

Bruno Henrique Todeschini

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS  
E NA REDE PÚBLICA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA NO  
RIO GRANDE DO SUL.**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Perícia Criminal  
Ambiental da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Mestre em Perícia Criminal  
Ambiental.

Orientador: Prof.Dr. Luis Augusto dos  
Santos Madureira.  
Supervisor: F.F.A Fabiano Barreto.

Florianópolis, SC, Brasil  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Todeschini, Bruno Henrique

Avaliação da presença de agrotóxicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em águas superficiais e na rede pública de abastecimento de água no rio grande do sul. / Bruno Henrique Todeschini ; orientador, Prof.Dr. Luis Augusto dos Santos Madureira - Florianópolis, SC, 2013.  
123 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Perícias Criminais Ambientais.

Inclui referências

1. Perícias Criminais Ambientais. 2. Agrotóxicos. 3. Resíduos de agrotóxicos em águas naturais. 4. Águas superficiais. 5. Águas de abastecimento. I. , Prof.Dr. Luis Augusto dos Santos Madureira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Perícias Criminais Ambientais. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado aos meus pais, cujo amor e caráter me serviram de exemplo, e à Cristiane, Pedro e Maria, que são a minha inspiração diária.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Madureira pela atenção, apoio e paciência na orientação neste trabalho.

Ao fiscal federal agropecuário Fabiano Barreto, do Lanagro/RS, que permitiu o acesso ao laboratório de resíduos de medicamentos e pesticidas, especialmente para o uso dos cromatógrafos líquidos, que foram fundamentais para a conclusão da análise proposta.

A pesquisadora do Lanagro/RS, doutoranda Louise Jank pelos ensinamentos, pelo apoio e por toda a força que deu para a elaboração da metodologia proposta.

Aos pesquisadores do Lanagro/RS Leonardo Meneghini, Gabriel Rubensam, pela ajuda dispensada e paciência para tirar eventuais dúvidas.

À doutoranda da UFRGS Rafaela Marin, pelo apoio ao trabalho e pela ajuda dispensada no tratamento das amostras ao longo de 2013.

Ao Professor Renato Zanella, da UFSM, que apoiou a elaboração de dois laudos criminais relacionados com resíduos de agrotóxicos em água superficial em 2010 e 2011, os quais despertaram a vontade de realizar este trabalho. Agradeço também por sanar algumas dúvidas e por emprestar material ao longo do desenvolvimento da metodologia proposta.

Aos colegas do Mestrado Profissional da UFSC, pelos bons momentos em que convivemos no decorrer do curso.

Agradecimento especial para o PCF Alexandre Bacellar Raupp, cuja dedicação integral e habilidade na condução do processo do mestrado profissional permitiu que este curso se transformasse num sucesso, num convenio inédito entre a UFSC e o DPF.

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS E NA REDE PÚBLICA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA NO RIO GRANDE DO SUL.**

No ano de 2012 o Brasil destacou-se mundialmente como um dos maiores consumidores de agrotóxicos. Este elevado consumo traz questionamentos quanto ao uso correto destas substâncias assim como o adequado manejo dos resíduos gerados, sejam estes sólidos ou líquidos. Uma consequência previsível deste elevado consumo de pesticidas é a presença de seus resíduos em mananciais hídricos. Desta forma, é imperativo conhecer a qualidade desta água e identificar os pontos mais severos de poluição e se esta descarga de resíduos de agrotóxicos está chegando até o consumidor de água potável, para a adoção de medidas adequadas e corretivas. Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia de análise de resíduos de pesticidas em águas superficiais para cinco agrotóxicos: carbofurano, clomazona, fipronil, imidacloprido e tebuconazol. A metodologia analítica adotada foi a extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de estireno-divinilbenzeno (Strata X®), seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* (LC-ESI-MS-MS). A fase móvel escolhida foi acetoneitrila:água (em gradiente). O método foi validado por meio da análise dos seguintes parâmetros: especificidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão (recuperação) e efeito de matriz. Os resultados obtidos indicaram que o método é sensível, específico, com limite de quantificação de 0,04 µg/L, com coeficiente de determinação acima de 0,99, recuperação entre 71 e 90%. Foi constatado o efeito de matriz, devido à presença de interferentes nas águas superficiais, de forma que a quantificação deve ser feita por superposição de matriz ou adição de padrão. O método é aplicável para os agrotóxicos carbofurano, clomazona, fipronil e imidacloprido.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, extração em fase sólida, águas superficiais.

## ABSTRACT

### ASSESSMENT OF THE PRESENCE OF PESTICIDES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY IN SURFACE WATER AND IN THE PUBLIC WATER SUPPLY IN RIO GRANDE DO SUL

In 2012 Brazil stood out as one of the world's largest consumers of pesticides. This high consumption raises questions about the correct use of these substances as well the management of generated waste, whether solid or liquid. An expected consequence of this high consumption of pesticides is the presence of their residues in water sources. Thus, it is imperative to know the quality of this water and identify the most severe pollution points and if this discharge of pesticide is coming to the consumer of drinking water for the adoption of appropriate and corrective measures. In this work a methodology for the analysis of pesticide residues in surface waters for five pesticides: carbofuran, clomazone, fipronil, imidacloprid and tebuconazole, is proposed. The analytical procedure included solid phase extraction (SPE) with styrene-divinylbenzene cartridges (Strata X®), followed by liquid chromatography coupled to eletrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The mobile phase was acetonitrile:water, in gradient mode. The method was validated by analyzing the parameters: specificity, sensitivity, limit of detection, limit of quantification, linearity, precision, accuracy (recovery) and matrix effect. The results indicated that the method is sensitive, specific, with quantification limit of 0.04 µg/L, with a coefficient of determination above 0.99 and recovery between 71 and 90%. The matrix effect was observed due to the presence of interfering in surface water, indicating that quantification should be made by matrix-matching or standard addition. The method is applicable to the pesticides carbofuran, clomazone, fipronil and imidacloprid.

**Keywords:** pesticides, Solid Phase Extraction, surface water, LC-ESI-MS/MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da importação de agrotóxicos entre 1961 e 2011, em milhares de dólares.

Figura 2 – Estrutura molecular do carbofurano.

Figura 3 – Estrutura molecular do clomazona.

Figura 4 – Estrutura molecular do fipronil.

Figura 5 – Estrutura molecular do imidacloprido.

Figura 6 – Estrutura molecular do tebuconazol.

Figura 07 – Etapas para Extração em Fase Sólida (SPE).

Figura 08 – Estrutura química do polímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Strata-X

Figura 09 – Esquema de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo.

Figura 10 – Esquema de equipamento de espectrometria de massas, do tipo triplo quadrupolo em modo tandem, com ionização por eletrospray.

Figura 11 – Espectrômetro de massas AB Sciex - QTRAP 5500.

Figura 12 – Placa de ccd com a combinação de fase móvel acetonitrila: metanol:água – 50:15:35. Leitura sob radiação ultravioleta em comprimento de onda de 254 nm.

Figuras 13 e 14 – Cromatograma obtido para clomazona 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.

Figuras 15 e 16 – Cromatograma obtido para tebuconazol 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.

Figuras 17 e 18 – Cromatograma obtido para fipronil 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.

Figuras 19 e 20 – Cromatogramas obtidos com a injeção de amostras brancas.

Figura 21 - Cromatograma obtido num cartucho de SPE da amostra superficial fortificada.

Figura 22 - Cromatograma obtido com o gradiente 1, injetando acetonitrila.

Figura 23 – Cromatograma obtido para o tebuconazol, 50 ng/mL, gradiente 1, em 220 nm

Figuras 24 e 25 – Cromatogramas obtido com a injeção de acetonitrila, gradiente 2, e a varredura do pico de 19,09 minutos em 270 nm.

Figuras 26, 27 e 28 – Cromatogramas obtido com a injeção de imidacloprido 50 ng/mL em gradiente, comprimentos de onda 254 nm; 270 nm; Varredura UV pico com Tr. de 10.34 min

Figuras 29 e 30 – Cromatograma obtido com a injeção de fipronil, 50 ng/mL em gradiente, comprimentos de onda 254 nm e varredura do pico com Tr de 17.16 min.

Figura 31 – Cromatograma no modo MRM, da solução dos cinco analitos em solvente, na concentração de 100 ng/mL.

Figuras 32 a 36 – Cromatogramas com as duas transições monitoradas de cada analito, em solvente, na concentração de 50 ng/mL.

Figura 37 – Cromatograma no modo MRM, da matriz branca de água superficial.

Figura 38 a 41 – Comparação das curvas de calibração em solvente com as curvas de calibrações em matriz para os analitos estudados carbofurano, clomazona, fipronil e imidacloprido.

Figura 42 – Local de coleta de água superficial no rio São Sepé.

Figura 43 – Local de coleta de água tratada em São Sepé

Figura 44 - Curva de calibração do carbofurano, em solvente.

Figura 45 - Curva de calibração para a clomazona em solvente.

Figura 46 - Curva de calibração para o fipronil em solvente.

Figura 47 - Curva de calibração para o imidacloprido em solvente.

Figura 48 - Curva de calibração para o tebuconazol, em solvente.

Figura 49 - Curva de calibração do carbofurano, em solvente.

Figura 50 - Curva de calibração para a clomazona, em solvente.

Figura 51 - Curva de calibração para o fipronil, em solvente.

Figura 52 - Curva de calibração para o imidacloprido, em solvente.

Figura 53 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em solvente.

Figura 54 - Curva de calibração para o carbofurano, em solvente.

Figura 55 - Curva de calibração para a clomazona, em solvente.

Figura 56 - Curva de calibração para o fipronil, em solvente.

Figura 57 - Curva de calibração para o imidacloprido, em solvente.

Figura 58 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em solvente.

Figura 59 - Curva de calibração do carbofurano, em matriz.

Figura 60 - Curva de calibração para a clomazona, em matriz.

Figura 61 - Curva de calibração para o fipronil, em matriz.

Figura 62 - Curva de calibração para o imidacloprido, em matriz.

Figura 63 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em matriz.

Figura 64 - Curva de calibração do carbofurano, em matriz.

Figura 65 - Curva de calibração para a clomazona, em matriz.

Figura 66 - Curva de calibração para o fipronil, em matriz.

Figura 67 - Curva de calibração para o imidacloprido, em matriz.

Figura 68 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em matriz.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação química dos agrotóxicos.

Tabela 2 – Agrotóxicos apreendidos entre 2005 e 2007 pela Polícia Federal do RS.

Tabela 3 – Propriedades dos agrotóxicos selecionados.

Tabela 4 – Valores calculados para o índice GUS.

Tabela 5 – Padrões analíticos utilizados.

Tabela 6 – Rfs obtidos para os agrotóxicos.

Tabela 7 – Tempo de retenção dos agrotóxicos no sistema cromatográfico descrito.

Tabela 8 – Resultados de combinações de diferentes misturas de fase móvel, modo isocrático.

Tabela 9 – Detalhes do Gradiente 1.

Tabela 10 – Detalhes do Gradiente 2.

Tabela 11 – Gradientes testados.

Tabela 12 – Gradiente usado na cromatografia.

Tabela 13 - Parâmetros otimizados para o analisador de massas dos analitos e por ionização por eletrospray no modo positivo. \*Fipronil no modo negativo.

Tabela 14 – Parâmetros para ionização por eletrospray no modo positivo.

Tabela 15 – Parâmetros para ionização por eletrospray no modo negativo.

Tabela 16 – Tempo de retenção dos agrotóxicos no sistema cromatográfico descrito.

Tabela 17 – Valores obtidos para o volume de quebra.

Tabela 18 – Dados obtidos na primeira curva de calibração, em solvente.

Tabela 19 – Dados obtidos na segunda curva de calibração, em solvente.

Tabela 20 – Dados obtidos na terceira curva de calibração, em solvente.

Tabela 21 – Dados obtidos na primeira curva de calibração em matriz.

Tabela 22 - Dados obtidos na segunda curva de calibração em matriz.

Tabela 23 - Valores de LDI e LQI obtidos.

Tabela 24 - Valores de LD e LQ obtidos

Tabela 25 – Supressão iônica verificada devido ao efeito de matriz em água superficial.

Tabela 26 – Relação entre os coeficiente angulares das retas em matriz e em solvente, com padrão interno.

Tabela 27 – Recuperação obtida para os analitos.

Tabela 28 - Resultados obtidos para a repetibilidade de amostras de água superficial.

Tabela 29 - Resultados obtidos para a repetibilidade de amostras de água de torneira.

Tabela 30 - Resultados obtidos para a reprodutibilidade de amostras de água superficial.

Tabela 31 - Resultados obtidos para a reprodutibilidade de amostras de água de torneira.

Tabela 32 – Curvas de calibração obtidas em amostras de rio e de torneira.

Tabela 33 – Concentração em ng /L dos agrotóxicos pesquisados nas amostras de água superficial e água de torneira.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

- C18, octadecil.
- C18ec, do inglês, octadecil *end capped*
- CAD, parâmetro do MS-MS que controla a pressão do gás de colisão
- CCD, cromatografia em camada delgada
- CE, do inglês *Collision Energy*
- CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês HPLC, *high performance liquid chromatography*)
- conc., concentração.
- CUR, do inglês Curtain gas
- CXP, do inglês *Collision Cell Exit Potential*
- CV, coeficiente de variação
- CV%, coeficiente de variação %
- DAD, detector de arranjo de diodos, do inglês *diode array detection*.
- DP, do inglês *Declustering Potential*
- ECD, Detector com captura de elétrons.
- EP, do inglês *Entrance Potential*
- EPA-USA, do inglês *Environmental Protection Agency United States of America*
- ESI, ionização por eletro spray, do inglês *electrospray ionization*.
- FIA, do inglês, *Flow injection analysis*
- GC, cromatografia gasosa.
- GS1, gás 1, parâmetro do MS-MS que controla o gás nebulizador
- GS2, gás 2, parâmetro do MS-MS que controla o gás turbo
- GUS, do inglês *Groundwater Ubiquity Score*
- HEPT, Altura Equivalente a um Prato Teórico.
- IS, do inglês *ion transference voltage*
- LC, cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*.
- LD, limite de detecção
- LQ, limite de quantificação
- LDi limite de detecção instrumental
- LQi, limite de quantificação instrumental
- MRM, do inglês Multiple Reaction Monitoring
- MS, espectroscopia de massas, do inglês *mass spectrometry*.
- NPD, detector fósforo nitrogênio
- Rf, do inglês *ratio to front*. Em português, índice de retenção
- RP, fase reversa, do inglês *reverse phase*.
- SPE, do inglês *solid phase extraction*
- S<sub>r</sub>, desvio padrão dos resíduos.
- t<sub>1/2</sub>, tempo de meia vida
- Tr, tempo de retenção.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>2 AGROTÓXICOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Avaliação teórica da presença de pesticidas no meio ambiente: método de GOSS e Índice de GUS.....	24
2.2 Legislação.....	26
2.3. Seleção dos agrotóxicos estudados.....	27
2.3.1 Propriedades dos agrotóxicos estudados.....	28
2.3.2 – Carbofurano.....	28
2.3.3 – Clomazona.....	28
2.3.4 – Fipronil.....	29
2.3.5 – Imidacloprido.....	29
2.3.6 – Tebuconazol.....	30
2.4 Métodos de análise.....	32
2.5 Ocorrência de resíduos em águas superficiais e subterrâneas.....	36
2.5.1 Ocorrência em outras matrizes.....	46
2.6 Técnicas de extração de analitos de amostras aquosas.....	47
2.6.1 Extração em fase sólida (SPE).....	49
2.7. HPLC com espectrometria de massas.....	52
2.8 VALIDAÇÃO.....	55
2.8.1 Seletividade.....	56
2.8.2 Sensibilidade.....	56
2.8.3 Linearidade.....	57
2.8.3.1 Faixa Linear de Trabalho.....	57
2.8.4 Limite de Detecção.....	58
2.8.5 Limite de Quantificação.....	59
2.8.6 Efeito Matriz.....	59
2.8.7 Volume de Quebra.....	59
2.8.8 Exatidão (Recuperação).....	60
2.8.9 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade).....	61
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>61</b>
3.1 – Solventes, reagentes e materiais.....	61
3.2 Preparo das soluções analíticas.....	62
3.3 Amostras de água superficial sem agrotóxicos.....	63
3.3.1 Detalhes de coleta de água superficial.....	62
3.4 Sistema SPE para a pré-concentração das amostras.....	63
3.5 Volume de quebra.....	64
3.6 Procedimento para a extração fase sólida e pré-concentração dos compostos.....	64

3.7 Instrumentação.....	64
3.8 Abordagem 1 - CCD e HPLC com detector de arranjo de diodos.....	66
3.9 Abordagem 2 - Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica empregando LC- MS/MS.....	76
3.10 Validação do método para determinação de agrotóxicos em amostras aquosas.....	78
3.11 Seletividade.....	78
3.12 Sensibilidade.....	78
3.13 Linearidade.....	78
3.14 Faixa Linear de Trabalho.....	79
3.15 Limite de detecção (LD).....	79
3.16 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Quantificação de Método (LQM).....	79
3.17 Efeito Matriz.....	79
3.18 Exatidão (Recuperação).....	80
3.19 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade).....	80
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1 Sistema de LC-MS-MS para a determinação dos resíduos de agrotóxicos.....	81
4.2 Seletividade.....	82
4.3 Volume de quebra.....	87
4.4 Linearidade e sensibilidade.....	87
4.4.1 Faixa Linear de Trabalho.....	90
4.5 Limite de detecção e de quantificação.....	91
4.6 Efeito Matriz.....	91
4.7 Exatidão (Recuperação).....	95
4.8 Precisão (Repetibilidade).....	95
4.9 Precisão (Reprodutibilidade).....	95
4.10 Amostra de água superficial e de torneira.....	96
5	
CONCLUSÃO.....	969
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
7 APENDICE A – Curvas de calibração dos analitos.....	111

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, remédios de planta, veneno. Essas são algumas das inúmeras denominações relacionadas a este grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas. São utilizados nas florestas nativas e plantadas, nos ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e pastagens para a pecuária, sendo também empregados nas campanhas sanitárias para o combate a vetores de doenças. (PERES, 2003).

Em diversas regiões do Rio Grande do Sul os rios que fornecem água para as atividades agrícolas são também utilizados para fornecimento de água potável para a população, e apresentam outros usos como a pesca esportiva, a dessedentação de gado de corte ou de gado leiteiro, banho, piscicultura, entre outras. Desta forma, considerando os múltiplos usos destes mananciais, é imperativo conhecer a qualidade desta água e identificar os pontos de poluição mais severa e se esta descarga de resíduos de agrotóxicos está chegando até o consumidor de água potável, para a adoção de medidas adequadas e corretivas.

O Rio Grande do Sul se destaca nacionalmente no cultivo de arroz irrigado, gerando empregos e divisas em grande escala. Conforme dados do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), na safra 2012-2013 foram plantados 1.078.833 hectares de arroz e a colheita foi de 8.069.903 de toneladas. (IRGA, 2013). Nos estados do sul, o arroz é predominantemente cultivado sob irrigação por inundação, com a permanência de uma lâmina de água sobre a superfície do solo. Normalmente, os produtores adotam o manejo de irrigação com entrada contínua de água (ou manejo contínuo), em face do menor risco de déficit hídrico, que pode causar perdas em produtividade e auxílio no controle de plantas daninhas.

Desta forma, a lavoura arrozeira muitas vezes é citada como forte geradora de contaminação ambiental, pois o moderno sistema produtivo se caracteriza pelo amplo uso de fertilizantes e agrotóxicos, que podem atingir o meio ambiente no entorno das áreas agrícolas. Independente do modo de aplicação, os agrotóxicos apresentam grande potencial de atingir o solo e as águas, devido aos ventos e à água das chuvas, que promovem a deriva, a lavagem das folhas tratadas, a lixiviação e a erosão, podendo também atingir as águas subterrâneas.

Considerando que em águas naturais ocorre o efeito de diluição, o método de análise escolhido para analisar resíduos de agrotóxicos deve ser capaz de detectar estas substâncias em baixas concentrações, normalmente em microgramas por litro. Para tal mister, foi usada a técnica de extração e pré-concentração chamada Extração em Fase Sólida (SPE) e a análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectroscopia de massas.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Validar uma metodologia para identificar e quantificar a presença de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais em municípios do Rio Grande do Sul, especificamente em regiões de plantio de arroz.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

Para alcançar adequadamente o objetivo proposto foram definidos os objetivos específicos:

- a) Definir os agrotóxicos com possibilidade de lixiviação, usando o Índice de Gus;
- b) A partir da revisão bibliográfica, eleger um tipo de cartucho para efetuar a pré-concentração das amostras, através da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE);
- c) Comparar o efeito de matriz na técnica de LC-MS/MS entre as curvas de calibração obtidas a partir de padrões em solventes e matrizes de água superficial fortificada;
- d) Analisar as amostras reais utilizando a metodologia validada.

## 2 AGROTÓXICOS

A definição de agrotóxicos, segundo a Lei 7802, de 11 de julho de 1989:

“...Para efeito desta Lei, consideram-se Agrotóxicos:

a) *os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos*”

Outro termo usado para definir estas substâncias é “Defensivo Agrícola”. Entretanto, esta denominação carrega uma conotação errônea de que as plantas são completamente vulneráveis a pragas e doenças, e esconde os efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente. O termo agrotóxico é mais ético, honesto e esclarecedor, tanto para os agricultores quanto para os consumidores. (INFORMATIVO CRQ III 1997).

Na literatura internacional em língua inglesa, o grupo de substâncias ou produtos químicos aqui definidos como agrotóxicos recebe a denominação de pesticida (*pesticide*). O termo “agroquímico” - o mais próximo de agrotóxico encontrado em literatura de língua inglesa (*agrochemicals*) e, em menor escala, também na língua portuguesa – engloba um número maior de produtos, como os fertilizantes e adubos inorgânicos. Portanto, não representa o real sentido do termo agrotóxico, que indica não apenas sua finalidade de uso, mas também o caráter prejudicial destas substâncias, visualizado no radical “tóxico”.(PERES, 2003).

A denominação pesticida, mantida pelo forte *lobby* da indústria química internacional, também reforça o caráter positivo do termo (pesticida, produto que mata – somente – as pestes) e cai como uma luva ao ratificar seus interesses através da consolidação de tais produtos como insumos indispensáveis (segundo profissionais ligados a esses setores produtivos) ao processo de produção rural. Na literatura de língua espanhola, tais produtos são tratados como “praguicidas” (*plaguicidas*) com clara associação à denominação de pesticidas. (PERES, 2003).



Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pelas áreas de agricultura e alimentação, os agrotóxicos são definidos como:

*“qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que – deva ser administrado para o controle de insetos, arcnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação “(FAO 2003).*

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto ao grupo químico que pertencem, conforme a tabela 1:

**Tabela 1 – Classificação química dos agrotóxicos. (Adaptado de PERES, 2003).**

Classificação quanto á natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos
Inseticidas	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio
	Extratos Vegetais	Óleos vegetais
	Organoclorados	Aldrin,* DDT,* BHC*
	Organofosforados	Fenitrothion, Paration, Malation, Metil-paration
	Carbamatos	Carbofurano, carbaril
	Piretróides sintéticos	Deltametrina, Permetrina
	Neonicotinóides	Imidacloprido
	Microbiais	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	Fenilpirazóis	Fipronil
Fungicidas	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril

Classificação quanto á natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos
	Organomercúriais	Acetato de fenilmercúrio
	Antibióticos	Estreptomicina, Ciclohexamida
	Trifenil estânico	Duter, Brestam
	Compostos Formilamina	Triforina, Cloraniformetam
	Fentalamidas	Captafol, Captam
	Triazóis	Tebuconazol
Herbicidas	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Fenoxiacéticos	CMPP; 2,4-D; 2,4,5 -T
	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
	Glifosato	glifosato
Isoxazolidinona	clomazona	
Desfoliantes	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
	Dinitrofenóis	Dinoseb, DNOC
Fumigantes	Hidrocarbonetos halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
	Geradores de metilisocianato	Dazomet, Metam
		Formaldeídos
Rodenticidas / Raticidas	Hidroxicumarinas	Sulfato de cobre, Cumatetrilil, Difenacum
	Indationas	Fenil-metil-pirozolona,

Classificação quanto á natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos
		pindona
Moluscocidas	Inorgânicos (aquáticos)	Sulfato de cobre
	Carbamatos (terrestres)	Aminocarb, Metiocarb, Mexacarbato
Nematicidas	Hidrocarbonetos halogenados	Dicloropropeno, DD
	Organofosforados	Diclofention, Fensulfotion
Acaricidas	Organofosforados	Dicofol, Tetradifon
	Dinitrofenóis	Dinocap, Quinometionato

**Fonte: Adaptado de PERES 2003.**

Os micropoluentes – poluentes que estão presentes no meio ambiente em concentrações na ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt) - tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Fármacos, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos persistentes (POP) são classes de substâncias muito investigadas devido, principalmente, aos seus efeitos uma vez presentes no meio ambiente. Uma grande preocupação relacionada a essas classes de substâncias é que podem produzir efeitos adversos aos organismos expostos em concentrações realmente muito baixas, interferindo no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como Desreguladores Endócrinos. (BILA, DEZOTTI, 2007).

Entre os agrotóxicos, são classificados como desreguladores endócrinos:

- 1) Inseticidas: DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano), DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1dicloroetileno), lindane (1,2,3,4,5,6-hexacloroexano), deltametrina, carbofurano.
- 2) Herbicidas: atrazina linuron.

3)Fungicidas: vinclozolina, carbendazime, penconazol, procloraz, propiconazol, epoxiconazol, procimidona, tridemorfos.

Entretanto, do ponto de vista histórico, até a década de 1940, antes da descoberta e uso generalizado do DDT, a agricultura praticamente não conhecia os produtos fitossanitários ou pesticidas, isto é, os inseticidas, fungicidas, herbicidas e demais produtos que agricultor moderno usa maciçamente.

LUTZEMBERGER (1992) afirma que a escalada da agroquímica na agricultura não foi desencadeada por pressão da agricultura e sim pela grande indústria, que impõem seu paradigma à agricultura moderna. A primeira guerra mundial deu origem aos adubos nitrogenados solúveis de síntese. A Alemanha estava isolada do salitre do Chile pelo bloqueio dos aliados e para a fabricação em grande escala de explosivos, viu-se obrigada a fixar o nitrogênio do ar pelo processo Haber Bosch. Ao final da primeira guerra mundial, as grandes instalações de síntese de amoníaco levaram a indústria química a procurar novos mercados. E, da mesma forma, ao terminar a segunda grande guerra, grandes instalações industriais produtoras de armas químicas direcionaram sua produção para a agricultura. Entre os gases de guerra concebidos na segunda guerra para eliminações de soldados em massa, estavam certos derivados do ácido fosfórico. Ao final dos combates sobraram grandes quantidades armazenadas e os químicos lembraram que o mecanismo de ação destes produtos poderia ser eficaz também para matar insetos. Assim surgiram e foram promovidos os inseticidas do grupo do parathion, os organofosforados. O DDT, que só foi usado para matar insetos, surgiu na guerra também, as tropas americanas no Pacífico sofriam muito com a malária. O dicloro-difenil-tricloro-etano era conhecido há mais tempo, mas suas qualidades inseticidas acabavam de ser descobertas, e começou a ser produzido em grande escala e usado de forma livre. As aplicações eram feitas de avião, sobre paisagens inteiras, inclusive sobre as pessoas. Mais uma vez, após a guerra os estoques eram grandes e havia a necessidade de usar estes materiais. Na guerra do Vietnã foram usadas grandes quantidades de um agente desfoliante conhecido como agente laranja, cuja composição era a mistura de dois herbicidas do grupo do ácido fenoxiacético, o 2,4 D e o 2,4,5 T. Entre os efeitos destes produtos sobre a população foram relatados casos de malformações congênitas, cânceres e síndromes neurológicas.

Nas áreas em que se pratica a monocultura intensiva, os agrotóxicos foram usados como um método padrão para o controle de

pragas. Infelizmente, com os benefícios da química também vêm os inconvenientes, alguns tão graves que agora ameaçam a sobrevivência de longo prazo dos principais ecossistemas, pela ruptura das relações predador-presa e perda de biodiversidade. Além disso, os agrotóxicos podem ter consequências significativas para a saúde humana. (FAO, 2013)

Embora a utilização de produtos químicos agrícolas seja restrita a um número limitado de compostos, a agricultura é uma das poucas atividades onde os produtos químicos são intencionalmente liberados para o ambiente, porque eles matam insetos/plantas considerados daninhos. Na região dos Grandes Lagos da América do Norte, por exemplo, a Comissão Mista Internacional estimou que existem mais de 200 produtos químicos de interesse na água e sedimentos do ecossistema dos Grandes Lagos. Como a carga ambiental de produtos químicos tóxicos inclui tanto a agricultura como compostos não- agrícolas, é difícil separar os efeitos ecológicos e para a saúde humana atribuíveis aos pesticidas ou aos compostos industriais, que são intencionalmente ou acidentalmente liberados para o ambiente. (FAO, 2013).

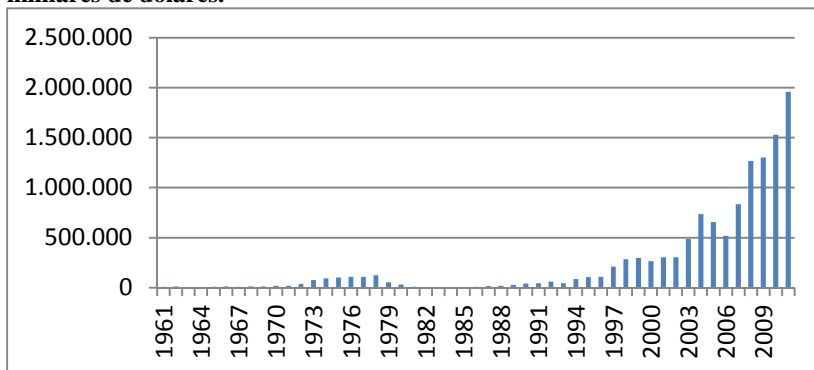
No Brasil, em 2013, temos um total de 495 princípios ativos autorizados para uso como agrotóxicos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em relação ao número de formulações de agrotóxicos, o Brasil possui mais de 2000 formulações registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Conforme um estudo publicado pela ANVISA, em 2006 seis empresas produtoras de agrotóxicos respondiam por 85 % do mercado nacional. No ano de 2009 foram vendidos 800.000 toneladas de agrotóxicos no Brasil. Entre 2000 e 2007 a importação de agrotóxicos aumentou 236 %. (ANVISA, 2010).

De acordo com a FAO, o Brasil se transformou num dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. No ano de 2011, o Brasil foi o segundo maior importador de agrotóxicos, ficando atrás apenas da França. Entretanto, a França foi também o segundo maior exportador do mundo naquele ano, de forma que o volume importado pode estar relacionado com a introdução no país de princípios ativos com objetivo de produzir formulações para exportar. O Brasil, por sua vez, consta como o décimo primeiro exportador mundial, de forma que o consumo interno de agrotóxicos está muito elevado, podendo ser o maior consumidor mundial destes produtos, atualmente. A figura 1 apresenta um gráfico com a evolução dos gastos (em milhares de dólares) da

importação de agrotóxicos no Brasil, entre os anos de 1961 e 2011 (FAOSTAT, 2013):

**Figura 01–Evolução da importação de agrotóxicos entre 1961 e 2011, em milhares de dólares.**



**Fonte: FAO, 2013.**

SOUZA et al (2009) realizaram um levantamento dos principais agrotóxicos envolvidos em apreensões da Polícia Federal no Estado do Rio Grande do Sul, através da análise retrospectiva dos laudos periciais sobre agrotóxicos contrabandeados e/ou falsificados, elaborados entre janeiro de 2005 a dezembro de 2007. Os autores identificaram que o agrotóxico metsulfurom-metílico é o mais frequentemente contrabandeado, seguido pelo fungicida tebuconazol e pelo inseticida imidacloprido, durante todo o período avaliado. Segundo os autores do estudo, a diferença de preço entre os agrotóxicos comprados no Brasil e no Uruguai podem chegar a mais de 2000%, sendo a motivação econômica o principal atrativo para o contrabando destes produtos. Os agrotóxicos que constavam em maior número nas apreensões estão arrolados na tabela 2:

**Tabela 2 – Agrotóxicos apreendidos entre 2005 e 2007 pela Polícia Federal do RS.**

2005	2006	2007
metsulfurom-metílico	metsulfurom-metílico	metsulfurom-metílico
imidacloprido	tebuconazol	tebuconazol
tebuconazol	imidacloprido	imidacloprido

quincloraque	quincloraque	fipronil
carbendazim	carbendazim	glifosato
pirazossulfuron etílico	pirazossulfuron etílico	quincloraque
clorimurom etílico	fipronil	carbendazim
-	bispiribaque-sódico	clomazona

**Fonte: SOUZA et al (2009)**

FRAGA (2012) avaliou os principais agrotóxicos contrabandeados/falsificados apreendidos pela Polícia Federal, também através da análise retrospectiva dos laudos periciais emitidos sobre as apreensões de 2008 e 2009, porém de todo o Brasil. Os resultados da compilação indicaram os seguintes ingredientes ativos como os mais contrabandeados em 2008 e 2009, respectivamente: metsulfurom - metílico (18% e 19%), imidacloprido (20% e 18%), fipronil (5% e 10%), tebuconazol (8% e 9%), clorimurom - etílico (12% e 9%) e glifosato (3% e 3%). Os estados com maior incidência de apreensões são o Rio Grande do Sul, o Paraná, o Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

O Departamento de Polícia Federal contém diversos sistemas de informática, com bancos de dados bastante variados. Um destes bancos de dados é o Sistema de Criminalística da Polícia Federal, SISCRIM, que mantém versões digitais de laudos periciais emitidos em todas as Unidades de Criminalística do Brasil. Em consulta ao SISCRIM, para o ano de 2010, os cinco agrotóxicos mais apreendidos no Rio Grande do Sul, em ordem decrescente foram o metsulfurom-metílico, o imidacloprido, o fipronil, o tebuconazol e a clomazona. Em 2011 foram metsulfurom metílico, o imidacloprido, o fipronil, o iodosulfuron-metil sódio e o bispiribaque sódico.

## **2.1 Avaliação teórica da presença de pesticidas no meio ambiente: método de GOSS e Índice de GUS**

O método de GOSS indica o potencial de transporte de princípio ativo associado a sedimento ou dissolvido em água. Este método considera a meia-vida do composto no solo ( $DT_{50}$  no solo), sua solubilidade em água a 25 °C e a constante de adsorção à matéria orgânica do solo ( $K_{oc}$ ). Desta forma, o transporte de agrotóxicos pode ser separado em dois grupos: transporte de agrotóxicos dissolvidos em água e transporte adsorvido ao sedimento, sendo então os agrotóxicos classificados como de alto, médio e baixo potencial de contaminação.

GUSTAFSON (1989) propôs o uso de um índice chamado GUS (do inglês, *Groundwater Ubiquity Score*) para avaliar o potencial de lixiviação dos princípios ativos, considerando o tempo de meia vida do composto no solo e a sorção ao carbono orgânico do solo, sem considerar a solubilidade em água. Este índice avalia o risco de contaminação de águas subterrâneas, calculando através da equação 1:

$$\text{GUS} = \log (t^{1/2} \text{ solo}) \times (4 - \text{Log} (\text{Koc})),$$

Onde:

**Equação 1**

$t^{1/2}$  = meia vida em campo,

Koc = coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo.

MARTINI *et al.* (2012) utilizaram modelos matemáticos e características físico-químicas de agrotóxicos para estimar o risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos. Foram analisados 32 agrotóxicos indicados para a cultura do arroz irrigado, usando os critérios propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency* - EPA) e o método de Goss. Os critérios da EPA envolvem os valores de solubilidade em água a 25°C (>30mg/L); constante de adsorção à matéria orgânica do solo (Koc) <300 mL/g; constante da Lei de Henry (KH) <10<sup>-2</sup> Pa m<sup>3</sup> /mol; especiação (presença de forma aniônica em pH normal, entre 5,0 e 8,0) e  $t^{1/2}$  em solo >21 dias e na água >175 dias; condições de campo que favorecem a percolação no solo, como índice de pluviosidade anual >250mm; aquífero não confinado e solo poroso. Agrotóxicos que se enquadram nessas características são considerados potencialmente poluidores de águas subterrâneas. Da análise dos 32 agrotóxicos, os autores concluíram que em relação ao risco de contaminação de águas superficiais, o herbicida glifosato e o inseticida carbofurano apresentam alto potencial de transporte por escoamento superficial adsorvido ao sedimento. Na avaliação de transporte dissolvido em água apresentam alto potencial os herbicidas clomazona, fenoxaprope-P-etílico, glifosato, imazetapir, imazapique e metsulfurom-metílico; os inseticidas fipronil, imidacloprido e tiametoxam; e o fungicida propiconazol. A respeito do risco de contaminação de águas subterrâneas, usando-se os critérios do EPA, os herbicidas que apresentam potencial contaminador são: bentazona, bispiribaque-sódico, clomazona, 2,4-D, etoxisulfurom, glifosato, imazetapir, imazapique, metsulfurom-metílico, penoxsulam, propanil, tiobencarbe e quincloraque; os inseticidas carbaril, carbofurano, imidacloprido,



tiametoxam e triclorfom; e o fungicida propiconazol. Já, usando-se o método de GUS, os herbicidas que apresentam maior probabilidade de lixiviação para águas subterrâneas são: bispiribaquesódico sódico, clomazona, imazetapir, imazapique, metsulfurom-metílico, pendimetalina e quincloraque; os inseticidas carbofurano, fipronil, imidacloprido, tiametoxam e triclorfom.

CABRERA et al. (2008) realizaram um estudo numa região produtora de arroz no Rio Grande do Sul e foi estimado o risco de contaminação hídrica por 27 agrotóxicos, usando critérios da EPA-USA, o índice GUS e o método de Goss, associadas com as propriedades físico-químicas destes compostos. Dos 27 pesticidas utilizados na região, pelo menos 19 apresentam risco de contaminação para águas de superfície e subterrâneas. Os autores citaram que os pesticidas atrazina, carbofurano, clomazona, linurom, metsulfurom-metílico, molinato e glifosato necessitariam de um estudo para avaliar sua ocorrência tanto na água superficial quanto na subterrânea, pois estes compostos têm alto potencial de poluição nestes dois compartimentos. Além disto, os autores indicam que o monitoramento de pesticidas em águas de superfície na região deve focar, além dos pesticidas citados anteriormente, também o pesticida lambda-cialotrina, que apresenta potencial de contaminação de águas superficiais (PC) segundo os critérios da EPA. Também são indicados para avaliação de ocorrência em água superficial os pesticidas 2,4-D, carboxina, propanil tiobencarbe, tiram e parationa-metilica, por apresentarem, segundo o critério de Goss, potencial médio de contaminação.

## 2.2 Legislação

A Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Esta Portaria revogou a Portaria no 518/GM/MS, de 25 de março de 2004. Esta Portaria, no seu anexo VII, apresenta uma Tabela de padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde, onde estão incluídos 35 agrotóxicos. As concentrações máximas permitidas para resíduos em água potável variam entre 0,03 a 500 µg/L. A título de exemplo, as concentrações máximas permitidas para o carbofurano é de 7 µg/L e para o tebuconazol é de 180 µg/L. (BRASIL, LEI 2914/2011)

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), estabeleceu alguns limites para agrotóxicos. Para águas superficiais são elencados 18 agrotóxicos, com maior atenção em organoclorados e organofosforados

proibidos. Para águas subterrâneas são elencados 29 agrotóxicos, entre eles, o carbofurano deve ser ausentes em águas classes 1 e 2 e possuir concentração máxima de 30 µg/L para águas destinadas à recreação, e para a dessedentação de animais o valor de 45 µg/L. (CONAMA 357/2005, CONAMA 396/2008 e CONAMA 430/2011).

As DIRETIVAS 98/83/CE e 2006/118/CE, da União Européia, estabeleceram limites de 0,1 µg/L para pesticidas individuais e 0,5 µg/L para a soma de todos os pesticidas presentes em amostras de água destinada ao consumo humano e águas subterrâneas. Em caso de águas superficiais que serão usadas para abastecimento para consumo humano, a Diretiva 76/464 estabelece o limite de 1,0 µg/L para pesticidas individuais e 5,0 µg/L para a soma de todos os pesticidas.

A Instrução Normativa Conjunta n.1, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 28/12/2012, estabeleceu restrições para aplicações aéreas e terrestres dos agrotóxicos imidacloprido, clotianidina, tiametoxam e fipronil. Estes agrotóxicos são usados para controles de pragas sugadoras e representam graves perigos para as populações de abelhas, estando, por este motivo, sendo implantadas medidas restritivas ao seu uso. A proibição no Brasil ainda não foi efetivada (MAPA, 2012).

O Decreto 5440/2005, regulamentando a Lei 8078/1990, estabelece a obrigatoriedade das empresas fornecedoras de água potável que informem ao consumidor sobre a qualidade da água fornecida, origem dos mananciais de onde a água é retirada e eventuais alterações na qualidade da água. As empresas devem fornecer relatórios da água fornecida baseados nas características da água que é fornecida para o usuário e não um relatório igual para todo o município atendido, visto que cada região da cidade pode receber águas de diferentes poços ou pontos de captação. A eventual presença de agrotóxicos deveria ser informada aos consumidores, para que estes se adaptem a esta possível situação (Decreto 5440/2005).

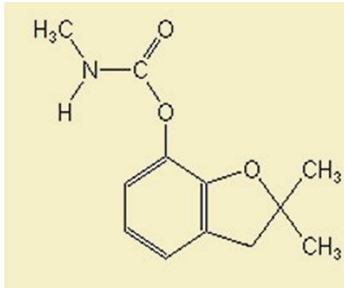
### **2.3. Seleção dos agrotóxicos estudados**

Considerando as diversas informações até aqui apresentadas sobre os agrotóxicos, incluindo maior número de apreensões, maior potencial de lixiviação, maior possibilidade de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e legislação nacional consultada, foram escolhidos cinco princípios ativos de agrotóxicos para avaliar sua ocorrência em águas superficiais e água tratada (para consumo humano): carbofurano, clomazona, fipronil, imidacloprido e tebuconazol.

### 2.3.1 Propriedades dos agrotóxicos estudados

#### 2.3.2 – Carbofurano

Figura 02 – Estrutura molecular do carbofurano.

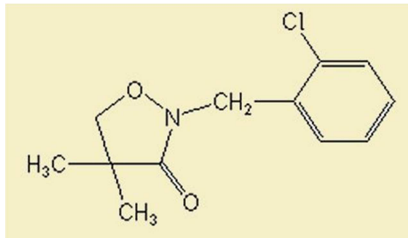


Fonte: University of Hertfordshire. Pesticides Properties Database.

Usado como inseticida, nematicida, acaricida. Atua de forma sistêmica, por contato e por via estomacal. Pertence ao grupo dos carbamatos, atua na inibição da enzima acetilcolinesterase. N° CAS: 1563-66-2 Nome químico: 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-ilmetilcarbamato. Fórmula bruta:  $C_{12}H_{15}NO_3$ . Massa molar: 221,26 g/mol. O tempo de meia-vida para fotólise aquática em pH 7 é de 71 dias, o que o classifica como estável. O tempo de meia-vida para hidrólise, a 20 °C e pH 7 é de 37 dias, moderadamente persistente. Seu principal metabólito é o 3-hidróxi-furano, sendo comum a expressão do teor deste agrotóxico como a soma da concentração do carbofurano com a concentração do 3-hidroxi-furano. Seu uso está banido na Comunidade Européia. (FOOTPRINT DATABASE, 2013).

#### 2.3.3 – Clomazona

Figura 03 – Estrutura molecular da clomazona



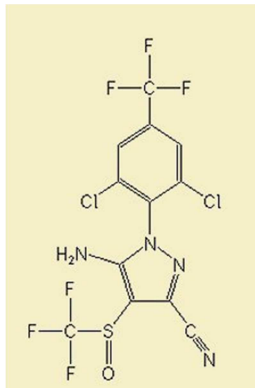
Fonte: University of Hertfordshire. Pesticides Properties Database.

Herbicida do grupo das isoxazolidinonas, seletivo, absorvido pelas raízes e brotos. Atua na inibição da enzima licopeno ciclase. N° CAS: 81777- 89 -1. Nome químico: 2 -(2- clorobenzil) -4,4 -dimetil-1,2

-oxazolidina -3 -ona. Fórmula bruta:  $C_{12}H_{14}ClNO_2$ . Massa molar: 239,7 g/mol. É considerado estável quanto à fotólise aquática e hidrólise. (FOOTPRINT DATABASE, 2013).

### 2.3.4 – Fipronil

Figura 04 – Estrutura molecular do fipronil

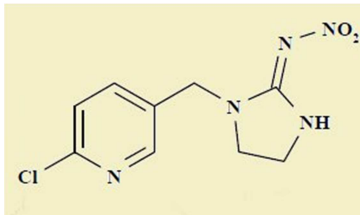


Fonte: University of Hertfordshire. Pesticides Properties Database.

Inseticida do grupo dos pirazois que atua no sistema nervoso central bloqueando o canal de cloreto regulado pelo GABA (Ácido gama -aminobutírico). N° CAS: 120068-37-3. Nome químico: (RS)-5-amino-1-(2,6- dicloro-  $\alpha,\alpha,\alpha$ - trifluoro - p -tolil) -4-trifluorometilsulfinilpirazol-3-carbonitrila. Fórmula bruta:  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ . Altamente tóxico para abelhas e várias espécies aquáticas e bioacumulável para algumas dessas. Massa molar: 437,15 g/mol. O tempo de meia-vida para fotólise aquática em pH 7 é de 0,33 dias. Em luz artificial sua degradação é ainda mais rápida. Quanto á hidrólise, a 20 °C e pH 7, é considerado muito persistente. (FOOTPRINT DATABASE, 2013).

### 2.3.5 – Imidacloprido

Figura 05 – Estrutura molecular do imidacloprido.

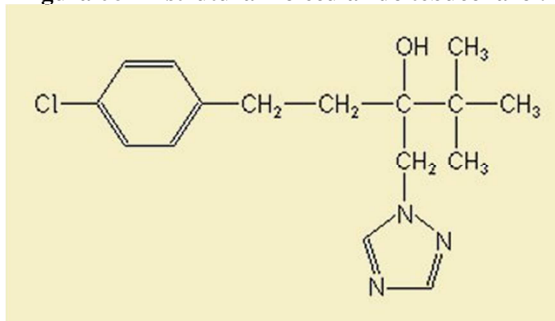


Fonte: University of Hertfordshire. Pesticides Properties Database.

Inseticida sistêmico do grupo das neonicotinóides, com ação de contato e ingestão que atua como uma neurotoxina, ligando-se ao receptor nicotínico da acetilcolina. N° CAS: 138261 -41 - 3. Nome químico: 1 -(6- cloro-3 -piridilmetil)- N - nitroimidazolidin- 2- ilideneamina. Fórmula bruta:  $C_9H_{10}ClN_5O_2$ . O potencial de bioacumulação e toxicidade para peixes e aves é baixo. No entanto, é altamente tóxico para abelhas. Massa molar: 255,66 g/mol. O tempo de meia-vida para fotólise aquática em pH 7 é de 0,2 dias. É estável á hidrólise, sendo a sua meia-vida em dias, a pH 9, de aproximadamente um ano. (FOOTPRINT DATABASE, 2013).

### 2.3.6 – Tebuconazol

**Figura 06 – Estrutura molecular do tebuconazol.**



**Fonte: University of Hertfordshire. Pesticides Properties Database.**

Fungicida sistêmico do grupo triazol que atua como inibidor da desmetilação na via metabólica do ergosterol para a biossíntese do esterol. N° CAS: 107534 -96- 3. Nome químico: (RS) -1 -p -clorofenil- 4,4- dimetil- 3- (1H - 1,2,4- triazol- 1 -ilmetil) pentan -3 -ol. Fórmula bruta:  $C_{16}H_{22}ClN_3O$ . Considerado muito tóxico para organismos aquáticos, tais como peixes, algas e microcrustáceos. Massa molar: 307,82 g/mol. É estável quanto à fotólise aquática e a hidrólise. (FOOTPRINT DATABASE, 2013).

Uma revisão das principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos foi realizada e consta na Tabela 3:

**Tabela 3 – Propriedades dos agrotóxicos selecionados numa base internacional de dados. (FOOTPRINT DATABASE).**

<b>Princípio Ativo</b>	<b>Carbofurano</b>	<b>Clomazona</b>	<b>Fipronil</b>	<b>Imidacloprido</b>	<b>Tebuconazol</b>
<b>Grupo Químico</b>	Carbamato	isoxazolidinona	fenilpirazol	neonicotinóide	triazol
<b>Massa molecular <math>\mu</math></b>	221,26	239,7	437,15	255,66	307,82
<b>Sol.agua mg/L</b>	322	1102	3,78	610	36
<b>Sol. diclorometano mg/L</b>	-	$9,55 \cdot 10^5$	-	$6,70 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^5$
<b>log P</b>	1,8	2,54	3,75	0,57	3,7
<b>pKa</b>	não aplicável	não aplicável	não aplicável	não aplicável	base fraca
<b>Ponto ebulição</b>	254	281,7	decompõe antes	decompõe antes	decompõe antes
<b>Temperatura de degradação °C</b>	276	-	230	230	350
<b>Pressão Vapor - mPa</b>	0,08	19,2	0,002	$4,00 \cdot 10^{-7}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$
<b>Constante Henry 25°</b>	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$2,31 \cdot 10^{-4}$	$1,70 \cdot 10^{-10}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$
<b>Constante Henry 20 °</b>	$2,09 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-6}$	$1,60 \cdot 10^{-7}$	$4,10 \cdot 10^{-11}$	$5,14 \cdot 10^{-9}$
<b>Koc</b>	22	300	803	210	1000
<b>t½ solo</b>	29	83	142	191	62
<b>Max UV (Comp/abs)</b>	276 = 2800 290 = 251	211 = 12800	203 = 48385 286 = 7281 291 = 6008	212 = 13346 270 = 22054	221 =11980 262 = 304 268 = 408
<b>Principais transições ESI</b>	(M+H)+ 222,1 – 165,1 222,1 – 123,0	(M+H)+ 240,1 – 125,0 240,1 – 89,1	(M-H)- 434,9 – 329,7 434,9 – 249,9	(M+H)+ 256,1 – 175,0 256,1 – 208,9	(M+H)+ 308,1 – 70,0 308,1 – 124,9

**Fonte: FOOTPRINT DATABASE. Disponível em [www.eufootprint.org](http://www.eufootprint.org).**

Com os valores de Koc e t½ no solo foi calculado o Índice GUS para os agrotóxicos carbofurano, clomazona, fipronil, imidacloprido e

tebuconazol. A tabela 4 apresenta os valores calculados para os agrotóxicos selecionados:

**Tabela 4– Valores calculados para o índice GUS.**

	KOC	log Koc	t½ solo (dias)	Índice GUS	Categoria
carbofurano	22	1,343	29	3,9	Provável Lixiviação
clomazona	300	2,477	83	2,9	Provável Lixiviação
fipronil	803	2,905	142	2,4	Faixa de Transição
imidacloprido	210	2,322	191	3,8	Provável Lixiviação
tebuconazol	1000	3.00	62	1.8	Faixa de Transição

**Fonte: Calculado pelo autor.**

## 2.4 Métodos de análise de resíduos de agrotóxicos

MARCHEZAN et al. (2009) analisaram a qualidade da água de dois rios na região central do Rio Grande do Sul, com base nos parâmetros nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amônia ( $\text{NH}_3^+$ ), fósforo (P), potássio (K), e sódio (Na), além do pH e condutividade elétrica. As coletas eram quinzenais, entre outubro de 2002 a março de 2003 e outubro de 2006 a março de 2007. O total anual de amostras era 120, sendo 60 amostras de cada rio. Os valores de nitrato, amônio permitiram o enquadramento dos rios citados como classe I, conforme a Resolução Conama 357/2005. De interesse foram os valores de pH obtidos, com valores entre 5,71 a 7,50 e a condutividade de 33,33 a 118,88 microsiemens ( $\mu\text{s}$ ). O aporte dos nutrientes avaliados estava relacionado com a precipitação.

MERKULOVA et al. (2006) analisaram os efeitos da concentração e da natureza de modificadores orgânicos, a composição da solução tampão e o pH da fase móvel na eficiência e seletividade da separação de 14 pesticidas, através de HPLC-UV, usando uma coluna Diaspher ®C16 (150 x 4,6 mm, partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) de silica gel. Entre os pesticidas utilizados estavam os triazois: difeconazole, o penconazole e o propiconazole; um fenilpirrol: fludioxonil. Previamente foi verificado que uma fase móvel com concentração de metanol abaixo de 50 % resultava em corridas com mais de 60 minutos para eluir todos os

compostos. Foram testados o metanol, acetonitrila e isopropanol a 60 % e 40 % de tampão fosfato, em pH 3, sendo a acetonitrila a que resultou num tempo de retenção mais razoável, menor que 40 minutos. Com a acetonitrila definida como melhor modificador orgânico, foram testadas soluções tampões fosfato, acetato e glicina, em pH 4,2, pois neste valor a maioria dos pesticidas estudados fica na forma molecular, sendo que o tampão fosfato e glicina a 0,01 M era a melhor alternativa de uso e que concentrações maiores, próximas a 10 M, aumentam a pressão da coluna. O efeito do pH foi verificado na faixa entre 2 e 7, usando acetonitrila 60 % e tampão fosfato 0,01M. Os resultados obtidos dividiram os pesticidas estudados em três grupos, sendo que o primeiro grupo não alterou o tempo de retenção, o segundo grupo (sulfonilureias e ácidos) é aquele onde o tempo de retenção decresce com o aumento do pH. No terceiro grupo (triazóis) o tempo de retenção aumenta junto com o aumento de pH. Também são analisadas as correlações entre o tempo de retenção e os parâmetros físicos químicos dos compostos (hidrofobicidade), obtendo valores de correlação próximos a um para moléculas com grupos funcionais similares.

ZANELLA et al.(2000) desenvolveram um método para analisar clomazona por HPLC – UV em águas superficiais, com extração por SPE. Foi usada uma coluna Bondesil C18® (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm), em temperatura ambiente, volume injetado de 20 µL, com fase móvel de metanol:água (65:35), com pH ajustado para 4 com ácido fosfórico. Fluxo de 1 mL/ min e detecção em 220 nm. Amostras de 200 mL de águas de rio foram fortificadas com a adição de 2 mg/ L de solução padrão de clomazona, resultando em cinco níveis de fortificação: 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 µ/L. As recuperações destas amostras após a filtração por SPE ficaram entre 89,1 e 104,8 %. O limite de detecção ficou em 0,03 µg/L e o limite de quantificação ficou em 0,1 µg/L. Este método permite determinar clomazona em águas superficiais em concentrações de 0,1 µL/L, desde que usada a pré-concentração citada. Neste artigo observa-se uma grande banda no início dos cromatogramas apresentados, até aproximadamente 5 minutos, possivelmente devida ao material orgânico presente nas amostras de águas superficiais.

D'ARCHIVIO et al. (2007) desenvolveram um método multirresíduo para analisar 16 pesticidas em amostras de água subterrânea, na Itália. A pré-concentração foi por SPE e a análise cromatográfica por HPLC-DAD. Os pesticidas analisados foram: aldicarb, atrazina, desetilatraxina, desisopropilatraxina, carbofurano, 2,4-D, dicloram, fenitrotiom, iprodione, linurom, metalaxil, metazaclor,



fenmedifam, procimidona, simazina e vinclozolim. Foram testados cinco cartuchos SPE diferentes: C18 (Isolute® SPE C18<sub>EC</sub>), carbono grafitizado (Superclean Envi-Carb®), polistireno-divinilbenzeno (Lichrolut EN®), divinilbenzeno-*N*-vinilpirrolidona (Oasis HLB®) e superfície modificada estireno divinilbenzeno Strata X®). A coluna analítica usada foi uma C18 Gemini®C18 (250x4.6 mm, partículas de 5 µm), em temperatura ambiente, fluxo de 1 mL/minuto e fase móvel de acetonitrila:água (1:1) com ácido fosfórico para ajuste de pH. Os comprimentos de onda foram entre 210 e 400 nm. A curva analítica usou cinco concentrações entre 0,1 e 1 µg/L. Os melhores valores de recuperação dos analitos foram para os cartuchos Oasis HLB e Strata X, para uma fortificação de 0,2 µg/L. Os autores citam um largo pico no início do cromatograma, devido ao efeito dos compostos presentes na matriz, que pode co-eluir com os pesticidas com menor tempo de retenção. Os valores de LD obtidos ficaram entre 0,003 e 0,04 µg/L e para LQ ficaram entre 0,009 e 0,1 µg/L.

O departamento californiano de alimentos e agricultura (CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE, 2008) publicou um método validado para a determinação de imidacloprido olefinico, guanidina, quanidina oleofinica, e metabolitos de uréia por HPLC – MS em águas de poços. Os resíduos de Imidacloprido e seus principais metabólitos são extraídos de água de poço usando um cartucho de fase sólida Focus, da empresa Varian. A coluna de HPLC usada foi a Lichrospher RP B 60®, e a fase móvel é composta por metanol (0,1% ácido fórmico) e água (0,1% ácido fórmico), com fluxo em gradiente. O detector de massas opera no modo MS/MS, com ionização por eletronebulização, polaridade positiva. São analisados os íon de massa 256 e o íon resultante 175,209. Os intervalos de recuperação ficam entre 82-125%, e o limite de detecção em 0,04 µg/L.

ROEHRHS et al. (2009) desenvolveram um método para determinar seis herbicidas comumente usados em cultivos de arroz: metsulfurom metílico, bensulfurom metílico, pirazosulfurom etil, bentazona, bispiribaque sódico e cialofop butil em água de lavoura e de consumo. A bentazona foi banida da União Européia. A análise foi por HPLC –DAD. O método de extração é por SPE, e foi comparada a eficiência de cartuchos C18 (40 mm, 500 mg) e Oasis-HLB® (30 mm, 200 mg). A fase móvel usada foi acetonitrila:água (pH 3 com ácido fosfórico) em gradiente. O fluxo foi de 1,2 mL/min. O volume injetado foi 20 µL, e os comprimentos de onda usados foram 220, 235, 240, e 247 nm. A coluna usada foi uma ULTRA C18 (4.6 x 150 mm, partículas

de 5 µm). Foram feitos três níveis de fortificação para o branco: 0,1; 0,3; 0,5 µg/L. As recuperações obtidas das fortificações de branco ficaram entre 43,8 a 152% para o cartucho C18 e entre 70,0 a 119,6% para o cartucho HLB. O pior desvio padrão relativo ficou em 19% para o cartucho C18 e 11% para o cartucho HLB. Para as amostras de água de lavoura foram feitos dois níveis de fortificação: 1 e 5 µg/L. As recuperações obtidas das fortificações de branco ficaram entre 68,2 a 109 % para o cartucho C18 e entre 46,7 a 96,3% para o cartucho HLB. O desvio padrão relativo ficou em 5,2 para o cartucho C18 e 8,3% para o cartucho HLB. Os limites de detecção ficaram em 0,03-0,04 µg/L para a água de consumo e em 0,3-1,7 µg/L para as águas de lavoura.

CALDAS; DEMOLINER e PRIMEL (2009) desenvolveram um método para analisar resíduos dos pesticidas carbofurano, clomazona, tebuconazol e 2,4 D. A análise foi por HPLC-DAD, com pré-concentração por SPE. Foi usada uma coluna analítica C18 (250x4.6 mm. Partículas de 5 µm). A fase móvel foi acetonitrila:água (ácido fosfórico), na proporção 52:48, com fluxo programado de 0,8 a 1,2 mL por minuto. Foram testados dois tipos de cartuchos: Strata C 18 - 200mg e Xtrata (estireno divinilbenzeno) - 200 mg. O que apresentou melhores resultados foi o Strata C18. Foram feitos quatro níveis de fortificação: 0,2; 1,25; 5,0 e 10,0 µg/L. As recuperações ficaram entre 66,7 e 107,7%. O limite de quantificação do método ficou entre 0,16 e 0,2 µg/L. O tempo de retenção dos analitos foi trabalhado para ficar acima de 6 minutos, devido aos interferentes presentes na matriz que possuem tempos de retenção de até 5 minutos, em geral.

CALDAS et al. (2010) desenvolveram um método para analisar três pesticidas com microextração por dispersão líquido-líquido (DLLME), em detecção por HPLC – MS –MS - ESI. Os pesticidas foram o carbofurano, o clomazona e o tebuconazol. O HPLC era equipado com injetor automático, degaseificador e bomba quaternária. A coluna usada foi uma XTerra® (50 x 3mm, partículas de 3,5 µm), com injeção de 20 µL. A fase móvel era composta por acetonitrila:água (52:48), acidificada com 0.1% de ácido fórmico. Fluxo de 0.4mL / min. A ionização dos compostos foi por eletrospray (ESI) no modo positivo. O tempo de corrida foi de 3 minutos. Condições de otimização para os íons precursores: voltagem no capilar de 3.5 kV, o fluxo de nebulização e dessolvatação foram de 350 e 150 L / h, respectivamente; temperatura de dessolvatação de 350°C. O gás nebulizador, dessolvador foi o nitrogênio e o gás de colisão era o argônio. Foram testados os dois modos de ionização, negativo e positivo. Para o carbofurano foi usado como íon precursor o íon (m/z) 222 e como íons filhos ou resultantes os

fragmentos 165 e 123. Para o clomazona foi usado como íon precursor o íon (m/z) 240 e como íons filhos ou resultantes os fragmentos 125 e 100. Para o tebuconazol foi usado como íon precursor o íon (m/z) 308 e como íons filhos ou resultantes os fragmentos 70 e 88. Foram feitos quatro níveis de fortificação: 0,02; 0,1; 0,2; e 2,0 µg/L. As recuperações ficaram entre 62 e 120 %. Os autores também comparam as diferenças entre as técnicas de extração por SPE e por DLLME nos parâmetros de limite de quantificação, desvio padrão relativo, tempo de extração e volume de amostra. A extração por DLLME foi superior em todos os aspectos, exceto no limite de quantificação, que ficou em 0,02 µg/L enquanto que a extração por SPE atinge limites de 0,004 µg/L.

## **2.5 Ocorrência de resíduos em águas superficiais e subterrâneas**

ZANELLA et al. (2002) analisaram a presença de clomazona em amostras de água superficial entre os anos de 1999/2000 e 2000/2001, na época do cultivo do arroz. Foram coletadas amostras de 6 rios da região central do RS, Ibicuí, Ibicuí-Mirim, Vacacaí-Mirim, Jacuí, Vacacaí e Tigre. O critério para a escolha dos pontos de coleta foi a presença de atividade agrícola acentuada. A metodologia usada foi por HPLC-DAD com pré-concentração por cartuchos SPE-C18, previamente descrita (ZANELLA et al., 2000). Também foi avaliada a dissipação aquática da clomazona em condições de campo, através da aplicação do herbicida em área experimental de cultivo de arroz na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e coletas de água desta lavoura após 1 hora, 7, 14, 21, 28 e 130 dias após a aplicação. No experimento de dissipação do pesticida foi constatado que a concentração de clomazona reduz após 14 dias, e que, em aproximadamente 130 dias ainda persistem concentrações de 0.2 a 0.9 µg/L em águas de lavoura. Nas amostras dos rios foram detectadas concentrações de 0.31 a 1.72 µg/L.

MARCHEZAN et al. (2007) analisaram a ocorrência de resíduos de 3 pesticidas (clomazona, quincloraque, propanil) em dois rios (Vacacaí e Vacacaí-Mirim) na Depressão Central do Rio Grande do Sul, durante três anos (2000 a 2003). Os pesticidas foram analisados por CLAE-UV. A concentração foi com cartuchos SPE C18, 200 mg, alíquotas de 250 mL. A coluna era C18, e a fase móvel composta por metanol:água. Os limites de detecção e quantificação ficaram em 0,1 µg/L e 0,3 µg/L para o clomazona; de 0,072, µg/L e 0,22 µg/L para o propanil e de 0,03 µg/L e 0,09 µg / L para o quinclorac. Foi detectada a presença de pelo menos um herbicida em 41% das amostras no rio

Vacacaí e 33% das amostras no rio Vacacaí-Mirim, e o clomazona foi detectado com maior frequência nos dois rios. Os autores mencionaram o excesso de chuvas nos períodos amostrais e que este excesso pode ter causado um extravasamento dos pesticidas das lavouras para os rios estudados. A clomazona foi detectado nos rios nas concentrações de 0,41 até 7,72  $\mu\text{g/L}$ , o propanil nas concentrações de 0,58 até 12,90  $\mu\text{g/L}$  e o quinclorac nas concentrações de 0,48 até 6,60  $\mu\text{g/L}$ .

MARCHEZAN et al. (2010) analisaram a ocorrência de resíduos de 8 pesticidas (clomazona, quincloraque, propanil, bentazona, 2,4-D, imazethapir, carbofurano e fipronil) em dois rios (Vacacaí e Vacacaí-Mirim) na Depressão Central do Rio Grande do Sul, durante cinco safras (2003/2004 até 2007/2008). O fipronil foi analisado por GC-ECD e os demais foram analisados por CLAE-DAD. As amostras que apresentaram resultado positivo foram analisadas por CLAE-MS/MS. As amostras foram pré-concentradas em cartuchos SPE C18, com 500 mg, com volume de 250 mL. A eluição foi com 1 mL de metanol. A coluna usada no HPLC foi Bondesil C18® (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel metanol : água (60:40) pH 3,0, fluxo de 0,8 mL/ min. Para análise por GC foi usada coluna capilar DB-5(30m, 0,25mm e 0,25  $\mu\text{m}$ ). Os limites de quantificação ficaram em 0,1  $\mu\text{g/L}$  para o imazetapir, o carbofurano, o propanil, e o 2,4 D. Para o quinclorac o LQ ficou em 0,6  $\mu\text{g/L}$ , para a clomazona e bentazona ficou em 0,2  $\mu\text{g/L}$ , para o fipronil 0,01  $\mu\text{g/L}$ . Considerando as cinco safras, os resultados indicaram a presença nos dois rios de clomazona em quatro safras, fipronil em 3 safras, carbofurano em duas safras, e de propanil em uma safra. As incidências de pelo menos um agrotóxico nas amostras foi elevada, indicando que ocorre o extravasamento de pesticidas das lavouras de arroz para os rios citados durante o período de safra do arroz (setembro a março). As concentrações de clomazona chegaram a 4.7 $\mu\text{g/L}$  e o fipronil a 26.2  $\mu\text{g/L}$ .

BORTOLUZZI et al. (2007) analisaram a presença de resíduos de pesticidas usados em plantações de tabaco em poços e águas superficiais, entre os anos de 2001 e 2002. Foram estudadas três bacias de drenagem: Nova Boemia, no município de Agudo, que drena para o rio Jacuí; Candido Brum, no município de Arvorezinha, que drena para o rio Guaporé e Passo do Meio no município de Cristal, que drena para o rio Camaquã. Os pesticidas Clorpirifos, flumetralin e iprodione foram analisados por GC-ECD. O imidacloprido, a atrazina, a simazina e o clomazona foram analisados por HPLC-DAD. Os pesticidas detectados foram clorpirifos, imidacloprido, atrazina, simazina e clomazona na época de crescimento das plantas, na primavera e verão. Não foram

detectados pesticidas no inverno. Este estudo demonstrou que o clorpirifos persiste na água por quatro meses após a aplicação. Diversos poços apresentaram água com teores de pesticidas acima de 0,1 µg/L, alguns até acima de 1,0 µg/L, o que torna esta água imprópria para consumo. Os autores atribuem a presença dos agrotóxicos detectados ao uso profilático destes na produção de tabaco. Na bacia de drenagem de Agudo foram detectados clorpirifos, imidacloprido, atrazina, e simazina nos poços e águas superficiais. Clorpirifos foi encontrado em 75% das amostras de águas de poços em concentrações médias de 0.09 µg/L. O imidacloprido foi detectado em 50% das amostras de águas de poços em concentrações médias de 4.53 µg/L e em amostras de águas superficiais em concentrações médias de 0.66 µg/L. Na bacia de drenagem de Arvorezinha, clorpirifos, imidacloprido, atrazina, e clomazona foram detectados nos poços e águas superficiais. Em determinado estágio de crescimento das plantas de fumo, entre 6 e 10 folhas, o imidacloprido foi detectado em 100% das amostras de águas de poços em concentrações médias de 1.34 µg/L. A clomazona foi detectada em 50% amostras de águas de poços e superficiais em concentrações médias de 6.76 e 9.45 µg/L, respectivamente. Na bacia de drenagem de Cristal foram detectados o clorpirifos e o imidacloprido.

GRÜTZMACHER et al. (2008) analisou a presença de agrotóxicos (sem considerar os metabólitos) nas águas do canal São Gonçalo e do rio Piratini, no Rio Grande do Sul, em épocas de plantio de arroz. Foram coletadas em cinco datas diferentes, entre 2005 e 2006, sendo três amostras de água do rio Piratini e quatro do canal São Gonçalo. Os agrotóxicos analisados foram o quinclorac, o carbofurano, clomazona, fipronil e betaciflutrina. Os três primeiros por HPLC-DAD e os dois últimos por GC-ECD com coluna DB-5®. Os agrotóxicos com maior frequência nas amostras foram o carbofurano (35%), o quinclorac (33%), a clomazona (16%) e o fipronil (16%). A betaciflutrina não foi detectada em nenhum local. As concentrações de clomazona chegaram a 6,51 µg/L e de carbofurano a 14.99 µg/L. Os autores concluíram que pontos amostrais mais baixos (menores altitudes), como as próximas do Laranjal, apresentam maiores quantidades de resíduos de agrotóxicos. E que a detecção de resíduos de agrotóxicos nas águas superficiais reduziram da semeadura à colheita do arroz.

MACEDO et al. (2009) realizou uma extensa amostragem de água da represa de Barro Duro e dos canais de irrigação de lavouras de arroz, no município de Camaquã, RS, na safra de 2007-2008, para analisar a presença de fipronil e clomazona. As amostras foram pré-concentradas em cartuchos de SPE e as análises foram por HPLC-DAD

para o clomazona e GC-MS para o fipronil. Os resíduos de clomazona foram detectados em 24 % das amostras analisadas e de fipronil em 47% das amostras. As concentrações de clomazona chegaram a 12.1 µg/L e de fipronil a 18.9 µg/L. Foram detectados resíduos nas fontes de água para irrigação do perímetro (reservatório da barragem do Arroio Duro e na captação no rio Camaquã) e no sistema de drenagem do perímetro.

DEMOLINER et al. (2010) analisaram resíduos de pesticidas em águas superficiais e em águas de torneira, após o tratamento da água pela empresa estatal responsável pelo abastecimento público, no município de Rio Grande, RS. As amostras foram coletadas entre janeiro de 2008 e abril de 2009. Foram analisados resíduos de dezoito pesticidas: clomazona, tebuconazol, diurom, irgarol, atrazina, simazina, metsulfurom-metilico, quinclorac, 2,4-D, pirazosulfuron-etil, bentazona, propanil, carbofurano, imazetapir, imazapic, fipronil, bispiribac-sodico, fenoxsulam. Também foram analisados dois metabolitos: 3,4-DCA e 3 – hidroxí carbofurano, por LC-MS/MS. O modo de fragmentação escolhido foi por ionização positiva para um grupo de pesticidas que incluía o carbofurano, o clomazona e o tebuconazol, e a ionização negativa foi escolhida para outro grupo que incluía o fipronil. Entre os pesticidas analisados, de interesse foram os tempos de retenção, em ordem crescente: carbofurano, clomazona, tebuconazol e fipronil. Foram detectados os agrotóxicos: diurom, irgarol, imazetapir, imazapic, fipronil, clomazona, tebuconazol, atrazina, pirazosulfurom-etil, simazine, 3-hidroxí-carbofurano e 3,4-DCA. A soma de todos os pesticidas detectados somente ultrapassou o limite de 0,5 µg/L em fevereiro de 2009. Nos outros meses a soma das concentrações destes agrotóxicos detectados ficou abaixo deste valor. O fipronil foi detectado em todas as amostras, o tebuconazol foi detectado nas amostras a partir do mês de maio.

CALDAS et al. (2010) descreve a metodologia de análise por LC-MS/MS com pré-concentração por SPE dos pesticidas carbofurano, clomazona, tebuconazol e 2,4 D em águas de 10 poços subterrâneos com profundidade entre 2,5 a 37 metros, em uma região agrícola do RS (Quitéria). As amostras foram coletadas entre setembro de 2007 e agosto de 2008. Os autores também comparam os valores obtidos para limite de quantificação quando se utiliza um detector do tipo arranjo de diodos (DAD) e um detector do tipo massas (MS-MS). As recuperações das amostras fortificadas com o carbofurano ficaram entre 67-91.4 %, para a clomazona entre 84.6 e 102.9 e para o tebuconazol entre 90.1 e 108.9. O limite de detecção do método ficou entre 0.04 e 0.004 µg/L. Foram detectados os pesticidas carbofurano, clomazona e tebuconazol em oito

dos 10 poços. As concentrações observadas variavam ao longo do ano, sendo as maiores concentrações detectadas de 10,4 µg/L para o carbofurano, de 0,82 µg/L para o clomazona e 1,73 µg/L para o tebuconazol. O clomazona foi detectado em 70 % dos poços.

DIECSON et al. (2009) realizaram uma análise da ocorrência de agrotóxicos em águas superficiais no sul do Brasil, em sete regiões associadas ao cultivo de arroz irrigado em três épocas, na safra 2007/2008. As amostras foram coletadas em três locais por região, totalizando 21 locais. Os agrotóxicos avaliados foram: clomazona, quinclorac, penoxsulam, imazethapyr, imazapic, carbofurano, 3-hidroxi-carbofurano, fipronil e tebuconazol. A técnica de extração foi por cartuchos SPE e analisadas por LC-MS/MS. Imazetapyr, carbofurano e fipronil foram detectados em todas as regiões estudadas. Todas as amostras em todas as épocas continham ao menos um agrotóxico. Para o carbofurano, a maior frequência de detecção foi observada durante o cultivo do arroz, com 38% das amostras contaminadas, e a menor frequência ocorreu após a drenagem das lavouras, com 5% das amostras. Devido à alta solubilidade em água e ao baixo coeficiente de adsorção ao solo, o carbofurano possui alto potencial de ser transportado dissolvido em água e assim contaminar os mananciais hídricos superficiais. O inseticida fipronil foi encontrado em todas as épocas e em todos os locais monitorados. Isso ocorre porque a meia-vida em solo de fipronil é longa, podendo variar de 123 a 600 dias .

DIECSON et al. (2011) realizou uma extensa análise territorial da ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas no sul do Brasil, em áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado em seis regiões produtoras de arroz do RS e uma em SC. As amostras de água foram coletadas em três épocas, sendo a primeira anterior ao cultivo das lavouras de arroz, a segunda durante o desenvolvimento da cultura e a terceira após a drenagem da água das lavouras, entre os anos de 2007-2008. As amostras foram acidificadas até pH3 com ácido fosfórico, pré-concentradas nos cartuchos de C18ec, Chromabond de 500 mg, no mesmo dia da coleta. O volume de amostra foi de 250 mL, eluição com 1 mL de metanol, resultando em um fator de pré-concentração de 250 vezes. As amostras foram analisadas por CLAE-MS com coluna analítica XTerra C18 ® (50 × 3 mm e 3,5 µm). A fase móvel era composta por água (0,1% ácido fórmico):acetonitrila(0,1% ácido fórmico):metanol 46:24:30, com fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Os limites de detecção do método variaram entre 2,0-40,0 ng/L, enquanto para os limites de quantificação a variação foi de 4,0-100,0 ng/L. Os agrotóxicos analisados foram

clomazona, imazapic, imazethapyr, penoxsulam, quinclorac, 3-hidroxi-carbofuran (metabólito do carbofurano), carbofurano e fipronil, e o tebuconazol. As frequências de detecção dos agrotóxicos nas amostras de águas subterrâneas foram: fipronil (87%), imazetapir (42%), clomazona (23%), imazapic (19%) e o quinclorac (2%). Destaque para o fipronil que apresentou frequências de 76 a 100% nas três épocas monitoradas. As concentrações de fipronil chegaram a  $0.9\mu\text{g/L}$  e de clomazona a  $0.023\mu\text{g/L}$ .

TODESCHINI e FEUERHARMELL (2010), através do Laudo 305.2010-UTEC/DPF/SMA/RS, analisaram a presença de resíduos de pesticidas nos rios Uruguai e Ibicuí, no Rio Grande do Sul, em 2010. As análises foram por LC-MS-MS, com pré-concentração por SPE, sendo realizadas no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), da UFSM. Foram detectados os pesticidas azoxistrobina, piraclostrobina, difeconazole, pirazofós, trifloxistrobina, clomazona, piridato, carbaril, fipronil, deltametrina, imidacloprido, pirimifós metil. Foram detectados os pesticidas, nas concentrações ( $\mu\text{g/L}$ ) descritas: azoxistrobina 331, piraclostrobina 20, difeconazole 18, pirazofós 11, trifloxistrobina 26, clomazona 202, piridato 12, carbaril 13, fipronil 81, deltametrina 46, imidacloprido 9, pirimifós metil 14.

TODESCHINI e SANDER (2011), através do Laudo 116.2011-SETEC/DPF/SR/RS, avaliaram a presença de resíduos de pesticidas em área de cultivo de arroz orgânico no Rio Grande do Sul, em 2011. As amostras foram extraídas e concentradas por SPE, e as análises foram feitas por LC-MS-MS, no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), da UFSM. Foram detectados os pesticidas: azoxistrobina ( $0,4\mu\text{g/l}$ ), carbendazim ( $0,4\mu\text{g/l}$ ), ciproconazol ( $2,0\mu\text{g/l}$ ), imazetapir ( $3,2\mu\text{g/l}$ ), clomazona ( $0,6\mu\text{g/l}$ ), imazetapir ( $3,6\mu\text{g/l}$ ), metsulfurom metílico ( $1,2\mu\text{g/l}$ ), propiconazol ( $1,4\mu\text{g/l}$ ), tebuconazol ( $1,8\mu\text{g/l}$ ), tiabendazol ( $2,8\mu\text{g/l}$ ).

ARMAS et al. (2007) analisaram a presença de herbicidas usados na cultura da cana de açúcar, em águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes, em São Paulo. Os herbicidas estudados: ametrina, atrazina, simazina, hexazinona, glifosato e clomazona. O glifosato foi analisado em resina complexante Chelex®-100 na forma férrica e os extratos obtidos, limpos em coluna de troca aniônica AG1-X8 e concentrados a vácuo. Para os herbicidas aniônicos, apolares e moderadamente polares foi feita a extração em fase sólida em discos de extração Bakerbond Speedisk® C8. Para os herbicidas levemente polares a apolares foi usado discos de extração Bakerbond Speedisk® divinilbenzeno (DVB hidrofóbica). Os discos foram



sobrepostos na seqüência C8 sobre DVB. A fase móvel usada foi acetonitrila:água (ácido acético) (40:60). A análise cromatográfica foi por HPLC/UV e CG/NPD. A coluna usada para o HPLC foi uma C18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 µm), mantida a 38 °C e com volume injetado de 100 µL. O fluxo foi de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A coluna usada para o CG foi coluna capilar DB-5 (30 m X 0,25 mm, espessura de 1,0 µm, gás hélio com fluxo constante de 2,0 mL min<sup>-1</sup>. Modo splitless, injetor mantido a 250 °C, volume injetado de 1 µL, detector a 325 °C e programação do forno de 90 °C por 1 min com rampa de 10 °C/min até atingir 240 °C, seguindo a 20 °C/min até 300 °C. Para amostras com 500 mL de água, o LQ para os herbicidas analisados por CG/NPD foi de 0,3 µg/L e para os herbicidas analisados no sistema HPLC/UV ficaram em 0,2 µg/L. Foram detectados resíduos de ametrina, atrazina, simazina, hexazinona, clomazona e glifosato, com concentrações de 1,0 a 6,6 µg/L.

MARQUES et al. (2007) avaliaram o impacto das atividades agrícolas na qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Ribeira do Iguape, em São Paulo. As análises foram em águas superficiais e de consumo humano (água bruta e tratada), com amostragens entre fevereiro de 2003 e janeiro de 2004 em 10 diferentes pontos. A pré-concentração foi com cartuchos SPE C18 (500 mg, 3 mL), com volume de amostras de 250 mL. A análise cromatográfica por HPLC-UV, usando coluna analítica C18 Shim-Pach CCL-ODS® (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel composta por acetonitrila:água, em gradiente. Os valores de LD ficaram entre 0,3 e 6,4 µg/L e os valores de LQ ficaram entre 1,1 e 21,4 µg/L. Foram avaliados os compostos: aldicarbe, carbofurano, carbaril, simazina, atrazina e trifluralina. Observou-se que das 76 amostras de água superficial analisadas, apenas uma amostra apresentou resíduo de aldicarbe, uma apresentou resíduo de simazina, 16 apresentaram resíduo de carbofurano, uma de atrazina e três apresentaram resíduo de trifluralina. O carbaril não foi detectado em nenhuma das 76 amostras analisadas. A água tratada também apresentou resíduos de agrotóxicos, pois das 76 amostras analisadas 4 apresentaram resíduos de simazina, 7 de carbofurano, 1 de carbaril, 2 de atrazina e 1 de trifluralina. O aldicarbe não foi detectado em nenhuma das 76 amostras analisadas. Os teores encontrados ficaram abaixo de 0,6 µg/L. O carbofurano foi encontrado em 23 amostras do total de 152 analisadas, entre água superficial e tratada, portanto, aproximadamente, 15% das amostras apresentaram resíduo deste pesticida.

CALHEIROS; FERRACINI; QUEIROZ (2010) analisaram a ocorrência de nove pesticidas na Bacia do Alto Paraguai (BAP), no

pantanal matogrossense: simazina, metribuzim, atrazina, tebutiurum, diurom, clomazona, hexazinona, sulfentrazone e propanil. Foram definidos 24 pontos de coleta nos principais rios formadores do sistema BAP/Pantanal em novembro de 2007, nas primeiras chuvas, quando as enxurradas carreiam os pesticidas utilizados nas lavouras do planalto para a planície pantaneira. A extração de pesticidas foi feita com diclorometano, e a análise realizada por HPLC – ESI-MS-MS. A coluna analítica foi uma Polaris C18 A® (50 x 2 mm, partículas de 5µm) e a fase móvel de água (0,1 % ácido fórmico) e metanol, com gradiente de eluição. Nas águas de quatro rios da BAP (Coxim, Taquari, Negro e Miranda) foram detectados resíduos do herbicida atrazina, porém em valores baixos, entre 0,006 e 0,048 µg/L próximos ao LQ do método (0,0026 µg/L).

RIBEIRO et al. (2013) analisaram a presença de 16 pesticidas em águas superficiais na região das nascentes do Rio São Lourenço, no Mato Grosso, entre agosto de 2010 e junho de 2011. A análise foi através de HPLC-DAD, com pré-concentração por SPE, com cartuchos SDVB (estireno divinilbenzeno copolímero). O volume das amostras era de 500 mL, com ajuste de pH entre 7,0-7,5 (hidróxido de sódio 1 mol/L). Os cartuchos com os analitos foram centrifugados, e o eluato concentrado em rotaevaporador a 42°C. A análise foi por HPLC-DAD, a coluna analítica usada foi uma C18 Gemini® (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e pré-coluna C18 Phenomenex® (20 x 4,6 mm). O volume injetado foi de 20,0 µL, vazão de 1,0 mL/min, fase móvel composta de ACN:H<sub>2</sub>O, em gradiente. A quantificação foi feita pelo método de padronização interna, empregando terbutilazina como padrão interno. Os comprimentos de onda empregados na quantificação dos analitos foram 230 e 280 nm. Os limites de detecção ficaram entre 0,07 e 0,75 µg/L e os limites de quantificação entre 0,19 e 0,99 µg/L. O carbofurano foi detectado em concentrações de até 35,25 µg/L, o acetamiprido em concentrações de até 23,61 µg/L, o carbendazim em 12 µg/L. Ao todo foram detectados oito pesticidas em concentrações entre 0,15 to 35,25 µg/L.

CARBO et al. (2008) analisaram a presença de doze pesticidas em águas subterrâneas em lavouras de algodão em Primavera do Leste, Mato Grosso. A extração foi feita em fase sólida (SPE) utilizando como adsorvente o copolímero estireno divinilbenzeno (SDVB). O método foi desenvolvido com CLAE/DAD, usando coluna C18 Omnisphere® (250 mm × 4,6 mm) partículas de 5 µm, e coluna guarda também Omnisphere® com partículas de 5 µm (20 mm × 4,6 mm). O volume injetado foi de 10 µL, na temperatura ambiente, com fluxo constante de

1 mL/min. A fase móvel era composta por acetonitrila:água, em gradiente, sendo inicialmente 18% de acetonitrila, aumentando para 40% até 6 min, 80% até 35 min, 90% aos 40 min, e 100% de acetonitrila aos 45 min., e mantido assim por 3 min, e então decresce linearmente até as condições iniciais. Os limites de detecção ficaram entre 0,06 a 0,57 µg/L, as recuperações entre 73 e 113%. O método foi aplicado em 110 amostras de águas subterrâneas, sendo detectados oito pesticidas (acetamiprido, aldicarbe, carbendazim, carbofurano, diurom, imidacloprido, metomil e teflubenzurom), com concentrações variando de 0,78 a 68,79 µg/L.

STARNER e GOH (2012) relataram a análise de 75 amostras de águas superficiais em três regiões agrícolas da Califórnia, para monitoramento da presença de imidacloprido. As amostras foram coletadas em 2010 e 2011, e o monitoramento foi realizado pelo Departamento Californiano de Controle de Pesticidas (California Department of Pesticide Regulation - CDPR). As amostras foram concentradas em cartuchos de extração em fase sólida Varian Focus, eluídas com 10 mL de metanol:acetonitrila:2% ácido fórmico em água(60:30:10). As amostras foram reconstituídas em metanol:água (1:1) e analisadas por HPLC com detector de massas. A fase móvel era composta por metanol (0,1% ácido fórmico) e água (0,1% ácido fórmico), com fluxo em gradiente, tempo total de 23 minutos. O fluxo foi de 0,75 mL / min. A concentração limite definida pela Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) de 1,05 µg/L foi detectada em aproximadamente 19 % das amostras.

MOHAN et al. (2010) descreve um método analítico multirresíduo para detecção de pesticidas em sementes de algodão na Índia, com extração por cartuchos SPE e análise por HPLC – UV. Os agrotóxicos analisados eram inseticidas da classe dos neonicotinoides (imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido). Os cartuchos utilizados eram do tipo LiChrosep RP18, a eluição foi com acetonitrila. A coluna utilizada foi C8-DB ® (150x4,6mm e 5 µm), com volume de injeção de 20 µL. A fase móvel era composta de acetonitrila:água (25:75), com fluxo de 1,2 mL /min. A detecção foi no comprimento de onda 254 nm. O imidacloprido apresentou recuperações de 86,96 % para fortificações de 10 ppb, de 65,47% para fortificações de 20 ppb, de 95,21% para fortificações de 30 ppb, e de 79,89% para fortificações de 40 ppb.

HADJMOHAMMADI; NIKOU e KAMEL (2006) analisaram a presença de fipronil em solo e água de lavoura de arroz no norte do Irã. Inicialmente foram definidas dez áreas iguais em lavouras de arroz, onde foi aplicada uma formulação de fipronil granular na concentração

de 40 g / ha. O pH das amostras de água foi medido *in loco* nas áreas da lavoura e resultou em 7,8. As amostras de água e solo foram colhidas 1 dia antes e 1, 7, 14, 28, 40 e 56 dias após o tratamento. Foi realizada uma filtração por filtro Whatman (0,45µm de poro) e posterior passagem de HCl diluído e água deionizada. A extração foi líquido-líquido, com diclorometano, que posteriormente foi evaporado e a amostra foi ressuspensa em acetonitrila. Metanol, acetonitrila e diclorometano foram testados e o diclorometano foi a melhor opção. A detecção foi por HPLC- UV, com coluna C18 RP (250 x 4,6 mm, 10 µm). A fase móvel foi acetonitrile 60% com pH 5 (tampão fosfato) e temperatura da coluna de 35°C. As recuperações dos analitos resultaram acima de 90%. Nas condições descritas não foram observadas interferências nos extratos das amostras de água e solo. São necessários 25 minutos para eluir todos os compostos não polares presentes nas amostras antes de injetar outra amostra. Fluxo de 1,5 mL / min, volume injetado de 10 µL e detecção em 280 nm. Foi analisada a degradação do fipronil em solução tampão nas temperaturas de 20° e 30° C, sendo verificado que a 30° C a degradação do fipronil é maior. Após 40 dias a 30°C a concentração inicial de 4µg / mL reduziu para 0,29 µg / mL.

CHENG et al. (2009) utilizaram a técnica de extração DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva) para analisar a ocorrência de pesticidas em águas superficiais de dois lagos na China. Foram analisados dois fungicidas usados em parreiras e tomateiros: Dietofencarb e Pirimetanil. O dietofencarb pertence ao grupo dos carbamatos. As amostras e os solventes foram filtrados através de membranas 0,45 mm para eliminar o material particulado. A análise foi com HPLC – UV, no comprimento de onda 254 nm. A coluna usada foi uma Zorbax Eclipse XDB-C8®, 150 mm, 4,6 mm, 5 µm. A fase móvel era composta por metanol: água (75:25), fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi de 40°C. A acetonitrila foi usada como solvente dispersor e o solvente extrator foi o tetracloroeto de carbono. Foi obtida uma recuperação entre 86,8 % e 107,2 % para amostras de água, e o limite de detecção ficou entre 0,015 e 0,021 ng/mL.

DONALD et al. (2007) avaliaram a ocorrência de 45 pesticidas em 15 comunidades rurais nas Grandes Planícies do Canadá. Estas comunidades foram selecionadas porque a água de abastecimento é originada de represas com dimensões entre 0,8 e 1,09 hectares. Estas represas recebem água de degelo de neve que passa por locais de cultivo de grão. O período escolhido para coletar as amostras foi a primavera, quando são aplicados os pesticidas. Os autores avaliaram também o tratamento de água destas comunidades e concluíram que era similar,

incluindo aeração e aplicação de sulfato de cobre, permanganato de potássio e/ou alumínio para induzir a precipitação/floculação, filtração por areia e finalmente cloração. Doze comunidades têm algum tipo de forma de tratamento com carvão ativado e uma comunidade usa filtração por membrana. Foram analisados 17 herbicidas ácidos: 2,4-D; MCPA; MCPB; 2,4-DB; 2,4,5-T; 2,3,6-TBA; benzoilprop; bromoxinil; clopiralid; dicamba; diclorprop; diclofop; fenoprop; imazametabenz A and B; imazetapir; mecoprop; e picloram. Os herbicidas neutros eram 8: atrazina, butilato, dialato, metolaclor, metribuzin, simazina, triallato e trifluralin. Também foram analisadas 5 herbicidas do grupo das sulfonilureias: etametsulfurom-metil, metsulfuron-metil, tifensulfuron-metil, tribenuron-metil, além de dois produtos de degradação: desetilatrazine e desetilsimazine. Foram analisados 13 inseticidas organofosforados: azinfos, clorpirifos, diazinom, dibrom, dimetoato, disulfotom, etiom, fonofos, malatiom, paratiom, forate, hosmet, and terbufos. As amostras de água com herbicidas neutros e inseticidas organofosforados foram extraídos com diclorometano. As amostras de água com herbicidas ácidos foi acidificada para pH 2 e depois extraídos com diclorometano. As amostras passaram por um processo de limpeza em colunas com sílica ou florissil. As análises foram por CG-MS, com derivatização em alguns casos. O detector de massa operou no modo de monitoramento de íons, com uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m). Os herbicidas do grupo das sulfonilureias foi pré-concentrado em cartuchos SPE OASIS HLB <sup>®</sup> e analisados por HPLC-MS-MS. A coluna analítica era um C18 (100 x 2,1 mm, com partículas de 2,5  $\mu$ m), com temperatura mantida em 30 °C, e a fase móvel constituída de acetonitrila:agua, com ácido fórmico 01 % e acetato de amônio 2 mM, em gradiente. Volume de injeção de 20  $\mu$ L e fluxo de 200  $\mu$ L/min. Foram detectados 27 herbicidas, 2 inseticidas e 2 produtos de degradação em águas de represa com concentrações de até 457 ng/L e na água de consumo foram detectados 21 herbicidas em 28 amostras de água de consumo, porém em níveis abaixo dos estabelecidos como seguros. A eficácia do tratamento de água para a retirada dos pesticidas variou muito, entre 14-86%, e os autores consideraram que definição da eficiência dos tratamentos é complexa e requer mais estudos.

### **2.5.1 Ocorrência em outras matrizes.**

RODRIGUES ET AL (2011) analisaram a presença de dimetoato, metalaxil, tebuconazol, azoxistrobina, difeconazol em cebola cultivada no Rio Grande do Sul. Foram feitas modificações no método QuEChERS e estas foram avaliadas para analisar os resíduos nesta

matriz. As análises foram feitas num LC-MS-MS, com fase móvel de água e acetonitrila, coluna analítica Waters XTerra®MS C18, com diâmetro de 50 x 3 mm e partículas de 3,5 µm. As modificações avaliadas foram: supressão da etapa de purificação, influência de NaCl na extração, efeito de matriz. Foi verificada a diferença nas quantificações feitas por padronização externa através de curvas em solventes ou curvas em superposição de matriz, devido ao efeito de matriz. Os autores concluíram que a supressão da etapa de purificação com PSA não afetou a extração. E também que a melhor forma de analisar estes resíduos em cebola é por superposição de matriz. Em amostras compradas no mercado local não foram encontrados resíduos dos pesticidas analisados.

FILHO et al (2012) validaram um método multirresíduo para análise de 98 agrotóxicos em manga, por LC-MS-MS. Foi feita uma adaptação do método QuEChERS usando sulfato de sódio e acetato de sódio, com extração com acetonitrila:ácido acético (99:1), com etapa de purificação com dispersivo sólido. Foi usada coluna de fase reversa LUNA C18, com dimensões de 150 x 2 mm, com partículas de 5 µm, usando a fase móvel em gradiente e ionização positiva. Foi avaliada a supressão ou o aumento do sinal pela interferência com a matriz e a ionização dos 98 pesticidas foi avaliada, através dos parâmetros voltagem do íon-spray, gás nebulizador, gás cortina, pressão do gás aquecedor, temperatura da fonte de íons. A estatística da validação usou os testes de Jackknife para identificar outliers, o teste de Ryan-Joiner para verificar a distribuição normal, e o teste Durbin-Watson para verificar se havia autocorrelação positiva residual. A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe. O método mostrou-se adequado e está sendo aplicado em programas oficiais de monitoramento.

## **2.6 Técnicas de extração de analitos de amostras aquosas**

Análises multirresíduo de agrotóxicos em água são difíceis de serem executadas, pois estes compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas e ocorrem em concentrações extremamente baixas, e existem interferentes em grandes concentrações, como compostos húmicos e fúlvicos.

Compostos húmicos são definidos como macromoléculas orgânicas heterogêneas, de coloração escura, resultado do produto do metabolismo de microrganismos. São moléculas orgânicas diversas, relativamente pequenas, que formam agregados unidos entre si por

ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, formando um arranjo supramolecular. Esse arranjo apresenta massa molecular só aparentemente elevada, mas que pode ser constante e indefinidamente alterada de acordo com as variações nas condições do meio de reação. PICOLLO (2002) redefiniu ácidos fúlvicos (AF) como produto da associação de moléculas pequenas e hidrofílicas com uma quantidade de grupos funcionais acídicos suficiente para manter os agregados dispersos a qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos (AH), por sua vez, foram definidos como associações nas quais predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteróides) estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas dispersivas. A conformação dos AH cresce progressivamente de tamanho quando as forças oriundas das ligações hidrogênio são progressivamente aumentadas até um valor baixo de pH na qual floculam.

A determinação de agrotóxicos em águas superficiais requer um pré-tratamento da amostra, pois caso os compostos húmicos não sejam removidos, estas poderão afetar a identificação e a quantificação. O pré-tratamento inclui o isolamento e a pré-concentração dos analitos. (CALDAS, 2011).

Métodos tradicionais de preparo da amostra, tal como a extração líquido-líquido (ELL), requerem grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam custo elevado, são de difícil automação e trabalhosos. Nesse sentido, novas técnicas que consomem menos tempo são efetivas e requerem uma menor quantidade de solventes vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para extração de agrotóxicos em amostras aquosas. Dentre estas técnicas, não pode deixar de ser citado o método QuEChERS, assim como a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a extração em fase sólida (SPE).

ANASTASSIADES et al. (2003) propuseram o método de preparo de amostra denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), sendo amplamente usado para análise de resíduos na área de alimentos. Resumidamente, a técnica consiste na extração com acetonitrila, seguida da partição líquido-líquido pela adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, e posterior purificação com extração em fase sólida dispersiva (PSA-amina primária-secundária e sulfato de magnésio) seguidas de agitação e centrifugação. Uma alíquota do sobrenadante é injetada diretamente no sistema cromatográfico, podendo ainda ser usado um padrão interno, como

trifenil-fosfato, que não interaje com o sorvente PSA e serve tanto para CG quanto para LC. (PRESTES, 2009).

A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) é uma variação da técnica de extração líquido-líquido que foi desenvolvida para extração de pesticidas em plantas e matrizes animais, onde os materiais gordurosos eram separados por precipitação em baixa temperatura. Com a adição da acetonitrila à matriz, é formada uma fase única líquida, contendo água e solvente. Esta mistura é então resfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e com o abaixamento da temperatura, grande parte dos interferentes ficam aprisionados na fase aquosa congelada. A acetonitrila, de temperatura de congelamento igual a  $-46^{\circ}\text{C}$ , fica líquida e é retirada facilmente, não sendo necessários outros processos de purificação. (VIEIRA, 2007).

Na técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), o princípio básico é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator. Em resumo, uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa. Após leve agitação, uma solução turva com microgotas é formada. As microgotas consistem no solvente extrator mais o analito já extraído. Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, que é retirada com o auxílio de uma seringa e é efetuada a quantificação dos analitos pela técnica mais apropriada. Como solvente dispersor usa-se metanol, acetonitrila, acetona e tetrahidrofurano. Como solvente extrator, para agrotóxicos em água usa-se clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno (CALDAS, 2011).

### **2.6.1 Extração em fase sólida (SPE)**

A técnica de SPE é amplamente utilizada para pré-concentração e remoção de interferentes da matriz de amostras aquosas. A SPE tem como princípio a retenção seletiva dos analitos presentes em uma amostra aquosa, em um adsorvente denominado de “fase sólida” (FS). A FS é colocada dentro de um cartucho que pode ser de teflon, polipropileno ou vidro, entre dois filtros que tem como função reter fisicamente as partículas da FS. De acordo com as características químicas das moléculas analisadas, é escolhida uma FS que possa interagir com estes compostos e realizar a melhor retenção destes

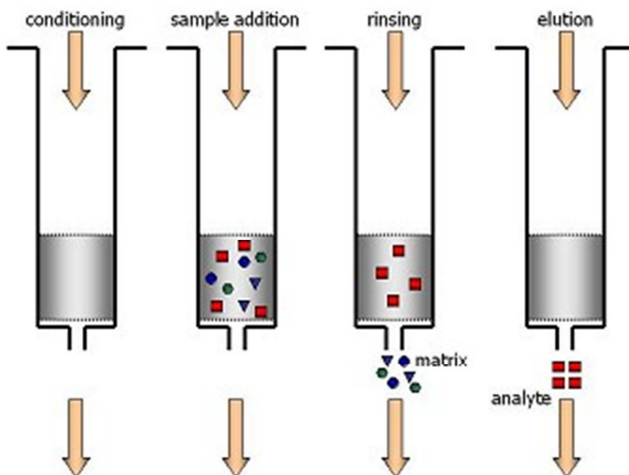


analitos de interesse. Quanto mais específico for o mecanismo de retenção da FS, tanto maior a seletividade e, portanto, maiores as chances de eliminar os interferentes. Portanto a SPE, além de ser o sistema de pré-concentração também poderá fazer às vezes de eliminação de interferentes da matriz. Em geral, os materiais de recheio empregados para SPE são similares aos usados em cromatografia líquida. Assim, carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio, fases quimicamente ligadas e polímeros são bastante utilizados.

A extração em cartuchos com grupos octadecil ligado à sílica ocorre por partição, devido as interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e CH do analito. A extração em resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio das forças de Van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. Basicamente ocorrem interações do tipo ligação ligação pi, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. (General Notes, Phenomenex, 2013).

Genericamente, as principais etapas de um procedimento de SPE são: condicionamento, percolação da amostra, remoção de interferentes, eluição dos analitos de interesse. A figura 07, abaixo, apresenta um esquema geral destas etapas:

**Figura 07 – Etapas para a extração em fase sólida (SPE).**



Fonte: <http://services.leatherheadfood.com/eman>

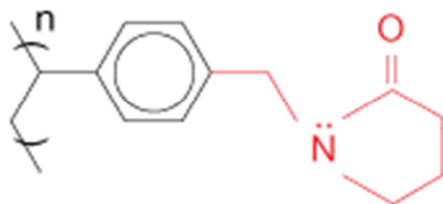
Na etapa de condicionamento, a fase sólida é preparada para receber o analito. Para o condicionamento, diversos solventes e/ou mistura de solventes bem como soluções tampão, básicas ou ácidas, podem ser utilizadas. A escolha do melhor condicionante irá depender do mecanismo de retenção envolvido. A etapa de percolação é quando se passa a amostra pela fase sólida de modo que os analitos de interesse fiquem retidos enquanto que os interferentes passem direto. A etapa de remoção de interferentes poderá existir ou não e dependerá da matriz e dos analitos e, por fim, tem-se a etapa de eluição dos analitos de interesse. Da mesma forma que na etapa de condicionamento, várias opções podem ser utilizadas, dependendo do mecanismo de retenção e consequentemente do mecanismo de dessorção utilizado para a pré-concentração dos analitos.

O delineamento de um procedimento de SPE tem por objetivo definir as melhores condições no que diz respeito ao que poderá ser utilizado em cada etapa em termo de solvente e/ou mistura de solventes, bem como a fase sólida mais adequada para um determinado conjunto de analitos de interesse sem deixar de lado a matriz. Por sua vez, a matriz desempenha um importante papel na SPE, pois a definição dos parâmetros mencionados poderá mudar de forma significativa dependendo da complexidade da mesma.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, para agrotóxicos são muito utilizadas as resinas de polímeros de estireno divinilbenzeno com superfície modificada, como Strata X<sup>®</sup>. Estes polímeros sorventes de fase reversa que apresentam grande retenção de compostos neutros, ácidos e básicos, sob condições agressivas de lavagem com solventes orgânicos. Todos os analitos selecionados apresentam anel aromático em suas estruturas, de forma que se espera que ocorram as interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre estes anéis aromáticos e o a resina do cartucho selecionado, permitindo uma retenção seletiva dos analitos.

Na figura 08 temos a estrutura química do estireno divinilbenzeno sólida é possível identificar um sítio lipofílico na região do anel aromático e um sítio hidrofílico na região do nitrogênio.

**Figura 08. Estrutura química do polímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Strata-X.**



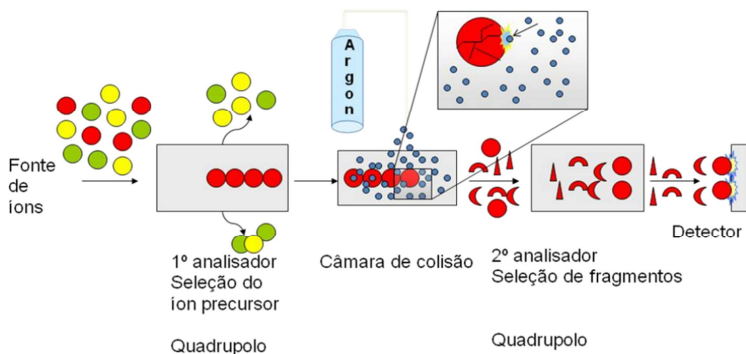
Fonte: Adaptado de [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)

## 2.7. HPLC com espectrometria de massas

A técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-MS) tem sido muito utilizada para a determinação de pesticidas em águas superficiais. Outros sistemas utilizando cromatografia a líquido com detectores de fluorescência e de UV-Vis, também tem sido utilizados, entretanto, devido a maior sensibilidade dos espectrômetros de massas, estes estão sendo mais usados para análises de resíduos.

Um espectrômetro de massas é constituído por um sistema de ionização, dois analisadores, câmara de colisão e detector, conforme apresentado na figura 09.

**Figura 09 – Esquema de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo.**



Fonte: IGLESIAS; Amadeo Hoshi. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas.**

O sistema de ionização tem a função de remover o solvente oriundo da fase móvel, ionizar os analitos de interesse e reduzir efeitos de matriz. Dentre os principais sistemas de ionização pode-se citar spray eletrônico (EI, do inglês *electrospray ionisation*); a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e foto spray (do inglês *Photospray*). Neste texto, será abordada apenas a ionização por eletrospray (EI) que foi a utilizada no trabalho. Na EI, dois modos de ionização são possíveis: o analito é carregado positivamente (modo positivo) ou o analito é carregado negativamente (modo negativo). A definição por um ou outro dependerá principalmente da estrutura química dos analitos em questão.

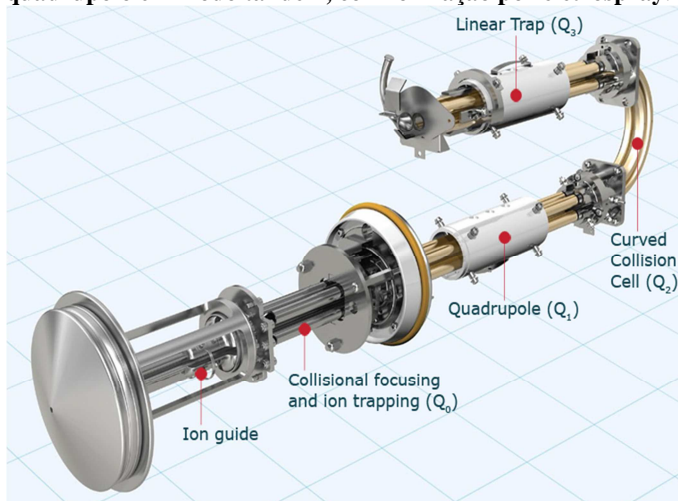
A molécula, ionizada com uma carga positiva, é representada por  $[M+H]^+$  a qual se refere ao íon molecular. As moléculas ionizadas e dessolvatadas passam para o analisador de massas. O analisador de massas mais antigo é o quadrupolo simples, o qual ainda hoje é muito utilizado. Atualmente, vários analisadores de massas podem ser encontrados nos equipamentos comerciais. Estes vão desde o sistema em tandem, que é o caso do MS/MS (também denominado de triplo quadrupolo que são dois quadrupolos em sequência com um quadrupolo no meio), os sistemas híbridos como o Q-TRAP (em que são colocados em sequência um quadrupolo, um hexapolo e um ion trap) até os analisadores mais avançados como o ORBITRAP® Setor Magnético e outros. Estes analisadores permitem obter-se o espectro de massas dos compostos em estudo, sendo este dado utilizado tanto para elucidação estrutural, como para determinação de metabólitos, produtos de degradação e análise confirmatória.

Após o analisador de massas fica o detector, que tem a função de recolher os dados enviados pelo analisador. Os detectores devem ser sistemas com resolução adequada para processar as informações recebidas. No caso dos espectrômetros de massas, os mais utilizados são: eletromultiplicadores e fotomultiplicadores.

O acoplamento da cromatografia a líquido a um espectrômetro de massas traz a grande vantagem de unir um sistema de separação indiscutivelmente robusto e eficiente com um sistema que fornece o espectro de massas, possibilitando a identificação inequívoca dos analitos presentes na amostra (tempo de retenção e espectro de massas). Estas características têm feito da LC-MS/MS uma das escolhas mais frequentes para a identificação e quantificação de compostos orgânicos em amostras ambientais.

A figura 10 foi obtida num sítio da internet especializado em espectrômetros de massa, e ilustra a estrutura interna do equipamento usado nas análises.

**Figura 10. Esquema de equipamento de espectrometria de massas, do tipo triplo quadrupolo em modo tandem, com ionização por eletrospray.**



**Fonte:**[http://www.chromacademy.com/Mass\\_Analyzers\\_Traps\\_and\\_TOFs\\_The\\_Essential\\_Guide.html](http://www.chromacademy.com/Mass_Analyzers_Traps_and_TOFs_The_Essential_Guide.html)

O equipamento utilizado permite que os dados sejam adquiridos utilizando diversos modos de operação, a citar: Varredura no primeiro quadrupolo (do inglês Q1 Scan), Monitoramento de múltiplas reações (MRM, do inglês Multiple Reaction Monitoring), Espectro de varredura do íon produtor – “filhos” (do inglês, Product Ion Scan), Varredura do íon precursor – íon pai (do inglês, Precursor Ion Scan) e varredura de fragmentos neutros (do inglês, Neutral Loss Scan).

No modo de varredura do íon produtor – “filhos” (do inglês, product Ion scan), os analitos de interesse (suas respectivas formas ionizadas) são selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), enviados para a câmara de colisão, onde são fragmentados de acordo com valores de energia de colisão (CE, do inglês Collision energy), previamente estabelecidas e seguem para o terceiro quadrupolo (Q3). Neste, os fragmentos gerados são analisados em função da razão massa/carga que dará origem aos espectros de massas dos compostos selecionado em Q1.

No modo de varredura do íon precursor – íon pai (do inglês, Precursor Ion Scan), o objetivo é determinar quais compostos podem

gerar, por fragmentação, determinados íons. Para isso, selecionam-se os fragmentos de interesse e o sistema irá determinar a que compostos estes íons pertencem.

No modo de varredura de fragmentos neutros (do inglês, Neutral Loss Scan), o objetivo é verificar a perda de fragmentos neutros de um íon molecular após a sua fragmentação.

No modo de operação MRM (monitoramento de múltiplas reações), o íon molecular de interesse é selecionado em Q1, fragmentado na câmara de colisão resultando em um fragmento específico de massa que é selecionado em Q3. É utilizado para análise quantitativa em que dois íons são escolhidos, sendo que o mais intenso é utilizado para a quantificação (quantificador) e o outro é utilizado para confirmação do composto de origem (qualificador).

Na prática, no primeiro quadrupolo (Q1) ocorre a separação dos íons moleculares selecionados, pela massa de sua forma protonada  $[M+H^+]$ . Na câmara de colisão (Q2) ocorre a fragmentação destes íons, com energia de colisão previamente estabelecida. No terceiro quadrupolo (Q3), os fragmentos originados são selecionados e chegam ao detector de massas, que neste caso é um eletro multiplicador, localizado ao final da sequência dos quadrupolos. A seleção dos parâmetros ótimos é descrita na seção 4.1.

A leitura de cada um dos fragmentos oriundos de um íon molecular é realizada em um canal específico. A leitura de cada canal é realizada por um período de milissegundos (ms), um canal após o outro e reiniciando após o último, motivo pelo qual o modo de aquisição é chamado monitoramento múltiplo de reações (MRM). A técnica de LC-MS/MS tem sido escolhida para a determinação de traços de analitos orgânicos, incluindo pesticidas em amostras ambientais, por ser capaz de detectar a maior parte dos compostos orgânicos, ser suficientemente sensível (limites de detecção da ordem de ng/L ou µg/L), específica e seletiva. Assim, a necessidade de dados de alta qualidade, em concentrações muito baixas explica o rápido crescimento da utilização desta técnica.

## 2.8 VALIDAÇÃO

A definição de Validação, de acordo com o Inmetro, CGCRE-008, de 2007:

*“Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.”*

Ainda de acordo com esta publicação do Inmetro, o método desenvolvido neste trabalho pode ser considerado MÉTODO NÃO NORMALIZADO, visto ser um método desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, adaptados a partir de métodos validados.

A validação da metodologia escolhida adotou um modelo misto, seguindo a normatização do Inmetro, DOQ – CGCRE-008, de 2007, para a análise de traços, bem como as recomendações do ICH Q2R1 e as recomendações constantes no Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica – Medicamentos Veterinários e Fármacos do MAPA, 2011.

Para tanto são analisados a seletividade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), linearidade e faixa linear de trabalho, sensibilidade, precisão, efeito matriz, volume de quebra, recuperação, repetitividade e reprodutibilidade.

### **2.8.1 Seletividade**

De acordo com a definição adotada pelo Inmetro (CGCRE-008, 2007):

*“...Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros é chamado seletivo.”*

A seletividade de um método de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. (Ribani, 2004). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas.

A espectrometria de massas em conjunto com separações por cromatografia é uma combinação muito poderosa para identificação de um analito em um extrato. Esta combinação fornece simultaneamente dados de tempo de retenção, razão de massa/carga iônica e dados de abundância.

### **2.8.2 Sensibilidade**

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da curva analítica, e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível o método. (INMETRO. DOQ-CGCRE-008).

### 2.8.3 Linearidade

O Inmetro, através do DOQ-CGCRE-008, define a linearidade como a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta (equação 2) relaciona as duas variáveis:

$$y = ax + b$$

**Equação 2**

Onde:

y = variável dependente (resposta medida em absorvância, altura ou área do pico, etc.),

x = variável independente (concentração, massa, etc.),

a = inclinação da reta ou coeficiente angular,

b = interseção com o eixo y ou coeficiente linear.

O valor do coeficiente de correlação deve aproximar-se o mais possível do valor de 1, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais. Um coeficiente de correlação acima de 0,999 é considerado como evidencia de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. (RIBANI, 2004).

Segundo as recomendações do MAPA, 2011, são aceitos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,95 para curvas preparadas em matriz e 0,97 para curvas preparadas em solvente. Em caso de exclusão de algum ponto da curva analítica, deve-se indicar qual a ferramenta estatística utilizada (teste de Grubs, ou outros).

#### 2.8.3.1 Faixa Linear de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e quantificação. No limite superior, estes fatores dependem da resposta do equipamento.

Uma relação linear simples, descrita pela equação  $y = ax + b$ , só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da



espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a *faixa linear dinâmica*. Esta pode ser definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade é aproximadamente constante (Ribani et al, 2004).

Sua avaliação pode ser feita através do uso da razão sinal/massa, conforme equação 3:

$$(S/Q)_i = (S_i - b)/Q_i,$$

**Equação 3**

Onde:

S= sinal do equipamento,

$(S/Q)_i$ = relação sinal/massa para o i-ésimo ponto da curva,

$S_i$ = sinal medido para dada concentração  $Q_i$ ,

b= interceptor da curva analítica,

$Q_i$ = concentração do analito.

Em uma suposta ausência de erros indeterminados ( $r^2=1$ ) e dentro da faixa linear, pode-se provar que  $(S/Q)_i=a$  para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na prática, com presença de erros indeterminados o valor de  $r^2$  resulta  $< 1$  e dentro da faixa linear,  $(S/Q)_i \approx a$ . Se  $(S/Q)_i < a$  ou  $(S/Q)_i > a$ , então o dado pode ser assumido como estando fora da faixa linear. Para a faixa linear pode ser atribuído um intervalo de 5 % ou 10 % de tolerância acima e abaixo do coeficiente angular, onde os valores obtidos para a razão S/Q podem variar. Valores maiores ou menores situam-se fora da faixa de linearidade (AUGUSTO; ANDRADE e CUSTÓDIO, 2000).

### 2.8.4 Limite de Detecção

Em determinações de nível traço, é importante saber o menor valor de concentração do analito detectável no equipamento. Segundo a IUPAC, limite de detecção (LD) é o resultado único e simples que, associado a uma probabilidade, pode ser distinguido do valor de um branco adequado. Já para o INMETRO, é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. É determinado através de uma análise completa de uma dada matriz contendo o analito. Em cromatografia, normalmente se utiliza o ruído da linha de base para obter o LD, considerando-se que a razão sinal/ruído deve ser 3:1.

### 2.8.5 Limite de Quantificação

Conforme o Inmetro (CGCRE-008, 2007), o Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser determinado da mesma maneira que o LD, entretanto com uma razão sinal/ruído de 10:1. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

### 2.8.6 Efeito Matriz

Um dado analito quando diluído em solvente orgânico gera um sinal em um detector que pode ser divergente do sinal deste mesmo analito quando diluído em uma matriz. Este “efeito matriz” pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector a um analito, fornecendo resultados errôneos.

A SANCO, através do documento nº10684/2009 recomenda o uso de curvas de calibração preparadas no extrato branco da matriz ou por superposição na matriz, para compensar a supressão iônica. A supressão iônica é um fenômeno onde a eficiência de ionização de um composto é diminuída pela presença de um composto interferente presente na amostra, reduzindo o sinal obtido para o analito de interesse.

A resposta do analito adicionado ao extrato branco da matriz (fortificação após a extração) e a resposta do padrão preparado em solvente são avaliadas. Esta forma de avaliar a intensidade do efeito matriz é bastante utilizada para quantificação de resíduos em matrizes complexas.

MARIOTTI et al (2013) avaliaram o efeito de matriz em amostras de saliva através da comparação do coeficiente angular das curvas fortificadas após a extração e curvas em solvente, com tolerância de 10% de variação positiva e negativa.

Caso seja detectada a ocorrência de efeito de matriz, pode-se partir para a superposição de matriz ou adição de padrão, dependendo da disponibilidade da matriz branca. (RIBANI 2004).

### 2.8.7 Volume de Quebra

O volume de quebra (VQ) é definido como o volume máximo de amostra que pode ser processado com a melhor recuperação possível. Ao utilizarmos volumes superiores ao volume de quebra para dado sistema de SPE a perda da recuperação ocorre, mesmo o com eluente

aquoso, ocorrendo a eluição da amostra ou quando ocorre a sobrecarga do cartucho por outros componentes da amostra. (SMITH, 2003).

### **2.8.8 Exatidão (Recuperação)**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. (RIBANI, 2004).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificado (CRM); comparação de métodos; ensaios de recuperação. Os CRM são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (“National Institute of Standards and Technology” - USA), LGC (“Laboratory of the Government Chemist” - UK), USP, entre outros, e os valores obtidos para um método pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método.

A comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos com um método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida.

A exatidão foi avaliada através dos ensaios de recuperação (R) de um analito adicionando-se quantidades conhecidas de padrões deste analito em uma matriz isenta do composto (*spike*). Para análise de

resíduos, os valores aceitáveis de recuperação ficam entre 70 e 120 %, com precisão de até  $\pm 20\%$ . (RIBANI, 2004).

### **2.8.9 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)**

A precisão determina o desvio nos resultados de uma análise e é um dos critérios mais importantes para a avaliação do desempenho de um método analítico.

A precisão pode ser avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também denominado de coeficiente de variação (CV%), através da equação 4:

$$\text{RSD} = s/x * 100$$

**Equação 4**

Onde:

s= desvio-padrão absoluto das replicatas

x= média das medidas em replicatas.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto espaço de tempo. As preparações usadas para determinação de repetitividade devem ser diferentes. Algumas vezes a repetitividade é chamada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). (RIBANI, 2004).

A reprodutibilidade é o grau de concordância de um mensurando sob diferentes condições de análise. Pode-se variar laboratório, operadores, equipamento.

## **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 – Solventes, reagentes e materiais**

Os solventes, os reagentes e os materiais utilizados durante toda a experimentação encontram-se listados a seguir:

- Água purificada em sistema Gehaka® resistividade máxima de 0,05 microsiemens;
- Acetonitrila e metanol grau HPLC (J.T.Baker);
- Ácido fórmico p.a. 98 - 100% (Merck, Brasil);
- Ácido acético glacial p.a, 100% - (Merck, Brasil);
- Detergente neutro Extran® (Merck, Brasil);

- cartuchos SPE, X-Strata – 200 mg - 6 mL, fase reversa polimérica (superfície modificada de estireno divinilbenzeno),
- Filtros de papel Framex®, com diâmetros de poros médios de 14 e 2 µm, utilizadas na filtração inicial das amostras de águas superficiais;
- Membrana de nitrato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro, marca Sartorius®, utilizadas para filtração final das amostras de águas;
- Frascos de vidro âmbar, com capacidade para 30, 50, 100 e 1000 mL;
- Frascos de vidro, capacidade para 1,5 mL;
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas calibradas e aferidas, etc.)
- Padrões analíticos, descritos na tabela 5:

**Tabela 5 – Padrões analíticos utilizados:**

Nome dos Padrões	Fornecedor	Pureza %
Carbofurano	Dr.Ehrenstorfer	99
Clomazona	Dr.Ehrenstorfer	98
Fipronil	Dr.Ehrenstorfer	96
Imidacloprido	Dr.Ehrenstorfer	98
Tebuconazol	Dr.Ehrenstorfer	98,5
Trifenilfosfato	Dr.Ehrenstorfer	99,5

### 3.2 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoques de padrões dos agrotóxicos foram preparadas individualmente na concentração de 1000 µg/mL, em acetonitrila, efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado, considerando o grau de pureza, com massa inicial mínima de 10 mg. As soluções analíticas estoques foram preparadas em balão volumétrico calibrado de 10 mL, sendo então transferidas para frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas a temperatura de -20 °C em freezer, por período não superior a 6 meses.

A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho, na concentração de 5 µg/mL para cada um dos 5 agrotóxicos (carbofurano, clomazona, imidacloprido, fipronil e tebuconazol).

Através da diluição desta solução de trabalho foram preparadas as soluções para construção das curvas analíticas, em diferentes concentrações (0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; e 200,0 µg/L).

### **3.3 Amostras de água superficial sem agrotóxicos**

Para a validação da metodologia utilizou-se água superficial coletada num pequeno arroio na região sul de Porto Alegre, bairro Ponta Grossa, em área onde não existe atividade agrícola, portanto, supostamente livre de contaminação por agrotóxicos.

As amostras de água superficial foram coletadas em frascos âmbar, previamente limpos com soluções ácidas diluídas, seco em estufa. Após a ambientação do frasco, em profundidade aproximada de 15 cm, as amostras eram coletadas e transportadas para o laboratório, onde eram filtradas no mesmo dia, sequencialmente em filtros de 14, 2 e 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. Após a filtração as amostras de água eram guardadas em geladeira a 5 °C, até o momento da análise, que era feita no dia seguinte.

#### **3.3.1 Detalhes de coleta de água superficial**

A coleta de águas superficiais deve observar algumas condições para evitar o aporte excessivo de matéria orgânica oriunda de drenagem do solo (compostos húmicos e fúlvicos). De um modo geral, no dia em que ocorre uma precipitação e nos dias subsequentes, ocorre o carregamento de nutrientes do solo para os corpos hídricos. Em regiões com pavimentação e rodovias pode ocorrer o aporte de material depositado sobre as pistas, como resíduos de óleo, combustíveis, graxas, além de resíduos plásticos. Em regiões agrícolas pode ocorrer o carregamento de parcelas superficiais do solo, com material orgânico em suspensão, além de fertilizantes e pesticidas. Em regiões urbanas, além dos resíduos de óleos e graxas das ruas, pode ocorrer o transbordamento de fossas sépticas e esgotos em geral para os cursos d'água. Desta forma, procurou-se evitar a coleta de água superficial em pelo menos 3 dias após um evento de chuvas, para evitar estes fatores citados, que podem alterar drasticamente a composição físico-química da água analisada, e, conseqüentemente, alterar os resultados obtidos.

### **3.4 Sistema SPE para a pré-concentração das amostras**

O sistema é composto por uma cuba de vidro onde é feito o vácuo e que possui na parte superior um tampa em material plástico, com os orifícios para encaixe dos cartuchos de SPE. O modelo utilizado possui capacidade para uso simultâneo de 12 cartuchos. O líquido filtrado através dos cartuchos é recolhido numa vasilha plástica para descarte.

Ao final do processo os analitos são eluídos em tubos de polipropileno. A vazão deve ser o mais constante possível, sendo adotada neste trabalho a vazão média de 2 mL/min.

### **3.5 Volume de quebra**

Para determinação das melhores condições para a SPE, com base na revisão bibliográfica realizada, definiu-se uma massa de 25 nanogramas dos analitos, em solução, para testes de volume de quebra. Os volumes testados foram de 100 mL, 250 mL e 500 mL em três matrizes (água ultrapura, água da torneira e água superficial). Após a adição de 25 ng dos analitos (solução padrão) em cada um dos volumes, estes foram processados por SPE e foram avaliados os valores obtidos nos três volumes.

### **3.6 Procedimento para a extração fase sólida e pré-concentração dos compostos**

A ativação dos cartuchos foi feita 3 mL de metanol (0,3 % ácido acético) seguido de 3 mL de acetona (0,3 % ácido acético) e posteriormente, para equilibrar o cartucho, era percolado 3 mL de água (5% metanol).

Em seguida adicionava-se o volume de água definido na etapa da quebra de volume (250 mL), na vazão de 2 mL/minuto, até a secagem total, sem deixar o cartucho ficar sem líquido, para evitar a formação de caminhos preferenciais através da fase estacionária. Após a passagem do volume amostral, deixava-se em vácuo por 5 minutos e fazia-se a eluição dos analitos em 6 mL de acetona (0,3 % ácido acético) e 6 mL de metanol (0,3 % ácido acético). Este eluato era recolhido em tubos de polipropileno e concentrados, a 45°, até a secura total, em corrente de nitrogênio ultrapuro. Este extrato seco era então retomado em 1 mL da mistura água:acetonitrila (90:10).

### **3.7 Instrumentação**

Os equipamentos utilizados durante o estudo experimental foram os seguintes:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE- DAD) da marca Shimadzu, equipado com degaseificador DGU – 20 A5, controlador e autosampler SIL - HT – C, Detector UV-VIS SPD20A, Detector DAD SPD-M 20A, bomba LC 20 AT;

- A coluna analítica usada no HPLC-DAD foi Nucleodur®, C18 fase reversa, com dimensões de 150 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm.
- Sistema LC-MS-MS- cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent, modelo 1260 Infinity, equipado com:
  - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
  - Espectrômetro ABSciex Qtrap 5500 triplo quadrupolo, em modo tandem, equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI), podendo operar no modo positivo e negativo simultaneamente, ilustrado pela figura 11;

**Figura 11 – Espectrômetro de massas AB Sciex - QTRAP 5500**



**Fonte: Manual do espectrometro AB SCIEX 5500 Series of Instruments.**

- Sistema de aquisição de dados através do software Analyst (Applied Biosystems);
- Sistema gerador de nitrogênio *in site* da marca Atlas Copco, modelo SF4FF, com pureza acima de 99%;
- A coluna cromatográfica usada no LC-MS-MS foi a Durashell RP (Agela Technologies®), fenil hexil, 3 mcm, 150 A°, 2,1 x 100 mm;
- Sistema de ultrapurificação de água, resistividade 0,05 microsiemens, Gehaka Master System;
- Bomba à vácuo Primatec modelo 131;
- Manifold para SPE Phenomenex para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- Concentrador de amostras TECVAP, marca Tecnal®, modelo TE-0194, com sistema de injeção com 50 agulhas, controle de temperatura, conectado a gerador de nitrogênio Peak Scientific, modelo AB3G.



### 3.8 Abordagem 1 - CCD e HPLC com detector de arranjo de diodos

Uma vez revisadas as principais técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais, iniciou-se a avaliação da melhor abordagem analítica.

Inicialmente foram feitas tentativas de determinação das melhores combinações de solvente para a obtenção da fase móvel para separar os agrotóxicos selecionados. TUZIMSKI (2002) analisou, em 50 pesticidas, a correlação entre razão de fluxo e o fator de capacidade nas técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando fase estacionária de C18 fase reversa. Os resultados obtidos indicam que é possível utilizar os dados obtidos na CCD para economizar tempo no desenvolvimento do método e otimizar as condições experimentais a serem usadas na HPLC.

Desta forma, foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de CCD com fase estacionária C18 (fase reversa) para testar a melhor combinação de solventes na fase móvel:

- 1) Acetonitrila : Água – 50:50, sem controle de pH.
- 2) Acetonitrila : Água – 50:50, pH 3,5 (ácido fosfórico).
- 3) Acetonitrila : Água – 60:40, pH 3,5 (ácido fosfórico).
- 4) Acetonitrila : Metanol : Água – 24:46:30, pH 3,5 (ácido fosfórico).
- 5) Acetonitrila : Metanol : Água – 50:10:40, pH 3,5 (ácido fosfórico).
- 6) Acetonitrila : Metanol : Água – 50:20:30, pH 3,5 (ácido fosfórico).
- 7) Acetonitrila : Metanol : Água – 50:15:35, pH 3,5 (ácido fosfórico).

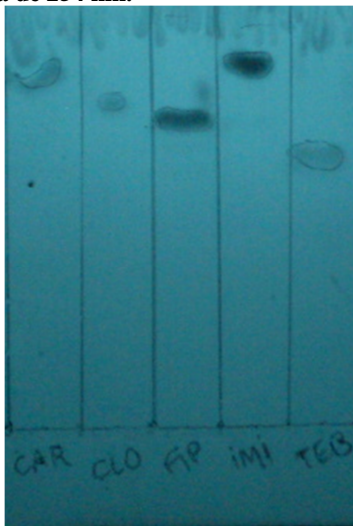
A fase móvel que proporcionou melhor separação dos cinco agrotóxicos selecionados em CCD foi a combinação acetonitrila: metanol : água – 50:15:35, com ajuste de pH até 3,5 com ácido fosfórico. A tabela 6 mostra a separação obtida pelo índice de retenção ( $R_f$ ) para os agrotóxicos separados na fase móvel citada. O valor do  $R_f$  é calculado pela razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente.

**Tabela 6 –  $R_f$ s obtidos para os agrotóxicos.**

<b>Agrotóxico</b>	<b><math>R_f</math></b>
Tebuconazol	0,44
Fipronil	0,47
Clomazona	0,56
Carbofurano	0,67
Imidacloprido	0,77

**Fonte: Desenvolvido pelo autor.**

**Figura 12 – Placa de ccd com a combinação de fase móvel acetonitrila: metanol : água – 50:15:35. Leitura sob radiação ultravioleta em comprimento de onda de 254 nm.**

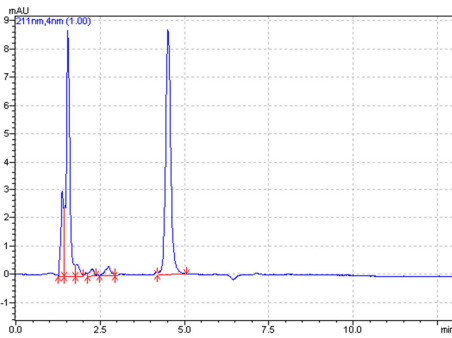


Esta fase móvel foi então usada para avaliar a separação dos agrotóxicos no HPLC– DAD descrito na seção 3.7, em condições isocráticas. O fluxo foi de 1 mL/min., com volume injetado de 20  $\mu$ L. Os cinco analitos foram injetados individualmente, diluídos em acetonitrila, na concentração de 50 ng/mL, e os cromatogramas obtidos indicaram que com este sistema houve uma boa separação dos analitos, conforme tabela 7:

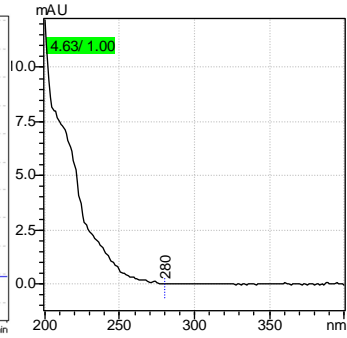
**Tabela 7 – Tempo de retenção dos agrotóxicos no sistema cromatográfico descrito.**

Agrotóxico	Tempo de retenção (min.)	UV MAX. ( $\lambda$ )
Imidacloprido	1,99	212 e 270
Carbofurano	2,92	276
Clomazona	4,63	208 e 211
Tebuconazol	7,21	221
Fipronil	9,37	286

**Figuras 13 e 14 – Cromatograma obtido para clomazona 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.**

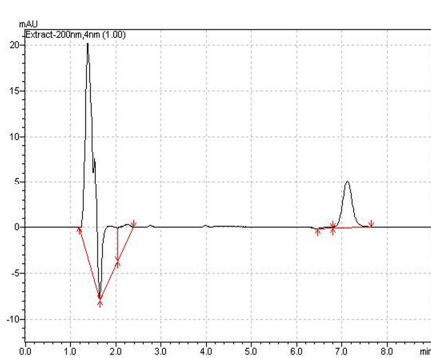


13

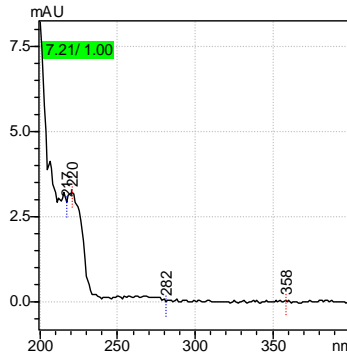


14

**Figuras 15 e 16 – Cromatograma obtido para tebuconazol 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.**

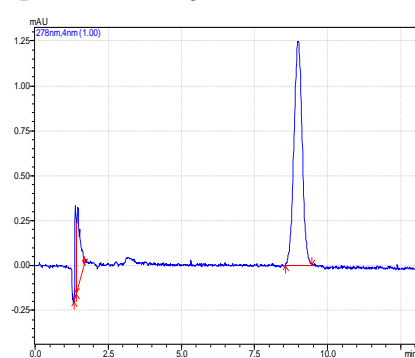


15

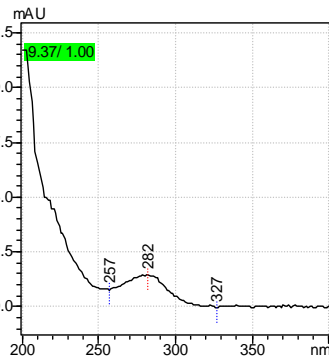


16

**Figuras 17 e 18 – Cromatograma obtido para o fipronil 50 ng/mL e o espectro de absorção ultravioleta.**



17



18

Adicionalmente, foram realizados testes com outras composições de fase móvel, para verificar se outras combinações poderiam ser mais interessantes na separação dos analitos. Entretanto, a combinação 50:15:35 de acetonitrila, metanol e água, respectivamente, foi a que resolveu melhor a separação dos agrotóxicos em tempo menor de 10 minutos, conforme tabela 8:

**Tabela 8 – Resultados de combinações de diferentes misturas de fase móvel, modo isocrático.**

	Tr	Tr	Tr	Tr
	ACN 50	ACN 50: MET 20	ACN 50: MET 10	ACN 50: MET 15
Imidacloprido	1,43	1,69	1,95	1,99
Carbofurano	2,82	2,3	NA*	2,92
Clomazona	4,65	3,33	5,42	4,63
Tebuconazol	7,66	4,84	NA	7,21
Fipronil	18,18	5,3	16,09	9,37

\*NA = não analisado.

Uma vez obtida a adequada separação dos cinco agrotóxicos na fase móvel selecionada, com uma resolução adequada, começaram os testes de fortificação em água superficial, que é a matriz com a maior possibilidade de apresentar interferentes para a metodologia escolhida. Para tanto, foi feita a fortificação com os agrotóxicos selecionados, e posterior concentração em cartuchos de extração em fase sólida.

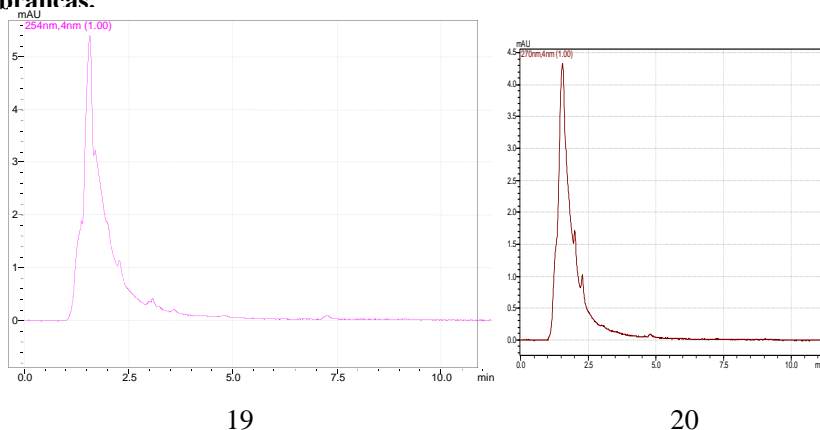
Foi coletada água superficial num arroio situado em região sem atividade agrícola, no bairro Ponta Grossa, em Porto Alegre, RS. Foi coletado um volume de dois litros, filtrado em papel com porosidade de 14 µm e posterior filtração em membrana com poros de 0,45 µm. Esta água superficial filtrada foi então dividida em duas amostras, uma chamada de amostra branca, e a outra chamada de amostra fortificada. Foi definido um volume experimental de 60 mL para cada amostra, onde foram adicionados os agrotóxicos misturados num pool, com uma mistura dos cinco agrotóxicos, em concentração de 500 ng, em massa. As soluções foram acidificadas com ácido fórmico 0,1%, para melhorar a interação dos analitos mais polares. A concentração final desta solução fortificada ficou em 8,3 ppb (mcg/L) para cada agrotóxico.

Em cartuchos de extração em fase sólida do tipo Strata X<sup>®</sup> foi realizada a concentração das amostras fortificadas em água superficial e

das amostras de água superficial não fortificada, sendo usados cinco cartuchos para cada matriz.

O procedimento experimental iniciou com a sequência de ativação do cartucho com metanol (3 mL), água (3 mL), água:ácido fórmico 0,1 % (3 mL). Posteriormente foram concentradas as amostras brancas e as amostras fortificadas. A remoção dos interferentes foi com água (ácido fórmico 0,1%):acetonitrila (10%) em 2 alíquotas com 3 ml. A eluição foi com 2 mL de acetonitrila. Este volume foi evaporado em nitrogênio ultrapuro. Posteriormente foi ressuspensionado a 1 mL com a fase móvel. Considerando uma recuperação de 100 % (ideal) as soluções finais apresentariam uma concentração de 500 ppb (ng/mL ou µg/L).

### Figuras 19 e 20 – Cromatogramas obtidos com a injeção de amostras brancas.



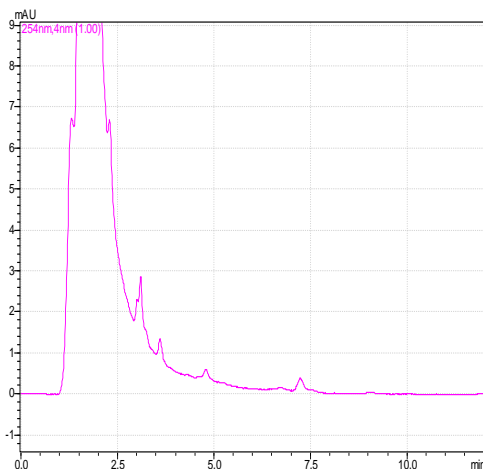
Os resultados obtidos para as amostras em água superficial branca apresentaram um pico de grande intensidade no início do cromatograma que se estende até os cinco minutos, aproximadamente. Além deste pico, ocorrem pequenos picos de pequena intensidade ao longo do cromatograma, em tempos diferentes daqueles observados para os padrões injetados. Estes picos são de substâncias húmicas e fúlvicas presentes em águas naturais e já foram descritos em outros trabalhos (CALDAS, 2010; ZANELLA, 2000).

A ocorrência deste grande pico no início do cromatograma acarreta a perda do sinal de dois dos analitos escolhidos, o imidacloprido e o carbofurano, além de interferir com o pico da clomazona, aos 4,63 minutos. Este grande pico ocorreu nos cinco cartuchos com amostra do branco.

O mesmo perfil de interferência observou-se nos outros cartuchos obtidos de matriz fortificada. Foram detectados outros analitos de interesse, como o fipronil, aos 9,15 minutos, porém a perda de sinal de dois analitos inviabilizou a utilização da fase móvel desenvolvida.

Os cromatogramas obtidos para a água superficial fortificada com os agrotóxicos apresentaram este pico da mesma forma, conforme figura 21:

**Figura 21 - Cromatograma obtido num cartucho de SPE da amostra superficial fortificada.**



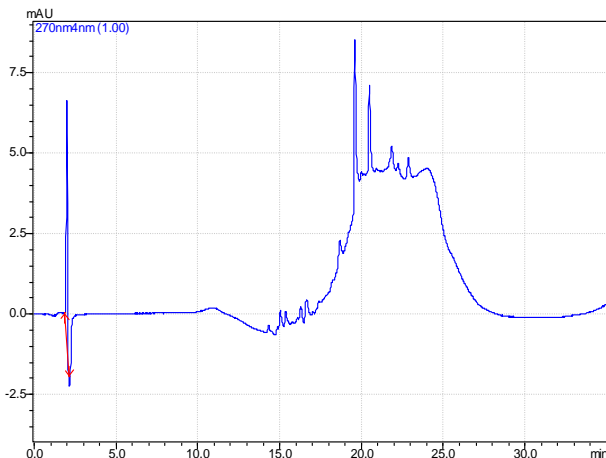
Para tentar reduzir este efeito da matriz no início do cromatograma, iniciou-se nova análise de fase móvel, desta vez em gradiente. Os padrões de agrotóxicos foram diluídos em acetonitrila, com concentração de 50 ng/mL, foi usada a mesma coluna cromatográfica e o fluxo foi de 1 mL/min, volume injetado de 20  $\mu$ L. A fase móvel escolhida foi acetonitrila:água (ac.formico 10%) em gradiente, conforme tabela 9:

**Tabela 9 – Detalhes do Gradiente 1.**

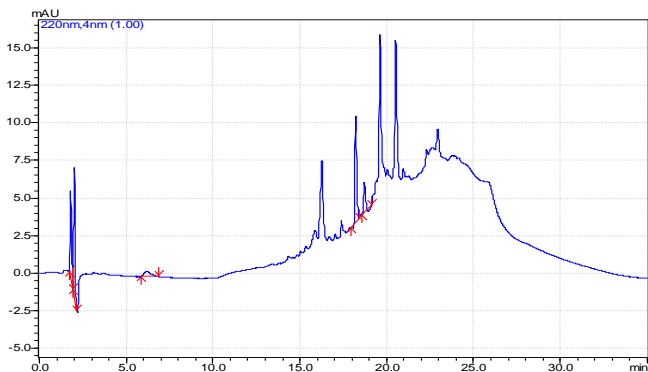
Tempo (min)	Gradiente ACN %
0,01	10
5,00	10
5,01	10
15	90
20	90
30	10
35	10

As figuras abaixo são respectivamente o cromatograma e a varredura ultravioleta para o pico de 19,64 minutos, obtida com o gradiente 1, através da injeção de acetonitrila como analito, para verificar a ocorrência de picos fantasmas:

**Figura 22 - Cromatograma obtido com o gradiente 1, injetando acetonitrila.**



**Figura 23 – Cromatograma obtido para o tebuconazol, 50 ng/mL, gradiente 1, em 220 nm.**



Este perfil de gradiente foi constante para os cinco agrotóxicos, com a ocorrência dos picos dos analitos de interesse no intervalo entre 10 e 20 minutos, porém com diversos picos fantasmas, como o grande

pico aos 19,64 minutos, inclusive quando é injetado somente acetonitrila.

WILLIAMS (2004) avaliou a existência de picos fantasmas em gradientes de HPLC e concluiu que estes podem ser atribuídos a diversas causas, entre eles:

- a) mecanismo de “enriquecimento” de traços em colunas analíticas que normalmente operam com sistemas isocráticos e que são submetidos a gradientes, liberando estes compostos ao variar a composição da fase móvel;
- b) impurezas presentes na acetonitrila e na água ultrapura, que nos níveis utilizados para a análise dos agrotóxicos podem interferir nas análises. Os solventes usados foram do tipo recomendado para HPLC, porém ocorreram trocas de lotes e fabricantes ao longo das análises, de forma que podem ter ocorrido pequenas variações;
- c) ftalatos, que podem estar presentes nos frascos utilizados e que o solvente pode extrair ao entrar em contato com a superfície do plástico.

Nova tentativa foi feita com outro gradiente. As condições gerais foram mantidas, os agrotóxicos diluídos em acetonitrila, concentração de 50 ng/mL, foi usada a mesma coluna analítica e o fluxo foi de 1 mL/min, volume injetado de 20 µL. A fase móvel escolhida foi acetonitrila:água (ac.formico 10%) em gradiente, conforme tabela 10:

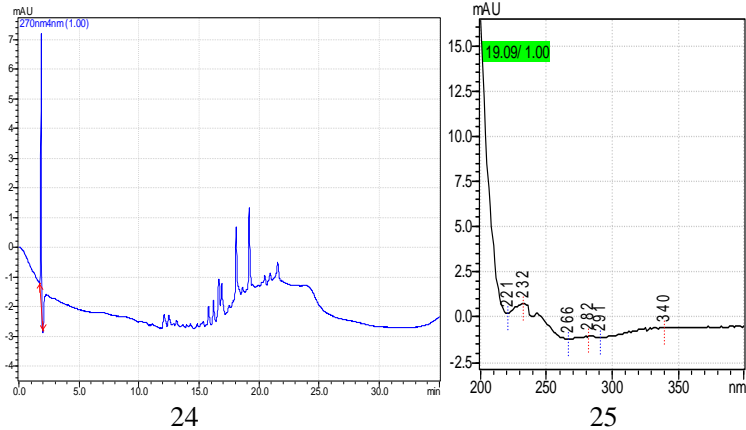
**Tabela 10 – Detalhes do Gradiente 2.**

Tempo (min)	Gradiente ACN %
0,01	10
1,50	10
1,51	10
15,00	90
20,00	90
30,00	10
35,00	10

A figura abaixo é um cromatograma obtido no gradiente citado com a injeção de acetonitrila, sendo visualizado um pico aos 19,09 min., cuja varredura não identificou nenhum composto de interesse:

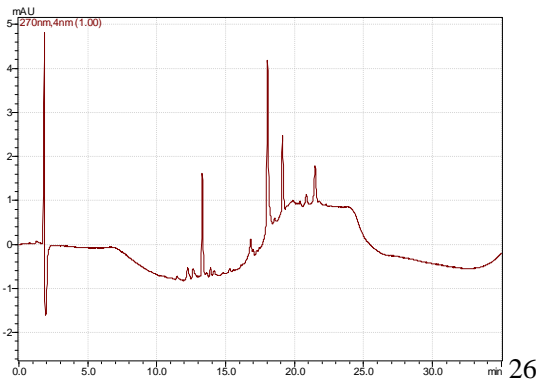


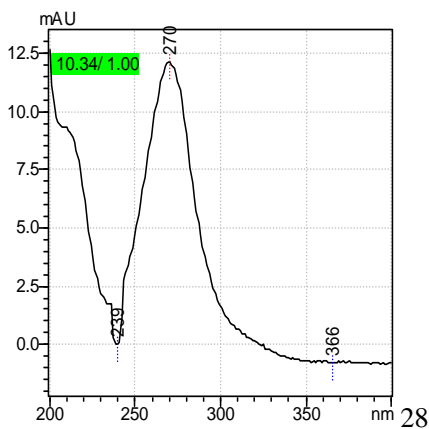
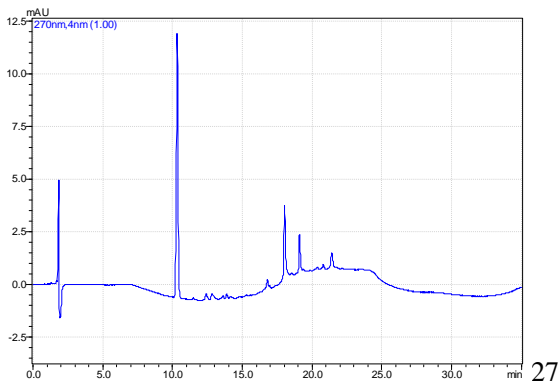
**Figuras 24 e 25 – Cromatogramas obtidos com a injeção de acetonitrila, gradiente 2, e a varredura do pico de 19,09 minutos em 270 nm.**



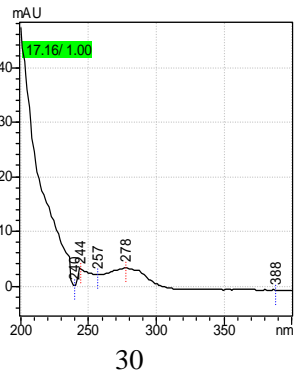
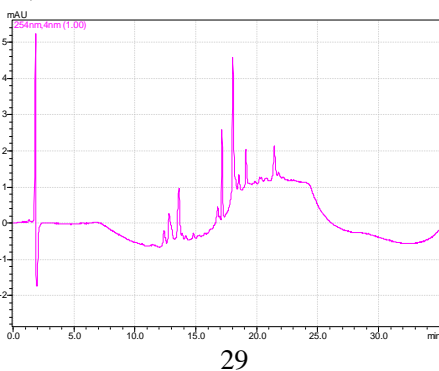
Outros cromatogramas obtidos com o gradiente 2 podem ser visto nas figuras abaixo:

**Figuras 26, 27 e 28 – Cromatogramas obtidos com a injeção de imidacloprido 50 µg/L em gradiente, comprimentos de onda 254 nm; 270 nm; Varredura UV pico com Tr. de 10,34 min.**





**Figuras 29 e 30 – Cromatogramas obtido com a injeção de fipronil, 50 µg/L em gradiente, comprimentos de onda 254 nm e varredura do pico com Tr de 17,16 min.**



A tabela 11 resume os tempos obtidos para a separação dos agrotóxicos obtidos com os dois gradientes:

**Tabela 11 – Gradientes testados.**

	GRADIENTE 1	GRADIENTE 2
	Tr	Tr
Imidacloprido	13,556	10,29
Carbofurano	15,932	13,29
Clomazona	17,33	15,06
Tebuconazol	18,212	-
Fipronil	18,78	17,1

Desta forma, falharam as tentativas de determinação dos agrotóxicos em modo isocrático pela ocorrência de um grande pico no início do cromatograma, devido aos compostos húmicos e fúlvicos. Com o bombeamento no modo gradiente ocorreram picos fantasmas de forma persistente. A solução adotada foi mudar o detector, partindo para o uso de um espectrômetro do tipo massas.

### **3.9 Abordagem 2 - Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica empregando LC- MS/MS**

O desenvolvimento de uma metodologia por LC-MS/MS se dá através de três passos: otimização das melhores condições para a fragmentação do analito (realizado por infusão), otimização das condições da fonte de ionização (realizado por FIA – do inglês, flow injection analysis) e otimização das condições da cromatografia líquida, nesta ordem.

A primeira etapa, a infusão, é a entrada de solução contendo os analitos por fluxo contínuo, geralmente em concentração maior do que a de trabalho (entre 100 e 500 ng/mL), com fluxo variando entre 5 e 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando-se uma seringa conectada a um pistão (integrante do equipamento). A infusão permite que seja obtida uma resposta imediata do sinal quando for realizada alguma alteração nos parâmetros de massas permitindo otimizar a ionização e fragmentação rapidamente. Estes parâmetros estão relacionados a parte do analisador de massas. Os parâmetros otimizados são CAD (CAD Gás, que controla a pressão do gás de colisão durante o Q3 scan e MS/MS scans), DP (Declustering Potential, controla a voltagem no orifício de entrada do triplo quadrupolo), EP (Entrance Potential, controla o potencial de entrada dos analitos no Q0), CXP (Collision Cell Exit Potential, controla o

potencial da saída da célula de colisão Q2), CE (Collision Energy, controla o potencial aplicado na célula de colisão Q2), entre outros.

A etapa seguinte é o FIA que tem por objetivo ajustar as condições de ionização do analito, de forma que a maior parcela possível de moléculas do analito seja convertida para a forma ionizada e entre no analisador. É necessária a utilização de uma bomba de cromatografia líquida e um amostrador automático. Uma pequena quantidade de solução padrão de analito é injetada pelo amostrador automático na corrente da cromatografia líquida sem a coluna. Múltiplas injeções da solução são realizadas durante o processo de otimização, com alteração dos parâmetros entre as injeções. Essa etapa ocorre na fonte de ionização do equipamento. Os parâmetros otimizados nessa etapa são GS1 (Gas 1, controla o gás de nebulização, que ajuda na dessolvatação da amostras, restando apenas pequenas gotas), GS2 (Gas 2, controla o gás auxiliar, responsável pela evaporação das pequenas gotas restantes da amostra e por prevenir a entrada de solvente no equipamento), TEM (Temperature, temperatura do aquecedor, auxilia na evaporação do solvente), CUR (Curtain Gas, o gás com fluxo entre o curtain plate e o orifício de entrada para o triplo quadrupolo) e IS (Ion Spray Voltage, controla a voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte).

Após a realização de testes na etapa de pré-validação da metodologia descrita neste trabalho, foi observado que, para os cinco agrotóxicos selecionados, quatro devem ser analisados no modo positivo e um deve ser analisado no modo negativo, pois os resultados indicaram serem estas as melhores formas de ionização.

Após a otimização supradescrita, as condições da separação cromatográfica são ajustadas. Os fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de um método de LC é o modo de ionização selecionado, a coluna analítica a ser utilizada (fase estacionária, diâmetro), a fase móvel utilizada, que pode afetar tanto a cromatografia como o processo de ionização, ou seja, a composição tem de garantir uma boa ionização e uma boa separação cromatográfica (pH, solventes, aditivos e temperatura). No presente caso, a fase móvel havia sido extensivamente avaliada nos testes realizados na abordagem 1, supradescrita.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico em gradiente. Foi mantido um fluxo de 300  $\mu\text{L}/\text{min.}$ , com volume injetado de 4  $\mu\text{L}$ . A tabela 12 apresenta o gradiente usado:

**Tabela 12 - Gradiente usado na cromatografia.**

Tempo	Fluxo	Água	ACN
3	300	80	20
10	300	5	95
15	300	5	95
16	300	80	20

### **3.10 Validação do método para determinação de agrotóxicos em amostras aquosas**

#### **3.11 Seletividade**

A seletividade do método foi estimada com a comparação entre a matriz isenta das substâncias de interesse (testemunha) e a matriz contendo os analitos (matriz fortificada com padrões analíticos).

#### **3.12 Sensibilidade**

A sensibilidade de cada analito ao método foi representada pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica. A sensibilidade relaciona a variação da resposta do equipamento com a concentração do analito, e foi expressa pelo coeficiente angular da curva analítica.

#### **3.13 Linearidade**

Foram construídas duas curvas de calibração em solvente composta por treze pontos, com concentração de 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ng/mL, adicionando volumes da solução padrão na mistura acetonitrila:água (10:90).

Num segundo momento, foram construídas duas curvas de calibração em solvente composta por sete pontos, com concentração de 0; 10; 25, 50, 100, 150; 200 ng/mL, adicionando volumes da solução padrão na mistura acetonitrila:água (10:90).

Para curvas construídas em matriz foram adicionados os volumes de solução trabalho referentes para obtenção das concentrações de 0; 10; 25, 50, 100, 150; 200 ng/mL, no vial. O volume escolhido foi de 250 mL de água superficial filtrada e após a fortificação com os analitos, estas amostras foram processadas por SPE. Uma curva analítica construída em matriz, com concentração final dos analitos, no vial, variando de 10 a 200 ng/mL, corresponde a uma concentração inicial

real que varia de 0,04 a 0,8 ng/mL (40 a 800 ppt) no balão volumétrico de 250 mL, considerando recuperação de 100%.

Através das curvas de calibração obtida nestas faixas de trabalho, avaliou-se a linearidade do método.

### **3.14 Faixa Linear de Trabalho**

Para avaliar a faixa linear de trabalho foi feito o teste de razão entre o sinal (área) e a concentração, definida por  $(S/Q_i) = (S_i - a)/Q_i$ , citada no item 6.3.1.

Foram estabelecidos limites de 90 a 110 % de tolerancia para os resíduos.

### **3.15 Limite de Deteção instrumental (LDi) e Limite de Quantificação instrumental (LQi)**

A matriz escolhida foi a água superficial, concentração de 10 ng/mL.

O limite de detecção do equipamento para cada analito foi determinado como sendo três vezes a razão sinal/ruído.

O limite de quantificação do equipamento para cada analito foi determinado como sendo dez vezes a razão sinal/ruído.

### **3.16 Limite de Deteção do método (LDm) e Limite de Quantificação do Método (LQm)**

O valor de 250 é o fator de concentração trabalhado nas amostras, resultando na concentração real ambiental que é possível detectar.

Para o limite de detecção do método foi feita a relação  $LDi/250$ .

Para o limite de quantificação do método foi feita a relação  $LQi/250$ .

### **3.17 Efeito Matriz**

A avaliação do efeito de matriz foi realizada de duas formas:

1) de forma pontual, sobre a resposta de cada analito é feita a comparação da área obtida em três amostras fortificadas (50 ng) e processadas por SPE em três frascos onde foram adicionados diretamente 50 ng dos analitos. A comparação pode ser feita pela equação 5, abaixo:

### Equação 5

$$\text{supressão do sinal (\%)} = 100 - ((\text{área}_{\text{matriz}} - \text{área}_{\text{branco}}) \times 100) / \text{área}_{\text{solvente}}$$

2) através da relação entre o coeficiente angular da curva de calibração em solvente com o coeficiente angular da curva em matriz. O limite de variação percentual de 10% pode ser um critério definido para a realização da curva em solvente ou em matriz.

### 3.18 Exatidão (Recuperação)

Para avaliar a recuperação foram processadas 06 amostras processadas pelo método SPE: três amostras fortificadas com 50 ng dos analitos (solução padrão) e três amostras brancas. As amostras brancas são fortificadas ao final da extração com 50 ng dos analitos, antes da injeção no LC, e são consideradas o 100%, para comparação com amostras fortificadas antes do processo extrativo.

A recuperação é calculada conforme a equação 6, abaixo:

#### Equação 6

$$R (\%) = (\text{massa obtida} \times 100) / \text{massa real}$$

Os limites máximos permitidos, para análise de resíduos, geralmente ficam entre 70 a 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . (RIBANI, 2004).

### 3.19 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)

Para avaliar a repetibilidade foram fortificadas 15 amostras de água superficial (250 mL) com 50 ng dos analitos (solução padrão), seguida da extração por SPE. Este processo foi dividido em três dias, com o processamento de 5 amostras por dia. (JELIC, 2009).

Para a avaliar a reprodutibilidade foram fortificadas 15 amostras de águas superficiais (250 mL) com 50 ng dos analitos (solução padrão), com a posterior extração por SPE. O procedimento foi repetido por três dias. (JELIC, 2009).

Para avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade, optou-se pela utilização da equação de Horwitz (HORWITZ, 2003), abaixo:

#### Equação 7

$$RSDr < [2 (1 - 0,5 \log C)],$$

onde:

RSDr = desvio padrão relativo das amostras referentes à repetibilidade;  
C = concentração.

Na concentração de trabalho (50 ng/mL), conforme a equação 7, os valores resultantes permitidos para RSDr são de 25 %. Entretanto, em condições mais exigentes, para métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20 %. (RIBANI, 2004).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Sistema de LC-MS-MS para a determinação dos resíduos de agrotóxicos

Foi feita a infusão da solução padrão de cada um dos analitos, separadamente, em concentrações entre 200 a 400 ng/mL, num fluxo de 10  $\mu$ L/min., foram utilizadas para estabelecer os parâmetros do analisador de massas. Os resultados estão descritos na tabela 13:

**Tabela 13. Parâmetros otimizados para o analisador de massas dos analitos e por ionização por eletrospray no modo positivo. \*Fipronil no modo negativo.**

Analito	Íon Molecular [M+H <sup>+</sup> ] (m/z)	Fragmento (m/z)		DP Declustering Potential	CXP Collision Exit Cell Potential	CE Energia de colisão (eV)
Carbofurano	222,2	165,2	Identificação	70	10	20
Carbofurano	222,2	123,1	Quantificação	70	10	35
Clomazona	240,064	125	Quantificação	61	10	27
Clomazona	240,064	99	Identificação	61	10	81
Fipronil*	434,84	329,8	Identificação	-55	-25	-24
Fipronil*	434,84	249,9	Quantificação	-55	-13	-38
Imidacloprido	256,1	175,1	Identificação	60	10	30
Imidacloprido	256,1	209,1	Quantificação	60	10	28
Tebuconazol	308,2	70	Quantificação	60	10	24
Tebuconazol	308,2	125	Identificação	60	10	35



			ão			
--	--	--	----	--	--	--

Para cada analito foram selecionados dois fragmentos característicos, sendo o fragmento mais intenso o escolhido para quantificação e o segundo fragmento, menos intenso, para identificação. A vantagem de obter dois fragmentos está na especificidade, distinguindo a estrutura do analito dos interferentes presentes na matriz.

O FIA foi realizado com uma solução mista dos analitos na concentração de 50 ng/mL para determinar os parâmetros da ionização. A solução foi analisada diversas vezes; sendo as variações dos parâmetros testadas, em duplicata, e o melhor resultado foi selecionado automaticamente pelo equipamento e encontra-se descrito nas tabelas 14 e 15.

**Tabela 14 – Parâmetros para ionização por eletrospray no modo positivo.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Potencial de Entrada (EP)	10 V
Gás de colisão (CAD)	High
Gás de cortina (CUR)	30 psi
Gás de Nebulização (GS1)	55 psi
Gás Auxiliar (GS2)	55 psi
Voltagem do Spray Eletrônico (IS)	5500 V
Temperatura, °C (TEM)	500 °C

**Tabela 15 – Parâmetros para ionização por eletrospray no modo negativo.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Potencial de Entrada (EP)	-10 V
Gás de colisão (CAD)	High
Gás de cortina (CUR)	30 psi
Gás de Nebulização (GS1)	55 psi
Gás Auxiliar (GS2)	55 psi
Voltagem do Spray Eletrônico (IS)	-4500 V
Temperatura, °C (TEM)	500 °C

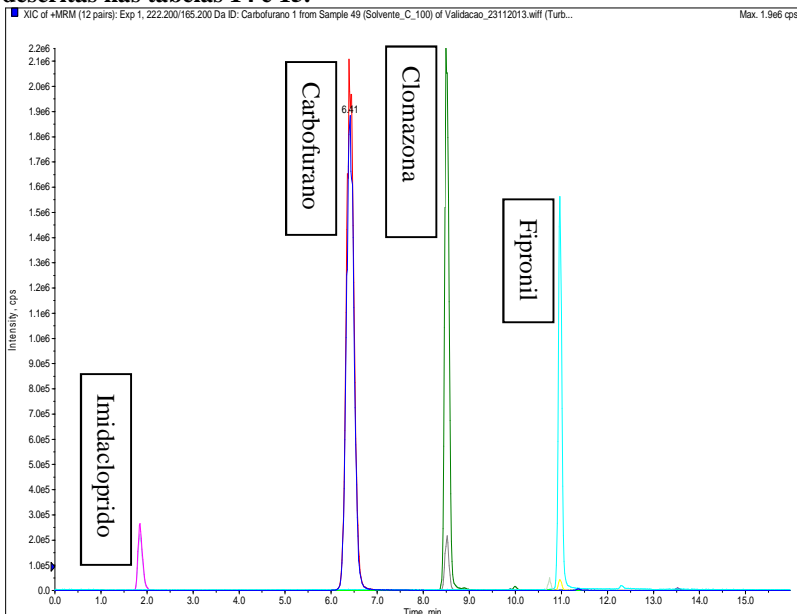
#### 4.2 Seletividade

O uso de espectrometros MS-MS em tandem, no modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM) permite a identificação e a separação de cada transição monitorada para os analitos de interesse. Desta forma, fazendo uso de padrões de referência com origem determinada, definindo seu tempo de retenção e monitorando duas transições específicas para a molécula em questão, obtemos uma resposta com três confirmações.

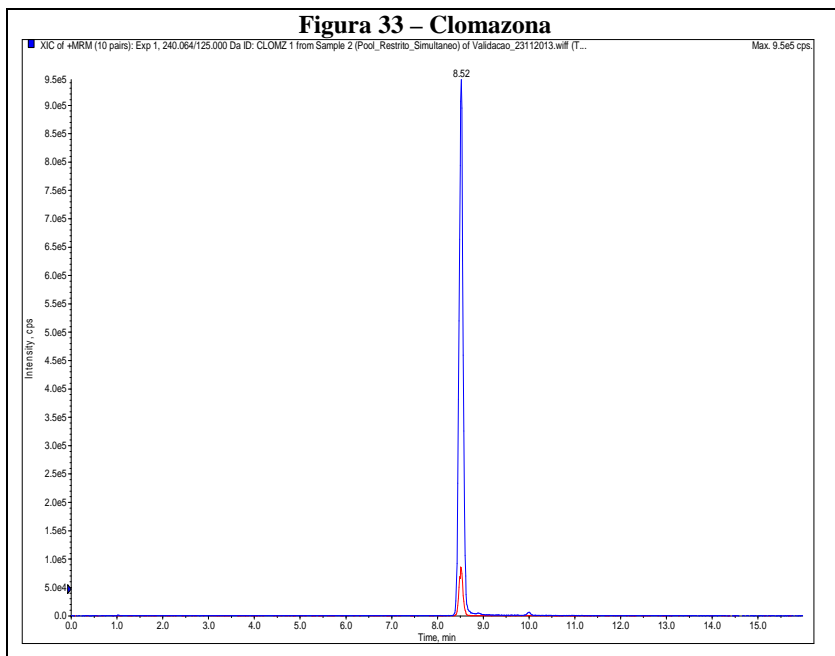
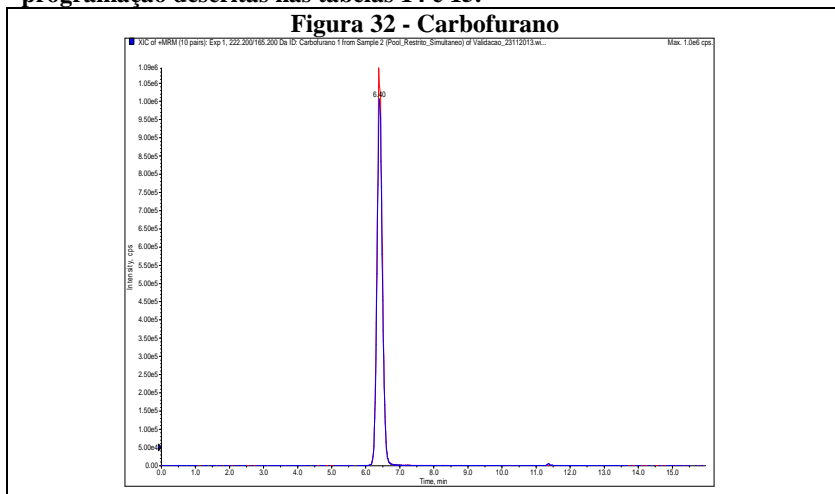
**Tabela 16 – Tempo de retenção dos agrotóxicos no sistema cromatográfico descrito.**

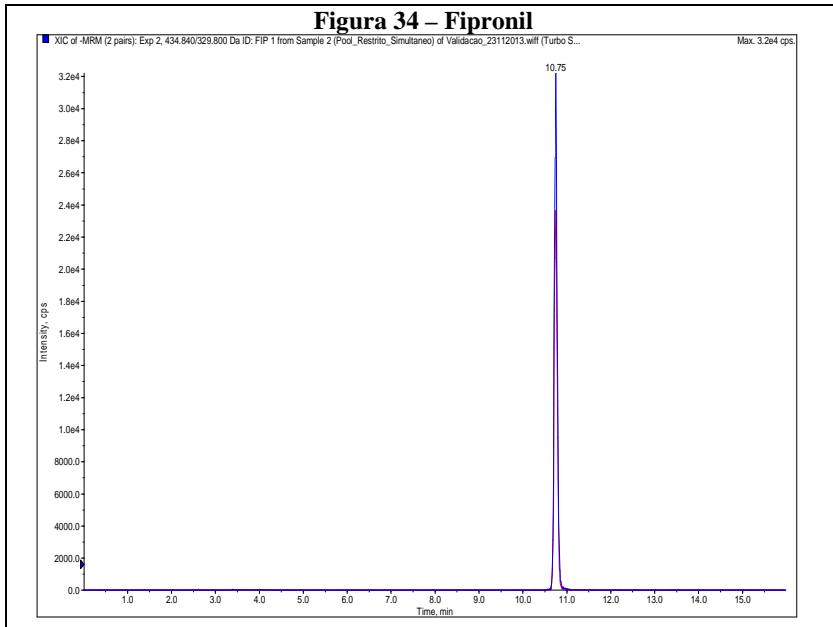
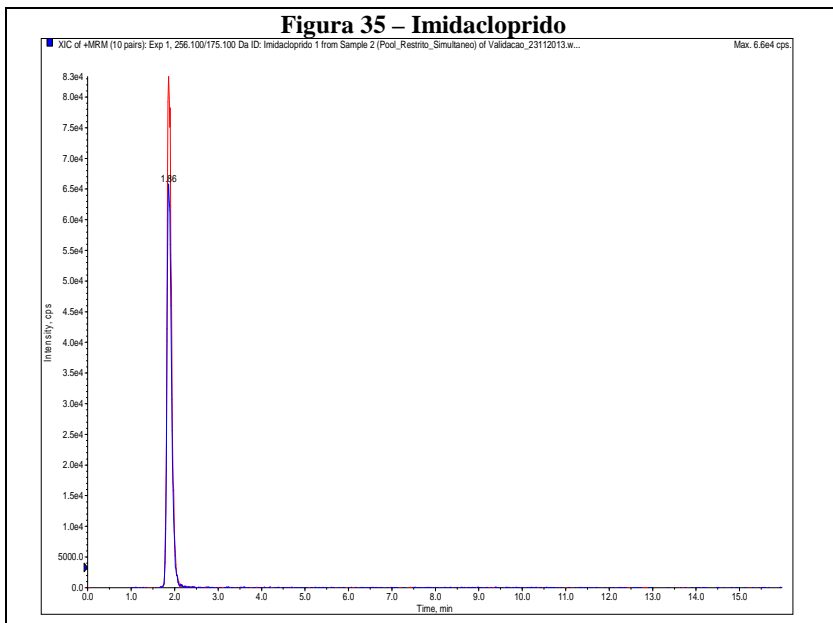
<b>Agrotóxico</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
Imidacloprido	1,84
Carbofurano	6,39
Clomazona	8,50
Fipronil	10,97
Tebuconazol	13,52

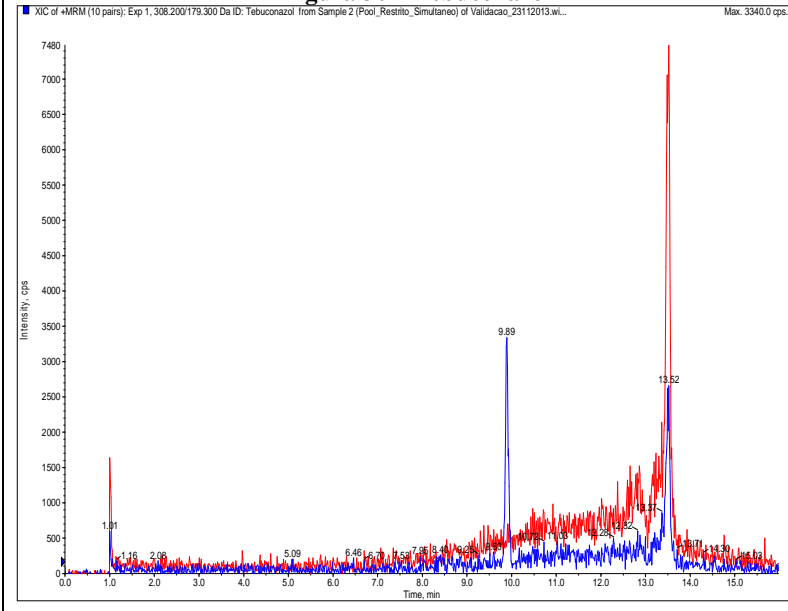
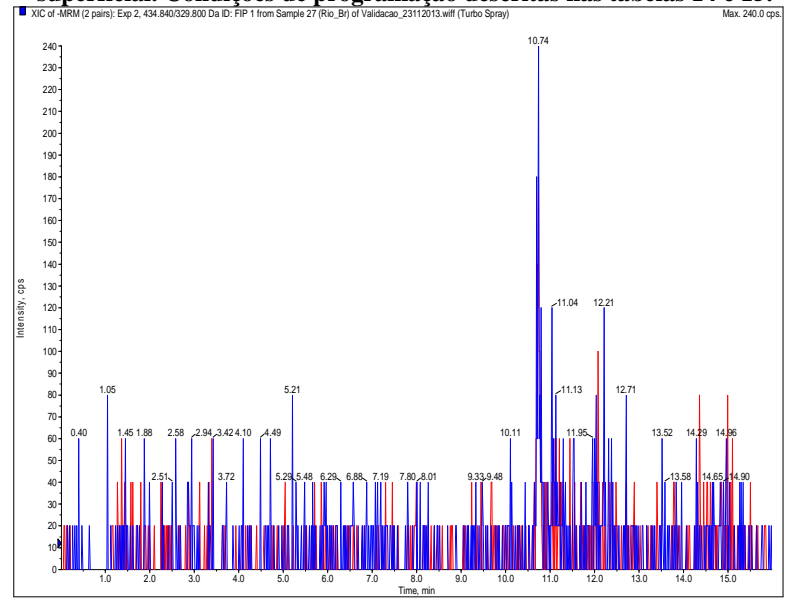
**Figura 31 – Cromatograma no modo MRM, da solução dos cinco analitos em solvente, na concentração de 100 ng/mL. Condições de programação descritas nas tabelas 14 e 15.**



**Figuras 32 a 36 –Cromatogramas com as duas transições monitoradas de cada analito, em solvente, na concentração de 50 ng/mL. Condições de programação descritas nas tabelas 14 e 15.**



**Figura 34 – Fipronil****Figura 35 – Imidacloprido**

**Figura 36 – Tebuconazol****Figura 37 – Cromatograma no modo MRM, da matriz branca de água superficial. Condições de programação descritas nas tabelas 14 e 15.**

### 4.3 Volume de quebra

Foram testados três volumes de amostras, 100, 250 e 500 mL. Foram testadas as matrizes: água ultrapura, água de torneira, água de rio. A massa adicionada nas amostras foi de 25 nanogramas. Os valores obtidos indicaram que entre os valores recuperados para volumes de 100, 250 e 500 mL não ocorreram diferenças significativas. Foi escolhido o volume de 250 mL porque este apresenta uma boa concentração dos analitos e evita a concentração elevada de interferentes da matriz, que no volume de 500 mL poderiam ocasionar maior supressão iônica. A coloração final dos extratos foi gradativamente mais escura, indicando o aporte de crescente de interferentes. A tabela 17 apresenta os valores obtidos para o volume de quebra:

Tabela 17 – valores obtidos para o volume de quebra.

<b>Água de torneira</b>	100 mL	250 mL	500 mL
Carbofurano	16,30	12,97	14,17
Clomazona	13,31	12,23	13,79
Fipronil	17,51	16,35	15,21
Imidacloprido	24,42	13,23	14,19
<b>Água de rio</b>	100 mL	250 mL	500 mL
Carbofurano	14,17	13,64	9,76
Clomazona	10,64	9,76	6,51
Fipronil	15,51	14,98	13,45
Imidacloprido	16,87	15,97	14,84

### 4.4 Linearidade e sensibilidade

As equações de reta resultantes para os analitos são apresentadas na Tabela 18, juntamente com seu coeficiente de determinação  $r^2$ . Segundo as recomendações do MAPA, 2011, são aceitos valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,95 para curvas preparadas em matriz e de 0,97 para curvas preparadas em solvente.

A sensibilidade do método foi demonstrada pelos elevados valores obtidos para os coeficientes de determinação em todas as curvas de calibração.

Na seção Apêndice A constam todas as curvas de calibração realizadas, com a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) cada uma delas.

Em solvente foram elaboradas três curvas de calibração. A primeira curva foi feita com quatorze pontos para avaliar a melhor faixa

de linearidade. Desta forma, o intervalo de concentração foi entre 0 e 500 ng/mL para os cinco analitos. A tabela 18 apresenta os resultados das curvas:

**Tabela 18 - Dados obtidos na primeira curva de calibração, em solvente.**

Analitos	Equação da reta	$r^2$	Avaliação
Carbofurano	$y = 87177x + 622772$	0,9947	Satisfatória
Clomazona	$y = 31083x + 79001$	0,9993	Satisfatória
Fipronil	$y = 854,34x + 5385,9$	0,9909	Satisfatória
Imidacloprido	$y = 5269,9x - 38348$	0,9859	Satisfatória
Tebuconazol	$y = -2,4353x + 16901$	0,0019	Não satisfatória

O coeficiente de determinação foi superior a 0,98 em quatro dos analitos, sendo o critério linearidade satisfeito para estes analitos. O tebuconazol não apresentou resultados satisfatórios.

A segunda curva foi feita também com quatorze pontos, com o mesmo intervalo de concentração, entre 0 e 500 ng/mL para os cinco analitos. A tabela 19 apresenta os resultados das curvas:

**Tabela 19 - Dados obtidos na segunda curva de calibração, em solvente.**

	Equação da reta	$r^2$	Avaliação
Carbofurano	$y = 83750x + 602654$	0,9935	Satisfatória
Clomazona	$y = 28364x + 11337$	0,9976	Satisfatória
Fipronil	$y = 28364x + 11337$	0,9792	Satisfatória
Imidacloprido	$y = 6906,8x + 10046$	0,987	Satisfatória
Tebuconazol	$y = 26,809x + 16726$	0,6162	Não satisfatória

O coeficiente de determinação foi superior a 0,97 para quatro dos analitos, sendo o critério linearidade satisfeito para estes analitos. O tebuconazol novamente não apresentou resultados satisfatórios.

Como as duas curvas abrangiam duas ordens de grandeza, optou-se por reduzir o número de pontos, notadamente os pontos com concentração mais baixa. Desta forma, a terceira curva foi feita com sete pontos, com intervalo de concentração entre 0 e 200 ng/mL para os cinco analitos. Para o fipronil foi feita a ionização no modo negativo, em função dos baixos valores de correlação observados nas duas primeiras curvas. A tabela 20 apresenta os resultados da nova curva obtida, em solvente:

**Tabela 20 - Dados obtidos na terceira curva de calibração, em solvente.**

	Equação da reta	$r^2$	Avaliação
Carbofurano	$y = 180537x + 4E+06$	0,9916	Satisfatória
Clomazona	$y = 123857x + 746718$	0,9918	Satisfatória
Fipronil	$y = 1117x + 3899,1$	0,9957	Satisfatória
Imidacloprido	$y = 16736x + 54542$	0,9944	Satisfatória
Tebuconazol	$y = 165,51x + 20651$	0,8023	Não satisfatória

O coeficiente de determinação foi superior a 0,99 em quatro dos analitos, sendo o critério linearidade satisfeito para estes analitos. O tebuconazol novamente não apresentou resultados satisfatórios.

Foram feitas duas curvas de calibração em águas superficiais. Estas curvas em matriz foram feitas com sete pontos, com intervalo de concentração entre 0 e 200 ng/mL para os cinco analitos. Para o fipronil foi feita a ionização no modo negativo. A tabela 21 apresenta os resultados das curvas:

**Tabela 21 - Dados obtidos na primeira curva de calibração em matriz.**

	Equação da reta	$r^2$	Avaliação
Carbofurano	$y = 133543x + 2E+06$	0,9993	Satisfatória
Clomazona	$y = 50518x + 63231$	0,9948	Satisfatória
Fipronil	$y = 279,95x - 10203$	0,9911	Satisfatória
Imidacloprido	$y = 9284,1x + 15392$	0,9978	Satisfatória
Tebuconazol	$y = 104,95x + 5711,8$	0,7618	Não satisfatória



O coeficiente de determinação foi superior a 0,99 em quatro dos analitos, sendo o critério linearidade satisfeito para estes analitos. O tebuconazol novamente não apresentou resultados satisfatórios.

A segunda curva em matriz de água superficial apresentou os resultados abaixo:

**Tabela 22 - Dados obtidos na segunda curva de calibração em matriz.**

	Equação da reta	$r^2$	Avaliação
Carbofurano	$y = 143513x + 3E+06$	0,9972	Satisfatória
Clomazona	$y = 57310x + 156294$	0,9959	Satisfatória
Fipronil	$y = 304,74x + 1197,8$	0,9908	Satisfatória
Imidacloprido	$y = 10429x + 29406$	0,9975	Satisfatória
Tebuconazol	$y = 145,91x + 5308,2$	0,786	Não satisfatória

O coeficiente de determinação foi superior a 0,99 em quatro dos analitos, sendo o critério linearidade satisfeito para estes analitos. O tebuconazol novamente não apresentou resultados satisfatórios.

#### 4.4.1 Faixa Linear de Trabalho

Uma vez obtidas as curvas de calibração em solvente e em matriz, realizou-se uma inspeção da faixa linear de trabalho, usando a razão sinal/massa, conforme metodologia descrita em AUGUSTO, 2013. Foram avaliadas a terceira curva de calibração em solvente e as duas curvas de calibração em matriz, para os quatro analitos que apresentaram uma boa correlação.

Estabeleceu-se o critério de aceitação entre 10% de tolerância acima e abaixo do coeficiente angular, para os valores obtidos para a razão S/Q.

As curvas de calibração apresentaram bons resultados para a linearidade nas faixas entre 10 e 200 ng/mL para todos os analitos, exceto tebuconazol. Optou-se pela não exclusão de pontos da curva após a análise da faixa de linearidade pelo baixo número de replicatas reais analisadas. Um número mínimo para atender a esta condição seria de três replicatas reais, em sete pontos de calibração, podendo ser excluídos até 20 % das replicatas, sem exclusão de pontos da curva.

#### 4.5 Limite de detecção e de quantificação de água superficial

Os valores obtidos para a relação sinal/ruído para os cinco analitos estão descritos na tabela 23, bem como os limites de detecção e quantificação instrumentais calculados:

**Tabela 23 - Valores de LDi e LQi obtidos.**

Curva em solvente	Sinal/Ruído	Limite de detecção ng/mL	Limite de quantificação ng/mL
Carbofurano	350	0,17	0,57
Clomazona	44,3	0,68	2,26
Fipronil	39	0,77	2,56
Imidacloprido	55	0,55	1,82

Para o limite de quantificação do método feita a divisão do limite de detecção/quantificação pelo fator de concentração (250), resultando na tabela 24, abaixo:

**Tabela 24 - Valores de LD e LQ obtidos.**

Curva em solvente	Limite de detecção ng/L	Limite de quantificação ng/L
Carbofurano	0,69	2,29
Clomazona	2,71	9,03
Fipronil	3,08	10,26
Imidacloprido	2,18	7,27

#### 4.6 Efeito Matriz

A avaliação pontual do efeito de matriz na água superficial foi feita de acordo com a metodologia citada no item 9.6. A abordagem pontual pode ser usada para indicar a necessidade de realizar-se a quantificação através de fortificação de matriz branca ou por curva de calibração com padrões em solvente. Caso não ocorram supressões de sinal em níveis significativos, pode-se realizar a quantificação dos analitos através das curvas em solvente.

Os resultados obtidos estão arrolados na tabela 25 e indicam que os componentes contantes na matriz de água superficial interferem na ionização dos analitos no LC-MS-MS. Uma vez observada esta

supressão iônica, partiu-se para a estimativa desta supressão pela comparação entre as curvas obtidas por fortificação de matriz branca e as curvas obtidas em solventes.

**Tabela 25 – Supressão iônica verificada devido ao efeito de matriz em água superficial.**

Analito	Supressão %
Carbofurano	54,61
Clomazona	80,563
Fipronil	77,92
Imidacloprido	80,04

As figuras 38 e 41 apresentam os gráficos obtidos das curvas de calibração obtidas em matriz e solvente para os agrotóxicos analisados. A inspeção visual dos gráficos obtidos indica que os dois métodos de quantificação apresentam coeficientes angulares diferentes, com acentuada redução da inclinação da reta obtida por adição de padrão na matriz.

**Figura 38 a 41 – Comparação das curvas de calibração em solvente com as curvas de calibração em matriz para os analitos estudados.**

**Figura 38 – Carbofurano**

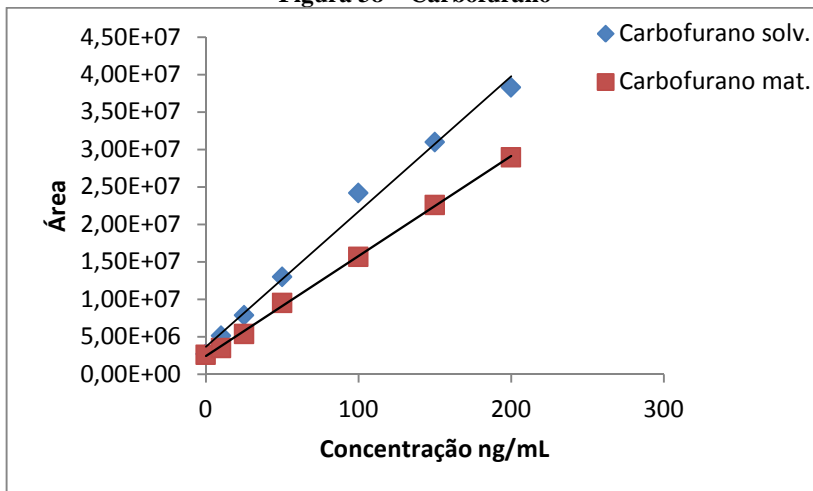


Figura 39 - Clomazona

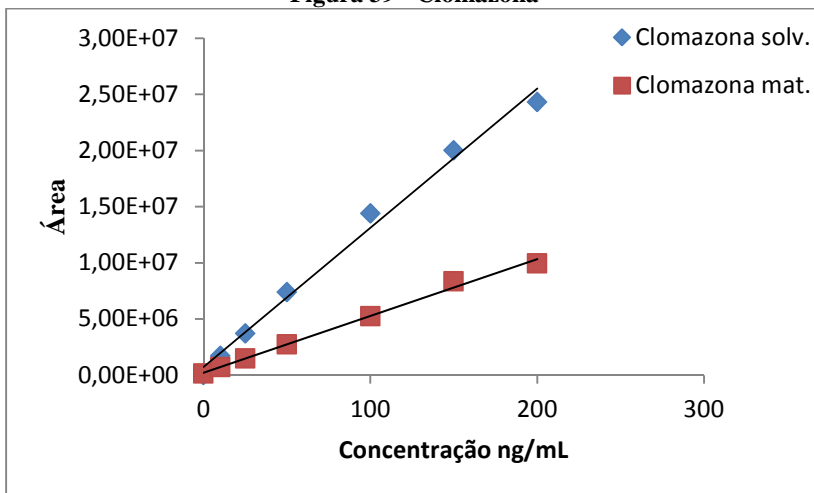


Figura 40 - Fipronil

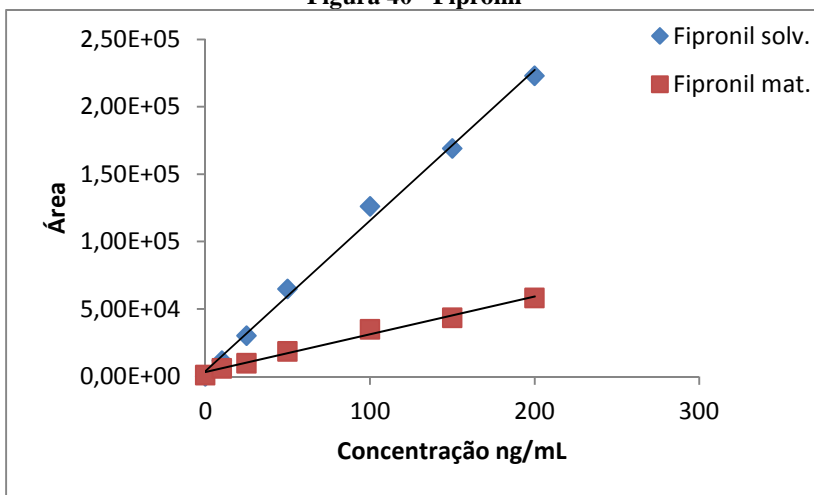
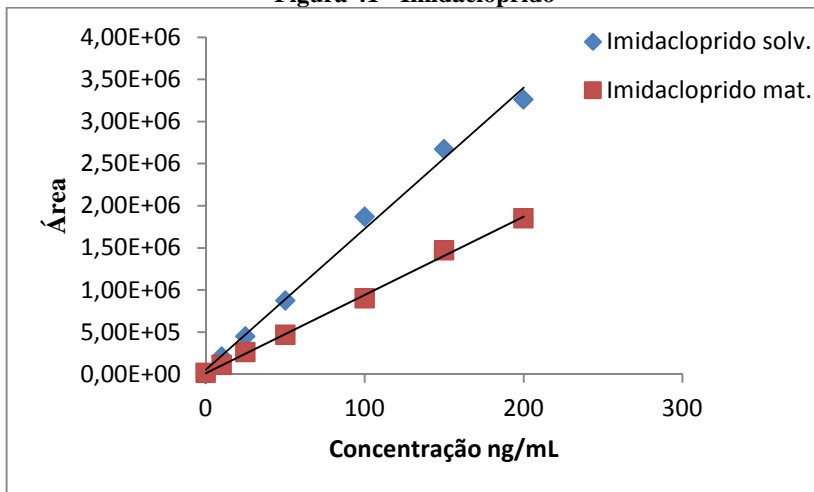


Figura 41 - Imidacloprido



A divisão do valor obtido para o coeficiente angular da reta em solvente pelo coeficiente angular da reta em matriz pode ser indicar esta relação de forma numérica. Estabelecendo um limite de 10 % de tolerância positiva ou negativa para a supressão de sinal por efeito de matriz, pode-se concluir pela possibilidade de se efetuar a análise em solvente ou em matriz. No caso em tela observou-se que os valores calculados ficaram abaixo de 80 % para todos os analitos, conforme ilustrado na tabela 26, confirmando a necessidade de efetuar-se a quantificação através do uso de superposição em matriz ou por adição de padrão, dependendo da disponibilidade da matriz branca.

**Tabela 26 – Relação entre os coeficientes angulares das retas em matriz e em solvente, com padrão interno.**

Análito	Relação entre coeficientes angulares.
Carbofurano	0,79
Clomazona	0,46
Fipronil	0,27
Imidacloprido	0,62

#### 4.7 Exatidão (Recuperação)

Os resultados obtidos para a recuperação estão arrolados na tabela 27. Exceto o tebuconazol, todos os analitos apresentaram recuperação entre 70 e 120 %, atendendo ao determinado para análise de resíduos.

**Tabela 27 – Recuperação obtida para os analitos.**

<b>Analito</b>	<b>Recuperação %</b>	<b>CV%</b>
Carbofurano	90,83	7,70
Clomazona	89,60	10,12
Fipronil	71,20	15,71
Imidacloprido	80,58	21,36
Tebuconazol	139,49	19,77

#### 4.8 Precisão (Repetibilidade)

Os resultados obtidos para a repetibilidade em água superficial e água de torneira estão arrolados nas tabelas 28 e 29. Os valores obtidos ficaram abaixo de 20% para quatro analitos, demonstrando uma boa precisão intradia, para um total de 15 repetições. Somente o tebuconazol apresentou valores acima de 20%.

**Tabela 28. Resultados obtidos para a repetibilidade de amostras de água superficial.**

<b>Analito</b>	<b>CV %</b>
Carbofurano	9,42
Clomazona	11,48
Imidacloprido	19,83
Fipronil	17,15
Tebuconazol	21,80

**Tabela 29. Resultados obtidos para a repetibilidade de amostras de água de torneira.**

<b>Analito</b>	<b>CV %</b>
Carbofurano	7,71
Clomazone	10,53
Imidacloprido	7,11
Fipronil	14,93
Tebuconazol	50,72

#### 4.9 Precisão (Reprodutibilidade)

A reprodutibilidade do método foi considerada satisfatória, situando-se dentro dos limites, abaixo de 25%, o que é adequado para análise de traços, exceto o tebuconazol. Pela equação de cálculo de desvio padrão relativo de Horwitz, apresentado no item 9.8, o limite estabelecido ficou em 25 %. Os valores obtidos estão arrolados na tabela 30 e 31:

**Tabela 30. Resultados obtidos para a reprodutibilidade de amostras de água superficial.**

<b>Analito</b>	<b>1º dia - CV %</b>	<b>2º dia - CV %</b>	<b>3º dia - CV %</b>
Carbofurano	5,80	8,68	13,80
Clomazona	12,65	9,58	12,22
Imidacloprido	17,23	19,73	22,52
Fipronil	10,93	16,55	23,96
Tebuconazol	16,81	17,26	31,34

**Tabela 31. Resultados obtidos para a reprodutibilidade de amostras de água de torneira.**

<b>Analito</b>	<b>1º dia - CV %</b>	<b>2º dia - CV %</b>	<b>3º dia - CV %</b>
Carbofurano	12,52	5,87	4,73
Clomazona	8,45	5,61	17,53
Imidacloprido	7,56	7,25	6,51
Fipronil	16,89	19,10	8,78
Tebuconazol	45,68	73,63	32,84

#### **4.10 Amostra de água superficial e de torneira**

Foi efetuada a coleta de água superficial e de água de torneira no município de São Sepé, no Rio Grande do Sul, no dia 12/12/2013. Foi coletado o volume de cinco litros de água em cada local. As amostras foram coletadas e mantidas em refrigeração até o dia 13/12/2013, quando foi efetuada a concentração em cartuchos SPE, para análise por LC/MS/MS.

O local escolhido para a coleta de água superficial foi o rio São Sepé, no local de captação de ponto de água de abastecimento do município. O local da coleta apresenta as seguintes coordenadas geográficas: Datum SIRGAS 2000, 30°10'46.80"S e 53°33'10.83"O.

Para a água tratada, foi escolhida a sede da CORSAN no município de São Sepé.

**Figura 42 – Local de coleta de água superficial no rio São Sepé.**



**Figura 43 – Local de coleta de água tratada em São Sepé.**



Conforme a metodologia descrita neste trabalho, a quantificação foi feita através da técnica de adição de padrão. Foi feita a fortificação com uma solução padrão dos cinco agrotóxicos escolhidos, em concentrações crescentes. As concentrações escolhidas foram 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 ng / mL.



O objetivo desta abrangência de pontos foi avaliar o coeficiente de determinação para as curvas com todos os pontos. Posteriormente, avaliar o resultado obtido nas amostras por adição de padrão e, dependendo do resultado, fazer uma curva de calibração com número menor de pontos, abrangendo a unidade de grandeza obtida, evitando avaliar concentrações de 10 e 500 ng/mL, na mesma curva de calibração. Nas amostras testadas, as concentrações obtidas ficaram abaixo de 50 ng/mL, de forma que a faixa de concentração escolhida para as curvas de calibração foi entre os pontos 0 e 150 ng/mL.

A tabela 32 apresenta os valores obtidos para as equações das retas e o coeficiente de determinação correspondente.

**Tabela 32 – Curvas de calibração obtidas em amostras de rio e de torneira.**

<b>Analitos</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
Carbofurano rio	$y = 134065x + 105082$	0,9989
Carbofurano torneira	$y = 116944x + 141948$	0,9969
Clomazona rio	$y = 50825x + 241760$	0,996
Clomazona torneira	$y = 42787x + 139929$	0,9972
Fipronil rio	$y = 421,62x + 1278,4$	0,9851
Fipronil torneira	$y = 2,1867x - 2,3667$	0,9997
Imidacloprido rio	$y = 11752x + 14695$	0,9993
Imidacloprido torneira	$y = 13784x + 11034$	0,9983

A tabela 33 apresenta as concentrações de agrotóxicos detectadas nas amostras de água superficial e água de torneira.

**Tabela 33 – Concentração em ng /L dos agrotóxicos pesquisados nas amostras de água superficial e água de torneira.**

<b>Amostras</b>	<b>ng/L</b>
Carbofurano rio	3,14
Carbofurano torneira	4,86
Clomazona rio	19,03
Clomazona torneira	13,08
Fipronil rio	12,13
Fipronil torneira	4,33
Imidacloprido rio	5,00
Imidacloprido torneira	3,20

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou os resultados da validação de uma metodologia para análise de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais. Foram escolhidos cinco agrotóxicos de acordo com a probabilidade de lixiviação, segundo o índice de GUS e com a ocorrência descrita na literatura revisada. Foram analisados cinco agrotóxicos: carbofurano, clomazona, fipronil, imidacloprido e tebuconazol, e destes, somente o tebuconazol não apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros avaliados. Para os demais analitos, o método mostrou-se seletivo, preciso, com boa recuperação e linearidade satisfatória dentro das concentrações definidas.

Foi realizada uma abordagem inicial com cromatografia líquida com detecção por ultravioleta, com arranjo de diodos. Esta abordagem não foi eficaz nas concentrações trabalhadas, 500 ng / mL, devido a interferentes presentes na matriz. Em função da necessidade de trabalhar-se com concentrações mais baixas, como são as verificadas em águas superficiais, optou-se por mudar o tipo de detector usado. O segundo gradiente utilizado na cromatografia por DAD mostrou-se promissor, com tempos de retenção menores que 20 minutos e com boa separação, com boa resolução e com o primeiro analito apresentando tempo de retenção após os primeiros 10 minutos, evitando a co-eluição com compostos fúlvicos e húmicos, que saem no começo da cromatografia, por serem mais polares do que os analitos. Entretanto, os limites de quantificação seriam mais elevados, na grandeza de 500 ng/mL após a ressuspensão do concentrado no cartucho de SPE, o que resultaria em limites 2 ng/mL em águas superficiais. Este valor de limite de quantificação necessitava ser reduzido e optou-se por alterar o tipo de detector usado, sendo escolhido um espectrômetro de massas.

Após a validação, a metodologia por LC-MS-MS apresentou limites de quantificação entre 2,28 e 10,27 ng/L, em águas superficiais, o que permite a análise de amostras ambientais sem perda de sinal de analitos. Eventualmente, em caso de concentrações acima do último ponto da curva de calibração proposta, pode-se trabalhar com diluição da amostra.

As curvas feitas em águas superficiais apresentaram efeito pronunciado de matriz, devido aos compostos húmicos e fúlvicos que existem naturalmente em águas de rios. O gradiente utilizado iniciava com composição preponderantemente polar, 90 % de água, para que estes compostos fossem eluídos antes dos analitos. Ainda assim, ocorreu supressão iônica. Da análise dos resultados obtidos, concluiu-se a

necessidade de realizar a quantificação dos analitos através da metodologia de adição de padrão, pois por padronização externa em solvente não foram obtidos resultados satisfatórios.

As amostras coletadas em águas superficiais (rio São Sepé, RS) e em água de torneira deste município foram analisadas através da metodologia de adição de padrão. Os valores de concentração verificados nas amostras foram baixos, em nanogramas por litro (ng/L), próximos aos valores dos limites de quantificação. Estes valores são coerentes com os valores obtidos em trabalhos recentes.(DEMOLINER, 2008).

Uma alternativa ao método proposto é a extração por QuEChERS, ou com adaptação desta técnica, pois a SPE apresenta o inconveniente de ser extremamente demorada, pela necessidade de permitir a adequada interação dos analitos com a fase estacionária. Esta necessidade pode aumentar o tempo de tratamento de amostras, ainda mais se for um elevado número de amostras. Técnicas alternativas ao SPE já foram validadas e apresentaram resultados satisfatórios, conforme a revisão bibliográfica. (CALDAS, 2010; CHENG, 2009).

Concluindo, o método proposto mostrou-se sensível, seletivo, com boa precisão, exatidão, limite de quantificação adequado e permite a detecção de agrotóxicos em águas superficiais e de abastecimento com segurança.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v.86, n.2, p.412-431, março de 2003.

ANVISA. *Guia para o Controle da Qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA*. Brasília: Julho de 2007.

ANVISA. *Monitoramento do Mercado de Agrotóxicos*. Brasília: março de 2010.  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c4bdf280474591ae99b1dd3fbc4c6735/estudo\\_monitoramento.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c4bdf280474591ae99b1dd3fbc4c6735/estudo_monitoramento.pdf). Data de acesso: 05/11/2013.

ARMAS, E. D. *et al.* Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1119-1127, 2007.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C. de; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. *Chemkeys*. <http://www.chemkeys.com.br>. Data do acesso: 03/04/2013.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Marcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BORTOLUZZI, Edson *et al.* Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Química Nova*, v.30, n. 8, p. 1872-1876, 2007.

BRASIL, **Decreto 5440, de 04 de maio de 2005**. Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano. BRASILIA.

BRASIL, **Lei n. 2.914, de 12 dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. BRASÍLIA.

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

CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A.; PRIMEL, E. G. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*. v.20. n.1, p.125-132, 2009.

CALDAS, S. S. *et al.* Pesticide Residue Determination in Groundwater using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*. v.21, n.4, p.642-650, 2010.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G.. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. v. 665, p. 55-62, 2010.

CALDAS, S. Souza *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*. v.34, n.9, p.1604-1617, 2011.

CALHEIROS, D. F.; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ S. C. do N.. Contaminação por agrotóxicos nas águas da Bacia do Alto Paraguai. *Cadernos de Agroecologia*. v.5, n.1, 2010.

CARBO, L.; SOUZA, V.; DORES, E. F. G. C.; RIBEIRO, M. L. Determination of Pesticides Multiresidues in Shallow Groundwater in a Cotton-growing Region of Mato Grosso, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*. v.19, n.6, p. 1111-1117, 2008.

CDFA - California Department of Food and Agriculture. Center for Analytical Chemistry. Environmental Monitoring Section.

*Determination of Imidacloprid and the Olefinic Imidacloprid, Guanidine, Olefinic Guanidine, Urea Metabolites in Well Water by High performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.* Los Angeles: 2008. 20p.

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. 2007. Canadian Water Quality Guidelines: Imidacloprid. Scientific Supporting Document. Winnipeg, 2007.

CHENG, J. *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. V. 90, n.11, p. 845-855, 2010

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 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. **Resolução 357, de 17 de março de 2005.** BRASÍLIA.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Resolução 396, de 3 de abril de 2008.** BRASÍLIA.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Resolução 430, de 13 de maio de 2011.** BRASÍLIA.

European Union. Council Directives 76/464/EC. *Official Journal of the European Communities*. L 129: 23-29, 1976.

D'ARCHIVIO, A. A. *et al.* Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*. v.71, p. 25-30, 2007.

DIRECTIVA 98/83/CE DO CONSELHO E DO PARLAMENTO DA UNIÃO EUROPEIA. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias La Union Europea*. 330/32, 5.12.1998.

DIRECTIVA 2006/118/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO. *Diario Oficial de La Union Europea*. L 372/19, 27.12.2006. 006.

DEMOLINER, A. **Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclassas de agrotóxicos e metabólitos em água de superfície e de abastecimento público**. 2008. 111 f. Dissertação de mestrado no Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2008.

DEMOLINER, A. et.al. Development and Validation of a Method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Classes of Pesticides and Metabolites in Water Samples. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v.21. n.8. p. 1424-1433, 2010.

DIECSON, R. O. da S. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural*. v.39. n.9, p.2383-2389, 2009.

DIECSON, R. O. da S. *et al.* Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. *Química Nova*. Vol. 34, No. 5, 748-752, 2011.

DONALD, David B. *et al.* Pesticides in Surface Drinking-Water Supplies of the Northern Great Plains. *Environmental Health Perspectives*. v.115, n.8., p.1183-1191. 2007.

FAO, Food and Agriculture Organization, Corporate Document Repository. <http://www.fao.org/docrep/w2598e/w2598e07.htm>. Data de acesso: 05/11/2013.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation. [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/mes/methodology\\_list/\\*S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/mes/methodology_list/*S). Data de acesso: 05/11/2013.

FILHO, F. N.; NASCIMENTO, C.A.; FARIA, A.R.; CRUVINEL, A.R.; OLIVEIRA, J.M. Within laboratory validation of a multiresidue method for the analysis of 98 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food, Additives and Contaminants*. v.29, n.4, p.641-656, 2012.

FOOTPRINT. Pesticide Properties Database. Disponível em: <http://www.eufootprint.org>. Data de acesso: 03/04/2013.

FRAGA, W. G.. **Identificação e determinação dos principais ingredientes ativos em agrotóxicos ilegais apreendidos pela polícia federal do Brasil**. Data da defesa: 13/06/2012. Dissertação de Mestrado para obtenção de obtenção do grau de Mestre em Química. UNB. Brasília: 2012. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/11569>. Data de acesso: 10/10/2013.

GENERAL NOTES – TN 23, Phenomenex. Strata -X - General Method for the Extraction of Neutral Compounds. Disponível em [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com). Data de acesso: 03/11/2013.

GRÜTZMACHER, D. D. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v.12, n.6, p.632–637, 2008.

GUSTAFSON, D.I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.8, p.339-357, 1989.

HADJMOHAMMADI, M. R.; NIKOU, S. M.; KAMEL, K. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. *Acta Chimica Slovenica*. n.53, p.517–520, 2006.

HORWITZ, W. **Validation: an invisible Component of Measurement**. Marine and Freshwater Toxins Analysis. <http://www.marineandfreshwatertoxins.org/docs/HorwitzValid.pdf>. Data de acesso: 11/11/2013

ICH – (International Conference on Harmonization) Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelin](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelin)



[es/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](#)>. Data de acesso: 09/04/2013.

IGLESIAS; A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. <http://www.cnpsa.embrapa.br/met//minicursos>. Data de acesso: 11/11/2103.

INFORMATIVO CRQ III. O dilema do uso dos defensivos agrícolas. Rio de Janeiro: Conselho Regional de Química, III Região, 1997.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Brasília: 2007.

INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ - IRGA, 2013. [http://www.irga.rs.gov.br/upload/20131018151801produtividade\\_municípios\\_safra\\_12\\_13\\_final.pdf](http://www.irga.rs.gov.br/upload/20131018151801produtividade_municípios_safra_12_13_final.pdf) Data de acesso: 28/11/2013.

JELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta*. v.80, p.363–371, 2009.

LUTZENBERGER, J. Ecologia – Do Jardim ao Poder. LPM:Porto Alegre, 11 ed.,1992.

MACEDO, V. R. M. *et al.* Resíduos de defensivos agrícolas na água dos sistemas de irrigação e drenagem das lavouras de arroz no perímetro irrigado da barragem do Arroio Duro, Camaquã, RS. In: Anais do VI Congresso Brasileiro Arroz Irrigado, Porto Alegre, 2009. V.1, p.179-182.

MARCHESAN, E. *et al.* Rice herbicide monitoring in two brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia Agricola*. v.64, n.2, p.131-137, 2007.

MARCHEZAN, E. *et al.* Qualidade de água dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. v.39. n.7, p.2050 – 2056, 2009.

MARCHEZAN, E. *et al.* Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. v.40. n.5, p.1053-1059, 2010.

MARQUES, M. N.; COTRIM, M. B.; PIRES, M. A. F. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1171-1178, 2007.

MARTINI, L. F. D. *et al.* Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. *Ciência Rural*. v.42. n.10. p. 1715-1721, 2012.

MERKULOVA, N.L.; SHAPOVALOVA, E.N.; SHPIGUN, O.A. Features of the separation of Pesticides of Different Classes by Reserved-Phase High-Performance Chromatography. *Journal Of Analytical Chemistry*. v.61, n.4, p.343-349, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, SECRETÁRIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, COORDENAÇÃO-GERAL DE APOIO LABORATORIAL. Guia de validação e controle de qualidade analítica - Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal. BRASÍLIA – 2011.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Instrução Normativa Conjunta n.1 de 28.12.2012. Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação para métodos analíticos e controle de qualidade Interna das análises de monitoramento do PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Anexo II da Instrução Normativa n.24, de 14 de julho de 2009. Brasília, 2009.

MARIOTTI, K. de C. *et al.* Simultaneous Determination of Fenproporex, Diethylpropione 3 and Methylphenidate in Oral Fluid by LC-MS/MS. *Chromatographia*. (no prelo)

MOHAN, C. *et al.* Multiresidue analysis of neonicotinoids by solid-phase extraction technique using high-performance liquid

chromatography. *Environmental Monitoring And Assessment*. v.165. p.573-576, 2010.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, v.75, p.57-134, 2002.

PERES, Frederico (org.). *É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*. v.32, n.6, 2009.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. v.27. n.5, p.771-780, 2004.

ROEHRS, R.. *et al.* Liquid Chromatographic–Diode-Array Detection Multiresidue Determination of Rice Herbicides in Drinking and Paddy-Field Water. *Journal of AOAC International*. V. 92, n. 4, 2009.

RIBEIRO, A. C. A. *et al.* Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova*. v.36, n.2, p.284-290, 2013.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G.. Determinação e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. *Química Nova*. v.34, n.5, p.780-786, 2011.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). Document n°SANCO/2009/10684. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 4<sup>a</sup> ed., Bélgica.2010.

SMITH, Roger M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques- Review. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, Issues 1-2, p. 3-27, 2003.

SOUZA, D. Z.; ROSSATO, L. G.; LIMBERGER, R. P.; DALLEGRAVE, E. Agrotóxico no Rio Grande do Sul: o grave problema do contrabando. *Toxicovigilância – Toxicologia Clínica: dados e indicadores selecionados Rio Grande do Sul 2008-2009*, Porto Alegre, v. 4, p. 19-27, agosto de 2009.

STARNER, K.; GOH, K. S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*. v.88. p.316–321, 2012.

TODESCHINI, B. H.; FEUERHARMEL, M. R.. Sistema Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal. Laudo 305.2010-UTEC/DPF/SMA/RS. 22.09.2010.

TODESCHINI, B. H.; SANDER, M. F. Sistema Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal. Laudo 116.2011-SETEC DPF/SR/RS. 31.05.2011.

TUZIMSKI, T. Thin-Layer Chromatography (TLC) as Pilot Technique for HPLC. Utilization of Retention Database (Rf) vs. Eluent Composition of Pesticides. *Chromatographia*. v.56. n.5/6, p.379-381, 2002.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*. v.30, n.3, p.535-540, 2007.

WILLIAMS, S. Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update. *Journal of Chromatography A*. v.1052, p.1-11, 2004.

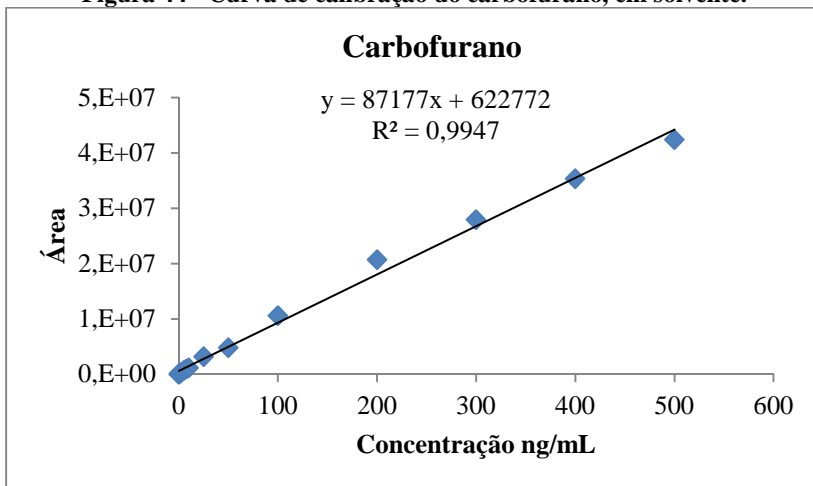
ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazona residues in surface water. *Journal of Chromatography A*. v. 904, p. 257–262, 2000.

ZANELLA, R. *et al.* Monitoring of the Herbicide Clomazona in Environmental Water Samples by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Chromatographia*. v.55, p. 573–577, 2002.

## 7 APENDICE A – Curvas de calibração dos analitos.

As figuras 44 a 48 são referentes a primeira curva obtida dos agrotóxicos, em solvente:

**Figura 44 - Curva de calibração do carbofurano, em solvente.**



**Figura 45 - Curva de calibração para a clomazona, em solvente.**

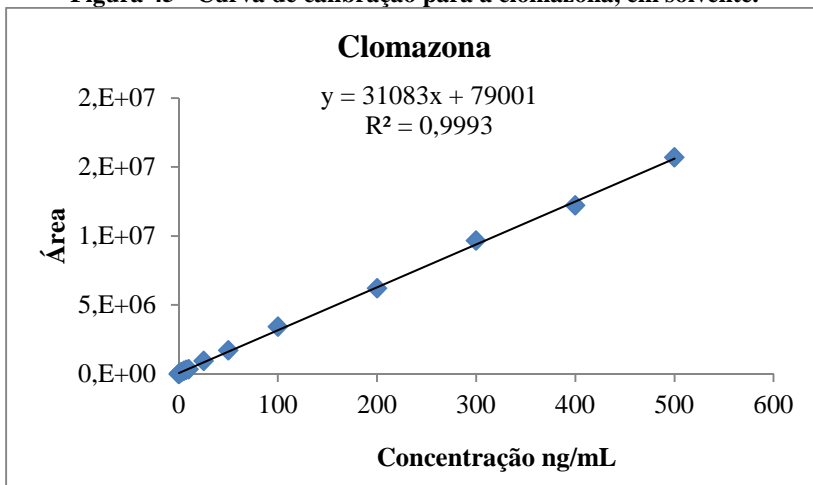


Figura 46 - Curva de calibração para o fipronil em solvente.

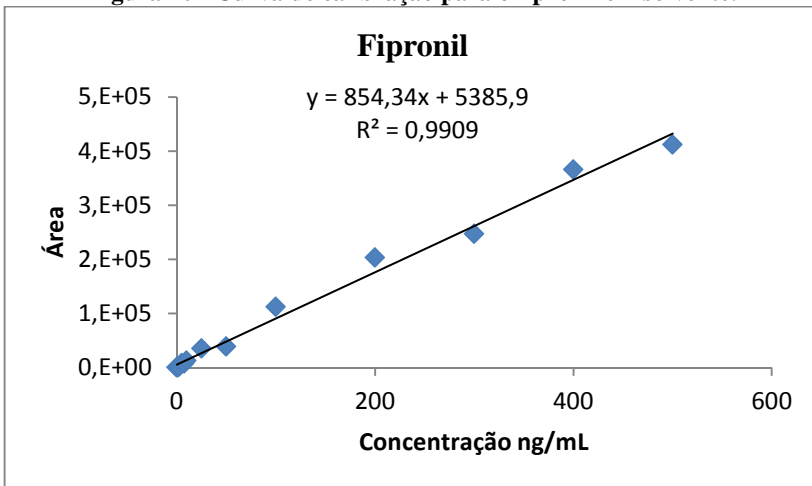
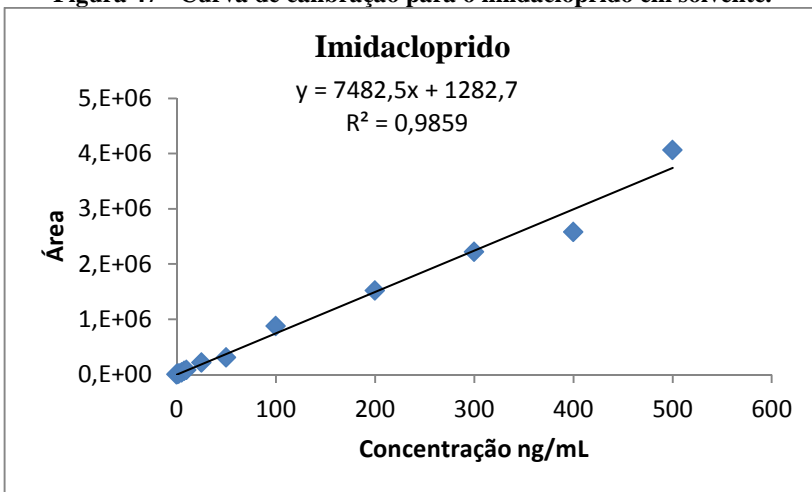
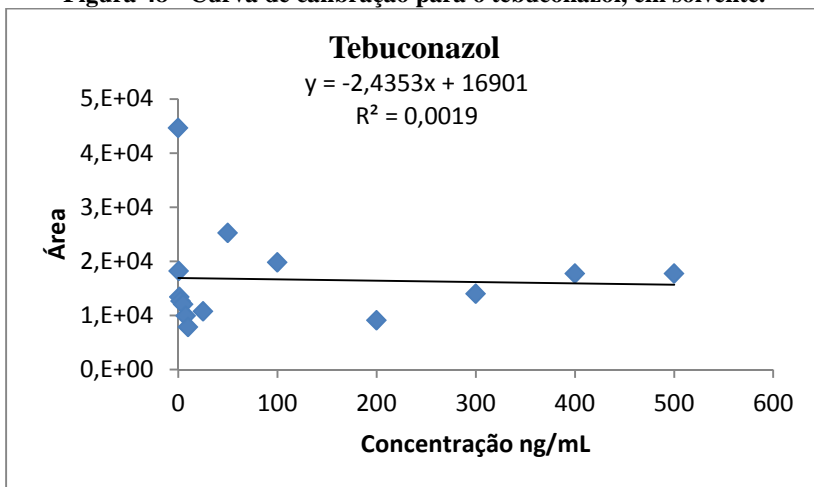


Figura 47 - Curva de calibração para o imidacloprido em solvente.



**Figura 48 - Curva de calibração para o tebuconazol, em solvente.**

As figuras 49 a 53 são referentes a segunda curva obtida dos agrotóxicos, em solvente:

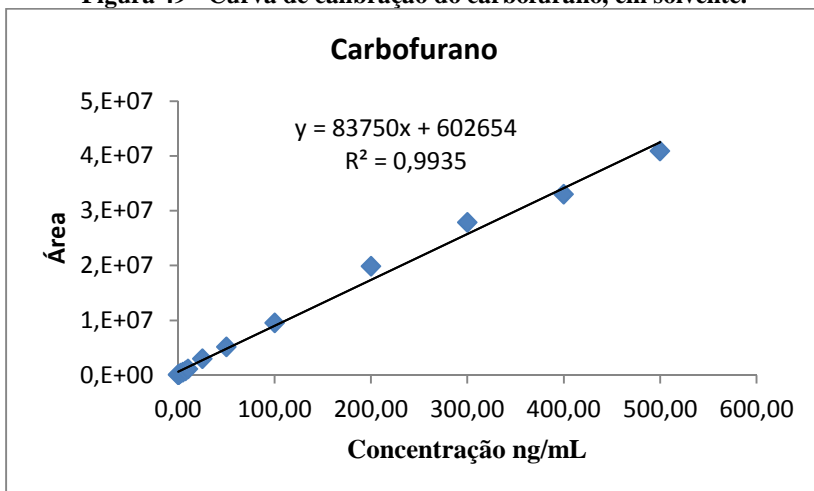
**Figura 49 - Curva de calibração do carbofurano, em solvente.**



Figura 50 - Curva de calibração para a clomazona, em solvente.

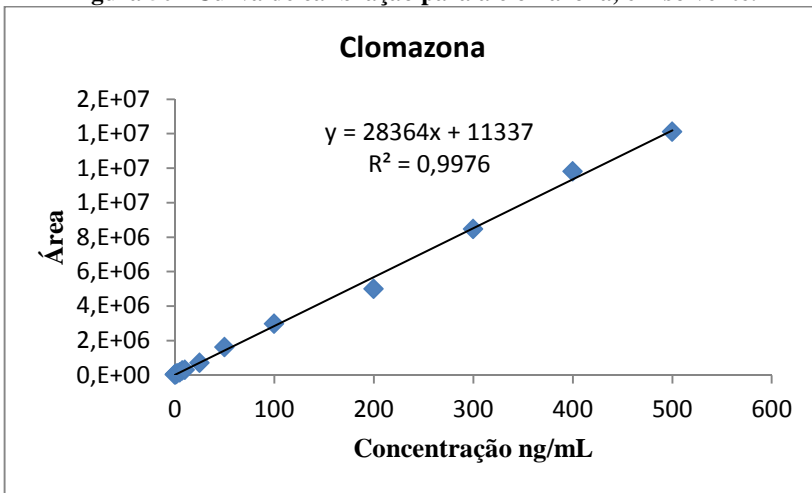
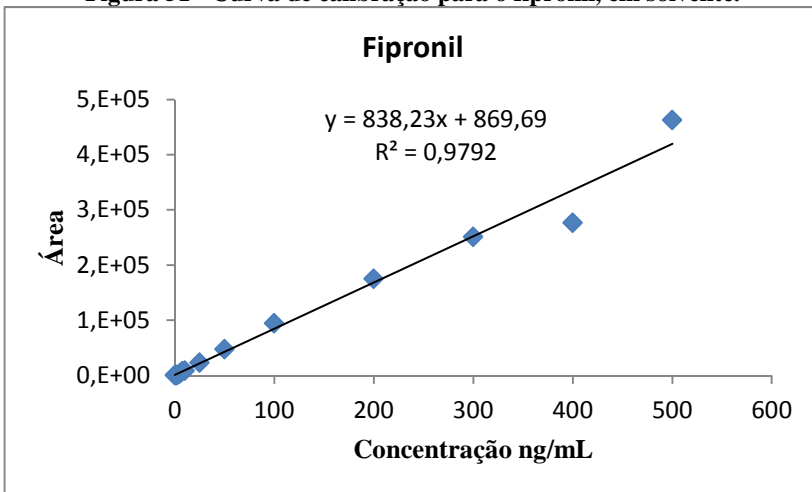
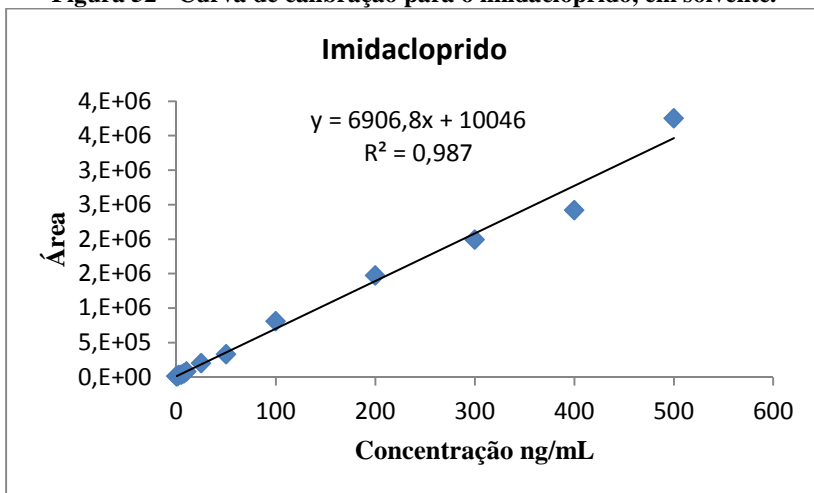
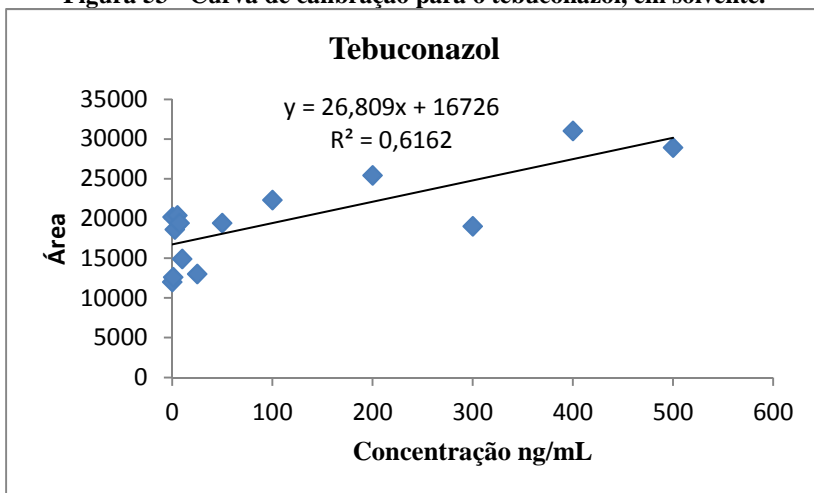


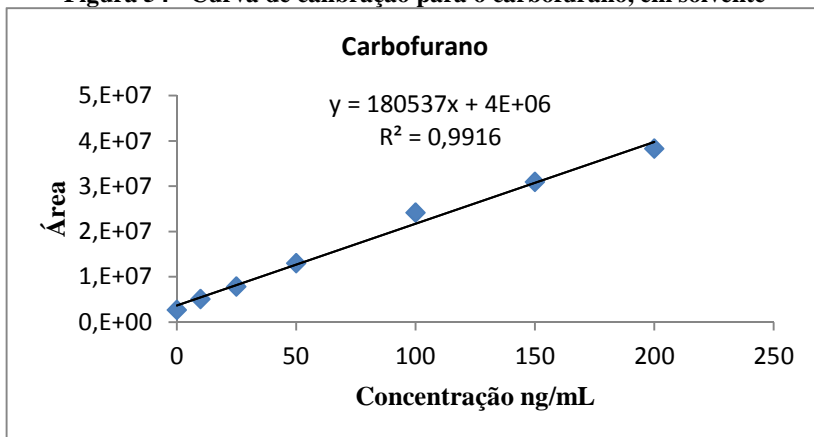
Figura 51 - Curva de calibração para o fipronil, em solvente.



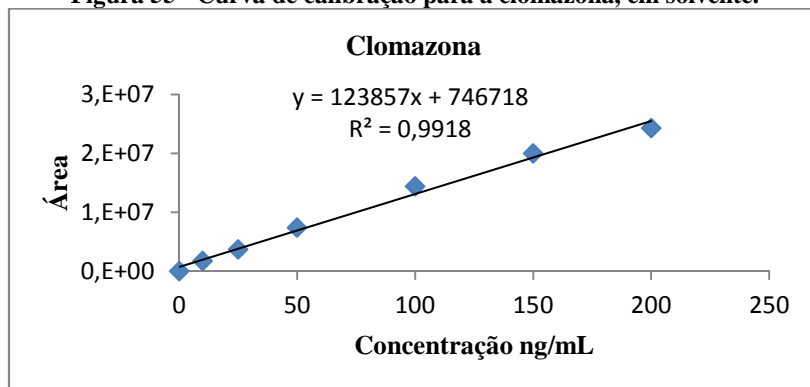
**Figura 52 - Curva de calibração para o imidacloprido, em solvente.****Figura 53 - Curva de calibração para o tebuconazol, em solvente.**

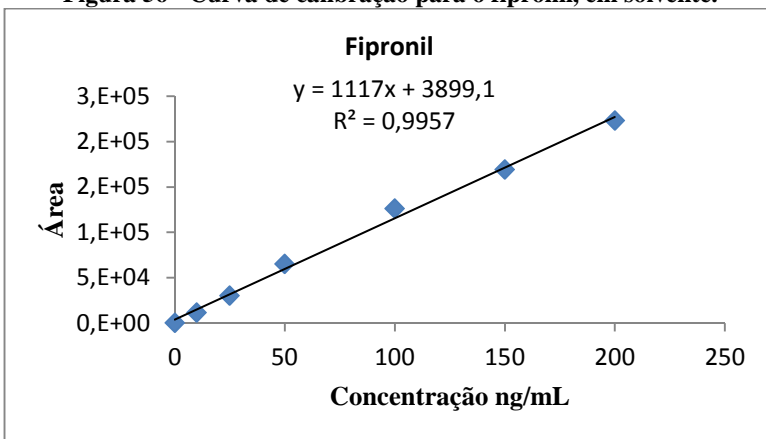
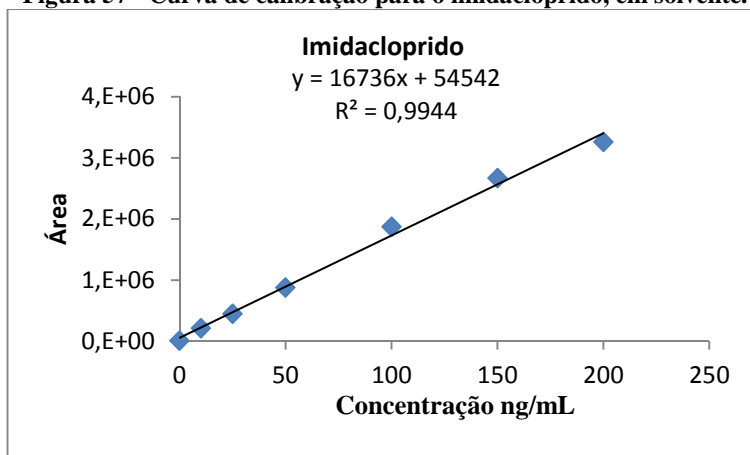
As figuras 54 a 58 são referentes a terceira curva obtida dos agrotóxicos, em solvente:

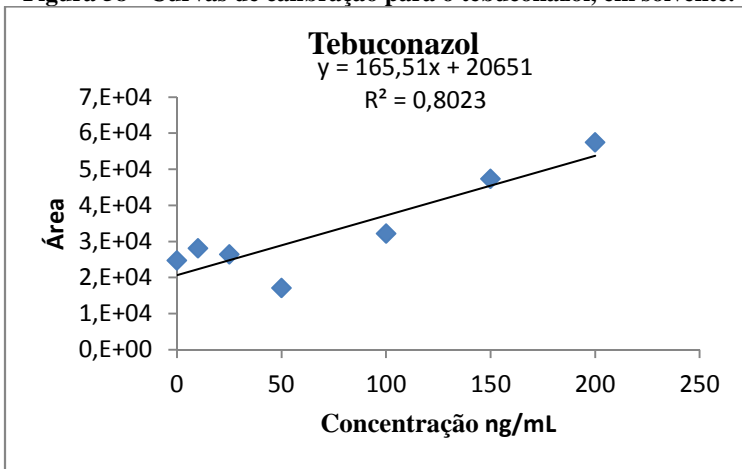
**Figura 54 - Curva de calibração para o carbofurano, em solvente**



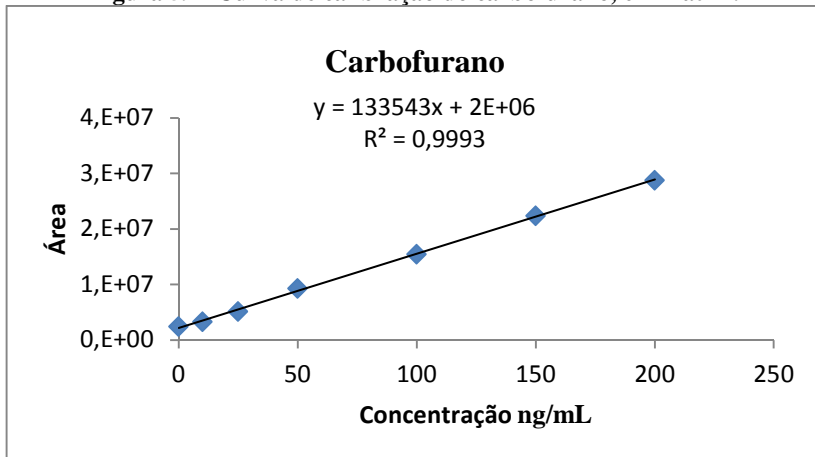
**Figura 55 - Curva de calibração para a clomazona, em solvente.**



**Figura 56 - Curva de calibração para o fipronil, em solvente.****Figura 57 - Curva de calibração para o imidacloprido, em solvente.**

**Figura 58 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em solvente.**

As figuras 59 a 63 são referentes a primeira curva obtida dos agrotóxicos, em matriz:

**Figura 59 - Curva de calibração do carbofurano, em matriz.**

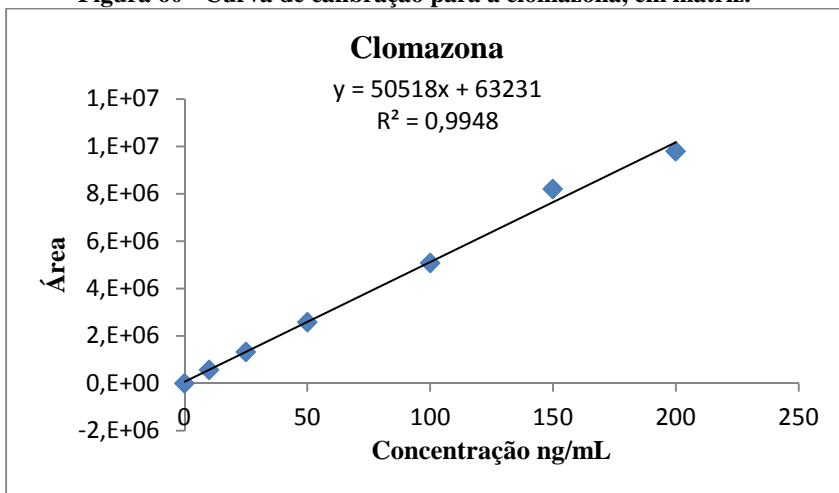
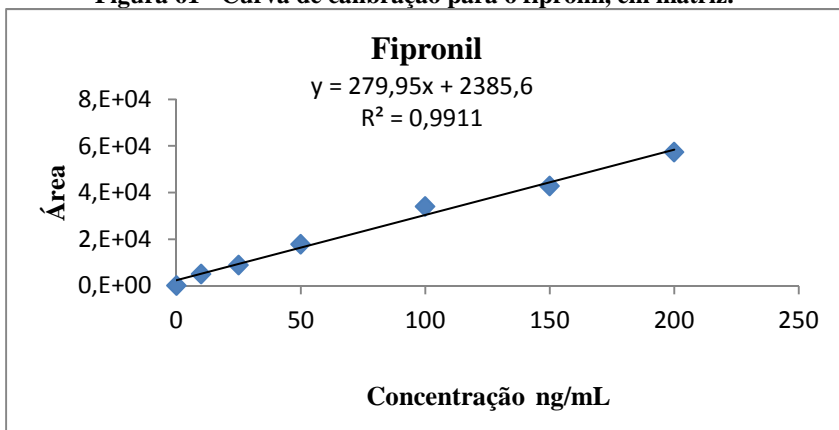
**Figura 60 - Curva de calibração para a clomazona, em matriz.****Figura 61 - Curva de calibração para o fipronil, em matriz.**

Figura 62 - Curva de calibração para o imidacloprido, em matriz.

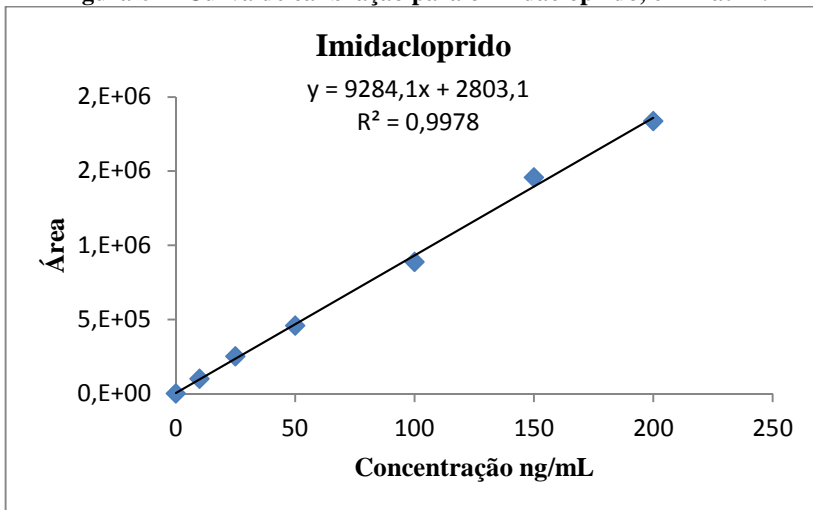
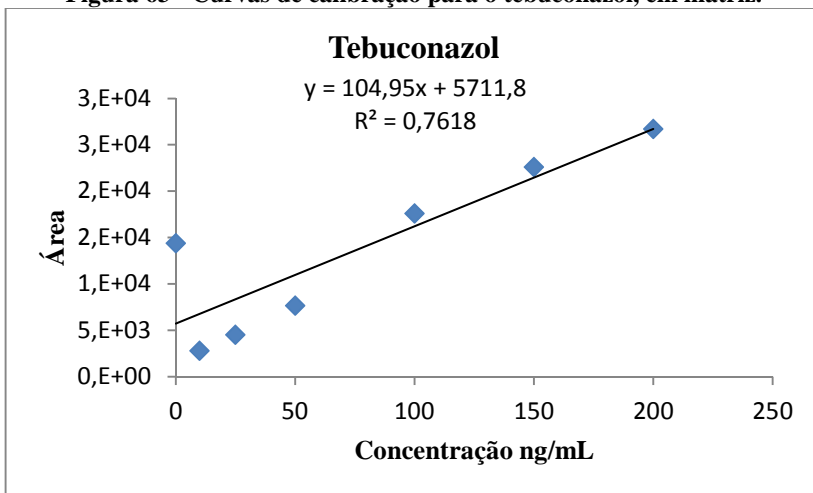
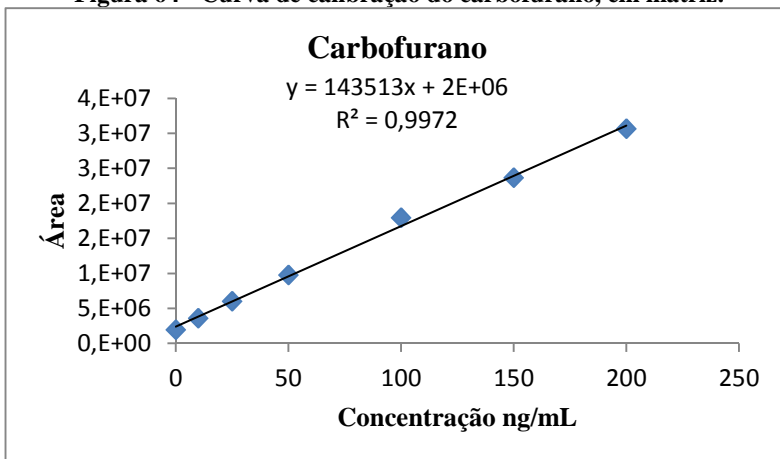


Figura 63 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em matriz.

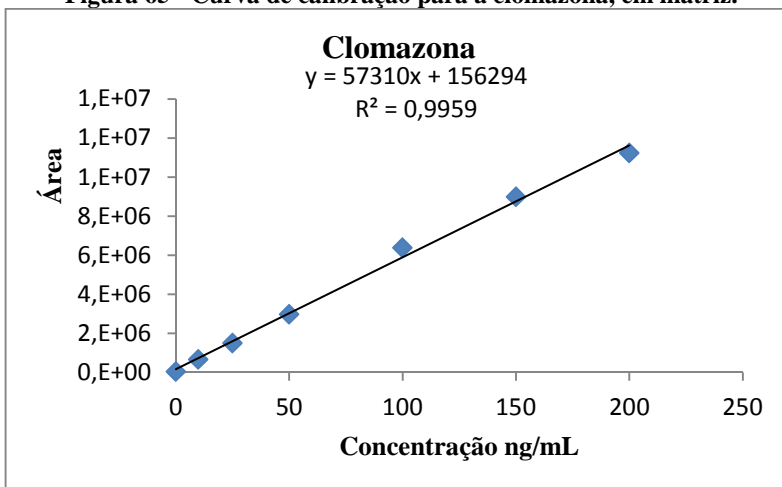


As figuras 64 a 68 são referentes a segunda curva obtida dos agrotóxicos, em matriz:

**Figura 64 - Curva de calibração do carbofurano, em matriz.**



**Figura 65 - Curva de calibração para a clomazona, em matriz.**





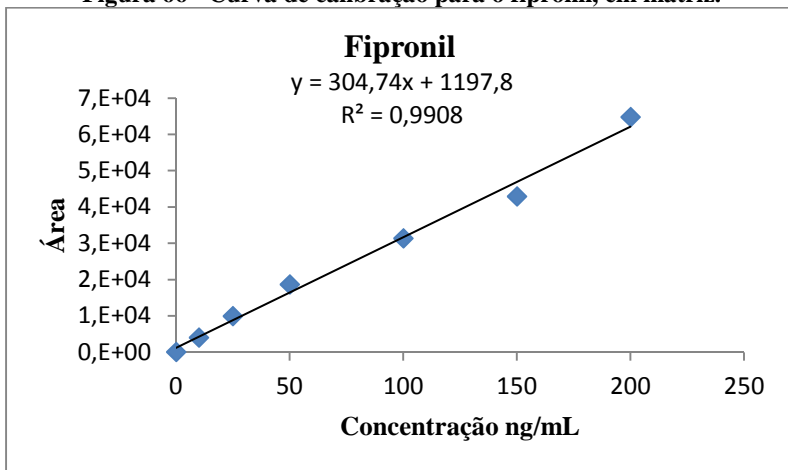
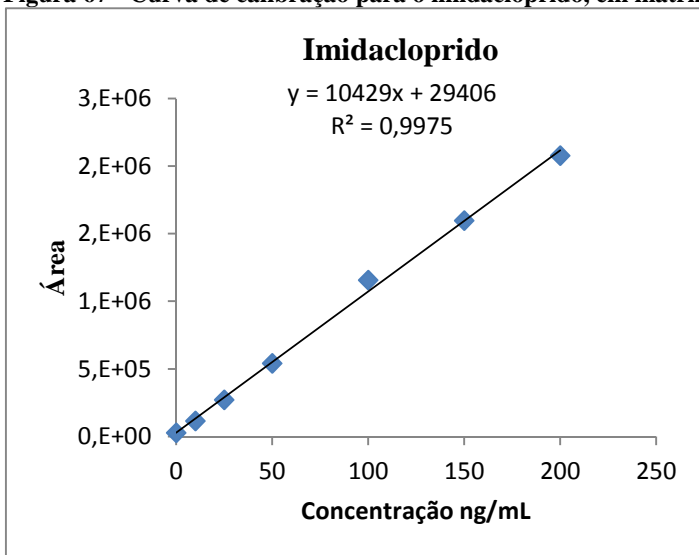
**Figura 66 - Curva de calibração para o fipronil, em matriz.****Figura 67 - Curva de calibração para o imidacloprido, em matriz.**

Figura 68 - Curvas de calibração para o tebuconazol, em matriz.

