d-6 <sup>(1)</sup>	LC	96,6	5,5
Malationa	LC	86,7	3,8
Metamidofós	LC	25,1	80,1
Metolaclo	GC	118,6	13,5
Metsulfurom metílico	LC	85,7	5,9
Molinato	LC	77,9	14,1
Oxifluorfen	GC	78,5	6,1
Parationa metílica	GC	95,8	3,7
Pendimetalina	LC	93,5	17,9
Permetrina	GC	91,2	6,1
Pirazossulfuron	LC	94,2	10,2

(continuação)

Compostos	Determinação	1,5 µg L <sup>-1</sup>	
		Recuperação (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Profenofós	LC	83,3	6,5
Propanil	LC	92,3	10,8
Propiconazole	LC	91,8	2,1
Quincloraque	LC	92,8	0,5
Simazina	LC	89,4	6,2
Tebuconazol	LC	91,8	2,2
Terbufós	LC	3,1	32,4
Tetraconazol	LC	93,2	7,4
Tiabendazol	LC	89,5	5,2
Tiametoxan	LC	91,1	1,3
Tiofanato metílico	LC	-	-
Triciclazole	LC	85,5	2,8
Trifloxistrobina	LC	82,3	4,9
Trifluralina	GC	73,3	10,5
Trifluralina d-14 <sup>(2)</sup>	GC	74,0	10,6

LC: Cromatografia Líquida; GC: Cromatografia Gasosa; <sup>(1)</sup> Padrão de substituição usado no LC,  
<sup>(2)</sup> Padrão de substituição usado no GC.

#### 4.5.6 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou supressão significativo (> 10%) 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 (GOSETTI *et al.*, 2010).

Na tabela 14 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para todos os agrotóxicos. Foram preparadas curvas em (1:1; v/v) diclorometano:metanol para os compostos determinados por GC e na fase móvel

para os analitos determinados por LC, juntamente com curvas preparadas na matriz “branco” (água da torneira). Observa-se que para a maioria dos compostos analisados apresentaram efeito matriz com aumento do sinal analítico. Demonstrando assim, a necessidade de realizar a quantificação dos agrotóxicos empregando curvas analíticas preparadas no extrato da matriz.

O efeito de matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. Os componentes das matrizes aquosas que podem influenciar na análise são: matéria orgânica, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, bem como os sais presentes nas amostras de água (PINHO *et al.*, 2009).

Grande parte da matéria orgânica contida em águas naturais encontra-se como substâncias húmicas. Essas substâncias são uma mistura complexa de moléculas com alto peso molecular, semelhantes entre si e formadas pela decomposição de plantas e organismos aquáticos (TOSCANO *et al.*, 2000).

As interações das substâncias húmicas com compostos orgânicos, como por exemplo, os agrotóxicos estão relacionados com efeitos de adsorção, efeitos solubilizantes, hidrólises e fotossensibilizantes. Processos estes, que quando presentes nas amostras aquosas, mesmo em baixas concentrações, acabam influenciando na detecção e ou na ionização do analito na análise cromatográfica (TOSCANO *et al.*, 2000).

Tabela 14 – Efeito matriz dos agrotóxicos avaliados por LC-(ESI)MS/MS e GC-(EI)MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e na matriz branco.

<b>Compostos</b>	<b>Determinação</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
2,4 D	LC	18,3
2,4 DDD	GC	15,2
2,4 DDE	GC	4,0
2,4,5 T	LC	20,7
Alaclor	GC	19,2
Aldicarbe	LC	14,0
Aldicarbe sulfona	LC	3,5
Aldicarbe sulfóxido	LC	-8,1

(continuação)

<b>Compostos</b>	<b>Determinação</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
Aldrin	GC	3,6
Atrazina	LC	9,5
Azinssulfuron	LC	17,5
Azoxistrobina	LC	7,8
Benfuracarbe	LC	45,2
Benomil	LC	-34,5
Bentazona	LC	13,3
Bifentrina	GC	2,4
Bispiribaque sódico	LC	25,6
Carbaril	LC	18,1
Carbendazin	LC	7,1
Carbofurano	LC	7,4
Cialofope butílico	LC	27,2
Cialotrina lambda	GC	60,9
Ciflutrina	GC	54,8
Cipermetrina	GC	52,7
Clomazona	LC	-1,0
Clordano	GC	26,8
Clorpirifós etílico	LC	31,1
Clorpirifós metílico	LC	-0,5
Clorpirifós oxon	LC	4,1
DDT	GC	50,5
Deltametrina	GC	63,3
Dieldrin	GC	4,7
Dlifenconazol	LC	19,5
Diuron	LC	2,6
Endossulfan alfa	GC	17,2
Endossulfan beta	GC	18,4
Endossulfan sulfato	GC	39,4

(continuação)

<b>Compostos</b>	<b>Determinação</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
Endrin	GC	32,6
Etoxissulfuron	LC	4,8
Fenitrotiona	GC	43,9
Fipronil	LC	19,3
Imazapique	LC	16,3
Imazapir	LC	16,4
Imazetapir	LC	7,1
Imidacloprido	LC	4,9
Lindano (gama HCH)	GC	16,5
Linuron d-6 <sup>(1)</sup>	LC	5,7
Malationa	LC	15,2
Metamidofós	LC	11,3
Metolacloro	GC	20,0
Metsulfurom metílico	LC	-2,7
Molinato	LC	-2,8
Oxifluorfen	GC	36,6
Parationa metílica	GC	38,1
Pendimetalina	LC	26,0
Permetrina	GC	49,8
Pirazossulfuron	LC	16,7
Profenofós	LC	-13,2
Propanil	LC	-9,4
Propiconazole	LC	4,5
Quincloraque	LC	2,4
Simazina	LC	12,8
Tebuconazol	LC	17,3
Terbufós	LC	13,8
Tetraconazol	LC	2,3
Tiabendazol	LC	1,0



(continuação)

<b>Compostos</b>	<b>Determinação</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
Tiametoxan	LC	9,5
Tiofanato metílico	LC	-34,6
Triciclazole	LC	26,5
Trifloxistrobina	LC	13,4
Trifluralina	GC	22,5
Trifluralina d-14 <sup>(2)</sup>	GC	32,8

LC: Cromatografia Líquida; GC: Cromatografia Gasosa; <sup>(1)</sup> Padrão de substituição usado no LC;

<sup>(2)</sup> Padrão de substituição usado no GC.

Na figura 24 estão representadas as curvas analíticas para os agrotóxicos: (A) alaclor e (B) tebuconazol, ambos determinados tanto em solvente quanto no extrato da matriz. É possível constatar a influência dos componentes da matriz no sinal analíticos. O mesmo procedimento foi utilizado para os demais analitos.

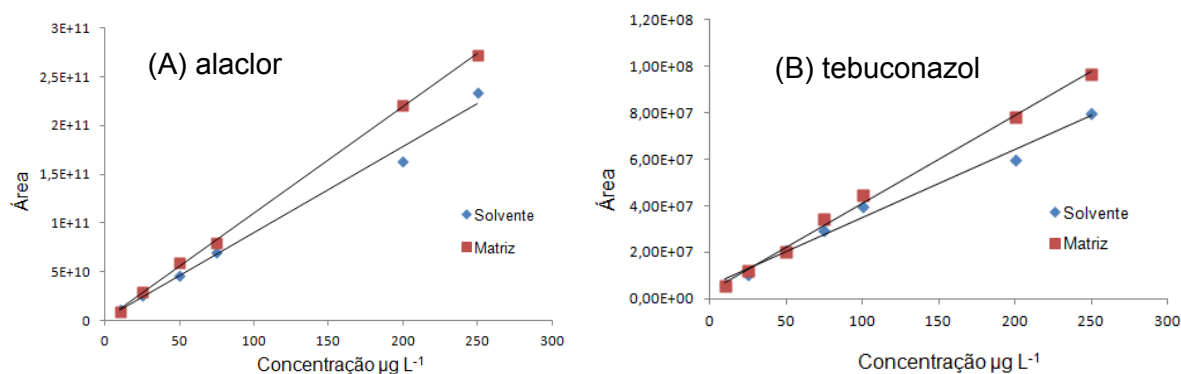


Figura 24 – Curvas analíticas para os agrotóxicos: (A) alaclor determinado por GC-MS/MS e (B) tebuconazol determinado por LC-MS/MS, ambos preparados tanto em solvente quanto no extrato da matriz.

#### 4.6 Aplicação do Método

A aplicação do método desenvolvido em amostras reais mostrou excelente desempenho, estando de acordo com os critérios de adequação de métodos cromatográficos. As amostras foram preparadas conforme o método validado (Figura 23).

Das doze (12) amostras analisadas, apenas duas (2) amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos. Em uma das amostras (água de vertente) foi detectado a presença de metolacloro, abaixo do limite de quantificação que é de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este valor é inferior ao estabelecido na Portaria N° 2914 de 14 de dezembro de 2011, para este resíduo em água potável que é de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Na outra amostra (água de rio) foi detectado a presença dos agrotóxicos permetrina, cipermetrina e lambda-cialotrina. Desses, apenas o composto lambda-cialotrina apresentou concentração de  $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ , acima do LOQ<sub>m</sub> ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo que a Portaria N° 2914 não estabele VMP para esse composto em água potável. Desses, apenas o composto

permetrina faz parte do escopo dos agrotóxicos presentes na Portaria N° 2914 com valor máximo permitido de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  em água destinada para consumo humano.

O fato das amostras apresentarem baixos níveis de concentração de resíduos de agrotóxicos está diretamente ligado ao período em que as mesmas foram coletadas. A cultura predominante nessas regiões é o arroz irrigado, que nesta época (julho/2012) os produtores estão apenas preparando o solo para posteriormente cultivá-lo.

## 5 CONCLUSÃO

A produção agrícola no Brasil desempenha um importante papel na economia e desenvolvimento do país, sendo um investimento de grande rentabilidade e constante expansão. Associado a isto, está o consumo cada vez mais expressivo de agrotóxicos para garantia do aumento da produtividade. Em contrapartida, o uso abundante de agrotóxicos pode ocasionar a contaminação dos sistemas hídricos superficiais e subterrâneos potencialmente utilizados para o consumo humano. Sendo assim, a hipótese central desse estudo foi desenvolver e validar um método analítico para monitorar 70 resíduos de agrotóxicos em água potável.

A escolha desses analitos buscou atingir o escopo de compostos estabelecidos pela Portaria 2914, bem como outros agrotóxicos comumente utilizados na agricultura. Devido ao grupo de agrotóxicos selecionados apresentar características muito diferenciadas e possuírem baixos Valores Máximos Permitidos (VMP) pela legislação vigente, um método multirresíduo foi otimizado empregando-se uma etapa de concentração através da SPE seguida pela determinação por GC-(EI)MS/MS e LC-(ESI)MS/MS.

A SPE demonstrou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras de águas e essencial para atingir os VMP de todos os analitos, por proporcionar um alto fator de concentração. É rápida, pois permite o preparo simultâneo de até 12 amostras, tem baixo consumo de solvente e, conseqüentemente, gera poucos resíduos e apresenta boas recuperações. Um mesmo extrato obtido permitiu a determinação por GC-(EI)MS/MS e LC-(ESI)MS/MS. Neste estudo, os melhores resultados foram obtidos utilizando 100 mL de amostra acidificada em pH 2,5 com ácido fosfórico (1:1; v/v), empregando o sorvente polimérico Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg/3 mL, e eluição dos agrotóxicos com diclorometano:metanol.

Dos 38 compostos estabelecidos pela Portaria 2914, apenas 7 compostos não puderam ser adequadamente determinados pelo método desenvolvido. Entre eles, glifosato, AMPA e mancozebe não foram incluídos no escopo deste trabalho por ser compostos que demandam métodos de análise dedicada. Enquanto os compostos metamidofós, terbufós, aldicarbe e benomil não foram recuperados de forma adequada na extração multirresíduo estabelecido neste estudo.

As técnicas GC-(EI)MS/MS e LC-(ESI)MS/MS demonstraram ser ideais para a determinação de resíduos de agrotóxicos, visto que o acoplamento com a espectrometria de massas à cromatografia possibilita elevada detectabilidade e seletividade. Além disso, permite realizar uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massas característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas tanto no LC quanto no GC permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, num tempo total de 15 min de corrida cromatográfica.

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados na validação do método foram satisfatórios. Todos os agrotóxicos em estudo apresentaram boa linearidade das curvas analíticas, com coeficientes de determinação maiores que 0,99 na faixa entre 10 e 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para os compostos dieldrin, aldrin e clordano o limite de detecção e quantificação do método foi de 0,006 e 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente já para os demais agrotóxicos os valores de  $\text{LOD}_m$  e o  $\text{LOQ}_m$  foram de 0,15 e 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

As recuperações empregando SPE para a maioria dos agrotóxicos estiveram entre 70 e 120%, e os valores de precisão obtidos ficaram dentro do limite aceitável ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ). Além dos 4 compostos da Portaria 2914 que não foram recuperados, os analitos benfuracarbe e tiofanato metílico também apresentaram resultados insatisfatórios.

O método quando aplicado em amostras reais de água mostrou-se adequado, possibilitando a detecção e a quantificação de lambda-cialotrina na concentração de 0,65  $\mu\text{g L}^{-1}$  em uma das amostras de rio. A Portaria 2914 não estabelece limite para este agrotóxico.

Portanto, conclui-se que o método proposto para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água potável utilizando GC-(EI)MS/MS e LC-(ESI)MS/MS mostrou-se eficaz por atender as os parâmetros de validação de métodos cromatográficos. Considerando-se os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram atingidos e o método pode ser aplicado em análise de rotina laboratorial, pois contempla uma única técnica de extração para duas técnicas de determinação, em apenas 15 minutos de determinação, além de ser uma excelente ferramenta para programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em água destinada ao consumo humano.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADKHANIHA, R. *et al.* Quantification of endogenous steroids in human urine by gas chromatography mass spectrometry using a surrogate analyte approach. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 845-856, 2010.

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.

ALVES, M. I. R.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; OLIVEIRA, L. G.; FURTADO, S. T. F. Avaliação da contaminação por pesticidas organoclorados em recursos hídricos do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, p. 67-74, 2010.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monografias>>. Acesso em 15 jun. 2012.

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 maio 2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em 23 fev. 2012.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons Ltd, 276 p, 2003.

AVILA, J. S. *et al.* Determination of atrazine, lindane, pentachlorophenol, and diazinon in water and soil by isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6799-6811, 2011.

BAER, W. **A economia brasileira**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 505 p, 2002.

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

BANDEIRA, M. I. A. C. A. **Métodos de Extração de aldrin de solos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro - Portugal, 2008.

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

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

BARREK, S. *et al.* Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. **Talanta**, v. 79, p. 712-722, 2009.

BEIGI, F. A. K., *et al.* SPE-HPLC method for determination of ketoconazole and clotrimazole residues in cow's milk. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1679-1685, 2011.

BELLUTA, I.; SILVA, A. M. M. Vulnerabilidade natural da Microbacia do córrego do Cintra frente aos pesticidas – um estudo de caso (Botucatu/SP). **Energia na Agricultura**, v. 23, p. 31-52, 2008.

BENASSI, M., 2009. Ionização por Impacto de Elétrons. <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=45&numero=6>> Acesso 26 de fevereiro, 2012.

BENVENUTO, F. *et al.* Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal Chem**, v. 397, p. 2791-2805, 2010.

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

BRASIL. Decreto nº. 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/D4074.htm#art98](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#art98)>. Acesso em 10 abr. 2012.

BRASIL. Lei n°. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)>. Acesso em 6 abr. 2012.

BRASIL. Lei n°. 9.433 de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei n° 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei n° 7.990, de 28 de dezembro de 1989. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/l9433.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/l9433.htm)>. Acesso em 6 mar. 2012.

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 dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilancia\\_controle\\_qualidade\\_agua.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf)>. Acesso em 14 mar. 2012.

BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 14 abr. 2012.

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

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

CAHILL, M. G.; CAPRIOLI, G.; STACK, M.; VITTORI, S.; JAMES, K. J. Semi-automated liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for basic pesticides in wastewater effluents. **Anal. Bional. Chem**, v. 400, p. 587-594, 2011.



CALDAS, S. S.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G. Herbicides and Environment. In: \_\_\_\_\_. **Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticides in the South of Brazil**. Rijeka: InTech, Cap. 23, p. 471-492, 2001.

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 resíduo de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CALDAS, S.S.; DEMOLINER, A. COSTA, F. P.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G.; pesticides residue determination in groundwater using SPE and HPLC-DAD and LC-MS/MS. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 642-650, 2010.

CARDOSO, L. V. **Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público**. 2011. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

CARVALHO, A. P. de. A. **Otimização e validação de métodos para análise simultânea de dicofol, permetrina, dieldrin, endossulfan e diclorvos em ração animal, fígado e cérebro de ratos**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CARVALHO, J. J.; JERÓNIMO, P. C. A.; GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M. F. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. **Anal. Bional. Chem**, v. 392, p. 955-968, 2008.

CEPEA (CENTROS DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA), 2012. Disponível em <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>> Acesso em: jun. de 2012.

CHIARADIA, M. C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD**. 2009. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 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.

CHROMEDIA, 2011. <[www.chromedia.org](http://www.chromedia.org)> Acesso 07 de jun. 2012.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v.24, p. 374, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS METHODOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, **Codex on Methods of Analysis and Sampling**, Budapeste, 2001.

COELHO, C. N. O princípio do desenvolvimento sustentado na agricultura brasileira. Revista de política agrícola: **CONAB**, trimestral, nº 2, abr./mai./jun. 66 p, 1998.

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

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

COUNCIL DIRECTIVE. **Relating to the quality of water intended for human consumption**. European Communities, 1980. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1980/L/01980L077819950101-en.pdf>>. Acesso em 26 maio de 2012.

COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, v. 16, p. 63-70, 2006.

DEMOLINER, A. *et al.* Development and validation of a method using SPE and LC-MS/MS for the determination of multiple class of pesticides and metabolites in water samples. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1424-1433, 2010.

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

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.

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

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 2012. Disponível em:< <http://www.embrapa.br/>>. Acesso 15 maio 2012.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Gestão Sustentável no baixo Jaguaribe, Ceará, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. Disponível em:< <http://www.embrapa.br/produçãocientifica>>. Acesso 15 mar. 2012.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED ATIONS), 2005. Disponível em <  
<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em 25 mar. 2012.

FARIAS, L. J. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia.** 2004. Dissertação (Mestre em Química) – UNICAMP, São Paulo, 2004.

FENIK, J., MACIEJ, T., BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 814-826, 2011.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Editora Elsevier, Amsterdam, v. XLIII, Cap. 4, 2005.

FOOTPRINT. **Pesticide Proprietis Database.** Disponível em <  
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

FREITAS, M. A. V. de. **O estado das águas no Brasil:** Perspectivas de gestão e informação de recursos hídricos. Brasília, DF: Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL, 334 p, 1999.

FRENICH, A. G. *et al.* Compensation for matrix effects in gas chromatography – tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 4798-4814, 2009.

FRIGGI, C. do. A. **Determinação de multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes empregando LC-MS/MS.** 2012. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GAO, J. *et al.*, Occurrence and distribution of organochlorine pesticides – lindane, p,p'-DDT, and heptachlor epoxide – in surface water of China. **Environment International**, v. 34, p. 1097-1103, 2008.

GAO, S.; ZHANG, Z.; KARNES, H. T. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. **J. Chromatogr. B**, v. 825, p. 98-112 2005.

GEIB, S.; GEBERT, S. Extration of highly polar organophosphorous pesticides from water. **Acta hydrochim. Hydrobiol**, v. 34, p. 464-473, 2006.

GOLFINOPOULOS, S. K. *et al.*, Organochlorine pesticides in the surface water of Northern Greece. **Chemosphere**, v. 50, p. 507-516, 2003.

GOSETTI, F. *et al.* 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.** 1ª ed. Springer, Alemanha, 2004.

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

HILDEBRANDT, A. *et al.* Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). **Water Research**, v. 42, p. 3315-3326, 2008.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE). Disponível em <<http://www.ich.org/>>. Acesso em novembro de 2011.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA), 2012. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/estatisticas\\_previsao\\_safras](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/estatisticas_previsao_safras)>. Acesso em 21 jun. 2012.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, ver. 4, 2011.

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.

JOKANOVIC M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 60, p. 166-139, 2001.

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

KRISTENSON, E. M.; RAMOS, L.; BRINKMAN, U. A. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 96-111, 2006.

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.

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

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

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. de. Pesticidas. **Química Nova**, v. 15, p. 161-166, 1992.

LAVORENTI, A.; PRATA F.; REGITANO J. B. Comportamento de pesticidas em solos. **Fundamentos Tópicos Ciência de Solo**, Viçosa, MG, v. 3, p. 335-400, 2003.

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

LIMA, V. L. A.; CHAVES, L. H. G. **Qualidade da água: leis, qualidade e recomendações**. Campina Grande, PB: agenda, 120 p, 2008.

LIU, F. *et al.* Multi-residue analysis of some polar pesticides in water samples with SPE and LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 63, p. 233-237, 2006.

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

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

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

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), 2011. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 21 jan. 2012.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense**. 2003. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

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

MARICONE, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no controle às pragas**. São Paulo, Ed. Nobel, 2ª ed., 1977.

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

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

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

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 363-372, 2009.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, P. L. R.; KEUKELEIRE, D. D.; NACIMENTO, R. F. Multiresidue methods for determination of pesticides using SPME and SPE followed by GC-NPD system: a comparative study. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.22, p. 2048-2055, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 12 jun. 2012.

MUNARETTO, J. S. **Determinação de disruptores endócrinos em filé de peixe utilizando QuEChERS modificado e GC-(TQ)MS/MS**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

NETO, M. de L. F.; FERREIRA, A. P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente** – InterfaccEHS, v. 2, ago. 2007.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H.; A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytical Chimica Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.

OPAS/OMS (Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde). Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília: Representação do Brasil, 1996.

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

**Pesticide Manual**, British Crop Protection Council – CD S Tomlin, 12 ed, 2000-2001.

PEREIRA, M. B. **Avaliação da técnica de extração por SPE e GC-(EI)-MS/MS na análise de agrotóxicos em água de lavoura de arroz irrigado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

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

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, v. 32, p. 987-998, 2009.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D. **Método rápido para a 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, Santa Maria, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F.C.; J, I. C. S. F. Novos sorventes baseados em poli(metiloctilsiloxano) sobre sílica para uso em extração em fase sólida. **Quim. Nova**, v. 29, p. 637-640, 2006.

QUINTANA, J.; MARTI, I.; VENTURA, F. Monitoring of pesticides in drinking and related Waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including na estimation of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 3–13, 2001.

REIFSCHNEIDER, J. B., *et al.* **Novos ângulos da história da história da agricultura no Brasil**. 2<sup>a</sup> ed, Brasília, DF: EMBRAPA, 116 p, 2012.

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

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.

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

SABESP (COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO). Revista do Departamento de água e esgoto (DAE). São Paulo, n°. 189, maio/ago. 2012.

SABIN, G. P. **Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SABIN, G. P.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gás chromatography – mass spectrometry after solid-phase extraction. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, p. 918-925, 2009.

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

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) **Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis**, 4ª Edição, Documento N° SANCO/12495/2011, 01 de Fevereiro 2012, Bruxelas, Bélgica. 2012.

SANKARARAMAKRISHNAM, N.; SHARMA, A. K.; SANGHI, R. Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface water of Kanpur, Uttar Pradesh, India. **Environment International**, v. 31, p. 113-120, 2005.

SHMITZ, R. J. **Introduction to water pollution biology**. Houston, Ed. Guef. Biblioshing Company, 1996.

SILVA, C. L. D. **Análise da vulnerabilidade ambiental aos principais pesticidas recomendados para os sistemas de produção de algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, citros, milho e soja**. Dissertação (Mestrado em Água e Solo) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

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

SILVA, D. R. O. *et al.*, Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de região orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2383-2389, 2009.

SINDAG (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA), 2012. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2278](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278)>. Acesso em 2 ago. 2012.

SINDAG (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA), 2011. **Agroquímicos: vendas sobem no acumulado do ano**. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2209](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2209)>. Acesso em 11 fev. 2012.

SINDAG (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA), 2006. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2273](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2273)>. Acesso em 22 jul. 2012.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICA), 2009. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/Tabela%204%20-%202009.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/Tabela%204%20-%202009.pdf)>. Acesso em 10 abr. 2012.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 999 p, 2008.

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



SPADOTTO, C. A., et al. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. Campinas: **Embrapa**, (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 78), 49p, 2010.

SPADOTTO, C. A., et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42) 29p, 2004.

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

SUCHARA, E. A. *et al.* A combination of statistical and analytical evaluation methods as a new optimization strategy for the quantification of pharmaceutical residues in sewage effluent. **Analytica Chimica Acta**, v. 6, p. 169-176, 2008.

TELLES, D. D. A. **Água na agricultura e pecuária**. São Paulo, Ed. Escrituras, 2ª ed., 2002.

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

TOSCANO, I. A. S. *et al.* Determinação de carbaril utilizando testes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e CLAE com detecção por arranjo de diodos. **Química Nova**, v 23, p. 466-471, 2000.

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**. 2002. Tese (Doutor em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

VARCA, L. M. Pesticides residues in surface Waters of Pagsanjan-Lumban catchment of Laguna de Bay, Philippines. **Agricultural Water Management**, v. 106, p. 35-41, 2012.

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

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil., **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 22; p. 2391-2399; 2006.

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

VICARI, M. C. de. **Determinação de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazol em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

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.

## **7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Inevitavelmente nas atividades laboratoriais gera-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos. Esses devem ser tratados ou descartados de forma adequada para que os mesmos não acabem contaminando o ambiente.

Neste sentido, os resíduos gerados durante o desenvolvimento desse trabalho foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM. O DQ é responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada capacitada nessa área.

## **8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Avaliar a aplicabilidade do método no monitoramento de diferentes amostras de água, como por exemplo, rios, água tratada, água mineral e água subterrânea determinando a presença e a concentração de resíduos de agrotóxicos;

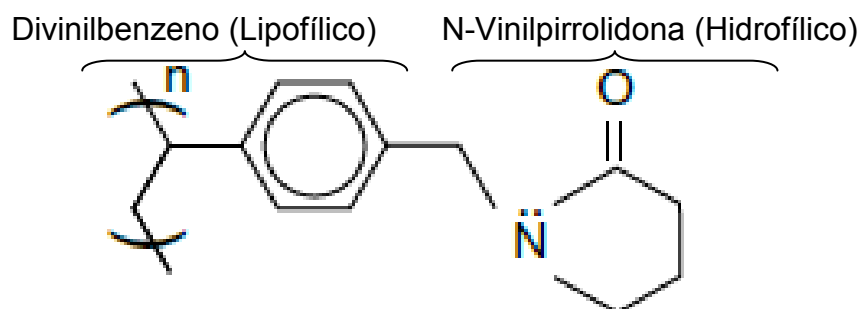
Aumentar o escopo de agrotóxicos analisados neste método;

Testar outras condições no preparo de amostra (SPE), a fim de obter melhores resultados para os compostos não recuperados neste trabalho;

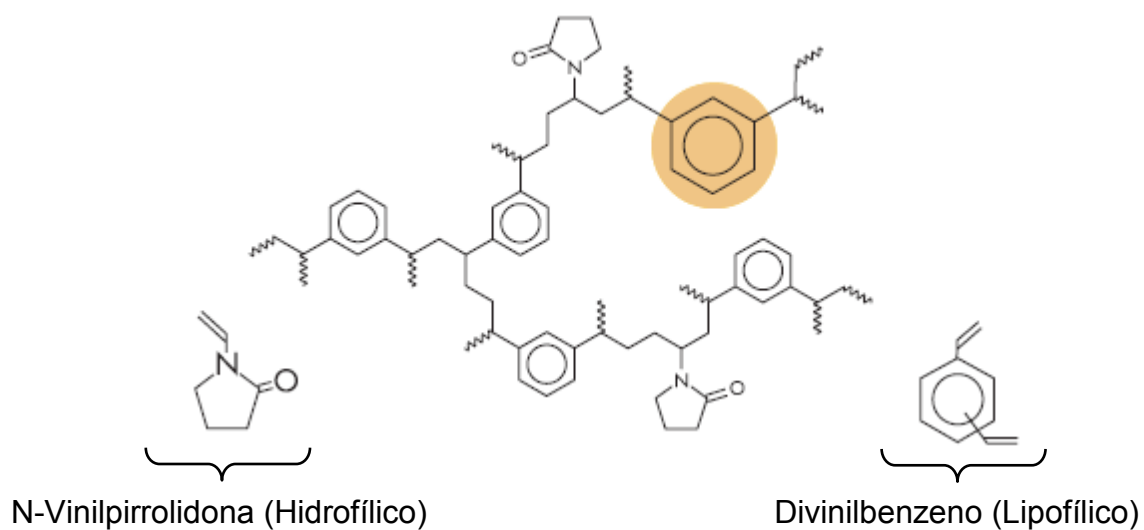
## 9 ANEXOS

**Anexo I** – Estruturas dos sorventes avaliados neste trabalho.

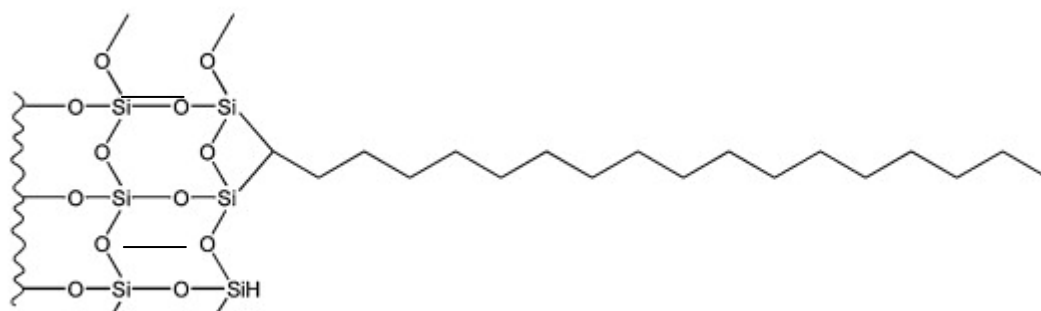
**A)** Estrutura do adsorvente **Strata<sup>®</sup> X**



**B)** Estrutura do adsorvente **Oasis<sup>®</sup> HLB**

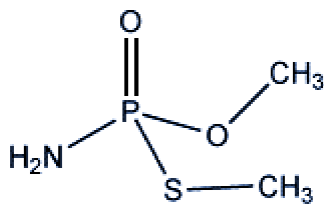


**C)** Estrutura do adsorvente **Strata<sup>®</sup> C<sub>18</sub>**

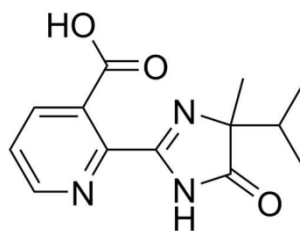


**Anexo II – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados nesse trabalho**

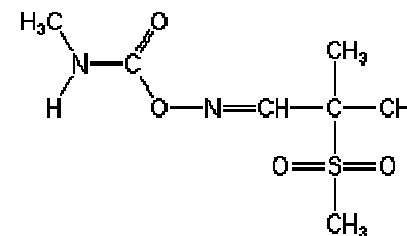
Estruturas dos agrotóxicos determinados por LC-MS/MS



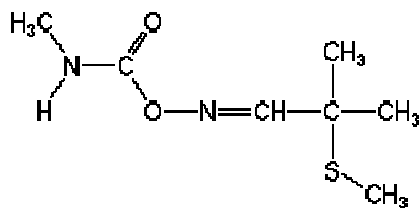
Metamidofós



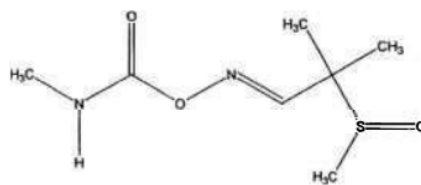
Imazapir



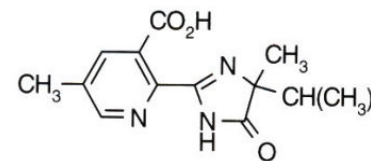
Aldicarbe Sulfona



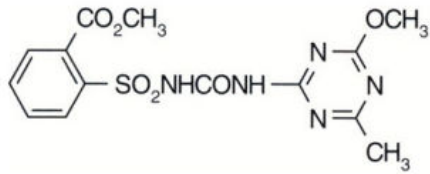
Aldicarbe



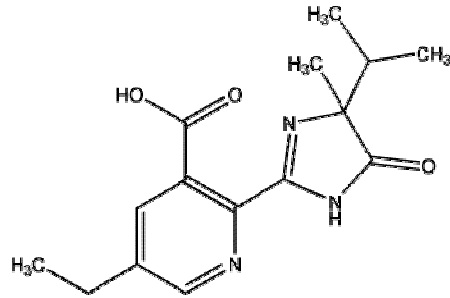
Aldicarbe Sulfóxido



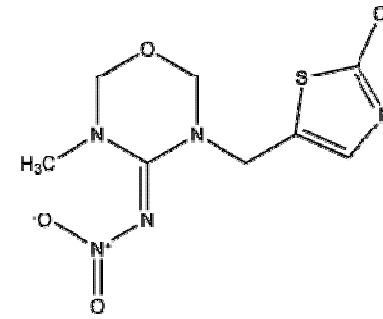
Imzapique



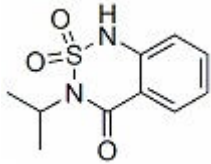
Metsulfurom Metílico



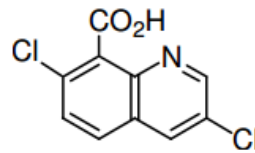
Imazetapir



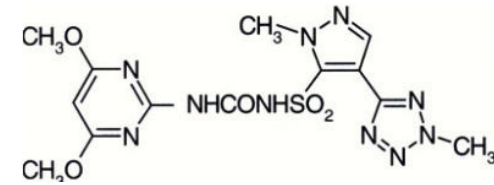
Tiametoxan



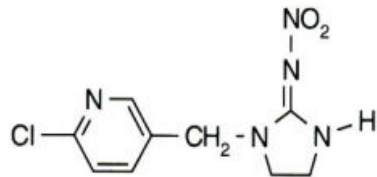
Bentazona



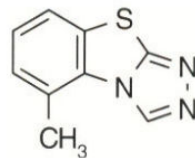
Quincloraque



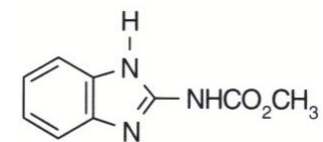
Azinssulfurom



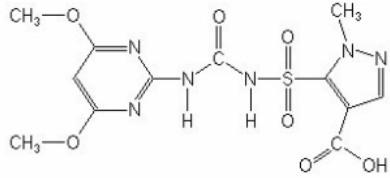
Imidacloprido



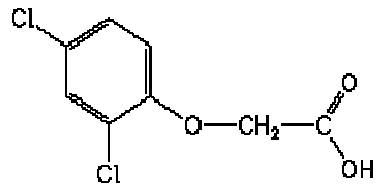
Ticiclazol



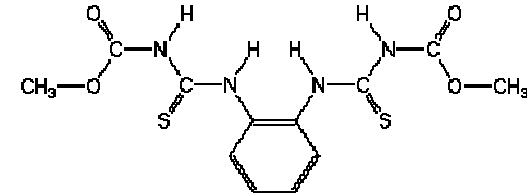
Carbendazim



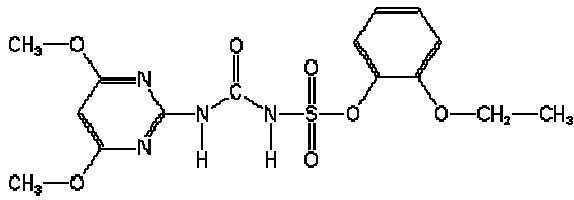
Pirazossulfurom



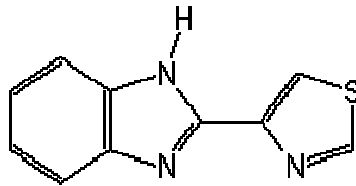
2,4 D



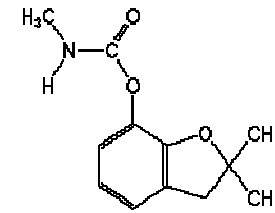
Tiofanato Metílico



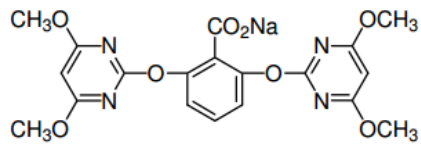
Etoxissulfurom



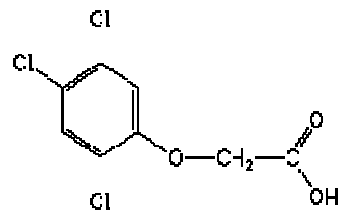
Tiabendazol



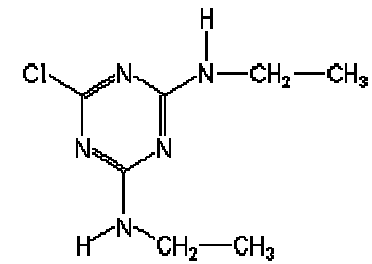
Carbofurano



Bispiribaque Sódico

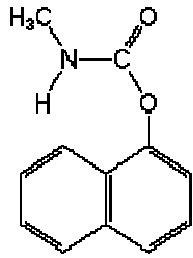


2, 4, 5 T

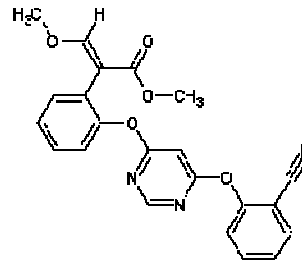


Simazina

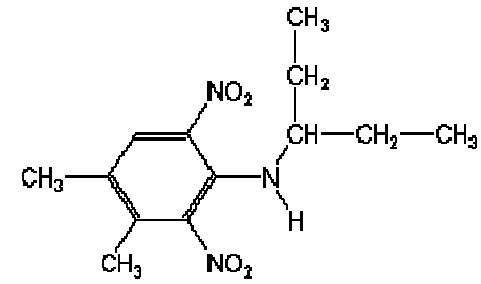




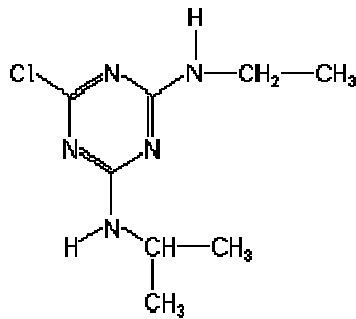
Carbaril



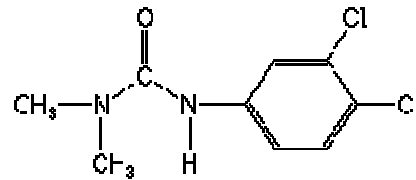
Azoxistrobina



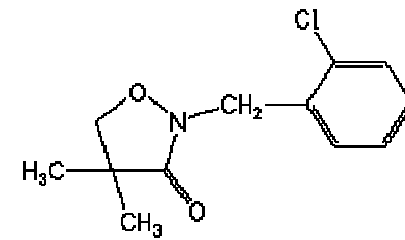
Pendimetalina



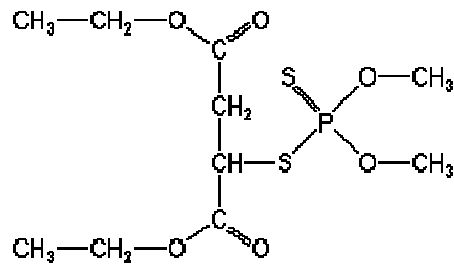
Atrazina



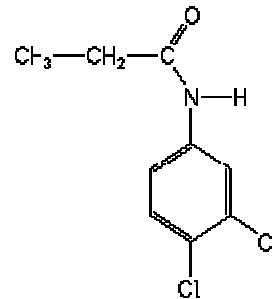
Diurom



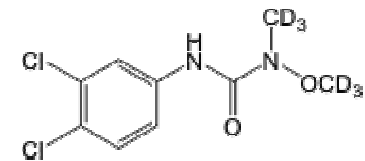
Clomazona



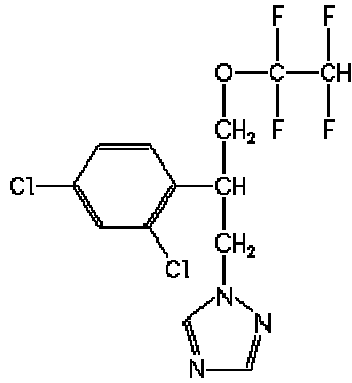
Malationa



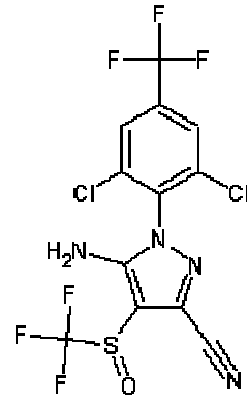
Propanil



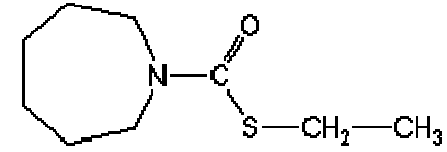
Linurom Deuterado



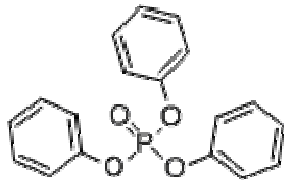
Tetraconazol



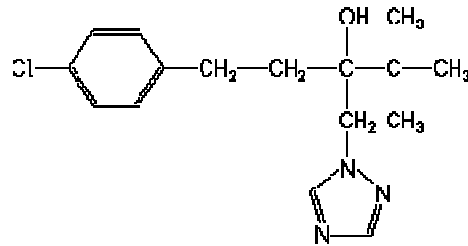
Fipronil



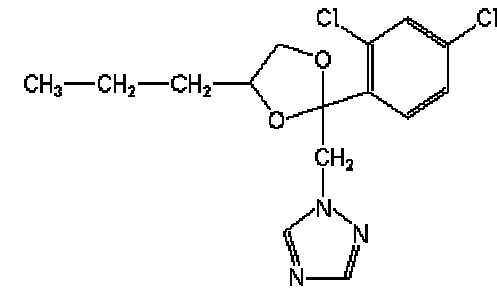
Molinato



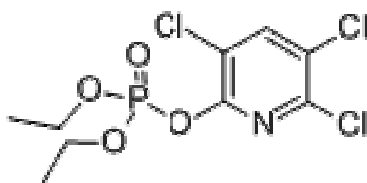
Trifenil fosfato (PI)



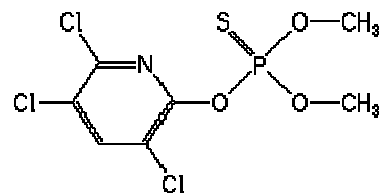
Tebuconazol



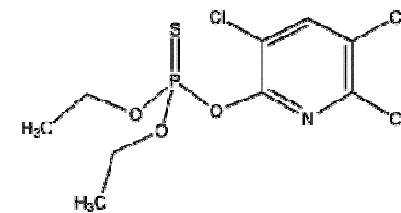
Propiconazol



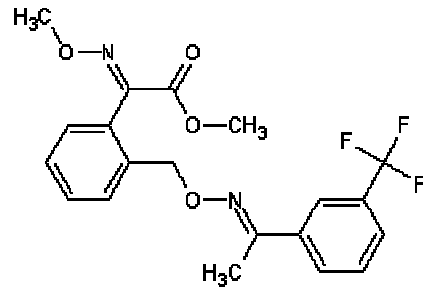
Clorpirifós Oxon



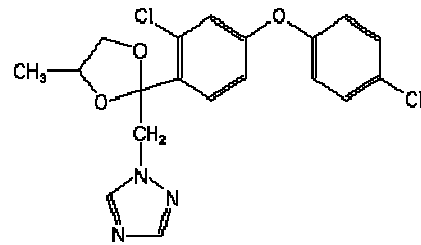
Clorpirifós metílico



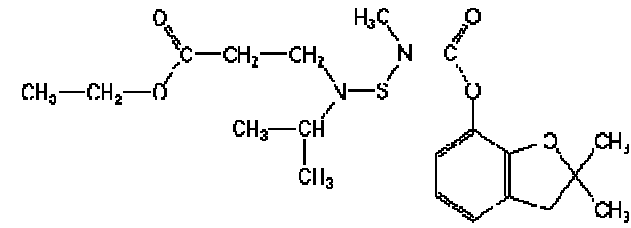
Clorpirifós Etílico



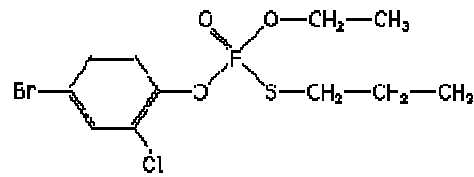
Trifloxistrobina



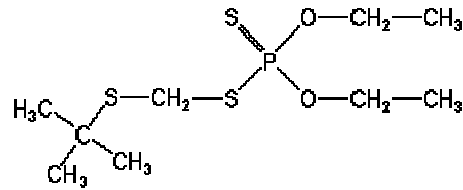
Difenoconazol



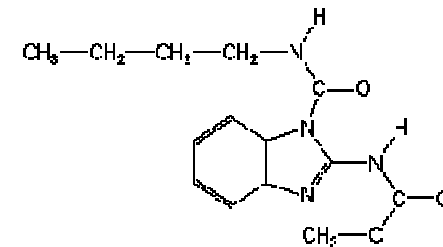
Benfuracarbe



Profenofós

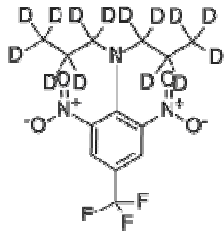


Terbufós

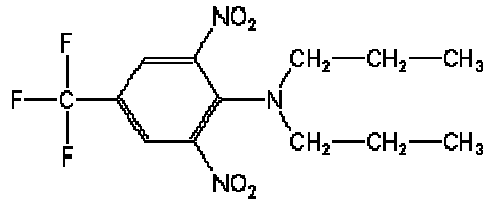


Benomil

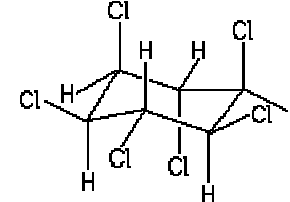
## Estruturas dos agrotóxicos determinados por GC-MS/MS



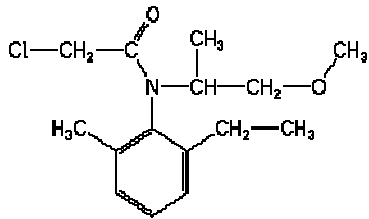
Trifluralina Deuterada



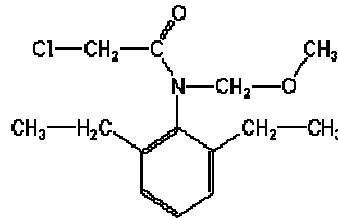
Trifluralina



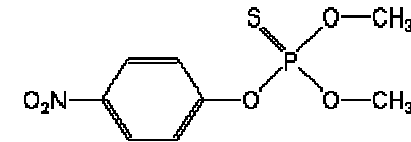
Lindano



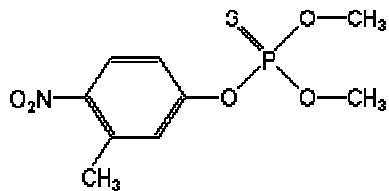
Metolachloro



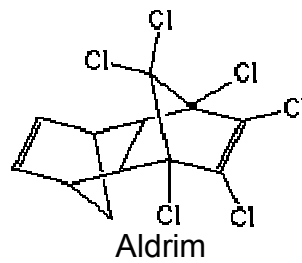
Alachloro



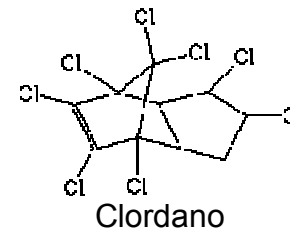
Parationa Metilica



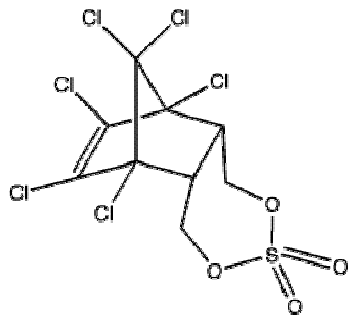
Fenitrotiona



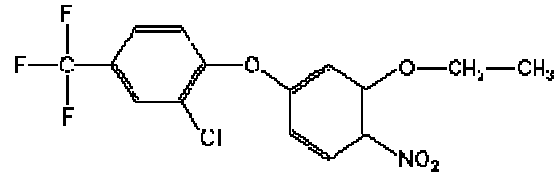
Aldrim



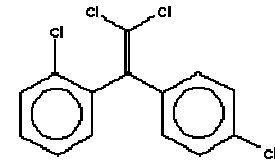
Clordano



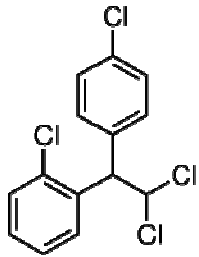
Endossulfan sulfato



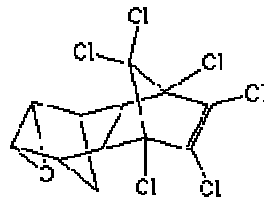
Oxifluorfen



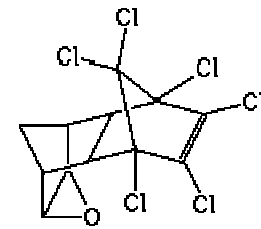
2, 4 DDE



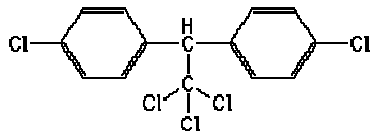
2, 4 DDD



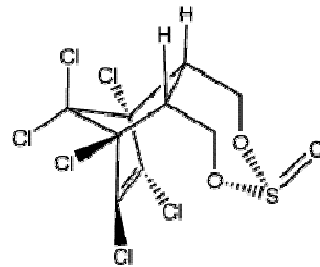
Dieldrin



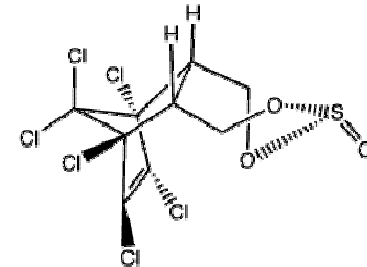
Endrin



DDT

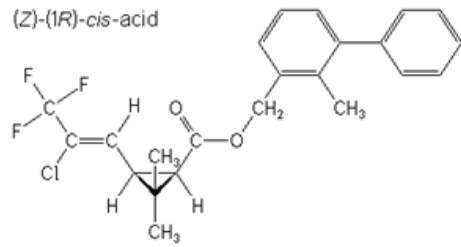


Endossulfan beta

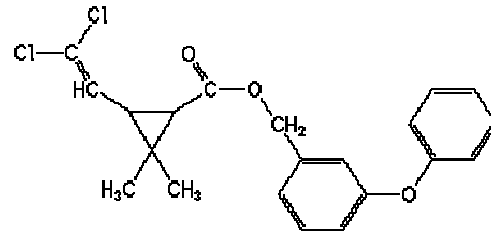


Endossulfan alfa

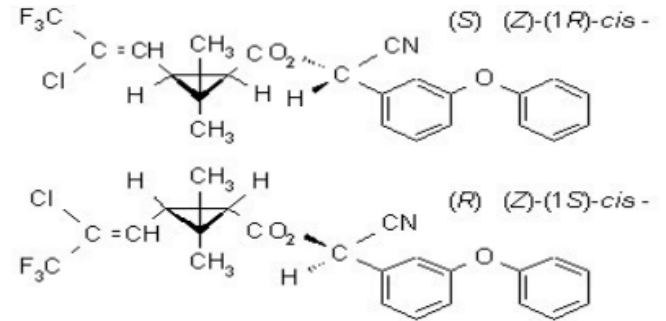
(Z)-(1R)-cis-acid



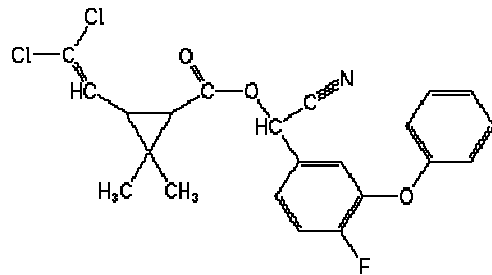
Bifentrina



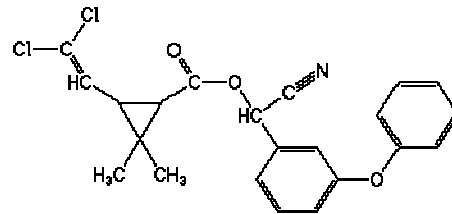
Permetrina



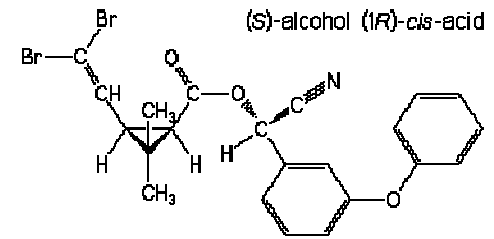
Cialotrina-lambda



Ciflutrina



Cipermetrina



Deltametrina