



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA
EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Geovanna Vilalva Freire

Orientadora: Prof^ª. Dra. Nilva Ré

Campo Grande – 2015



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA
EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Geovanna Vilalva Freire

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

Orientadora: Prof^ª. Dra. Nilva Ré

Campo Grande – 2015

***Eu dedico este trabalho à minha família
E amigos que sempre estiveram ao meu lado.***

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo, pela vida, inteligência, capacidade, amigos e família tão maravilhosos que possuo.

À Prof^a Dr^a Nilva Ré por ter me orientado e permitido que eu trabalhasse com ela a fim de proporcionar meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador João Batista Gomes de Sousa pela amizade, orientação e por ter me ensinado muitas coisas.

Ao meu amigo, colega de laboratório, irmão e mestre em Química Érico Vinícius Rocha Sanches, pela amizade, por todo apoio e ajuda fornecida.

À minha colega de laboratório e mestre em Química Wellyta de Oliveira Ferreira, por dividir seus conhecimentos e trabalho comigo.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial ao Romeu Viana Neto, Emerson Brito, Aline Herrero e quem mais me acompanhou desde o início do mestrado.

À todos os meus colegas de trabalho, principalmente ao Heriberto Gimênes Junior, Fernanda Vizzotto, Carla Kovalski, Guilherme Kinjo e Karine por toda a força sempre.

À minha família, minha incrível mãe Auxiliadora, minhas irmãs Giulia e Talita, minha prima Ana e meu tio Naudir. Amo vocês.

À todos os meus amigos de curso, especialmente ao Rafael Cardoso Rial, Patrick da Silva Mirowski, Gustavo Kollet e Rafael Gonçalves.

À todos os meus amigos que sempre me dão suporte, principalmente ao Leopoldo Albigesi e ao João Emmanuel por me escutarem e animarem.

Às todas as pessoas que possibilitaram que essa pesquisa seguisse em frente.

Sumário

1	Introdução.....	13
2	Revisão da Literatura.....	14
2.1	Agrotóxicos.....	14
2.1.1	Organoclorados.....	16
2.1.2	Organofosforados.....	21
2.1.3	Dinitroanilinas.....	24
2.1.4	Cloroacetamidas.....	25
2.1.5	Tiocarbamatos.....	26
2.2	Métodos de análises de agrotóxicos.....	27
2.2.1	Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	29
2.3	Legislações sobre agrotóxicos em água potável.....	31
3	Objetivos.....	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	Parte Experimental.....	33
4.1	Materiais.....	33
4.1.1	Padrões.....	33
4.1.2	Reagentes e solventes.....	33
4.1.3	Instrumentação.....	33
4.1.4	Outros materiais.....	34
4.2	Protocolo de limpeza.....	34
4.3	Preparo de soluções.....	34
4.3.1	Conservantes.....	35
4.3.2	Amostragem.....	35
4.4	Métodos.....	35
4.4.1	Determinação de agrotóxicos por GC-MS/MS.....	35
4.4.2	Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	37
4.4.3	Validação do método DLLME-GC-MS/MS.....	41
5	Resultados e discussão.....	43
5.1	Separação cromatográfica dos agrotóxicos por GC-MS/MS.....	43
5.2	Otimização das condições da DLLME.....	49
5.2.1	Seleção e volumes dos solventes dispersor e extrator.....	49
5.2.2	Efeito do pH.....	50
5.2.3	Efeito da adição de sal.....	50
5.2.4	Efeito do tempo, tipo de agitação vigorosa e velocidade de centrifugação.....	51
5.2.5	Efeito da adição de conservantes.....	54
5.2.6	Condições estabelecidas para a DLLME para a extração dos agrotóxicos avaliados.....	55
5.3	Validação do método DLLME-GC-MS/MS.....	56
5.3.1	Precisão do instrumento.....	56
5.3.2	Linearidade do instrumento.....	57
5.3.3	Seletividade.....	58
5.3.4	Limites de detecção e quantificação.....	60
5.3.5	Linearidade e curva analítica.....	61
5.3.6	Recuperação e precisão do método.....	62
5.4	Outros métodos de análises dos agrotóxicos por GC-MS/MS.....	65
6	Conclusão.....	67
7	Perspectivas de continuidade do trabalho.....	68
	ANEXOS I.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do p,p'-DDT	17
Figura 2	Degradação do DDT para DDE e DDD	18
Figura 3	Estrutura química metoxicloro	19
Figura 4	Estrutura química endossulfan I	20
Figura 5	Estrutura química do hexaclorobenzeno	21
Figura 6	Estrutura química do terbufós	22
Figura 7	Estrutura química do malation	23
Figura 8	Estrutura química clorpirifós	23
Figura 9	Estrutura química do paration	24
Figura 10	Estrutura química do trifluralina	25
Figura 11	Estrutura química do alacloro	26
Figura 12	Estrutura química do molinato	26
Figura 13	Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	30
Figura 14	Esquema da extração da amostra por DLLME	40
Figura 15	Cromatograma da varredura de íon totais. A) MIX de agrotóxicos a 10 mg L ⁻¹ . B) Branco da coluna	44
Figura 16	Espectro de íons para o hexaclorobenzeno mostrando as diferentes energias de excitação testadas no método AMD. A) com 0,5 V. B) com 0,6 V. C) com 0,7 V. D) com 1,0 V.	46
Figura 17	Cromatograma da solução padrão dos agrotóxicos a 10 µg L ⁻¹ para a análise GC-MS/MS	48
Figura 18	Gráfico das áreas médias e desvios padrões da DLLME em pH 3,8; 7,0 e 8,0	50
Figura 19	Influência da força iônica na extração dos agrotóxicos	51
Figura 20	Influência da velocidade de centrifugação (854 RCF e 2616 RCF) na extração dos agrotóxicos	52
Figura 21	Influência do tipo de agitação vigorosa (em <i>vortex</i> e em ultrassom) na extração dos agrotóxicos	53
Figura 22	Influência do tempo de agitação em <i>vortex</i> (1, 2 e 3 minutos) na extração dos agrotóxicos	54
Figura 23	Influência da adição de conservantes na extração dos agrotóxicos	55
Figura 24	Cromatogramas da matriz aquosa. A) fortificada com os analitos e B) sem a adição dos analitos	59
Figura 25	Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para hexaclorobenzeno	62
Figura 26	Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para o paration	62
Figura 27	Gráfico, equação da reta e r^2 do alacloro	78

Figura 28	Gráfico, equação da reta e r^2 do clorpirifós	78
Figura 29	Gráfico, equação da reta e r^2 do endossulfan I	79
Figura 30	Gráfico, equação da reta e r^2 do hexaclorobenzeno	79
Figura 31	Gráfico, equação da reta e r^2 do malation	80
Figura 32	Gráfico, equação da reta e r^2 do metoxicloro	80
Figura 33	Gráfico, equação da reta e r^2 do molinato	81
Figura 34	Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDD	81
Figura 35	Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDE	82
Figura 36	Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDT	82
Figura 37	Gráfico, equação da reta e r^2 da trifluralina	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Revisão dos trabalhos publicados que utilizaram GC, DLLME para extração de agrotóxicos em água e os solventes utilizados	28
Tabela 2	Valores máximos permitidos dos agrotóxicos selecionados para águas superficiais, subterrâneas e tratadas	31
Continuação	Valores máximos permitidos dos agrotóxicos selecionados para águas superficiais, subterrâneas e tratadas	32
Tabela 2		
Tabela 3	Parâmetros cromatográficos adotados no GC	36
Tabela 4	Concentração dos agrotóxicos nas amostras de água de torneira enriquecidas com os agrotóxicos	38
Tabela 5	Parâmetros obtidos pelo método GC-MS/MS	47
Tabela 6	Dados do tempo de retenção médio, desvio padrão e coeficiente de variação dos agrotóxicos	56
Tabela 7	Estudo da repetitividade das áreas dos agrotóxicos. %CV para as concentrações de 520, 690 e 920 $\mu\text{g L}^{-1}$	57
Tabela 8	Estudo da linearidade e faixa de aplicação dos compostos por injeção direta dos padrões	58
Tabela 9	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos agrotóxicos utilizando a DLLME-GC-MS/MS	60
Tabela 10	Estudo da linearidade e faixa de aplicação para os agrotóxicos após a extração	61
Tabela 11	Curvas analíticas empregadas para cálculo de concentração no estudo da eficiência de extração (recuperação absoluta)	63
Tabela 12	Valores de recuperação absoluta, coeficiente de variação e fator de pré-concentração dos agrotóxicos estudados	64
Tabela 13	Valores de recuperação relativa, coeficiente de variação nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos estudados	65
Tabela 14	Comparação da extração de agrotóxicos com DLLME e SPE	66
Tabela 15	Comparação da extração de agrotóxicos com DLLME e SPME	67

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- AGROFIT – Sistema de agrotóxicos fitossanitários.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BHC – Hexaclorobenzeno, do inglês *Benzene hexachloro*.
- CE – Eletroforese capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.
- CV – Coeficiente de variação.
- DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid Liquid Microextraction*.
- DLLME-GC-MS/MS – Microextração líquido-líquido dispersiva com cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas em série.
- DLLME-SFO - Microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação da gota orgânica, do inglês *Dispersive Liquid Liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Drop*.
- DP – Desvio padrão.
- ECD – Detector de captura de elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*.
- FID – Detector por ionização de chama, do inglês *Flame Ionization Detector*.
- GC – Cromatografia em fase gasosa, do inglês *Gas Chromatography*.
- GC/MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.
- HCl – Ácido clorídrico.
- HF-LPME – Microextração em fase líquida com fibra oca, do inglês *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*.
- HPLC – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*.
- IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer.
- IE – Ionização por impacto de elétrons.
- LD – limite de detecção.
- LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *Liquid liquid extraction*.
- LPME – Microextração em fase líquida, do inglês *Liquid Phase Microextraction*.
- LQ – limite de quantificação.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*.
- NaCl – Cloreto de sódio.
- OMS – Organização Mundial da Saúde.
- PF – Fator de pré-concentração.
- SAA – Sistema de abastecimento de água.
- SDME – Microextração da gota única, do inglês *Single Drop Microextraction*.
- Sisagua - Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano.
- SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*.

US/EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

VMP – Valores máximos permitidos.

RESUMO

As pragas afetam o crescimento sadio de uma cultura, sendo um dos maiores inconvenientes nesta atividade, uma vez que afetam a economia e muitas vezes a saúde da população. Como forma de remediar tal problema houve a necessidade da criação de compostos capazes de combatê-las, os chamados agrotóxicos. Existem diversas categorias para a aplicação destes em uma ampla gama de organismos causadores de prejuízos nas lavouras. Como a agricultura é uma atividade consolidada e bastante antiga, o controle destes organismos prejudiciais também o é, desse modo algumas substâncias químicas que apresentam propriedades específicas que permitem com que persistam por anos após sua aplicação em solos e águas, necessitaram ser controladas e monitoradas. Como forma de avaliar a presença de alguns destes agrotóxicos em água, este trabalho desenvolveu e otimizou um método que envolveu a utilização da microextração líquido-líquido dispersiva associada a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (DLLME-GC-MS/MS) para a análise multiclasse dos agrotóxicos alacloro, clorpirifós, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, endossulfan I, hexaclorobenzeno, malation, metoxicloro, molinato, paration e trifluralina nesta matriz. Para a DLLME as amostras tiveram seu pH ajustado; tetracloreto de carbono foi o solvente extrator e acetonitrila o solvente dispersor, a agitação vigorosa por *vortex*, centrifugação a 2616 RCF (Força G Relativa), por 5 minutos, a 10°C. A metodologia apresentou boa linearidade ($r^2 > 0,9901$), sensibilidade e seletividade. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,03 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,10 a 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A precisão foi inferior a 10,7% e exatidão entre 88,7 e 109%, indicando a boa eficiência do método.

Palavras-chaves: agrotóxicos; DLLME-GC-MS/MS; água.

ABSTRACT

The pests affecting the healthy growth of a crop becoming one of the biggest inconvenience in this activity, since they affect the economy and often the health of the population. Pesticides, compounds capable of combat them, emerged as a way to remedy this problem. There are various categories for use in a wide range of organisms that cause damage to crops. Once the agriculture is an established and very old activity, the struggle against these pests with pesticides also is, thus some chemicals that have specific properties that allow to persist for years after application in soil and water needed to be controlled and monitored. In order to evaluate the presence of any of these in water, this work has developed and optimized a method involving the use of dispersive liquid-liquid microextraction associated to gas chromatography coupled to mass spectrometry *in tandem* (DLLME-GC-MS/MS) for multiclass analysis of pesticides alachlor, chlorpyrifos, p, p'-DDD, p, p'-DDE, p, p'-DDT, endosulfan I, hexachlorobenzene, malathion, methoxychlor, molinate, parathion and trifluralin in aqueous matrix. For DLLME samples were pH adjusted; carbon tetrachloride was extractor solvent and acetonitrile dispersing solvent, vigorous agitation by vortexing, centrifuging at 2616 RCF for 5 minutes at 10 ° C. The method showed good linearity ($r^2 > 0.9901$), sensitivity and selectivity. The limits of detection and quantification were 0,03 to 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0,10 to 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The precision was less than 10.7% and accuracy between 88.7 and 109%, indicating good efficiency of the method.

Key-words: pesticides; DLLME-GC-MS/MS; water.

1 Introdução

Desde que o crescimento populacional aumentou exponencialmente (MADDISON, 2008; UN/ESA, 2013), houve uma preocupação mundial em fornecer alimento suficiente para os habitantes em geral. Sendo assim, para garantir um rendimento razoável da atividade agrícola foi necessário o desenvolvimento e aplicação de produtos específicos para combater eventuais problemas (TERRA, 2008).

O Mercado Mundial de Agrotóxicos movimentou em 2014 cerca de US\$ 56,655 milhões de dólares (MCDOUGALL, 2015), sendo a América Latina responsável por US\$ 16,147 milhões, liderados por Brasil e Argentina (MCDOUGALL, 2015). O Brasil atingiu US\$ 12,249 milhões (SINDIVEG, 2015) e é possível notar que o país gasta uma quantia elevada com tais produtos, para atender 33,4% de área agricultável (THE WORLD BANK, 2015). A classe dos inseticidas foi responsável por 39,9% das vendas nacionais de agroquímicos. Já os fungicidas apresentaram o maior percentual de crescimento, 12,1%. A classe dos herbicidas totalizou 4,3% de crescimento, e os acaricidas e outras classes de agrotóxicos tiveram uma queda de 6,1% (SINDIVEG, 2015).

Os ingredientes ativos utilizados como agrotóxicos (inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc) apresentaram grande variedade química, sendo os compostos classificados como tiocarbamatos, organoclorados, organofosforados, dinitroanilinas, anilinas, entre outros. Alguns tipos de agrotóxicos, como os organoclorados, após diversos estudos indicaram possuir um tempo de meia-vida elevado persistindo mesmo após o banimento de seu uso (VILLA *et al.*, 2011).

Outros têm uma volatilidade alta podendo contaminar não só o solo, mas a atmosfera e atingir outros organismos vivos pelo ar. A pouca ou nenhuma solubilidade em água de alguns agrotóxicos fazem com que os mesmos se fixem fortemente ao solo ou bioacumulem em tecidos adiposos de diversas espécies animais (VERDES *et al.*, 1990). Dessa maneira, para evitar maiores transtornos à saúde humana, bem como à fauna e flora, diversos estudos foram desenvolvidos para auxiliar no estabelecimento de leis, restrições e revisões na utilização destes produtos.

De forma geral, a cromatografia em fase gasosa (GC) e em fase líquida de alta eficiência (HPLC) são as técnicas mais empregadas em análises de agrotóxicos. Alguns destes compostos se encontram em níveis baixos juntamente com vários outros que interferem em suas determinações. Portanto, um método de limpeza e pré-concentração se faz necessário.

Muitas pesquisas têm direcionado para métodos eficientes, econômicos e miniaturizados de extração (LEONG, 2009). A microextração em fase líquida (LPME) pode, por exemplo, ser realizada através da extração dos analitos por uma gota suspensa do solvente extrator (SDME), ou pela partição dos compostos de interesse em amostras aquosas através de uma mistura de solventes orgânicos (dispersor e extrator) (DLLME), ou ainda utilizando o mesmo sistema de solventes com a solidificação da fase orgânica (DLLME-SFO).

A DLLME envolve a transferência de massa, ou partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis (aquosa e orgânica). A solubilização dos analitos em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, e a diferença desta propriedade entre as fases e o próprio analito fará com que um equilíbrio dinâmico ocorra. Nesta técnica a área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa é infinitamente grande, e por isso a transferência dos analitos desejados para a fase extratora é rápida, uma vez que o estado de equilíbrio é atingido rapidamente. Além da rapidez, este método apresenta como pontos positivos a utilização de menores volumes de solventes orgânicos, baixo custo para aplicação e praticidade, já que envolve uma menor utilização de materiais durante sua execução. Esta microtécnica é comumente usada para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (REZAEI *et al.*, 2006), herbicidas triazina (NAGARAJU, 2007), fenóis voláteis (FARINA, 2007), clorofenóis (FATTAHI, 2007), clorobenzenos (KOZANI, 2007a), pesticidas organofosforados (BERIJANI *et al.*, 2006), trihalometanos (KOZANI, 2007b), entre outros.

O Brasil apresenta escasso número de fontes oficiais para obtenção de informações relativas a estudos de agrotóxicos em água para consumo humano. O Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Sisagua) em 2008 indicou que apenas 24% dos sistemas de abastecimento de água (SAA) cadastrados apresentavam informações sobre o controle da qualidade da água para os parâmetros agrotóxicos e apenas 0,5% apresentava informações sobre a vigilância da qualidade da água para tais substâncias (CARNEIRO *et al.*, 2015). No Mato Grosso do Sul, 41% dos municípios (32) realizaram análise de agrotóxicos em 2010. É importante ressaltar que dentre as análises realizadas, foram constatadas ocorrências de alguns agrotóxicos em níveis superiores aos limites estabelecidos pela Norma de Potabilidade de Água (SVS, 2011). Dessa maneira, fica evidente a adoção de medidas que possam aumentar a contribuição do controle destes compostos químicos na água potável.

Portanto, com a finalidade de permitir uma determinação rápida e satisfatória de alguns agrotóxicos em águas, este trabalho visou desenvolver um procedimento de análise com a utilização da microextração líquido-líquido dispersiva e da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

2 Revisão da Literatura

2.1 Agrotóxicos

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos são produtos e agentes provenientes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso em setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas. Pode também ser utilizado em 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 nocivos, bem como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989). No Brasil, eles precisam ser registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Existe ainda o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) um banco de dados para consulta pública sobre pragas, ingredientes ativos, produtos formulados, relatórios e componentes de fórmulas registrados no Ministério da Agricultura, com informações dos ministérios da Saúde e do Meio Ambiente (MAPA, 2015).

Os primeiros compostos utilizados como agrotóxicos eram substâncias tóxicas de origem natural, tais como a piretrina (piretro) (flores do *Chrysanthemum (Pyrethrum) cinerariaefolium*) e a nicotina (folhas de *Nicotiana tabacum*), além de espécies inorgânicas contendo mercúrio, enxofre ou cobre (COUTINHO *et al.*, 2005 apud JONATHAN, 1989). As antigas civilizações gregas, romanas e chinesas já conheciam a três mil anos atrás, a capacidade do sal (NaCl) para matar ervas daninhas (MARASCHIN, 2003). O primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos foi a descoberta do “Verde de Paris”, ou acetoarsenito de cobre, para combater o escaravelho da batata (MARASCHIN, 2003). Entre os compostos mais usados atualmente existem diversas classes como, por exemplo, os organofosforados e organoclorados, compreendendo uma grande variedade de substâncias químicas e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação (GALLI *et al.*, 2006).

De todo agrotóxico aplicado na agricultura, uma parcela considerável atinge rios, lagos, aquíferos e oceanos por meio do transporte por correntes atmosféricas, eliminação incorreta de restos de formulações, limpeza de acessórios e recipientes empregados na aplicação desses produtos e também pelo carreamento do material aplicado no solo pela ação erosiva da chuva (CALDAS *et al.*, 2011). Devido aos mecanismos de transporte característicos dos meios aquáticos, alguns desses compostos têm sido detectados até na região Antártica (CORSOLINI, 2009).

Atualmente o desafio consiste em desenvolver pesticidas cada vez mais seletivos e menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente; assim como possibilitar a substituição dos pesticidas pelo controle com agentes biológicos naturais para controle das pragas; ou ainda pelo melhoramento genético das plantas (MARASCHIN, 2003).

A escolha dos pesticidas para desenvolver este trabalho levou em consideração as aplicações nas culturas agrícolas mais populares do Brasil, toxicidade, proibição em alguns países e a classificação da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC).

Os agrotóxicos são classificados de várias formas dentre elas, quanto ao seu modo de ação no organismo alvo, em relação à sua estrutura química e quanto aos efeitos que causa à saúde humana são as mais comuns.

Quanto ao modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou à natureza da praga combatida, eles são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e/ou raticidas, acaricidas, nematicidas, fumigantes, moluscicidas etc. (ANDREI, 2005; LARINI, 1999).

Quanto à sua estrutura química os agrotóxicos selecionados se encontravam entre organoclorados, organofosforados, ditiocarbamatos, dinitroanilinas e cloroacetamidas. Nos próximos tópicos serão indicadas algumas características e propriedades destes.

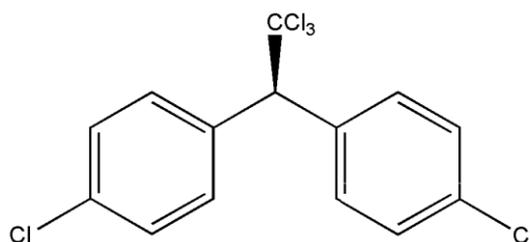
2.1.1 Organoclorados

Foram introduzidos em meados da década de 40, após a Segunda Guerra Mundial (DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001), e amplamente utilizados na agricultura e, na saúde pública (OGA, 2003), no combate de mosquitos causadores da malária e na prevenção de epidemias de tifo, transmitidas por piolhos (FLORES *et al.*, 2004).

São compostos com propriedades físico-químicas semelhantes, lipofílicos, à base de carbono com radicais de cloro e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos (SAVOY, 2011). Possuem em geral baixa pressão de vapor e alta estabilidade química, que levam estes compostos e seus derivados a se acumular nos tecidos graxos dos seres vivos e a persistirem no ambiente (VERDES *et al.*, 1990). Devido a estas características o seu uso está proibido ou severamente restringido em diversos países. Alguns dos principais e mais conhecidos organoclorados com atividade inseticida são: hexaclorobenzeno (BHC), endossulfan, DDT, DDE, DDD, etc (SAVOY, 2011).

O termo DDT se refere ao composto p,p'-DDT (para,para'-diclorodifeniltricloroetano) (Figura 1). Este inseticida organoclorado é uma mistura dos isômeros p,p'-DDT (85%), com o,p'-DDT e o,o'-DDT em quantidades menores (EXTOXNET, 1993a). Ele foi sintetizado em 1874 pelo químico alemão Zeidler, sendo que suas propriedades pesticidas foram descobertas sessenta e cinco anos depois (MARASCHIN, 2003). Derivados deste composto incluem DDD, DDE, metoxicloro e dicofol (SANTOS, 2002), sendo suas propriedades físico-químicas semelhantes (CUNHA, 2003).

Figura 1 Estrutura do p,p'-DDT



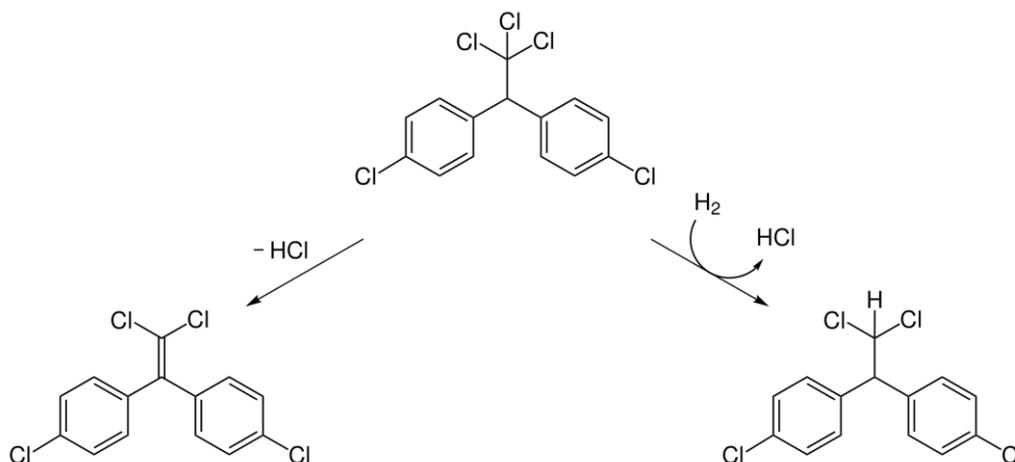
Fonte: Próprio autor

O DDT foi extensivamente usado na agricultura, mas foi banido em diversos países devido à persistência no ambiente e alta afinidade por lipídios que contribui para a bioacumulação e biomagnificação (fenômeno que ocorre quando há acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro ao longo da cadeia alimentar) (US EPA, 2010). Ainda é utilizado no controle de mosquitos vetores de malária em alguns países, como Zâmbia (CETESB, 2012a). O Brasil proíbe a fabricação, importação, exportação, manutenção em estoque, comercialização e uso do DDT desde 1985. (Portaria MAPA nº 329 de 2 de setembro de 1985).

Devido a pouca solubilidade em água, o DDT e seus metabólitos aderem firmemente ao solo, permanecendo nas camadas superficiais (CETESB, 2012a). Dessa forma, eles podem atingir águas superficiais por escoamento superficial, transporte atmosférico, tração, ou por aplicação direta (EXTOXNET, 1993a) e ficam adsorvidos ao material particulado e fixos aos sedimentos (CETESB, 2012a).

A degradação do DDT no ambiente atmosférico ocorre por foto-oxidação atmosférica ou por fotólise na superfície da água. A meia-vida estimada no solo é de aproximadamente 15 anos, no meio aquático é de 350 dias em água superficiais e de 31 anos em águas subterrâneas (HOWARD, 1991). Ao perder uma molécula de HCl, por degradação biológica ou ambiental, o p,p'-DDT forma o metabólito 2,2-bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno, conhecido como DDE (Figura 4) (CETESB, 2012a). Este composto é ainda mais resistente às degradações que o DDT. Pode ser detectado no sangue, gordura, urina, sêmen, e leite materno. (ATSDR, 1994). Outro metabólito formado é o DDD, 2,2-bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetano (Figura 2). A biodegradação das formas DDE e DDD é lenta e ocorre por descloração reductiva (CETESB, 2012a).

Figura 2 Degradação do DDT para DDE e DDD

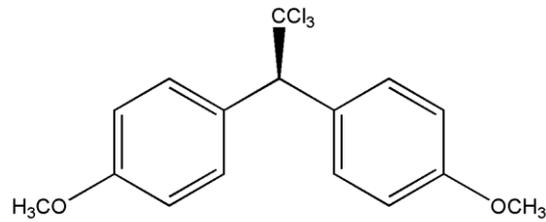


Fonte: Próprio autor

Este organoclorado, nos mamíferos, é inicialmente transformado em DDE e DDD que é rapidamente estocado nos tecidos adiposos (ATSDR, 1994). Estes por sua vez são transformados em DDA (diclorodifenil ácido acético) via outros metabólitos e em uma taxa bem lenta. DDA ou DDA associado é então eliminado pela urina (ATSDR, 1994). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica o DDT no Grupo 2B - possível cancerígeno humano com base na indução de tumores hepáticos em animais. (CETESB, 2012a) É altamente tóxico para várias espécies invertebradas aquáticas e para peixes também (EXTOXNET, 1993a).

O metoxicloro é o inseticida análogo do DDT, levemente tóxico, que o substitui em diversas aplicações (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014). Enzimas presentes nos mamíferos e nos organismos do solo são capazes de catalisar a desmetilação dos átomos de oxigênio metoxi, produzindo um produto de degradação mais polar que pode ser conjugado e excretado, assim o metoxicloro não se acumula nos tecidos dos animais e não persiste no ambiente (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014). A Figura 3 apresenta a sua estrutura química.

Figura 3 Estrutura química metoxicloro



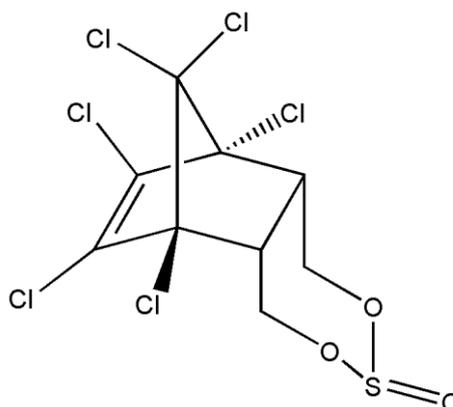
Fonte: Próprio autor

O metoxicloro tem uma estrogenicidade fraca e seu metabólito ativo, hidroxifeniltricloroetano, uma atividade estrogênica muito mais potente (YE *et al.*, 2014). Este exerce os efeitos típicos de desregulação endócrina, tais como falhas de ovulação, hipertrofia do útero, atrofia dos órgãos sexuais masculinos e deteriorações da produção de espermatozoides em ratos (AOYAMA & CHAPIN, 2014). Portanto, pode causar danos sérios de reprodução em seres humanos e outros animais. Desde 1985 é proibido no Brasil (Portaria MAPA n° 329 de 02/09/1985).

O composto apresenta um tempo de meia-vida no solo de 120 dias, uma vez que possui a característica de se prende fortemente as partículas deste, além de ser insolúvel em água, lixiviando-se muito lentamente (WEXLER & ANDERSON, 2005). Muitos peixes são sensíveis ao agrotóxico, no entanto, metabolizam rapidamente logo tendem a não acumulá-lo no organismo (EXTOXNET, 1993b). De acordo com a IARC pertence ao grupo 3 (Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos).

Endossulfan é um inseticida ciclodieno que é produzido pela mistura na proporção de 2:1 a 7:3 dos isômeros endossulfan I e endossulfan II (BUSSIAN *et al.*, 2015). Atua contra uma grande variedade de insetos e ácaros que foi introduzido no mercado em 1950 (BECKER, *et al.*, 2011). A estrutura química do endossulfan I, agrotóxico selecionado para a pesquisa, é apresentada na Figura 4.

Figura 4 Estrutura química endossulfan I



Fonte: Próprio autor

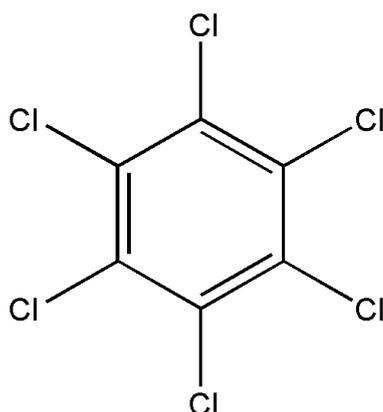
Ele foi banido em mais de 60 países por volta dos anos 80 (BUSSIAN *et al.*, 2015). De acordo com o comitê de revisão de Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), o endossulfan cumpre os critérios sobre bioacumulação, persistência, potencial de transporte longo e efeitos adversos (POPRC, 2008), e em outubro de 2009, a Comissão aprovou o projeto do perfil de risco do endossulfan (BECKER, *et al.*, 2011). Ele teve sua proibição no Brasil desde 31 de julho de 2013 (RDC ANVISA nº 28 09/08/2010).

Tem baixa solubilidade em água e se atem rapidamente as partículas do solo (EXTOXNET, 1993c). O tempo de meia-vida do endossulfan I e II em água é da ordem de dias a meses, enquanto que o derivado endossulfan sulfato, formado a partir da degradação com o ar, é de semanas a anos (LEONARD *et al.*, 2001; WAN *et al.*, 2005).

Este composto e seus derivados podem ser encontrados em placenta humana e em leite materno de indivíduos expostos (CERRILLO *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2007; FUJII *et al.*, 2012).

O hexaclorobenzeno (HCB) (Figura 5) é uma substância sintética que foi introduzida em 1933 para uso agrícola como fungicida no tratamento de sementes (CETESB, 2012b). Apesar da proibição de utilização como fungicida, HCB é ainda utilizado como um produto químico industrial, e é um subproduto não intencional de vários processos, tais como a produção de solventes clorados e preservativo de madeira (SONG *et al.*, 2013).

Figura 5 Estrutura química do hexaclorobenzeno



Fonte: Próprio autor

O tempo de meia-vida nos seres humanos é entre 4 a 8 anos (IARC, 2001) e devido a sua alta solubilidade em lipídios, é encontrado no tecido adiposo de uma larga porcentagem da população (ARREBOLA *et al.*, 2009; WALISZEWSKI *et al.*, 2012). Sendo assim, por apresentar um tempo de meia-vida longo, distribuição global, alta toxicidade para a população (MEIJER *et al.*, 2003), o HCB é conhecido como contaminante ambiental e como um POP (poluente orgânico persistente) regulamentado (SONG *et al.*, 2013). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica o HCB como possível cancerígeno humano (Grupo 2B) (CETESB, 2012d).

O HCB é persistente na água e sua degradação por processos abiótico e biótico não ocorre facilmente (CETESB, 2012d). Este composto possui maior adsorção ao material particulado orgânico do que aos solos com minerais (AHMED *et al.*, 2014) pode resultar em longa persistência também no sedimento.

2.1.2 Organofosforados

São compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, tiosfosfórico ou ditiosfosfórico (SAVOY, 2011). Os pesticidas desta classe são degradados no meio ambiente rapidamente (menos persistentes que os organoclorados) (CUNHA, 2003). Os organofosforados exercem a sua toxicidade através da ligação com a acetilcolinesterase, que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina. A inibição desta enzima faz com que ocorra uma acumulação de acetilcolina nas sinapses e, conseqüentemente, uma estimulação excessiva de neurotransmissão seguido por depressão ou paralisia e morte (BIANCO *et al.*, 2013).

Possuem um poder de toxicidade aguda relativamente alta na maioria dos casos (GARCÍA, 1997). Vários organofosforados representam uma periculosidade à saúde dos trabalhadores que aplicam e a outros que possam entrar em contato com os mesmos. A

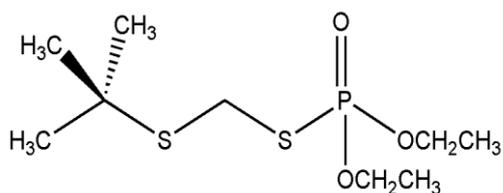
intoxicação por essas substâncias pode ocorrer por exposição via inalação, ingestão ou absorção direta (WHO, 1986).

Como os organoclorados, os organofosforados são lipossolúveis, porém decompõem-se dentro de dias ou semanas, e por esta razão são raramente encontrados na cadeia alimentar (BAIRD, 1995).

Existem compostos organofosforados sintéticos utilizados como inseticidas, acaricidas, nematocidas e fungicidas (SAVOY, 2011).

O terbufós (Figura 6) é um inseticida e nematocida usado na cultura algodão, amendoim, banana, café, cana-de-açúcar, feijão e milho (HAZ-MAP, 2015). Domesticamente utilizado principalmente no combate a baratas, moscas e na proteção de algumas hortaliças (KIM, 2005).

Figura 6 Estrutura química do terbufós

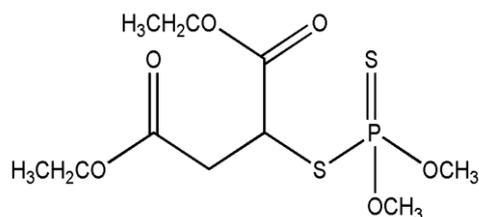


Fonte: Próprio autor

Ele é extremamente tóxico e apresenta de baixa a moderada persistência no solo, sendo que ele juntamente com seus metabolitos se degrada facilmente durante os primeiros 15-30 dias após a aplicação, em seguida, estabilizam-se gradualmente (RAHMAN *et al.*, 2012). No meio aquoso sofre predominantemente degradação química em vez da degradação microbiana (BOWMAN & SANS, 1982).

Malation (Figura 7) é um organofosforado desenvolvido como inseticida no campo, mas também usado para controlar mosquitos em corpos d'água (PARRISH, 1977).

Figura 7 Estrutura química do malation



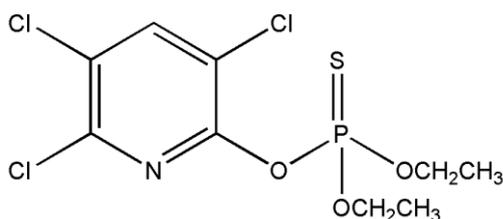
Fonte: Próprio autor

De acordo com alguns pesquisadores, esta substância causa anomalias e alterações no comportamento de várias espécies de peixes (DUTTA *et al*, 1994; PATIL & DAVID, 2008). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica malation no Grupo 2A - provavelmente cancerígeno aos seres humanos.

A degradação no solo é rápida e se relaciona com o grau de ligação com as partículas do solo. A quebra ocorre pela combinação de reações biológicas e não biológicas com a água (HOWARD,1991). A meia vida deste composto é de seis dias. Em água os produtos formados são ácidos mono e di carboxílicos, e devido à sua meia-vida muito curta, não é esperado que o malation se bioconcentra em organismos aquáticos (HOWARD,1991).

Introduzido em 1965, o clorpirifós (Figura 8) é eficaz no controle de uma variedade de insetos, incluindo lagartas, larvas das raízes do milho, baratas, larvas de pulga, besouros, moscas, formigas e piolhos (US EPA, 1986).

Figura 8 Estrutura química do clorpirifós



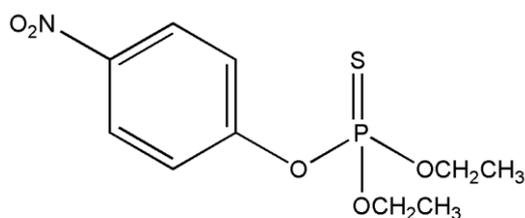
Fonte: Próprio autor

Ele é moderadamente tóxico para humanos e altamente tóxico para a vida aquática e marinha uma vez que se acumulam nos tecidos destes seres (US EPA, 1989a).

O clorpirifós é fortemente absorvido pelo solo, portanto é improvável de lixiviar ou contaminar as águas subterrâneas (RACKE, 1993). Seu tempo de meia vida é de 60 a 120 dias de acordo com o tipo de solo, clima e outras condições (KAMRIN, 1997).

Paration (Figura 9) é um composto que apresenta uma ampla aplicação sendo importante para o controle de vários insetos e ácaros (HARTLEY *et al.*, 1983) em variadas culturas. Este composto é altamente tóxico por todas as rotas de exposição para os seres humanos, sendo um possível cancerígeno – grupo 2B – de acordo com a IARC.

Figura 9 Estrutura química paration



Fonte: Próprio autor

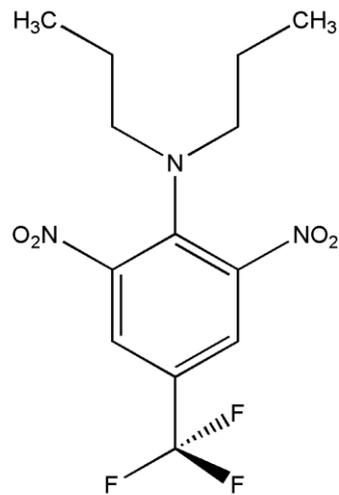
O paration tem pouco ou nenhum potencial de contaminação de águas subterrâneas e se liga fracamente as partículas do solo e é degradado por processos biológicos e químicos em várias semanas (MEISTER, 1992). A degradação é mais rápida em solos inundados, já a fotodegradação pode ocorrer na superfície de solos (HOWARD, 1991).

2.1.3 Dinitroanilinas

São normalmente aplicadas no solo em uma grande variedade de culturas e particularmente no inverno e primavera, em cereais, possuindo alta lipofilicidade, considerável pressão de vapor e baixa solubilidade em água, sendo escassamente presentes na água de superfície ou subterrânea (TADEO *et al.*, 1996). O principal representante deste grupo é a trifluralina.

A trifluralina (Figura 10) é um dos herbicidas utilizados no controle de várias gramíneas anuais e ervas daninhas (SAGHIR, *et al.*, 2008).

Figura 10 Estrutura química da trifluralina



Fonte: Próprio autor

O EPA considera a trifluralina como possível cancerígeno humano (US EPA, 1989b). No entanto, a IARC classifica como sendo do grupo 3 - Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos. Foi relatado como causador de tumores em ratos, de acordo com SAGHIR e colaboradores (2008).

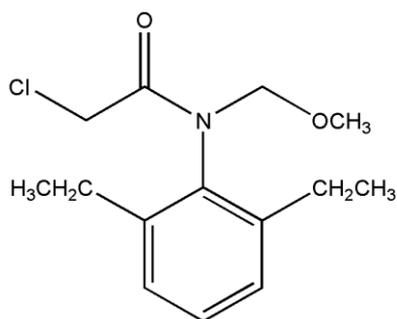
Este composto é levemente insolúvel em água e sua quebra é mais rápida de acordo com o tipo de solo em que se encontra (CAMPER, 1980).

2.1.4 Cloroacetamidas

Alguns são utilizados como herbicidas no controle de pragas nas lavouras do milho e soja (MARASCHIN, 2003). Em geral esses compostos e seus metabólitos são relativamente comuns em bacias hidrográficas e aquíferos em áreas agrícolas que tem uma história de aplicação (STAMPER & TUOVINEN, 1998). As cloroacetamidas fazem parte do grupo das acetamidas, e apresentam ação herbicida e agem na inibição de proteínas (MIDIO & MARTINS, 1997). Os principais compostos desta classe são, alacloro, metolacloro e o propalacloro.

O alacloro (Figura 13) é utilizado para controle de gramíneas anuais e ervas daninhas, é levemente solúvel em água e tóxico para organismos aquáticos, podendo se bioacumular, além de ser persistente com um tempo de meia-vida de mais de 70 dias no solo e 30 dias na água (KIDAK & DOGAN, 2015).

Figura 11 Estrutura química do alacloro



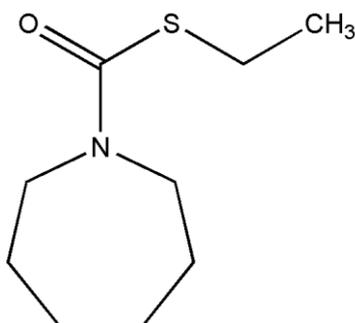
Fonte: Próprio autor

2.1.5 Tiocarbamatos

Quando utilizados como herbicidas são compostos que inibem o crescimento das plantas e a persistência no solo é curta, devido à volatilização e decomposição por microrganismos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). O principal representante é o molinato.

O molinato (Figura 14) é usado no controle de ervas daninhas nos arrozais e é altamente solúvel em água, por possuir um tempo de meia-vida no solo de duração moderada (de 5 a 21 dias) é esperado que tenha um amplo potencial de contaminação de águas subterrâneas (WEXLER & ANDERSON, 2005).

Figura 12 Estrutura química do molinato



Fonte: Próprio autor

O composto se liga fortemente as partículas do solo e pode ser quebrado pela ação da luz solar se estiver exposto ao ar (EXTOXNET, 1993d).

É classificado como classe II – altamente tóxico (PORTAL FIOCRUZ, 2015). Estudos mostram que ele pode ter efeitos adversos ligados ao campo reprodutivos dos mamíferos (COCHRAN *et al.*, 1997).

2.2 Métodos de análises de agrotóxicos

Técnicas cromatográficas mais simples para determinação de agrotóxicos como a cromatografia em camada delgada já foram muito utilizadas, porém devido a sua baixa sensibilidade passou a ser substituída por técnicas mais avançadas. Ainda hoje em dia a sua utilização é bem restrita, sendo mais utilizada para análises preliminares (identificação). Com o desenvolvimento de equipamentos de análises que proporcionaram investigações em menor tempo destes compostos, houve uma aplicação maior dos cromatógrafo a gás (GC) e líquido de alta eficiência (HPLC), dependendo do tipo de matriz e principalmente das características dos agrotóxicos (CUNHA, 2003).

Devido a algumas propriedades destes compostos químicos, há a necessidade de um pré-tratamento das amostras a fim de possibilitar uma melhor eliminação de substâncias interferentes bem como permitir a concentração de alguns analitos em baixos níveis presentes em matrizes complexas (BRUZZONITI *et al.*, 2000). Técnicas de preparo de amostras, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) apresentam diversas vantagens como ser simples no quesito montagem do sistema de extração, utilizarem solventes puros facilmente disponíveis, diversos materiais de recheios para empregar a SPE, no entanto, podem ser longas, envolverem elevada quantidade de amostra e solventes orgânicos tóxicos, proporcionarem poluição ao meio ambiente, riscos à saúde dos operadores e elevados custos para o tratamento dos resíduos, além de apresentarem automação relativamente complexa (CALDAS *et al.*, 2011). Para superar esses problemas, houve a introdução de técnicas miniaturizadas simples e baratas, como a microextração em fase sólida (SPME), a microextração líquido-líquido (LLME) e a microextração em fase líquida (LPME) foi recentemente introduzida (JEANNOT & CANTWELL, 1996). A LPME é uma miniaturização da extração líquido-líquido (LLE), onde apenas alguns microlitros de solvente são necessários para a concentração, e é uma técnica compatível com cromatografia capilar gasosa (GC), a eletroforese capilar (CE) e HPLC (LEE *et al.*, 2008). Na LPME, a extração normalmente envolve uma pequena quantidade de um solvente imiscível em água (fase receptora) e uma amostra aquosa contendo analitos (fase doadora), podendo ser dividida em nas categorias de microextração da gota única (SDME: *Single Drop Microextraction*), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), microextração com fibra oca (HF-LPME: *hollow fiber liquid-phase microextraction*) (ZHANG *et al.*, 2013) entre outras.

A maior vantagem na miniaturização do sistema de extração está na elevada rapidez e eficiência da análise, além de ser ambientalmente correta, já que consome pouco solvente, e altamente seletiva para as mais variadas aplicações (SARAFRAZ-YAZDI & AMIRI, 2010).

Foi feita uma verificação sobre publicações que investigassem agrotóxicos, tendo água como matriz, a DLLME e GC como instrumento de análise, sendo alguns trabalhos indicados na Tabela 1.

Tabela 1 Revisão dos trabalhos publicados que utilizaram GC, DLLME para extração de agrotóxicos em água e os solventes utilizados

Agrotóxicos	Solvente dispersor	Solvente extrator	Referência
Organofosforados	Acetonitrila (2 mL)	Hexano (24 µL)	MOINFAR & HOSSEINI, 2009
Organofosforados	Acetonitrila (1,0 mL)	Clorobenzeno (12 µL)	BERIJANI <i>et al.</i> , 2006
Multiclasse	Acetona (0,5 mL)	1-undecanol (50 µL)	RODRÍGUEZ-CABO <i>et al.</i> , 2011
Multiclasse	Acetona (0,4 mL)	Tetracloroeto de carbono (100 µL)	CUNHA <i>et al.</i> , 2009
Triazínicos	Acetonitrila (1 mL)	Clorofórmio (40 µL)	FARIÑA <i>et al.</i> , 2007
Organosulfurados	Metanol (800 µL)	Tetracloroeto de carbono (10 µL)	XIONG; HU, 2008
Organoclorados	Acetona (1 mL)	Tetracloroetileno (10 µL)	CORTADA <i>et al.</i> , 2009
Multiclasse	Acetonitrila (1,9 mL)	Tricloroetano (178 µL)	CARRO <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Próprio autor.

É possível notar uma aplicação cada vez mais frequente da microextração líquido-líquido dispersiva para este tipo de analito e matriz, dessa forma este foi o pré-tratamento selecionado para o presente estudo.

2.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

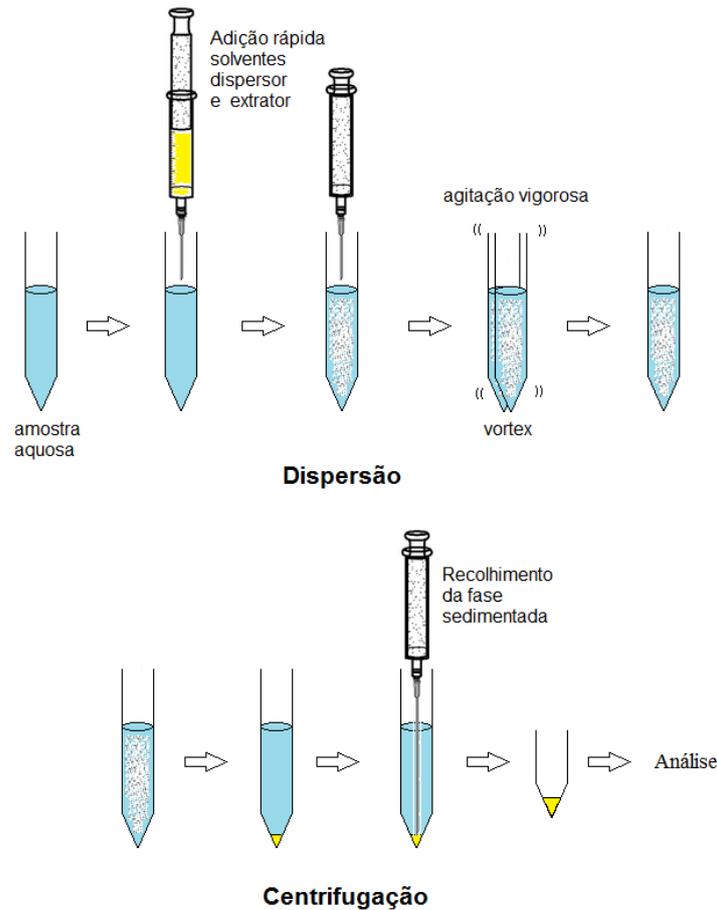
Esta microtécnica de extração é recente e foi desenvolvida por REZAEI e colaboradores em 2006. Ela é muito bem aplicada a amostras aquosas e segundo estes autores (REZAEI *et al.*, 2006) envolve a partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, onde a fase orgânica é composta por uma mistura de solventes dispersor e extrator.

Os solventes utilizados devem obedecer a alguns critérios. O solvente dispersor necessita ser solúvel no solvente extrator e na fase aquosa. A variação no volume adicionado influenciará diretamente no volume de fase sedimentada, contendo o analito. Já, o solvente extrator deve ter baixa solubilidade em água para possibilitar a separação adequada do extrato orgânico, ter densidade diferente da água gerando a fase sedimentada no fundo ou na superfície do recipiente onde ocorrerá a extração, respectivamente. O volume de extrator utilizado determinará o fator de pré-concentração desta microtécnica, quanto maior o volume, maior será a fase sedimentada e menor o fator de pré-concentração. Outro fator interessante é que tanto o solvente extrator quanto o dispersor devem ter pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas de solvente durante todo o processo (MARTINS *et al.*, 2012).

Tempo de extração, definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006), influência da força iônica (adição de sais), ajuste do pH, velocidade de centrifugação são outros parâmetros que podem ser otimizados para garantir uma maior eficiência à DLLME (MARTINS *et al.*, 2012).

O processo de extração, de forma geral, ocorre em duas etapas. Segundo REZAEI e colaboradores (2006), a primeira etapa (dispersão) consiste na adição da mistura de solventes e a segunda (centrifugação), na agitação por centrífuga e transferência da fase formada para análise no instrumento selecionado. A Figura 13 ilustra o procedimento.

Figura 13 Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).



Fonte: Próprio autor.

A utilização de um tubo de ensaio de fundo cônico é uma das características da técnica. Este tipo de vidraria facilita o recolhimento da fase sedimentada. O volume médio de amostra utilizado para desenvolver o processo também é outra característica marcante, analisando os dados da literatura ele é de cerca de dez mililitros. Depois de ter levado a alíquota da amostra até o tubo específico, a mistura dos solventes dispersor e extrator escolhidos deve ser rapidamente adicionada para a formação da nuvem dispersiva (microgotas de solvente). Logo após esta etapa, é necessária uma agitação vigorosa em um curto espaço de tempo, variando de segundos a poucos minutos, sendo feita manualmente ou com o auxílio de um agitador de tubos (*vortex*) ou ultrassom. Quanto menores forem as gotículas de solventes obtidas, mais fina será a nuvem de dispersão e maior será a eficiência da extração já que a área superficial será grande. O tubo é então levado para uma centrífuga, ocorrendo a separação das fases imiscíveis. A fase contendo o solvente extrator e analito é recolhida, podendo ser evaporada e redissolvida antes da análise, ou simplesmente levada para equipamento analítico adequado.

Na DLLME existe um tempo em que ocorre o equilíbrio da partição dos analitos, e somente após este tempo ter transcorrido é que as fases se separam (MARTINS *et al.*, 2012). A diferença das cargas elétricas é que determinará o equilíbrio resultante. A migração dos componentes da amostra de uma fase para outra, neste processo de extração, é dominada exclusivamente pela polaridade relativa do sistema como um todo. Geralmente os analitos são apolares (moléculas com cargas eletrônicas distribuídas igualmente), logo preferem a fase orgânica (solvente apolar) em contraste da fase aquosa, extremamente polar (cargas eletrônicas diferentes concentradas nos extremos das moléculas) (HARRIS, 2012).

2.3 Legislações sobre agrotóxicos em água potável

Os principais órgãos internacionais que estabeleceram normas referentes aos valores permitidos de agrotóxicos em águas tratadas são a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US/EPA). No Brasil, isto ficou ao cargo do Ministério da Saúde.

Na Tabela 2 estão descritos 17 agrotóxicos selecionados no presente estudo e os valores máximos permitidos (VMP) para águas utilizadas para o consumo humano segundo *Guidelines for drinking-water quality: Recommendations* norma da OMS, *National Primary Drinking Water Regulations* norma da US/EPA e Portaria n° 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde,

Tabela 2 Valores máximos permitidos dos agrotóxicos selecionados para águas superficiais, subterrâneas e tratadas

Composto	Valores Máximos Permitidos (VMP) ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	MS n° 2914	EPA	OMS
Alacloro	20	2	20
Atrazina	2	3	2
Clorpirifós + Clorpirifós oxon*	30	-	30
DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD)	1	-	1
Endossulfan I + Endossulfan II* + Endossulfan sulfato*	20	-	-
Heptacloro + Heptacloro epóxido*	-	0,6	-
Hexaclorobenzeno	-	1	-
Lindano	2	0,2	2

Continuação da Tabela 2 Valores máximos permitidos dos agrotóxicos selecionados para águas superficiais, subterrâneas e tratadas

Composto	Valores Máximos Permitidos (VMP) ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	MS n° 2914	EPA	OMS
Malation	-	-	-
Metoxicloro	-	40	20
Molinato	6	-	6
Paration	-	-	-
Simazina	2	4	2
Terbufós	1,2	-	-
Trifluralina	20	-	20

* Compostos listados de acordo com as normas e legislações que não se encontram no estudo, mas que tem seus valores máximos permitidos (VMP) fornecidos em conjunto com outros.

Fonte: adaptada segundo as legislações e normas regulamentadoras citadas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação de agrotóxicos em águas usando a microextração líquido-líquido dispersiva e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.2 Objetivos Específicos

Estabelecer as variáveis da técnica de DLLME (solventes de extração e dispersão, pH, força iônica, tempo de extração e velocidade de agitação) que evidencie maior eficiência na extração de alacloro, atrazina, clorpirifós, DDT (p,p'-DDD; p,p'-DDE; p,p'-DDT), endossulfan I, heptacloro, hexaclorobenzeno, lindano, malation, metoxicloro, molinato, paration, simazina, terbufós e trifluralina de amostras de água;

Validar o método de acordo como os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, recuperação e limites de detecção e quantificação, para garantir que atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados;

Comparar o desempenho analítico do método desenvolvido com os já existentes.

4 Parte Experimental

4.1 Materiais

4.1.1 Padrões

Os padrões de agrotóxicos foram:

Alacloro; p,p'-DDD; endossulfan I; heptacloro; lindano; metoxicloro; molinato, simazina e trifluralina adquiridos como padrões puros (10 mg cada). Os padrões p,p'-DDE e p,p'-DDT estavam em solução de metanol (1 mL com concentração de 2,7 mg mL⁻¹ e 1 mL com concentração de 5 mg/mL, respectivamente). Hexaclorobenzeno adquirido como padrão puro (100 mg). Todos estes são da marca *AccuStandard*.

Atrazina e clorpirifós adquiridos como padrões puros (250 mg); malation, paration e terbufós adquiridos puro (100 mg). Todos estes são da marca *Sigma Aldrich*.

O 4,4-dibromobifenil foi utilizado como padrão interno da marca *Sigma Aldrich*.

4.1.2 Reagentes e solventes

Acetona (grau cromatográfico, J. T. Baker); ácido ascórbico L (+) (P.A. – ACS, Vetec); acetonitrila (grau cromatográfico, Panreac); ácido cítrico anidro (P.A – ACS, Dinâmica); água destilada; água ultrapura; água de torneira; clorofórmio (99,9%, Dinâmica); cloreto de sódio (99,5%, *Sigma Aldrich*); clorobenzeno (99,9%, CHROMASOLV); *Extran Dinamicatec D-27* da marca Dinâmica; gás hélio (99,999% de pureza); hidróxido de potássio (P.A, Dinâmica); metanol (grau cromatográfico, VWR Chemicals); tetracloreto de carbono (99,9%, Merck); ácido etilenodiamino tetracético trissódico (EDTA trissódico) (99,101%, Merck).

4.1.3 Instrumentação

Foram utilizados agitador de tubos de ensaio – VM 3000 tipo *VORTEX* (Vixar, Brasil); balança analítica XT 220^a (Precisa, Suíça) com mínimo de massa de 0,0001 g; centrífuga 4K15 (SIGMA, Alemanha); destilador (Sppencer, Brasil); lavadora ultrassônica USC1800A com aquecimento da (Unique, Brasil); sistema de purificação de água *Milli-Q* Gradiente Classic PURELAB (Elga, França).

Para as análises foi utilizado um cromatógrafo a gás GC-3900, acoplado a um Espectrômetro de Massas *Saturn 2100T MS/MS* (Agilent *Technologies*, Santa Clara, Califórnia, USA), com injetor automático CP 8410, técnica de ionização por impacto eletrônico (IE) com energia de 70 eV, *software Saturn Work Station 5.52* com processador de dados MS 2.0 e banco de dados NIST 2.0;

A coluna capilar de sílica fundida, SLBTM-5ms da marca Sigma-Aldrich / Supelco, com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm e fase estacionária com 5% fenil 95% polidimetilsiloxano de baixo sangramento.

4.1.4 Outros materiais

Balões volumétricos de 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 mL; frascos de vidro de 2,0 mL com tampa de plástico e septo de PTFE/silicone (*Agilent Technologies*); frascos âmbar de vidro de 4,0 mL com tampa de plástico e septo de PTFE; micropipeta de 10 a 100 μL LM100 (LABMATE, Polônia); Micropipeta de 100 a 1000 μL Research (EPENDORF, Brasil); microseringa hipodérmica de vidro de 3 mL (BD, Brasil); pipeta graduada de 10 mL; pipeta volumétrica de 10 mL; pipetas Pasteur; tubos de ensaio de vidro com fundo cônico de 12 mL.

4.2 Protocolo de limpeza

Para a limpeza adequada da vidraria, e com a finalidade de evitar qualquer contaminação durante o procedimento experimental, um protocolo foi adaptado de LIMA (2011). Toda a vidraria necessária foi submetida à imersão em solução aquosa de detergente *Extran* (2% v/v) por 6 horas, e em seguida feito o enxague com água corrente. Após completa retirada do detergente, houve a lavagem com água destilada, e logo em seguida com água ultrapura. Efetuada a secagem da vidraria, houve a lavagem com acetona e aguardou-se a sua evaporação naturalmente. Antes da utilização, a vidraria era enxaguada com o solvente extrator selecionado para o experimento.

4.3 Preparo de soluções

Para as soluções estoques os padrões foram pesados e transferidos para balões volumétricos, onde foram dissolvidos em metanol. As soluções estoques ficaram em concentrações entre 5000 mg L^{-1} e 20.000 mg L^{-1} . O p,p'-DDT e p,p'-DDE já se encontravam em solução (metanol) a 5000 mg L^{-1} e 2700 mg L^{-1} , respectivamente. Todas as soluções foram estocadas em frascos de vidro âmbar de 2 ou 4 mL, conforme os volumes preparados e refrigerados em freezer a -5°C .

A partir das soluções estoque individuais dos agrotóxicos uma solução contendo todos os analitos (MIX) foi preparada na concentração de 10 mg L^{-1} em balão volumétrico de 5 mL. Esta foi condicionada em um frasco de vidro âmbar adequado e novamente estocado em freezer a -5°C . As novas diluições necessárias para a execução do procedimento experimental foram todas realizadas através desta sendo que todas foram preparadas e estocadas da mesma forma. A solução de 10 mg L^{-1} foi renovada a cada 2 meses para evitar erros devido à volatilização dos analitos e/ou do solvente, ou antes desse período caso fosse observada a degradação de algum dos analitos.

4.3.1 Conservantes

No método EPA 525.3 (US EPA, 2012) é descrito como sendo o procedimento para a determinação de agrotóxico em água, e emprega a Extração em Fase Sólida (SPE) e determinação por GC-MS. Neste método o dihidrogênicitrato de potássio é obtido em solução e permite ajustar o pH das amostras para aproximadamente 3,8; além de inibir o crescimento microbiano e a degradação de alguns analitos.

Pensando que isso poderia ser interessante também para a DLLME, ensaios empregando amostras de água em pH abaixo de 4,0 foram efetuados. Em substituição ao dihidrogênicitrato de potássio empregou-se o ácido cítrico e hidróxido de potássio.

Adicionou-se à água coletada da torneira o ácido cítrico e o hidróxido de potássio (KOH) para chegar a uma solução na concentração de 1 mol L^{-1} de cada um dos reagentes adicionados.

Para reduzir o cloro livre da água e inibir a hidrólise catalisada por metais no método EPA 525.3 foi estabelecido adição de ácido L-ascórbico e etilenodiaminotetracético trissódico (EDTA trissódico) as amostras no momento da coleta. No presente trabalho estudou-se o efeito da adição dos conservantes na eficiência de extração empregando a DLLME.

4.3.2 Amostragem

As amostras de água utilizadas para o desenvolvimento do método foram de alíquotas retiradas de um litro de água de torneira coletado e estocado, no início do trabalho, em frasco âmbar com tampa, que foi mantido refrigerado durante todo o período.

4.4 Métodos

4.4.1 Determinação de agrotóxicos por GC-MS/MS

As condições e parâmetros cromatográficos foram previamente estudados e otimizados por FERREIRA (2015).

Foi realizada uma bateria de testes com os agrotóxicos escolhidos e como resultado o método GC proposto apresentou as especificações encontradas nas Tabelas 3.

Tabela 3 Parâmetros cromatográficos adotados no GC

Parâmetro	Condição adotada
Temperatura do injetor	275°C
Gás de arraste	Hélio (99,999% de pureza)
Vazão do gás de arraste na coluna	1,0 mL min ⁻¹ (constante), com pulso de pressão de 40 psi e duração de 1 minuto
Injeção	Manual, no modo <i>splitless</i> (4,0 minutos tempo de amostragem), seguido de uma razão de <i>split</i> de 50:1 (15,0 minutos) e de 20:1 no restante da corrida

Fonte: Próprio autor.

Quanto à programação de temperatura do forno da coluna do GC, inicialmente este se encontrava a 60°C e foi mantido nesta temperatura por 1 minuto. Em seguida, foi levado a 200°C com uma taxa de aquecimento de 4°C/min. Então, foi elevado de 200°C a 240°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min, e se manteve nesta temperatura por 2 minutos. E por fim, foi de 240°C para 280°C, com aquecimento de 15°C/min, ficando por 3 minutos dessa forma. Esta programação do forno da coluna resultou em um tempo total de análise de 47,67 minutos. O tempo de estabilização do forno foi de 0,50 minutos.

Para o espectrômetro de massas as temperaturas definidas foram de 275°C para a linha de transferência, de 70°C para o *manifold* e de 200°C para o *trap*.

A princípio foi feita a análise de uma solução padrão mista dos agrotóxicos na concentração de 10 mg L⁻¹ por GC-MS, modo varredura de íons totais (modo *Scan*) e aquisição no intervalo de massas de 45-400 m/z. O pico no cromatograma foi identificado por comparação do espectro de massas obtido com o do banco de dados NIST 2.0; e quando necessário confirmou-se o tempo de retenção com a análise do padrão individual. Deste experimento obtiveram-se os tempos de retenção e os espectros de massas do analitos.

A espectrometria de massas em série (MS/MS), ou *tandem*, foi escolhida com a ideia de garantir maior seletividade no método de análise. Para o desenvolvimento do método se selecionou como íon precursor um íon de elevada razão massa/carga (*m/z*) e de grande intensidade.

Nesta etapa, o modo *AUTOMATED METHODS DEVELOPMENT* (AMD) foi o escolhido, pois ele permite determinar o modo de excitação e a selecionar a voltagem da energia necessária para que a fragmentação dos analitos seja satisfatória. As energias no modo ressonante analisadas foram 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 volts, e no modo não ressonante de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 volts. Assim também se pôde eleger o íon de quantificação de cada um dos compostos e estabelecer as condições de aquisição de dados do método GC-MS/MS.

4.4.2 Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Para o desenvolvimento do método de extração adotado neste trabalho foram necessários estudos para a escolha do solvente dispersor, solvente extrator e o volume de ambos, efeito do pH, adição de sal (NaCl), tempo de extração e tipo de agitação.

Após a verificação de alguns métodos na literatura para determinação de agrotóxicos, em água utilizando DLLME e GC como instrumento de análise, várias possibilidades de pares de solventes dispersor/extrator foram avaliados.

Baseando-se nos trabalhos já publicados, os volumes de acetonitrila (solvente dispersor) e tetracloreto de carbono (solvente extrator) foram estudados a partir de combinações que variaram de 0,5; 1,0 e 2,0 mL de dispersor e de 60, 130 e 200 μL de extrator.

Para verificar o efeito do pH na eficiência de extração foram efetuados experimentos com os pH ácido (aproximadamente 3,8 gerado por solução de dihidrogênicitrato de potássio), pH neutro e levemente alcalino (pH=8). A adoção de pH adequado facilitará na partição dos analitos na dispersão formada pelas microgotas de solvente extrator. Neste experimento as concentrações empregadas dos analitos nas amostras variaram entre 2,6 e 9,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A água de torneira do laboratório foi analisada empregando o método EPA 525.3 adaptado e nenhum dos analitos foram encontrados. Esta análise foi realizada no mesmo período em que este trabalho estava sendo efetuado e fez parte da dissertação de outra aluna do nosso grupo de pesquisa. De forma que a água de torneira foi considerada a matriz isenta.

Para o pH ácido, uma alíquota da amostra de água de torneira coletada foi utilizada no preparo de uma solução (0,04 mol L^{-1} de ácido cítrico e hidróxido do potássio, respectivamente) que resultou no sal dihidrogênicitrato de potássio que manteve o pH em torno de 3,8.

Com o uso de pHmetro foi verificado que na alíquota aquosa selecionada esta se encontrava em pH neutro, não sendo necessários ajustes para a realização dos testes.

Já as amostras com pH básico foram preparadas com água coletada da torneira e adição de algumas gotas de solução de hidróxido de potássio 1% para correção do pH para 8,0.

As amostras de água já com os pH ajustados foram empregadas no preparo de 25 mL de soluções padrões mistas dos agrotóxicos por diluição das soluções padrões dos agrotóxicos que se encontravam a $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ em metanol, conforme mostra Tabela 4.

Tabela 4 Concentração dos agrotóxicos nas amostras de água de torneira enriquecidas com os agrotóxicos

Concentração*	Analitos	Volume adicionado da solução padrão individual de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$
$9,2 \mu\text{g L}^{-1}$	simazina, clorpirifós, malation, paration, endossulfan I, DDT, metoxicloro	115 μL
$5,6 \mu\text{g L}^{-1}$	atrazina, alacloro, heptacloro	70 μL
$2,4 \mu\text{g L}^{-1}$	DDD, hexaclorobenzeno, terbufós, DDE	30 μL
$2,6 \mu\text{g L}^{-1}$	trifluralina, molinato, lindano	32,5 μL

* soluções com volume de 25 mL e pH de 3,8; 7,0 e 8,0.

Fonte: Próprio autor.

Para a DLLME foram transferidos 5 mL da solução padrão mista preparada com água da torneira e pH ajustado para tubo de ensaio de vidro com fundo cônico. A seguir, injetou-se rapidamente na amostra uma mistura contendo 0,5 mL de acetonitrila (solvente dispersor) e 60 μL de tetracloreto de carbono (solvente extrator) com uma microseringa (de vidro de 3 mL). A amostra foi agitada em *Vortex* por 30 s para formação de microgotas de solvente orgânico dispersas na fase aquosa. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 854 RCF a 10°C . A fase sedimentada, aproximadamente 40 μL foi recolhida com o auxílio de uma micropipeta (de 10 a 100 μL). Nestes experimentos, para a análise cromatográfica usando o injetor automático, adicionou-se uma pequena alíquota do padrão interno a 30 μL do extrato da DLLME e o volume foi completado a 0,1 mL com tetracloreto de carbono. O extrato foi colocado no *insert* dentro de frasco de vidro de 2 mL com tampa de rosca e septo, e para análise cromatográfica injetou-se 1 μL da solução. As extrações foram realizadas em triplicata e cada extrato foi analisado três vezes.

O efeito da força iônica sobre a eficiência de extração foi avaliado em amostras com concentração de 2 mg L^{-1} de cada um dos agrotóxicos, pH ajustado a 3,8; sem adição de sal e em concentração de 2,0; 5,0 e 10% de NaCl. As condições da DLLME e as diluições para análise cromatográficas foram similares as descritas no estudo de pH.

O tipo de agitação e a velocidade de centrifugação influenciam na formação de micro gota e separação de fases, e conseqüentemente na eficiência de extração. Neste sentido, os extratos da DLLME foram centrifugados a 854 RCF (Força G Relativa) e a 2616 RCF, a 10°C. Nestes experimentos a extração foi efetuada com o 0,5 mL de acetonitrila e 60 µL de tetracloreto de carbono, amostra em pH 3,8 (concentrações dos analitos conforme informado na Tabela 4) e agitação de 1 min em agitador tipo *vortex* em velocidade média. A diluição do extrato da DLLME para análise cromatográfica foi feita conforme descrito no item 4.4.2 para o estudo do pH.

Experimentos foram realizados empregando dois sistemas de agitação da amostra: agitador tipo *vortex* e banho ultrassônico (à temperatura ambiente). Os experimentos foram realizados usando as condições descritas acima, exceto quanto a centrifugação que foi de 854 RCF.

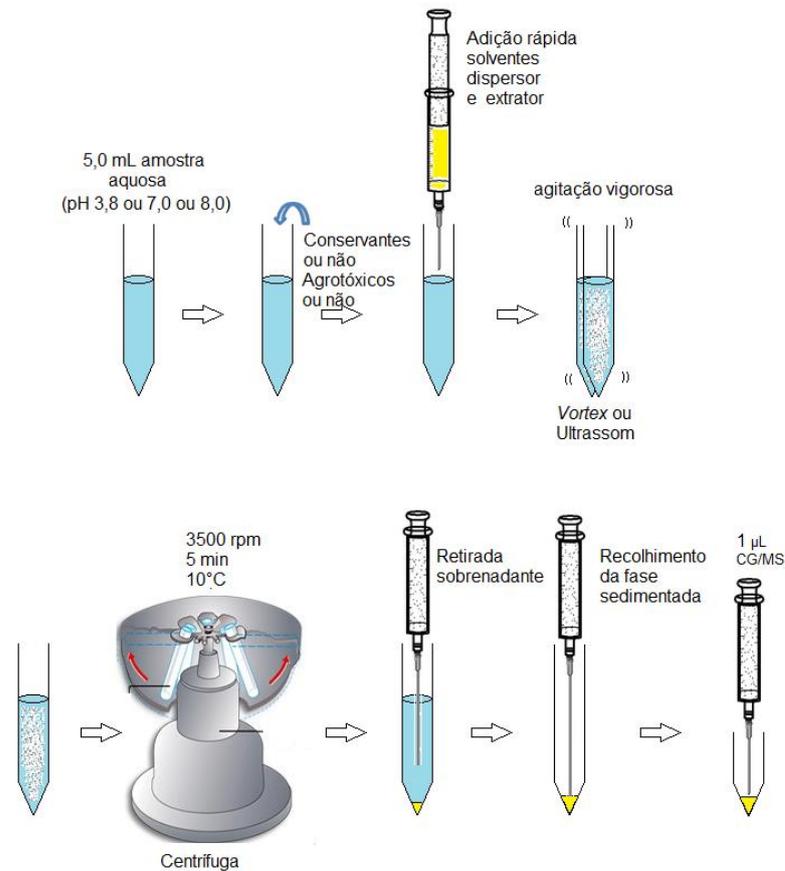
O tempo de extração é outro parâmetro importante para ser analisado no desenvolvimento da DLLME. Foram analisados o perfil cromatográfico usando tempos de 1,0; 2,0 e 3,0 min em *vortex*, com centrifugação do extrato de 854 RCF.

O método EPA 525.3 indica a adição de conservantes para eliminação de alguns interferentes (cloro, metais, entre outros). Estudou-se a diferença de amostras com ou sem a adição do ácido L-ascórbico e do EDTA trissódico.

Neste experimento as amostras de água de torneira foram enriquecidas com os padrões na concentração de 9,2 µg L⁻¹ e pH da amostra 3,8. Para 5 mL de amostra aquosa foram acrescentados 0,050 g de ácido L-ascórbico e 0,0175 g de EDTA trissódico. A DLLME foi realizada empregando 0,5 mL de acetonitrila e 60 µL de tetracloreto de carbono, agitação da amostra por 3 min em *vortex* e centrifugação por 5 min a 2616 RCF. Obteve-se 40 µL da fase orgânica sedimentada e neste experimento não se procedeu à diluição do extrato, para a análise cromatográfica a injeção foi efetuada de forma manual.

Após todas estas etapas avaliadas o procedimento de DLLME adotado para as análise por GC-MS/MS estão representadas na Figura 14.

Figura 14 Esquema da extração da amostra por DLLME



Fonte: Próprio autor.

Foi definido que a alíquota de água seria de 5 mL (esta poderia vir da solução em pH ácido, neutro ou básico dependendo do estudo). Em seguida, para o estudo da influência da adição de conservantes os mesmos foram ou não adicionados. Durante a validação do método as amostras foram então contaminadas com diversas concentrações do MIX de agrotóxicos. A amostra real não passou por esta última etapa. A mistura de solventes dispersor/extrator foi rapidamente acrescentada com uma seringa de vidro de 3 mL. A agitação vigorosa foi efetuada (por *vortex* ou ultrassom). A seguir, levou-se o tubo de ensaio para a centrífuga, onde suas condições foram de 2616 RCF, por 5 minutos à 10°C. Retirou-se o sobrenadante do tubo, que foi descartado adequadamente, e coletou-se a fase sedimentada com micropipeta e levada para um frasco de 2 mL. Utilizando-se uma microseringa de 10 µL houve a injeção de 1 µL da fase recolhida para análise no CG-MS/MS.

4.4.3 Validação do método DLLME-GC-MS/MS

Os parâmetros para a validação do método DLLME-GC-MS/MS foram a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (método e instrumento).

4.4.3.1 Seletividade

A seletividade foi obtida pela comparação dos cromatogramas obtidos da matriz aquosa isenta dos analitos de interesse e da matriz fortificada com os padrões dos analitos de interesse na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A água de torneira do laboratório foi considerada a matriz isenta dos agrotóxicos.

4.4.3.2 Linearidade do método

Para avaliar a linearidade do método, soluções padrões de concentrações diferentes de agrotóxicos em água de torneira tratada (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$) foram analisadas empregando os parâmetros estabelecidos para DLLME e análise GC-MS/MS. Todo o procedimento foi feito em triplicata.

O estudo do comportamento linear do instrumento foi realizado através da injeção direta dos padrões de agrotóxicos e com a extração dos mesmos, sendo a faixa de concentração de 50 a $570 \mu\text{g L}^{-1}$.

A padronização externa foi selecionada como método de quantificação. Os gráficos de calibração foram feitos de acordo com a relação área obtida de cada agrotóxico com sua respectiva concentração. A equação da reta ($y = ax + b$ ou $A = aC + b$, onde y ou A = área do pico; a = coeficiente angular da reta; b = coeficiente linear da reta; x ou C = concentração do analito) foi determinada pelo programa *Microsoft Excel 2010* para o tratamento dos dados. A avaliação da linearidade do método foi feita através do coeficiente de correlação linear ao quadrado (r^2). De acordo com a literatura quanto mais esse valor se aproximar de 1 melhor será a linearidade.

4.4.3.3 Limites de detecção e quantificação

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação, água de torneira (matriz isenta) foi contaminada com concentrações diferentes do MIX de agrotóxicos, e a extração foi feita empregando a DLLME, os extratos coletados e analisados pelo método GC-MS/MS geraram resultados que tiveram seus valores de razão sinal/ruído determinados.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos quando fossem igual a 3 e a 10, respectivamente.

4.4.3.4 Exatidão e precisão

4.4.3.4.1 Precisão do instrumento

Para avaliar a precisão do instrumento foi necessário um estudo da repetitividade dos tempos de retenção dos analitos e de suas respectivas áreas.

O estudo do tempo de retenção levou em consideração a análise em triplicata de uma solução padrão a $1150 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos. Assim obteve-se através das médias (M) dos tempos de retenção, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (%CV).

A fórmula para determinar %CV é:

$$\%CV = (DP/M) \times 100$$

Já a análise da repetitividade das áreas dos analitos foi realizada pelo estudo de três diferentes concentrações de padrões de agrotóxicos (520 , 690 e $920 \mu\text{g L}^{-1}$) em duplicatas. Com a média das áreas e desvio padrão se chegaram aos valores dos coeficientes de variação.

4.4.3.4.2 Exatidão e precisão do método DLLME-GC-MS/MS

A precisão foi investigada de acordo com a repetitividade da resposta do detector (tempo de retenção e área) para o método de análise proposto através dos valores obtidos para %CV, como descrito no item anterior. A exatidão do método foi avaliada pelos ensaios de recuperação absoluta e relativa.

Os ensaios de recuperação absoluta foram realizados em triplicata na concentração de $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

As áreas médias para os picos cromatográficos de três réplicas de extração DLLME foram calculadas e as concentrações dos analitos no extrato orgânico foram determinadas. Para isso, curvas analíticas foram obtidas com os dados de análises de soluções dos padrões em tetracloreto de carbono (injeção direta) na faixa de concentração de $0,28$ a $1,15 \text{ mg L}^{-1}$.

A eficiência de extração ou recuperação absoluta (Bressolle *et al*, 1996) foi calculada conforme equação:

$$R (\%) = [C_{\text{sed}} \times V_{\text{sed}} / C_o \times V_{\text{aq}}] \times 100$$

V_{sed} = volumes da fase orgânica sedimentada (40 μ L);

V_{aq} = volume da amostra aquosa (5 mL);

C_{sed} = concentração analito na fase orgânica sedimentada.

C_o = concentração do analito na amostra aquosa

O fator de pré-concentração também chamado de fator de enriquecimento foi calculado empregando a seguinte equação:

$$FP = C_{\text{sed}} / C_o$$

Para avaliação da recuperação relativa amostras fortificadas nas concentrações de 1,0; 3,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram analisadas. As concentrações nas amostras foram determinadas empregando-se a equação da reta da curva analítica de análise DLLME-GC-MS/MS das soluções padrões aquosas. A recuperação relativa foi calculada conforme equação:

$$\% \text{Rec.} = [(C_1 - C_2) / C_3] * 100$$

Onde: %Rec. = recuperação em porcentagem; C_1 = concentração do analito na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada; C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

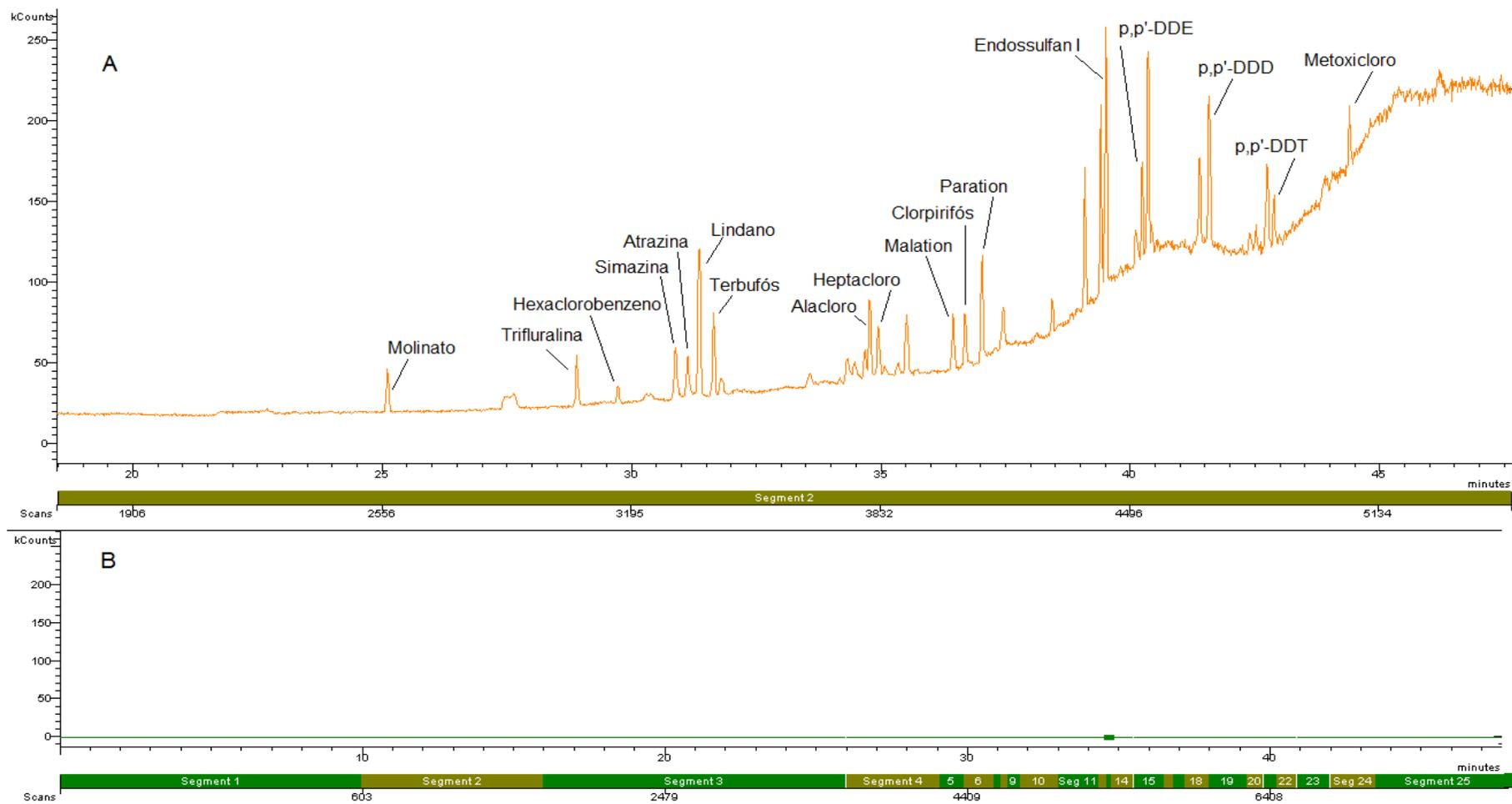
A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação percentual, sendo que esse foi calculado para os valores de recuperação obtidos.

5 Resultados e discussão

5.1 Separação cromatográfica dos agrotóxicos por GC-MS/MS

Com as condições pré-determinadas para as análises de agrotóxicos por GC, foi injetado uma solução padrão do MIX contendo 10 mg L^{-1} dos agrotóxicos em metanol, no modo *scan*, varredura de íons totais, gerando um cromatograma (Figura 15-A). Esta concentração foi a mais alta empregada neste método quantitativo.

Figura 15 Cromatograma da varredura de íon totais. A) MIX de agrotóxicos a 10 mg L⁻¹. B) Branco da coluna

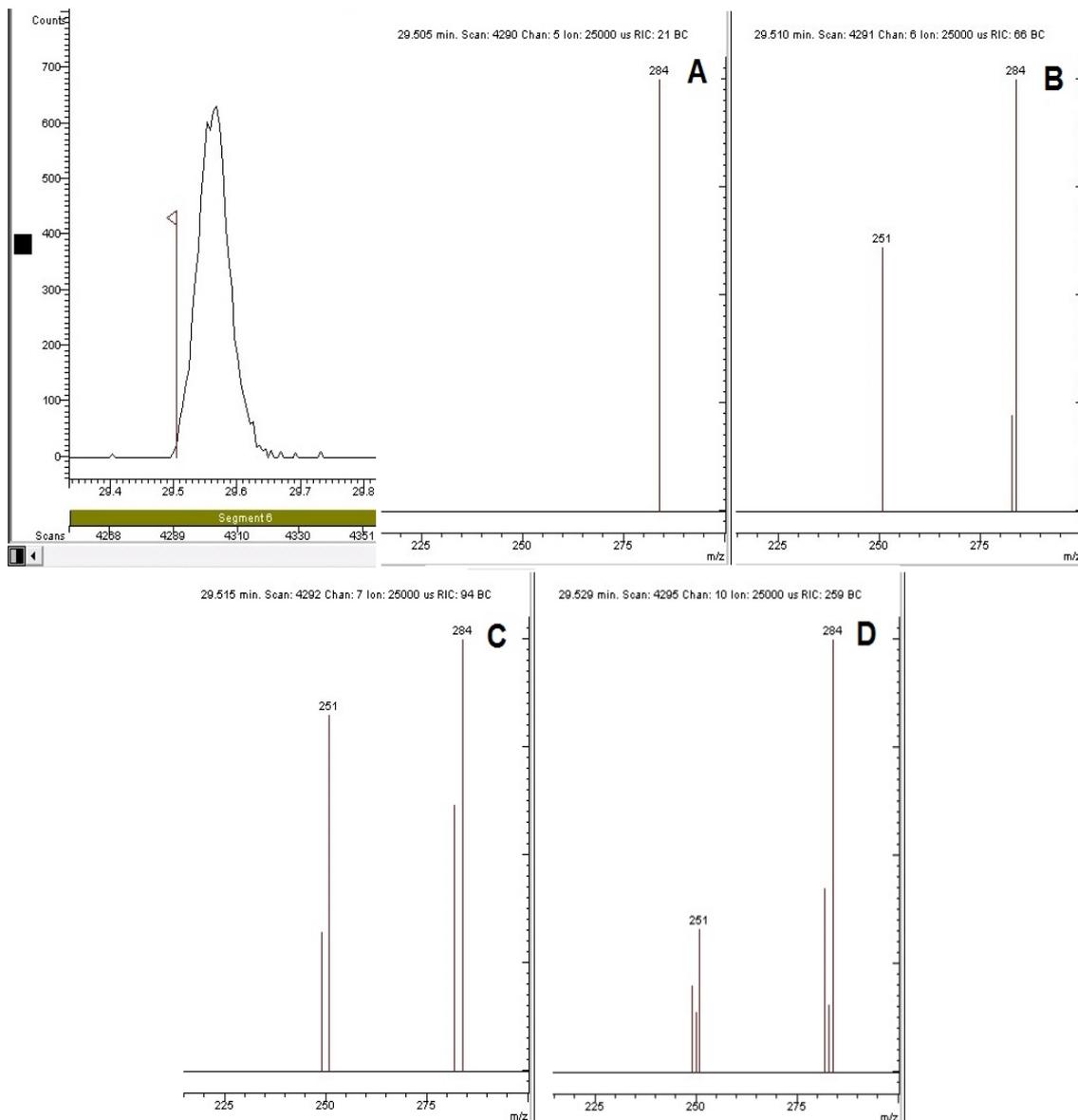


Fonte: Próprio autor.

Foi através deste resultado que foram identificados os picos e tempos de retenção dos agrotóxicos selecionados indicando que tais condições garantiram uma ótima separação. Com um branco da coluna (Figura 15-B) se verificou a ausência de qualquer contaminante que afetaria a análise.

Como exemplo do estudo dos parâmetros necessários para a definição das melhores condições para a espectrometria de massas em série, na Figura 20 estão apresentados os vários canais de energias analisados no modo AMD ressonante para o hexaclorobenzeno. Nota-se que com 0,5 V (Figura 16-A) não houve quebra do íon precursor (íon 284), com 0,6 V (Figura 16-B) o íon 284 começa a se fragmentar, com 0,7 V (Figura 16-C) a fragmentação do íon precursor aumenta e, com 1,0 V (Figura 16-D) o íon 284 tem maior fragmentação. Cada um dos analitos foi submetido à mesma análise.

Figura 16 Espectro de íons para o hexaclorobenzeno mostrando as diferentes energias de excitação testadas no método AMD. A) com 0,5 V. B) com 0,6 V. C) com 0,7 V. D) com 1,0 V.



Fonte: FERREIRA, 2015.

Os parâmetros adotados para aquisição de dado no modo MS/MS são mostrados na Tabela 5.

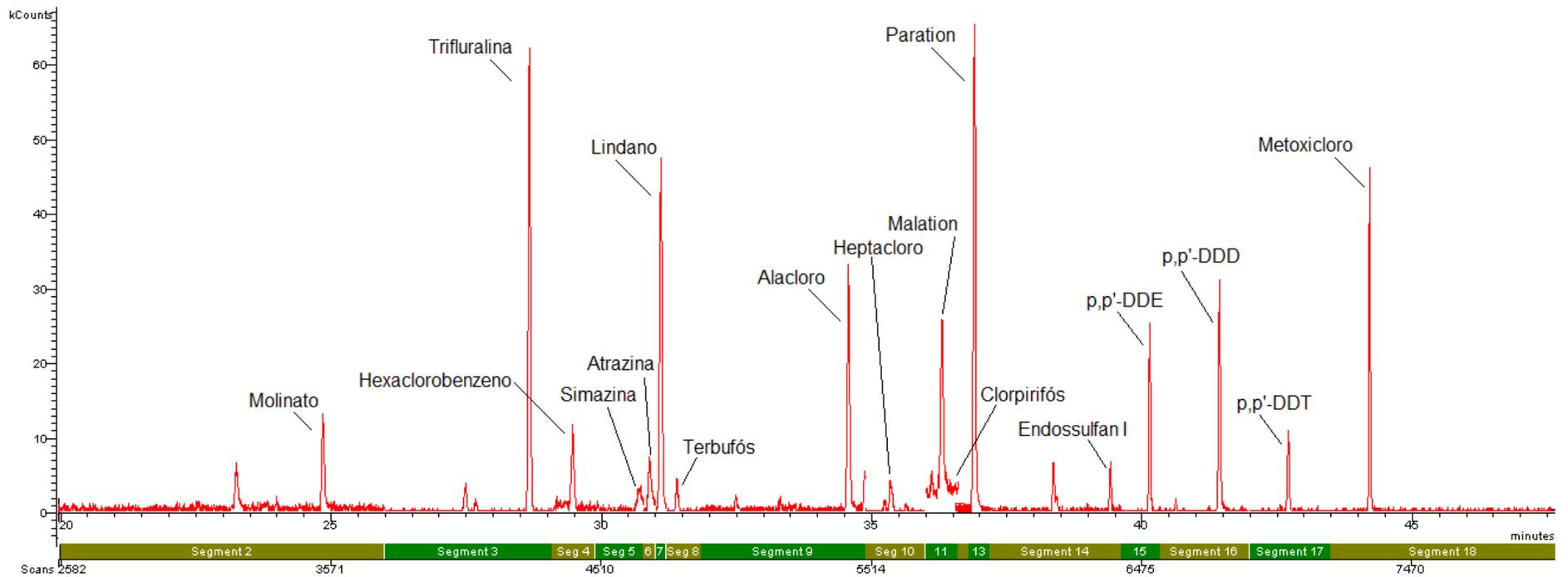
Tabela 5 Parâmetros obtidos pelo método GC-MS/MS

Compostos	Íon precursor (m/z)	Modo de ionização	Íon de quantificação (m/z)	Energia de excitação (V)
Molinato	126	não ressonante	98, 124, 126	0
Trifluralina	306	ressonante	305, 306	0
Hexaclorobenzeno	284	ressonante	282, 283, 284	0,9
Simazina	201	não ressonante	200, 201	0
Atrazina	200	não ressonante	200	0
Lindano	181	ressonante	109, 145, 146, 147, 148, 181	0,3
Terbufós	231	ressonante	231	0,3
Alacloro	188	ressonante	158, 159, 160,161	0,2
Heptacloro	272	não ressonante	263, 317	100
Malation	125	não ressonante	126, 171	0
Clorpirifós	314	ressonante	97, 98	0,3
Paration	291	não ressonante	291	0
Endossulfan I	339	ressonante	194, 195, 231, 267	0,2
p,p'-DDE	318	não ressonante	246, 316	100
p,p'-DDD	235	não ressonante	165, 199	95
p,p'-DDT	235	não ressonante	165, 199	98
Metoxicloro	227	não ressonante	141, 153, 281	95

Fonte: FERREIRA, 2015.

O cromatograma obtido na análise da solução MIX de agrotóxicos contendo 10 µg L⁻¹ por GC-MS/MS é mostrado na Figura 17.

Figura 17 Cromatograma da solução padrão dos agrotóxicos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para a análise GC-MS/MS



Fonte: Próprio autor.

O método GC-MS/MS, por ser seletivo, apresentou uma sensibilidade maior em relação ao modo *SCAN*, menor ruído e melhores relações sinal/ruído puderam ser observadas quando comparado ao cromatograma no modo *scan* (GC-MS).

5.2 Otimização das condições da DLLME

Após a aplicação da metodologia para a extração dos agrotóxicos selecionados com o auxílio da microextração líquido-líquido dispersiva foram obtidas respostas que ajudaram a compor o melhor procedimento para a aplicação na amostra real. Estes resultados serão apresentados na sequência.

5.2.1 Seleção e volumes dos solventes dispersor e extrator

Ao tentar reproduzir as combinações listadas na literatura, algumas não formaram a nuvem de dispersão ou a fase sedimentada, mesmo variando os volumes dos solventes, sendo logo descartadas. Dentre elas estão: acetonitrila/clorofórmio; acetonitrila/clorobenzeno.

Outras combinações que utilizavam tetracloreto de carbono, tricloroetano ou 1-undecanol como solventes extratores não puderam ser testadas por falta da disponibilidade destes no laboratório. Sendo assim, restaram o hexano e o tetracloreto de carbono como prováveis agentes extratores. O tetracloreto de carbono apesar de ser mais tóxico do que o hexano foi escolhido, pois apresenta um ponto de ebulição maior do que o hexano (76,5°C e 68,7°C, respectivamente), o que é importante para evitar perdas por vaporização de solvente que implicaria na eficiência de extração.

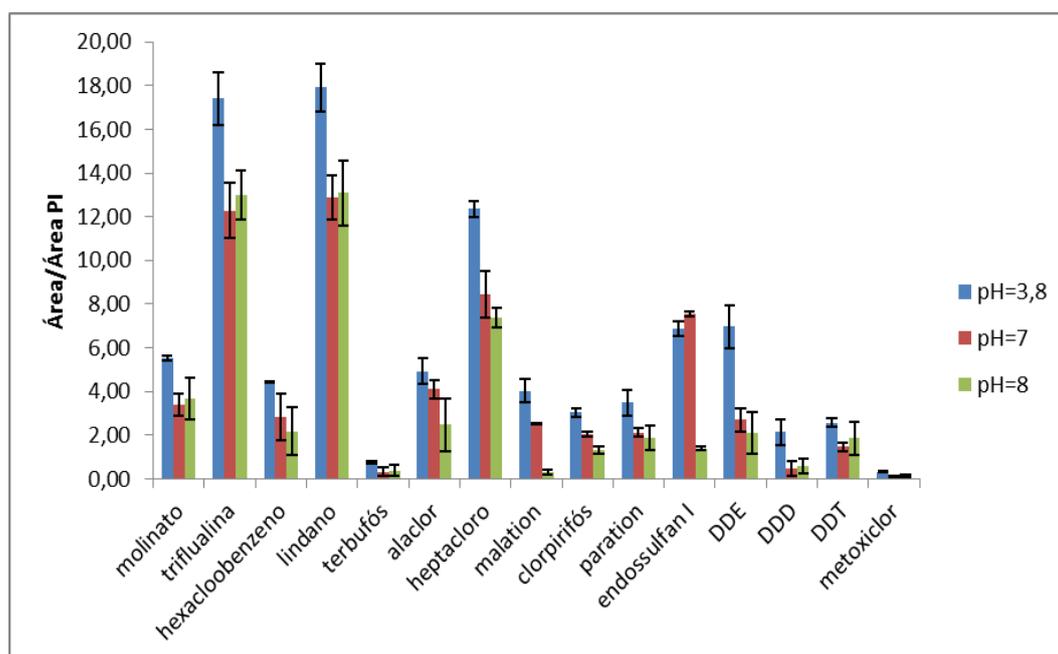
Com o extrator determinado foram estudados metanol, acetona e acetonitrila como solventes dispersores. A combinação que formou a maior fase sedimentada em todos os casos, mesmo com a variação dos volumes, foi acetonitrila/tetracloreto de carbono. Logo este par foi o selecionado.

Foram priorizadas as combinações que utilizavam a menor quantidade de solvente extrator, já que ele é um quesito de extrema importância no fator de pré-concentração. A relação do volume e do fator é inversamente proporcional, logo quanto menor o volume, menor será fase sedimentada e maior o fator de pré-concentração. Com 2,0 mL/60 µL e 0,5 mL/60 µL ocorreram as melhores formações da dispersão em relação aos outros volumes testados. A reprodutibilidade da combinação 2,0 mL/60 µL não ocorreu da forma esperada, logo a combinação com os valores mínimos de solvente dispersor e extrator (0,5 mL/60 µL) foi adotada.

5.2.2 Efeito do pH

Avaliou-se o comportamento da DLLME na extração dos agrotóxicos em três valores de pH 3,8; 7,0 e 8,0. As razões das áreas médias e seus respectivos desvios padrões encontram-se no gráfico da Figura 18.

Figura 18 Gráfico das áreas médias e desvios padrões da DLLME em pH 3,8; 7,0 e 8,0



Fonte: Próprio autor.

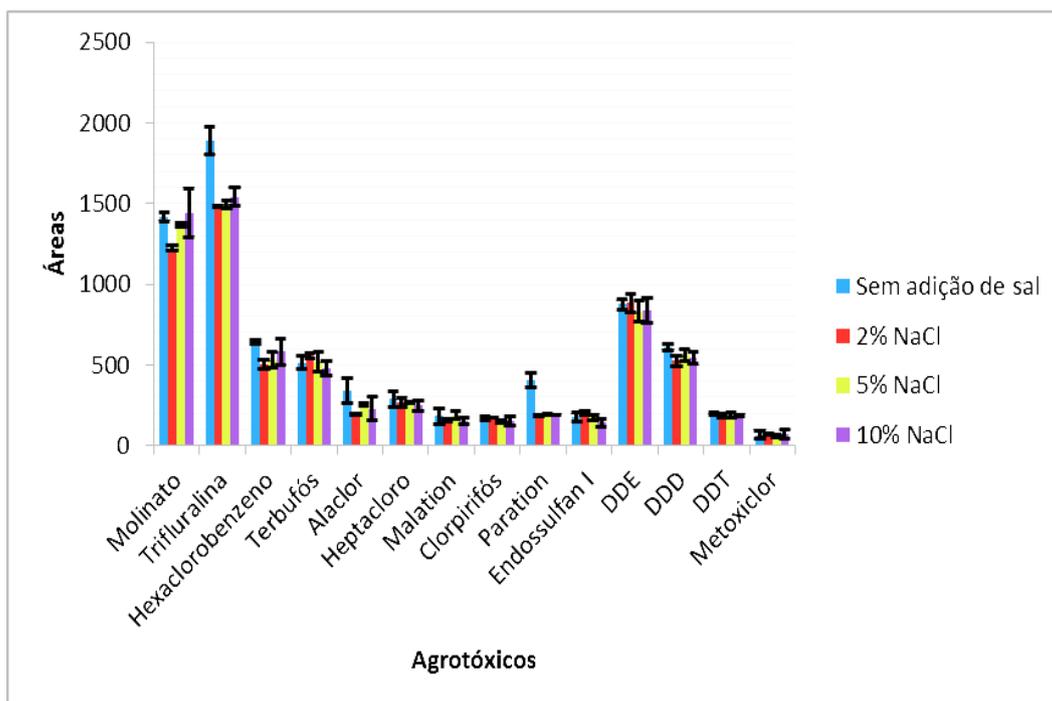
Simazina e atrazina não foram detectadas, simazina na concentração de $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e atrazina na concentração de $5,6 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como observado, para o pH 7,0 e 8,0 não existem variações expressivas na extração dos analitos. Para pH 3,8 o comportamento da DLLME para estes agrotóxicos foi melhor, sendo este o pH estabelecido para garantir o melhor desempenho da técnica.

5.2.3 Efeito da adição de sal

Para medir a influência da força iônica na extração dos agrotóxicos selecionados foram realizadas investigações sem a adição de NaCl ou com a adição de 2%, 5% ou 10% do mesmo. Os resultados das áreas são mostradas no gráfico da Figura 19.

Figura 19 Influência da força iônica na extração dos agrotóxicos



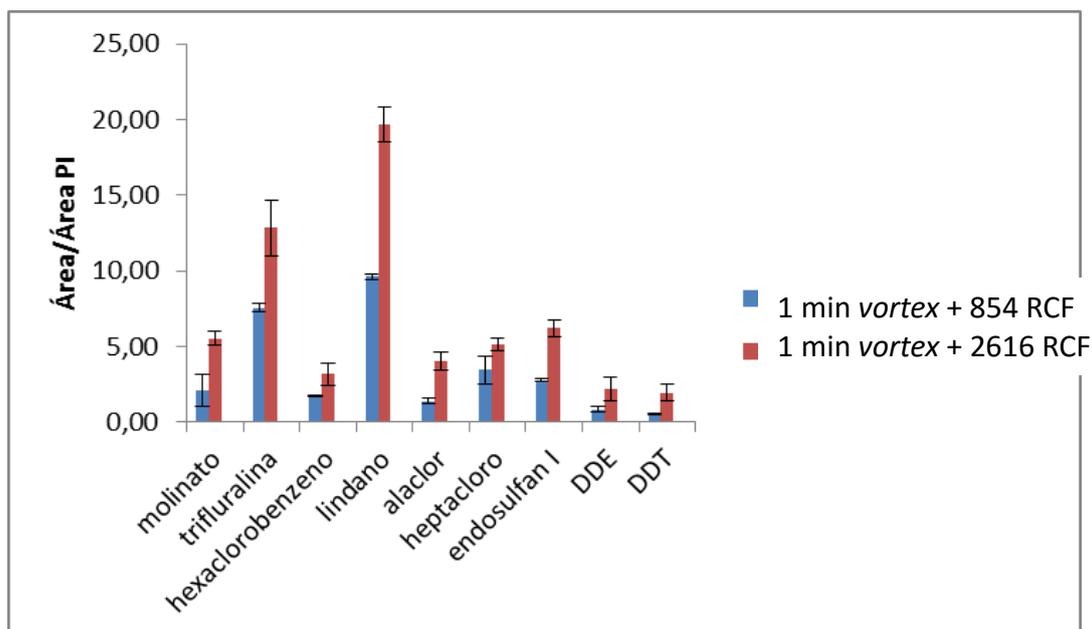
Fonte: Próprio autor.

O acréscimo de sal altera a separação das fases, provocando um aumento do volume da fase sedimentada. No caso, as adições em concentrações crescentes de NaCl não indicaram alterações na extração. Dessa forma não foi utilizado NaCl durante a DLLME neste trabalho.

5.2.4 Efeito do tempo, tipo de agitação vigorosa e velocidade de centrifugação

Foi avaliada a influência da velocidade de centrifugação na extração dos agrotóxicos, onde os resultados se encontram na Figura 20.

Figura 20 Influência da velocidade de centrifugação (854 RCF e 2616 RCF) na extração dos agrotóxicos

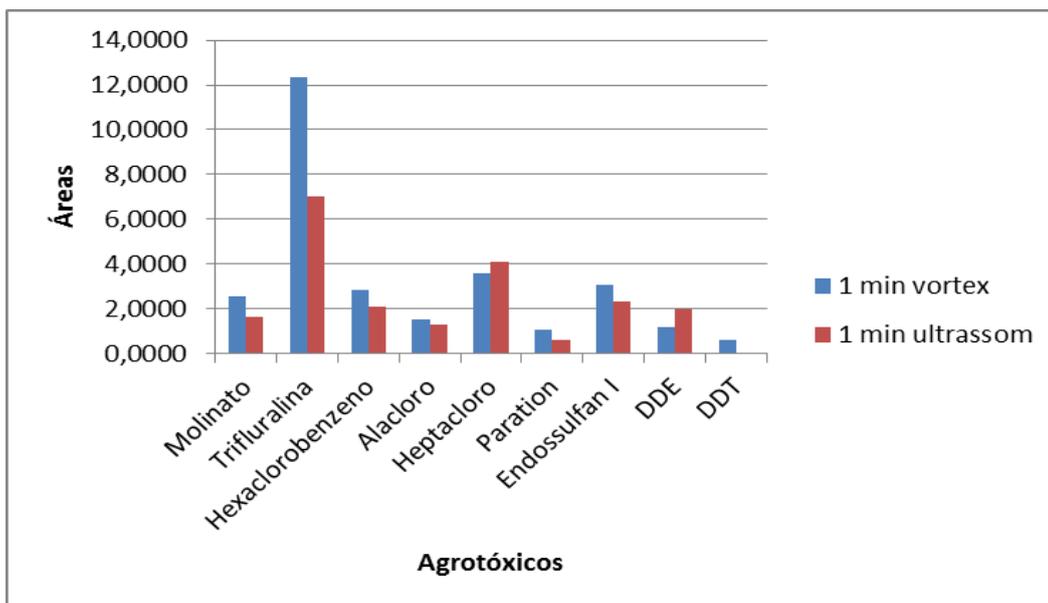


Fonte: Próprio autor.

Observou-se uma melhora na resposta para os analitos quando do aumento da velocidade de centrifugação de 854 RCF para 2616 RCF.

O tempo de agitação e tipo de instrumento para executar tal processo são relevantes para a formação da melhor dispersão para a DLLME, segundo MARTINS e colaboradores (2012). Na Figura 21 é apresentado o gráfico com as razões médias de áreas para os analitos cujas áreas que puderam ser integradas, ou seja picos com razão sinal/ruído igual ou superior a 10, para a extração com o uso de *vortex* ou ultrassom.

Figura 21 Influência do tipo de agitação vigorosa (em *vortex* e em ultrassom) na extração dos agrotóxicos

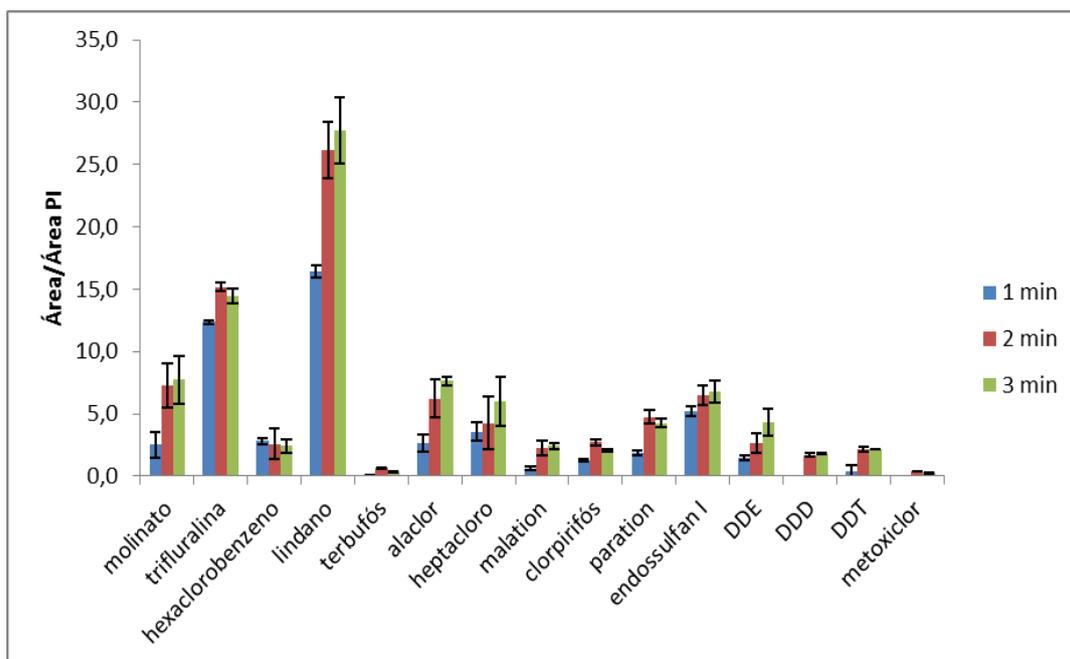


Fonte: Próprio autor.

A utilização do sistema em *vortex* garantiu uma extração mais eficaz para a maioria dos agrotóxicos do presente trabalho, sendo portanto a agitação adotada.

Em seguida foram feitos experimentos variando o tempo de extração. A Figura 22 ilustra o gráfico contendo as áreas referente ao tempo de 1,0; 2,0 e 3,0 minutos de agitação vigorosa utilizando o sistema *vortex*.

Figura 22 Influência do tempo de agitação em *vortex* (1, 2 e 3 minutos) na extração dos agrotóxicos



Fonte: Próprio autor.

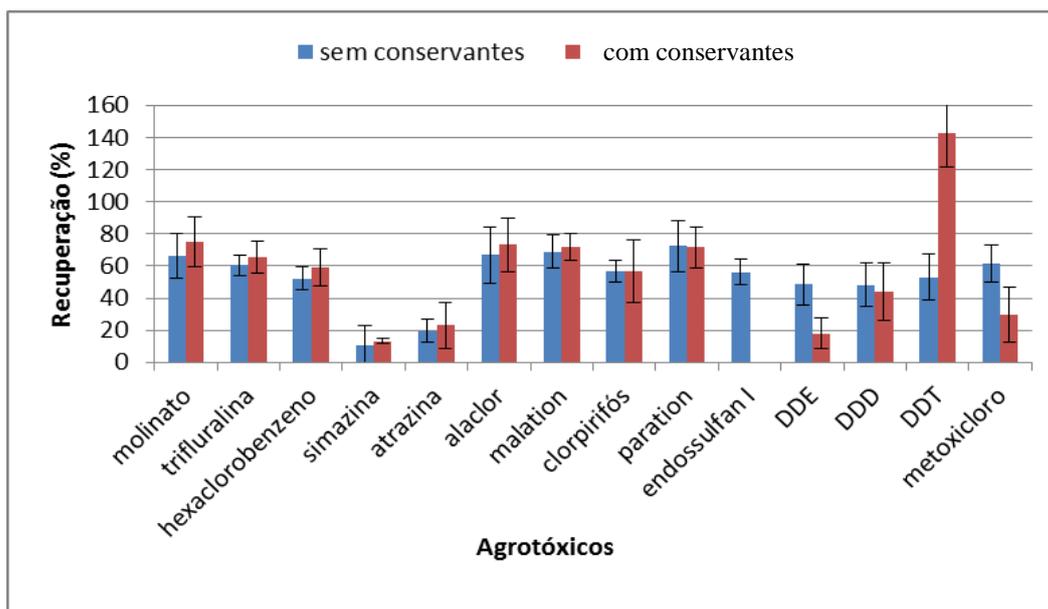
Nestes experimentos não se detectaram os agrotóxicos simazina e atrazina.

O tempo de 2 e 3 minutos foram os mais eficientes durante a DLLME. No entanto, os melhores resultados foram obtidos com o tempo de 3 minutos, e este foi selecionado.

5.2.5 Efeito da adição de conservantes

Este parâmetro foi analisado utilizando os valores obtidos para recuperação absoluta dos agrotóxicos com a presença e ausência de conservantes. Os resultados estão representados na Figura 23.

Figura 23 Influência da adição de conservantes na extração dos agrotóxicos



Fonte: Próprio autor.

Lindano que até então vinha mostrando bons resultados, nestes experimentos, não obteve repetitividade nas áreas das réplicas. Foi observado também um decréscimo em relação à intensidade do sinal. Terbufós não foi detectado e para o heptacloro também não se obteve repetitividade para as áreas.

Os resultados evidenciaram elevado valor de recuperação para p,p'-DDT (142%) com o uso dos conservantes e nenhuma recuperação para endossulfan I. Para molinato, trifluralina, hexaclorobenzeno, simazina, atrazina e alacloro a adição de conservantes evidenciou uma pequena melhora na eficiência de extração. Para DDE e metoxicloro maior eficiência de extração foi observada na extração sem adição de conservantes. De forma que se optou por não se adicionar os sais à amostra de água tratada.

5.2.6 Condições estabelecidas para a DLLME para a extração dos agrotóxicos avaliados

Para a utilização da DLLME como procedimento de pré-concentração, limpeza e extração dos 17 agrotóxicos seleccionados para o estudo em amostras de água de torneira as seguintes condições foram otimizadas:

1. 10 mL de alíquota aquosa;
2. 0,5 mL de acetonitrila (solvente dispersor) e 60 µL de tetracloreto de carbono (solvente extrator);
3. pH ajustado para 3,8, com tampão de dihidrogênicitrato de potássio;
4. Sem a adição de qualquer concentração de NaCl;

5. Etapa de agitação vigorosa por *vortex* em 3 minutos;
6. Sem a adição de conservantes, ácido L-ascórbico e EDTA trissódico.
7. Centrifuga a 2616 RCF, por 5 minutos, a 10°C.

5.3 Validação do método DLLME-GC-MS/MS

5.3.1 Precisão do instrumento

Os resultados sobre a repetitividade dos tempos de retenção (TRs) são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 Dados do tempo de retenção médio, desvio padrão e coeficiente de variação dos agrotóxicos

Analito	TRs (min)	DP	%CV
Molinato	24,831	6,364E-3	0,025
Trifluralina	28,650	9,192E-3	0,032
Hexaclorobenzeno	29,445	7,070E-4	0,002
Terbufós	31,477	2,828E-3	0,008
Alacloro	34,551	2,121E-3	0,006
Heptacloro	35,338	7,071E-3	0,020
Malation	36,29	7,071E-3	0,019
Clorpirifós	36,645	3,464E-2	0,094
Paration	36,889	7,071E-3	0,019
Endossulfan I	39,407	2,828E-3	0,007
DDE	40,130	3,536E-3	0,008
DDD	41,422	4,950E-3	0,011
DDT	42,699	7,778E-3	0,018
Metoxicloro	44,206	0	0

Fonte: Próprio autor.

Os coeficientes de variação (%CV), responsáveis pela precisão, apresentaram valores abaixo de 0,094% indicando a boa repetitividade do cromatógrafo frente ao tempo dos agrotóxicos.

Os valores de %CV gerados pelo ensaio da repetitividade das áreas se encontram listados na Tabela 7.

Tabela 7 Estudo da repetitividade das áreas dos agrotóxicos. %CV para as concentrações de 520, 690 e 920 $\mu\text{g L}^{-1}$

Analito	%CV (520 $\mu\text{g L}^{-1}$)	%CV (690 $\mu\text{g L}^{-1}$)	%CV (920 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Molinato	15,98	15,26	11,93
Trifluralina	14,18	17,51	21,04
Hexaclorobenzeno	15,97	16,55	11,11
Alacloro	13,23	13,91	10,02
Malation	11,27	8,32	9,61
Clorpirifós	0	0	0
Paration	28,67	61,64	11,78
Endossulfan I	15,34	11,68	4,38
DDE	16,35	-	15,34
DDD	15,10	6,27	14,22
DDT	14,97	9,87	14,16
Metoxicloro	17,08	8,12	12,46

Fonte: Próprio autor.

Conforme observado a maioria dos analitos se comportou de forma satisfatória com valores de coeficiente de variação inferiores a 17,51%. Para a trifluralina em concentrações acima de 690 $\mu\text{g L}^{-1}$ a boa repetitividade da sua área pode diminuir, enquanto que para paration acontece o contrário, em altas concentrações (acima de 920 $\mu\text{g L}^{-1}$) é que atingem uma estabilidade permitindo a reprodução das áreas de seus picos. O clorpirifós não apresentou variações. Conclui-se dessa maneira que o instrumento apresenta precisão para determinados agrotóxicos, enquanto que para outros pode haver a necessidade de ajustes para garantir seu melhor desempenho.

5.3.2 Linearidade do instrumento

Curvas analíticas foram obtidas no início do nosso trabalho e no transcorrer do mesmo para atender as necessidades dos experimentos executados.

Com a injeção direta do MIX de agrotóxicos em concentrações que variaram de 50 a 570 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram determinadas as equações da reta para cada analito através da curva de calibração analítica. Estas equações se encontram na Tabela 8, juntamente com a faixa de concentração, o coeficiente de correlação (r^2) e o número de pontos na reta (N).

Tabela 8 Estudo da linearidade e faixa de aplicação dos compostos por injeção direta dos padrões

Composto	Faixa de concentração($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da reta	N*
alacoloro	170-370	0,9902	A = 4,53E-06 C + 2,89E-04	6
atrazina	150-370	0,9918	A = 1,30E-06 C + 2,85E-04	9
lindano	50-210	0,9959	A = 1,78E-5 C + 1,83x10E-04	9
clorpirifós	350 -570	0,9944	A = 1,23E-06 C + 9,85E-05	8
endossulfan I	350 -570	0,9903	A = 3,42E-06 C - 4,63E-04	9
hexaclorobenzeno	70-230	0,9991	A = 6,58E-06 C + 4,09E-05	6
terbufós	90-250	0,9981	A = 4,00E-06 C + 4,02E-04	6
heptacoloro	230-370	0,9900	A = 4,80E-06 C + 4,91E-04	5
malation	350-540	0,9987	A = 5,66E-07 C + 1,15E-04	5
metoxicoloro	450-570	0,9814	A = 1,41E-06 C - 3,27E-04	5
molinato	50-170	0,9945	A = 8,42E-06 C + 2,12E-08	8
p,p'-DDD	70-230	0,9883	A = 4,35E-06 C - 2,00E-05	5
p,p'-DDE	70-250	0,9946	A = 8,55E-06 C + 1,26E-04	9
p,p'-DDT	350-570	0,9927	A = 1,30E-06 C + 9,93E-05	7
paration	350-570	0,9959	A = 1,30E-06 C + 2,31E-04	5
trifluralina	450-570	0,9814	A = 1,41E-06 C - 3,27E-04	5

r^2 = coeficiente de correlação linear ao quadrado; N = número de pontos da reta;

A = área; C = concentração.

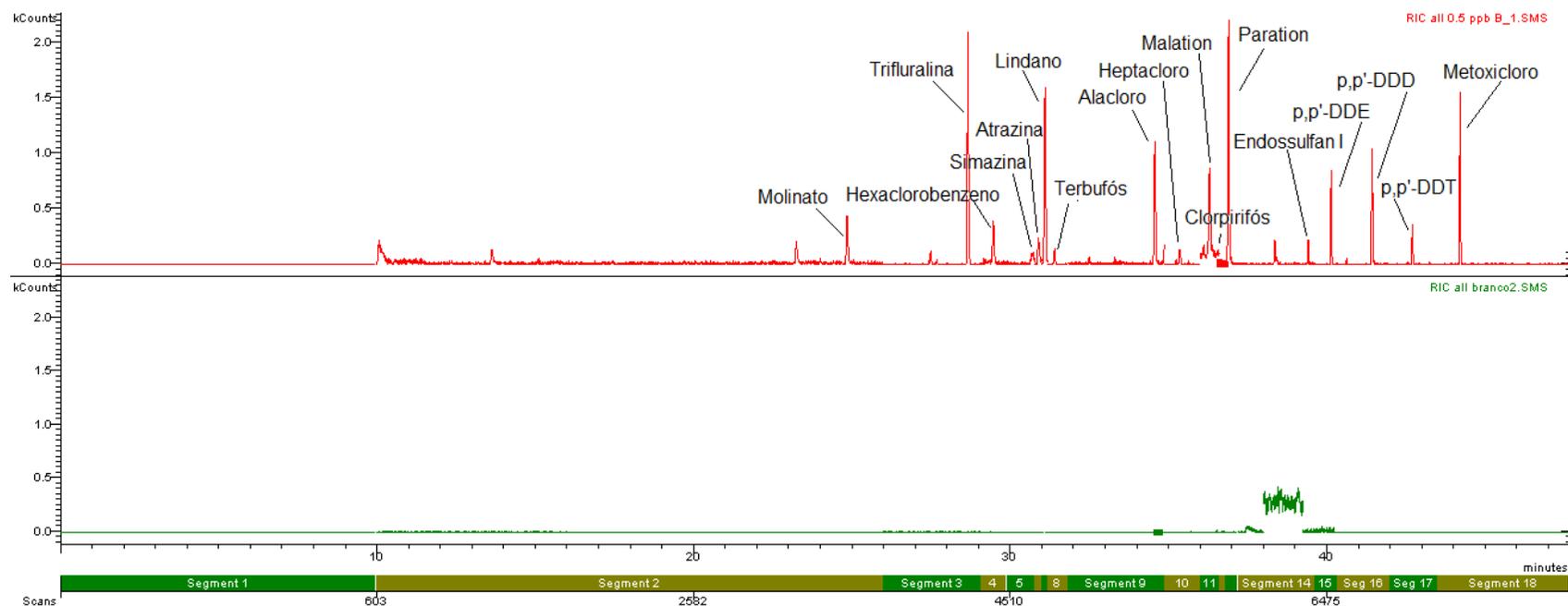
Fonte: Próprio autor.

Quanto mais próximo o valor de r^2 for de um, melhor será a eficiência. Os valores ficaram entre 0,9814 e 0,9991, podendo-se dizer que existe uma boa linearidade para o instrumento.

5.3.3 Seletividade

A seletividade foi estudada pelo método de adição de padrão, onde foram comparados os resultados da solução de trabalho na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ adicionada à matriz (água de torneira) e outra sem a presença do MIX de agrotóxicos na água. Na Figura 24 estão os cromatogramas da matriz com (Figura 24-A) e sem a adição dos analitos (Figura 24-B), respectivamente.

Figura 24 Cromatogramas da matriz aquosa. A) fortificada com os analitos e B) sem a adição dos analitos



Fonte: Próprio autor.

É possível concluir que a água de torneira não possui interferentes, já que há a ausência de picos com tempo de retenção semelhantes aos agrotóxicos do experimento, ou seja, não existe o efeito da matriz neste caso, sendo adotada como matriz isenta para a validação do método DLLME-GC-MS/MS e indicando que o método é seletivo.

5.3.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o método DLLME-GC-MS/MS para cada pesticida em amostra aquosa estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos agrotóxicos utilizando a DLLME-GC-MS/MS

Agrotóxico	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Alacloro	0,09	0,30
Atrazina	3,2	10,8
Clorpirifós	0,50	1,65
Endossulfan I	0,15	0,48
Hexaclorobenzeno	0,12	0,40
Malation	0,12	0,40
Metoxicloro	0,09	0,30
Molinato	0,12	0,40
p,p'-DDD	0,07	0,25
p,p'-DDE	0,03	0,10
p,p'-DDT	0,12	0,40
Paration	0,20	0,67
Simazina	11,0	36,2
Trifluralina	0,03	0,10

Fonte: Próprio autor.

Analisando os valores pode-se dizer que a metodologia sugerida tem alta detectibilidade para este tipo de estudo com agrotóxicos. Os limites de detecção tiveram valores de 0,03 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ assim como os limites de quantificação de 0,10 a 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para atrazina e trifluralina os limites de detecção foram altos (3,2 e 11,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente).

Comparando os resultados com os valores máximos permitidos (VMP) dos agrotóxicos em água tratada no Brasil, Portaria MS 2914, oito compostos se encontram com limites dentro dos estabelecidos, os outros não tem valores estimados e a atrazina e simazina estão acima do determinado (VMP > 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos). Alacloro, clorpirifós, endossulfan I, molinato, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT e trifluralina (VMP < 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; VMP < 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; VMP < 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; VMP <

6 $\mu\text{g L}^{-1}$; VMP < 1 $\mu\text{g L}^{-1}$; VMP < 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) se apresentaram em níveis aceitáveis, indicando dessa forma a boa qualidade da matriz analisada.

5.3.5 Linearidade e curva analítica

A curva analítica foi obtida para cada um dos agrotóxicos através da extração destes. Neste estudo foram utilizadas concentrações de padrões de 0,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A equação da reta ($A=aC+b$), a faixa de concentração, o coeficiente de correlação linear (r^2) e o número de pontos na reta (N) encontram-se listados na Tabela 10.

Tabela 10 Estudo da linearidade e faixa de aplicação para os agrotóxicos após a extração

Composto	Faixa de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da reta	N*
Alacloro	0,5-4,0	0,9993	$A = 6724,5 C - 180,8$	5
Clorpirifós	2,0-6,0	0,9996	$A = 74571 C - 2,7143$	5
Endossulfan I	0,5-10	0,9961	$A = 1061,5 C - 261,0$	7
Hexaclorobenzeno	0,5-10	0,9913	$A = 3612,2 C - 1319,5$	8
Malation	1,5-10	0,9987	$A = 4534,2 C - 3263,8$	5
Metoxicloro	0,5-10	0,9949	$A = 10923,3 C + 6680,2$	6
Molinato	0,5-4,0	0,9945	$A = 4234,0 C - 1053,7$	5
p,p'-DDD	0,5-6,0	0,9964	$A = 5000,9 C + 413,1$	6
p,p'-DDE	0,5-10	0,9946	$A = 4346,5 C - 1667,1$	6
p,p'-DDT	1,0-10	0,9963	$A = 2532,8 C - 1822,6$	5
Paration	1,5-10	0,9970	$A = 4462,9 C - 3236,1$	5
Trifluralina	0,5-4,0	0,9908	$A = 15913,8 C - 4771,9$	6

r^2 = coeficiente de correlação linear ao quadrado; N = número de pontos da reta;

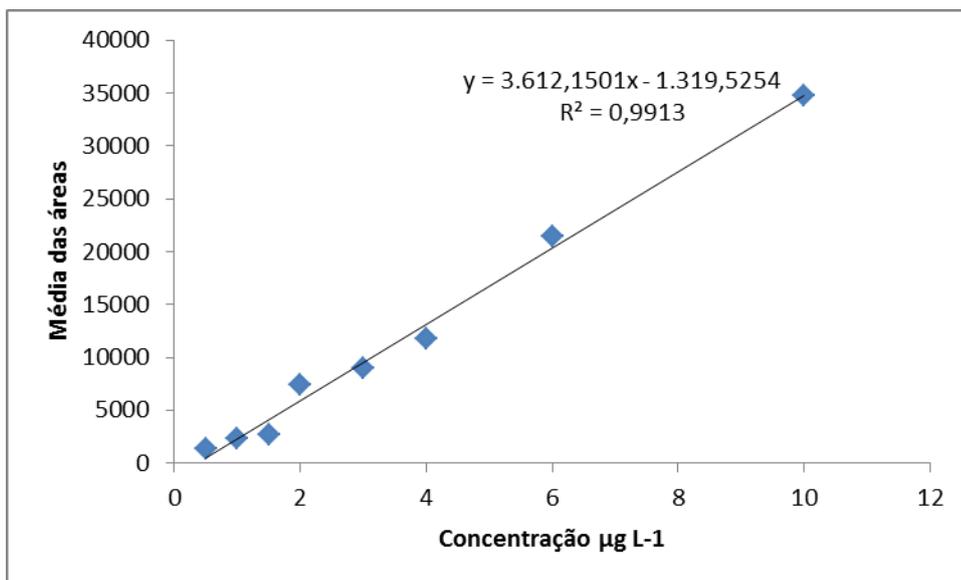
A = área; C = concentração.

Fonte: Próprio autor.

A linearidade foi definida pelo valor de r^2 que variou entre 0,9908 e 0,9996. O método indicou uma boa linearidade (valores de r^2 próximos a 1) nas faixas de concentração avaliadas para cada analito. Com a utilização da DLLME é notável uma pré-concentração do metoxicloro e da trifluralina, pois neste experimento apresentaram melhores valores de r^2 do que na curva da injeção direta destes (r^2 de 0,9814 para ambos).

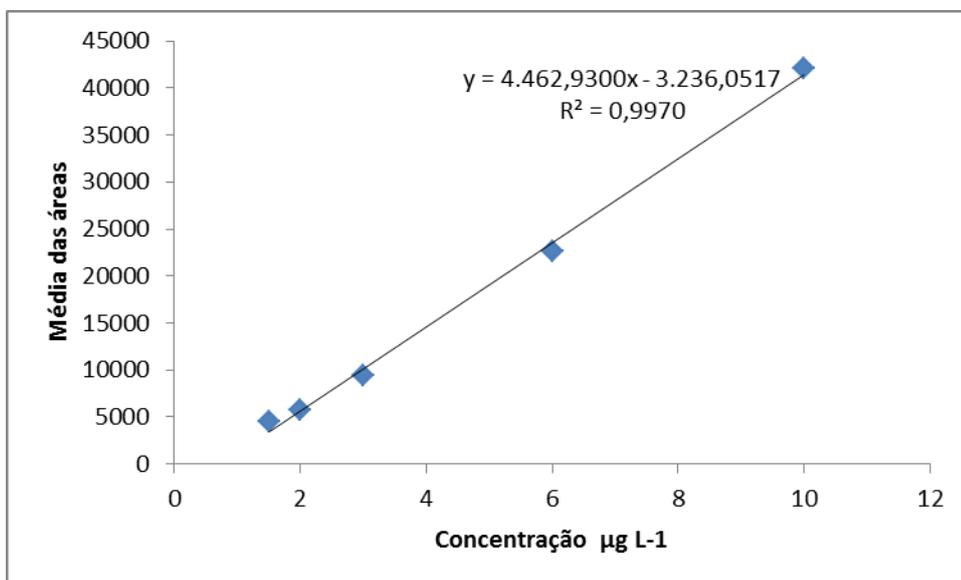
Como exemplos, os gráficos com as curvas analíticas do hexaclorobenzeno e do paration são mostrados nas Figuras 25 e 26, respectivamente. As curvas com extração dos outros agrotóxicos se encontram no Anexo I (Figura 27 a 37).

Figura 25 Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para hexaclorobenzeno



Fonte: Próprio autor.

Figura 26 Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para o paration



Fonte: Próprio autor.

5.3.6 Recuperação e precisão do método

5.3.6.1 Recuperação

As técnicas de extração e pré-concentração não exaustivas chamadas de microtécnicas de extração são consideradas técnicas de equilíbrio, o analito é parcialmente transferido da fase aquosa para a fase orgânica. Neste caso, a recuperação (R) pode ser definida como a

quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase aceptora (ou orgânica) ao final da extração.

Na Tabela 11 encontram-se as equações utilizadas para o cálculo de concentração dos analitos no estudo de recuperação.

Tabela 11 Curvas analíticas empregadas para cálculo de concentração no estudo da eficiência de extração (recuperação absoluta)

Composto	Faixa de concentração: 0,28 - 1,15 mg L ⁻¹ (n=5)	
	Equação da reta	r ²
Alacloro	A = 33,95 C – 730,86	0,9960
Atrazina	A = 26,24 C – 1131,14	0,9928
Clorpirifós	A = 0,6805 C + 35,69	0,9885
Endossulfan I	A = 4,30 C + 448,46	0,9901
Hexaclorobenzeno	A = 18,18 C – 1417,65	0,9943
Malation	A = 14,20 C – 1149,73	0,9962
Metoxicloro	A = 37,75 C – 6097,78	0,9943
Molinato	A = 21,19 C + 1232,76	0,9907
p,p'-DDD	A = 33,80 C – 3171,31	0,9898
p,p'-DDE	A = 27,47 C – 2373,66	0,9983
p,p'-DDT	A = 12,79 C – 2306,00	0,9948
Paration	A = 17,71 C – 2913,20	0,9980
Trifluralina	A = 72,22 C + 2007,63	0,9946

Fonte: Próprio autor.

As recuperações ou eficiência de extração para o método proposto encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de recuperação absoluta, coeficiente de variação e fator de pré-concentração dos agrotóxicos estudados

Agrotóxico	Recuperação absoluta (%)	CV (%)	PF
Molinato	66,55	13,96	83,19
Trifluralina	60,54	6,42	75,67
Hexaclorobenzeno	52,32	7,53	65,40
Simazina	10,58	12,71	13,23
Atrazina	19,64	7,36	24,55
Alacloro	66,81	17,37	83,51
Malation	69,06	10,06	86,33
Clorpirifós	56,68	6,84	70,86
Paration	72,27	15,77	90,33
Endossulfan I	56,24	8,05	70,30
DDE	48,47	12,75	60,57
DDD	48,33	13,45	60,42
DDT	53,09	14,09	66,37
Metoxicloro	61,64	11,67	77,05

CV % = porcentagem do coeficiente de variação; PF= fator de pré-concentração

Fonte: Próprio autor.

Valores de recuperação entre 48 e 72% foram observados para 12 das 14 substâncias restantes do estudo. Simazina e atrazina apresentaram baixos valores de recuperação: 10,6% para simazina, e 19,6% para atrazina. Para a DLLME como em outras técnicas de extração não exaustivas as condições experimentais selecionadas são fixas, para que, ainda que o analito contido na alíquota da amostra seja apenas parcialmente transferido na operação a concentração final na fase extratora seja proporcional à concentração na amostra. Para isso a curva analítica é feita empregando a DLLME na extração dos padrões.

O fator de pré-concentração, parâmetro utilizado para a investigação da eficiência do método, encontra-se também listado na Tabela 12. Foi encontrado o fator de enriquecimento para o paration com o valor de 90,33. Este resultado é alto, assim como para outros (com exceção para a simazina e atrazina com fatores de 13,23 e 24,55, respectivamente), logo é possível observar que a DLLME é uma microtécnica eficiente para a pré-concentração dos agrotóxicos deste trabalho.

Simazina e atrazina não mostraram boas recuperações ou fatores de pré-concentração, sendo retirados do estudo.

Na Tabela 13 encontram-se os valores de recuperação relativa. Para encontrar a concentração do analito na amostra submetida ao ensaio de recuperação utilizou-se a curva analítica obtida da análise dos padrões empregando a DLLME na extração dos mesmos.

Tabela 13 Valores de recuperação relativa, coeficiente de variação nas concentrações de 1, 3 e 10 µg L⁻¹ dos agrotóxicos estudados

	Faixa de concentração (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)	Recuperação relativa					
			1 µg L ⁻¹		3 µg L ⁻¹		10 µg L ⁻¹	
			R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
Molinato	0,5-4,0	0,4	104	5,4	99,5	10,3	-	-
Trifluralina	0,5-4,0	0,07	106	9,3	105	5,7	-	-
Hexaclorobenzeno	0,5-10	0,5	99,6	8,7	94,6	10,7	99,9	8,0
Alacloro	0,5-4,0	0,30	94,9	4,7	102	1,4	-	-
Malation	1,5-10	0,4	-	-	93,5	4,3	100	10
Clorpirifós	2,0-6,0	1,65	-	-	102	15	99,0	7,0
Paration	1,5-10	0,7	-	-	94	4,4	96,5	10
Endossulfan I	0,5-10	0,48	104	8,3	109	7,2	105	12
DDE	0,5-10	0,06	90,4	5,4	101	7,1	98	10
DDD	0,5-6,0	0,25	98,2	2,2	103	9,6	-	-
DDT	0,5-10	0,4	84,0	7,1	91,0	4,2	98,9	3,6
Metoxicloro	0,5-10	0,1	88,7	12	99	14	99,6	7,1

Fonte: Próprio autor.

O coeficiente de variação (%CV) é o principal valor analisado para a determinação da precisão do método desenvolvido. Os valores obtidos para os coeficientes da variação de 2-14% para recuperação relativa. A precisão em análises de nível de traço deve ser menor do que 20% (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA RE n° 899 de 29 de maio de 2003 e INMETRO DOQ-CGCRE 008 de julho de 2011).

Os valores permitidos para exatidão são de 80 a 120% (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA RE n° 899 de 29 de maio de 2003 e INMETRO DOQ-CGCRE 008 de julho de 2011). Conforme os dados fornecidos pela Tabela 13 as recuperações se encontram na faixa estipulada pela literatura de 88,7 a 109%, logo o método apresenta boa exatidão, como esperado.

5.4 Outros métodos de análises dos agrotóxicos por GC-MS/MS

Alguns dos agrotóxicos do presente estudo já foram investigados com a utilização de outras técnicas de extração (SPE e SPME) através da mesma técnica de análise cromatográfica (GC-MS/MS). Os resultados de limites de detecção e quantificação, exatidão (%CV) e precisão (recuperação relativa) dos trabalhos encontram-se na Tabela 14 e 15.

Tabela 14 Comparação da extração de agrotóxicos com DLLME e SPE

Extração	Agrotóxicos analisados	LD	LQ	Precisão	Exatidão	PF
DLLME	alacloro, clorpirifós, DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD), endossulfan I, hexaclorobenzeno, malation, metoxicloro, molinato e trifluralina	0,03 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,10 a 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$	Inferior a 10,7%	Entre 88,7 e 109%	13 a 90
SPE*	alacloro, atrazina, clorotalonil, clorpirifós, DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD), dieldrinendossulfan I, γ -clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, lindano, malation, metoxicloro, molinato, paration, paration metílico, simazina, terbufós e trifluralina	0,008 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,02 e 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	Inferior a 15,59%	Entre 80,58 e 117,55%	250

* SPE – FERREIRA, 2015.

Fonte: Próprio autor.

Todos os analitos em matriz aquosa foram também investigados por FERREIRA (2015) através da técnica clássica de extração em fase sólida (inglês *SolidPhaseExtraction* – SPE). A metodologia adotada foi uma adaptação do método EPA 523.5, onde se partiu de 250 mL de amostra aquosa e cujas ordens de grandezas utilizadas são bem diferentes do utilizado no método DLLME proposto. Dessa forma pode ser observado que o fator de pré-concentração para a SPE apresenta um valor bem distinto em relação a DLLME (250 e de 13 a 90, respectivamente).

A microextração em fase sólida - do inglês *SolidPhaseMicroextraction* (SPME) - também se tornou uma técnica padrão de análise de agrotóxicos pelo US/EPA, assim como a SPE. Sete agrotóxicos do atual trabalho (hexaclorobenzeno, heptacloro, endossulfan I, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, metoxicloro) foram também estudados por PRATES e colaboradores (2011). A comparação é representada na Tabela 15.

Tabela 15 Comparação da extração de agrotóxicos com DLLME e SPME

Extração	Agrotóxicos analisados	LD	LQ	Precisão	Exatidão
DLLME	alacoloro, clorpirifós, DDT (p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD), endossulfan I, hexaclorobenzeno, malation, metoxicloro, molinato e trifluralina	0,03 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,10 a 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$	Inferior a 10,7%	Entre 88,7 e 109%
SPME**	α -HCB, γ -HCB, β -HCB, δ -HCB, heptacoloro, aldrin, heptacoloroepóxido, endossulfan I, p,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD, dieldrin, endrin, endosulfan II, endrin aldeído, endosulfan sulfato, endrin cetona e metoxicloro	5,0 x 10^{-4} a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	3,3 x 10^{-3} e 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	Inferior a 7,6%	Entre 88 e 110%

** SPME – PRATES e colaboradores, 2011.

Fonte: Próprio autor.

Comparando os valores de limites de quantificação (LQ) com os obtidos para a DLLME e SPE, esta técnica se mostrou muito mais eficaz para a determinação de organoclorados. Os valores de LQ para SPME se situaram entre $3,3 \times 10^{-3}$ e $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$, para DLLME de 0,1 a $1,65 \mu\text{g L}^{-1}$ enquanto para SPE 0,02 a $3,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Dessa forma, a DLLME deve ser mais bem ajustada para uma melhor aplicação para este grupo de agrotóxicos.

6 Conclusão

A microextração líquido-líquido dispersiva e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (DLLME-GC-MS/MS) proposta indicou ter uma boa seletividade, sensibilidade e linearidade para a aplicação na análise multiclasse de 12 agrotóxicos a partir da concentração de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ em água tratada, sendo eles alacoloro, clorpirifós, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, endossulfan I, hexaclorobenzeno, malation, metoxicloro, molinato, paration e trifluralina.

Os valores de coeficiente de correlação linear, r^2 , foram maiores do que 0,9901. Exatidão considerada de acordo com estimada pela literatura (88,7% a 109%). Boa precisão (%CV inferiores a 10,7% para recuperação relativa). Limites de detecção e quantificação ficaram entre $0,03$ a $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,10$ a $1,65 \mu\text{g L}^{-1}$.

A sensibilidade obtida indicou que a metodologia pode ser aplicada para determinação de agrotóxicos em águas pelo órgão regulamentador (Ministério da Saúde) seguindo a portaria MS nº 2914, pois conseguiu detectar os analitos dentro dos valores máximos permitidos estipulados.

7 Perspectivas de continuidade do trabalho

O método DLLME-GC-MS/MS desenvolvido requer novas otimizações para que todos os analitos sugeridos possam ser determinados através do mesmo.

Assim, espera-se futuramente que após estes novos estudos, ele venha a ser empregado em análises de águas tratadas, subterrâneas e superficiais para garantir um monitoramento de tais compostos químicos que possam ser prejudiciais aos seres vivos do planeta.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. A. *et al.* How soil organic matter composition controls hexachlorobenzene–soil–interactions: Adsorption isotherms and quantum chemical modeling. **Science of the Total Environment**, v. 476, p. 98-106, 2014.

ANDREI, E. *Compêndio de defensivos agrícolas*. 7.ed. São Paulo, 2005.

ARREBOLA, J. P. *et al.* Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: a multivariate analysis by gender in Southern Spain. **Environment international**, v. 35, n. 1, p. 27-32, 2009.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 4,4-DDT, 4,4-DDE, and 4,4-DDD. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 1994.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899 de 29 de maio de 2003.

AOYAMA, H., CHAPIN, R.E. Reproductive toxicities of methoxychlor based on estrogenic properties of the compound and its estrogenic metabolite, hydroxyphenyltrichloroethane. **Vitam. Horm.** v.94, p. 193–210, 2014.

BAIRD, C. Toxic organic chemicals. **Environmental chemistry**, p. 215-286, 1995.

BECKER, L. *et al.* Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1737-1743, 2011.

BERIJANI, S. *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, n. 1, p. 1-9, 2006.

BIANCO, K. *et al.* Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. **Aquatic toxicology**, v. 144, p. 26-35, 2013.

BOWMAN, B. T.; SANS, W. W. Adsorption, desorption, soil mobility, aqueous persistence and octanol-water partitioning coefficients of terbufos, terbufos sulfoxide and terbufos sulfone. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 17, n. 5, p. 447-462, 1982.

BRASIL, Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Lei federal de agrotóxicos, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/03/Leis/l7802.htm>>. Acesso em: setembro de 2015.

BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Preconcentration of contaminants in water analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 289-309, 2000.

BUSSIAN, B. M. *et al.* Persistent endosulfan sulfate is found with highest abundance among endosulfan I, II, and sulfate in German forest soils. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 661-666, 2015.

CALDAS, S. S. *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.

CAMPER, N. D.; STRALKA, K.; SKIPPER, H. D. Aerobic and anaerobic degradation of profluralin and trifluralin. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 15, n. 5, p. 457-473, 1980.

CARNEIRO, F. F. *et al.* Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Fundação Oswaldo Cruz, p. 624, 2015.

CARRO, A. M., *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 134-143, 2012.

CERRILLO, I. *et al.* Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental research**, v. 98, n. 2, p. 233-239, 2005.

COCHRAN, R. C. *et al.* Characterization of risks associated with the use of molinate. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 146-157, 1997.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Ficha de Informação Toxicológica – DDT e seus derivados, 2012a. Disponível em: < <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/DDT.pdf>> Acesso em setembro de 2015.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Ficha de Informação Toxicológica – Hexaclorobenzeno, 2012b. Disponível em: < <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/Hexaclorobenzeno.pdf>> Acesso em setembro de 2015.

COBB, G. P. *et al.* Uptake, metabolism and toxicity of terbufos in the earthworm (*Lumbricus terrestris*) exposed to counter®-15G in artificial soils. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 14, n. 2, p. 279-285, 1995.

CORSOLINI, Simonetta. Industrial contaminants in Antarctic biota. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 3, p. 598-612, 2009.

CORTADA, Carol *et al.* Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 649, n. 2, p. 218-221, 2009.

COUTINHO, C. F. B.; *et al.* Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez **Pesticidas**, v.15, p. 65-72, 2005, apud TURK, J. **Introduction of environmental studies**, 3rd ed., Saunders College: New York, 1989.

CUNHA, M. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em sedimentos dos principais rios do Pantanal Mato-grossense por CG/EM. 2003. 91f.** 2003. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)-Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

DE ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**. Folium, 2001.

DE OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Capítulo 6 – Introdução ao controle químico. Curitiba: Ed. Omnipax, v. 1, p. 348, 2011.

DUTTA, H. M. *et al.* Behavioral changes in an air-breathing fish, *Anabas testudineus*, exposed to malathion. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 52, n. 1, p. 80-86, 1994.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK – EXTOXNET. Carbaryl to Dicrotophos, DDT. PESTICIDE MANAGEMENT EDUCATION PROGRAM – P MEP, 1993a. Disponível em: < <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/ddt-ext.html>> Acesso em janeiro de 2015.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK – EXTOXNET. Haloxyfop to Methyl Parathion, METHOXYCHLOR. PESTICIDE MANAGEMENT EDUCATION PROGRAM – PMP, 1993b. Disponível em: < <http://pmp.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxfop-methylparathion/methoxychlor-ext.html>> Acesso em janeiro de 2015.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK – EXTOXNET. Dieldrin to Glyphosate, Endosulfan. PESTICIDE MANAGEMENT EDUCATION PROGRAM – PMP, 1993c. Disponível em: <http://pmp.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dieldrin-glyphosate/endosulfan-ext.html> > Acesso em janeiro de 2015.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK – EXTOXNET. Metiram to Propoxur, Molinate. PESTICIDE MANAGEMENT EDUCATION PROGRAM – PMP, 1993d. Disponível em: < <http://pmp.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/molinate-ext.html>> Acesso em janeiro de 2015.

FARINA, L. *et al.* Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1, p. 46-50, 2007.

FATTAHI, N. *et al.* Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid–liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1, p. 23-29, 2007.

FERREIRA, W. O. **Validação do método EPA 525.3 para determinação multiclasse de agrotóxicos em águas. 2015. 119f.** Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

FLORES, Araceli Verônica *et al.* Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-24, 2004.

FUJII, Y. *et al.* Comparative survey of levels of chlorinated cyclodiene pesticides in breast milk from some cities of China, Korea and Japan. **Chemosphere**, v. 89, n. 4, p. 452-457, 2012.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006

GARCÍA, J. E. Propuestas de solución a la problemática de los plaguicidas. **Introducción a los plaguicidas**, p. 287-352, 1997.

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

HARTLEY, D., *et al.* **The agrochemicals handbook**. The Royal Society of Chemistry, 1983.

HAZ-MAP. Terbufos. Last updated: December, 2015. Disponível em: <<http://hazmap.nlm.nih.gov/category-details?id=1653&table=copytblagents>> Acesso em dezembro de 2015.

HOWARD, P. H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data: For Organic Chemicals, Volume III Pesticides**. CRC press, 1991.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) - Hexachlorobenzene Some Thyrotropic Agents, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2001, v. 79, 2001.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) – DOQ-CGCRE 008, Orientação sobre validação de métodos analíticos – Documento de caráter orientativo, julho de 2011.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1996.

KAMRIN, Michael A. **Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate**. CRC press, 1997.

KOZANI, R. R. *et al.* Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 387-393, 2007a.

KOZANI, R. R. *et al.* Determination of trihalomethanes in drinking water by dispersive liquid–liquid microextraction then gas chromatography with electron-capture detection. **Chromatographia**, v. 66, n. 1-2, p. 81-86, 2007b.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. Manole, p. 230, 1999.

LEE, J. *et al.* Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. **Analytica chimica acta**, v. 624, n. 2, p. 253-268, 2008.

LEONARD, A. W. *et al.* Fate and toxicity of endosulfan in Namoi River water and bottom sediment. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 3, p. 750-759, 2001.

LEONG, M. I.; HUANG, S. D. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7645-7650, 2009.

LIMA, D. M. D. **Metodologia para quantificação e avaliação da partição de agrotóxicos no estuário do Rio Jaguaribe-Ce. 2011.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará.

MADDISON, A. Historical Statistics of the World Economy: 1-2008 AD, 2008. Disponível em: <<http://www.ggdcc.net/maddison/Maddison.htm>> Acesso em: Setembro, 2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastaceminto (MAPA) – Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>>. Acesso em setembro de 2015.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense.** 2003. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

MARTINS, M. L. *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p, 35-51, 2012.

MCDUGALL, P; MCDUGALL, J. The development of the crop protection market in Europe and beyond. European Regulatory Conference, Bruxelas, Bélgica, 2015.

MEIJER, S. N. *et al.* Global distribution and budget of PCBs and HCB in background surface soils: implications for sources and environmental processes. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 4, p. 667-672, 2003.

MEISTER, R. T. Farm chemicals handbook'92, 1992.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I.. **Herbicidas em alimentos: aspectos gerais toxicológicos e analíticos.** Livraria Varela, 1997.

MOINFAR, S.; HOSSEINI, M. R. M. Development of dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1, p. 907-911, 2009.

NAGARAJU, D.; HUANG, S. D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1, p. 89-97, 2007.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

PARRISH, P. R. **Chronic toxicity of methoxychlor, malathion, and carbofuran to sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*)**. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1977.

PATIL, V. K.; DAVID, M. Behavioural and respiratory dysfunction in the freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton) under malathion intoxication. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 167-176, 2008.

Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC) - Decision POPRC-4/5 on endosulfan fulfilling the screening criteria of the Stockholm Convention. 2008. Disponível em: <<http://www.pops.int>>

PORTAL FIOCRUZ, 2015. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf> Acesso em outubro de 2015.

Portaria nº 329 de 2 de setembro de 1985 do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA).

PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; RÉ-POPPI, N. Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1260-1264, 2011.

RACKE, K. D. **Environmental fate of chlorpyrifos**. Springer New York, 1993.

RAHMAN, M. M. *et al.* Pepper leaf matrix as a promising analyte protectant prior to the analysis of thermolabile terbufos and its metabolites in pepper using GC–FPD. **Food chemistry**, v. 133, n. 2, p. 604-610, 2012.

RDC, Resolução da diretoria colegiada, nº 28, DE 9 DE AGOSTO DE 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1, p. 1-9, 2006.

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

RODRÍGUEZ-CABO, T. *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography–mass spectrometry determination of fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6603-6611, 2011.

SANTOS, S. P. A química dos inseticidas. Disponível em: http://ew0qyn.esoterica.pt/boletim/85/bl085_art01.pdf. Acesso em setembro de 2015.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2010.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 91-92, 2011. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/docs/bio/v73_1/savoy_palestra.pdf>. Acesso em outubro de 2015.

SHEN, H. *et al.* From mother to child: investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring. **Chemosphere**, v. 67, n. 9, p. S256-S262, 2007.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introduction to food toxicology**. Elsevier, p. 320, 2014.

SINDIVEG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defesa Vegetal. **SINDIVEG NEWS** Ed. 9. 2015.

SONG, S. *et al.* Hexachlorobenzene in human milk collected from Beijing, China. **Chemosphere**, v. 91, n. 2, p. 145-149, 2013.

SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Mato Grosso do Sul / Ministério da Saúde, 5 ed., Brasília, p. 35, 2011.

STAMPER, D. M.; TUOVINEN, O. H. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. **Critical reviews in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 1-22, 1998.

TADEO, J. L. *et al.* Determination of cereal herbicide residues in environmental samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1, p. 347-365, 1996.

TERRA, F. H. B. **A indústria de agrotóxicos no brasil**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Sociais Aplicadas. Curitiba, 2008.

THE WORLD BANK. Agricultural land (% of land area). Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.AGRI.ZS/countries/1W?display=default>>. Acesso em novembro de 2015.

UN/ESA. World Population Prospects: The 2012 Revision. 2013. Disponível em: <<http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>>. Acesso em Setembro de 2015.

US EPA, U.S. Environmental Protection Agency. 1986 (Sept.). Ambient water quality criteria for chlorpyrifos. Office of Water Regulations and Standards. Criteria and Standards Division. Washington, DC, 1986.

US EPA, US Environmental Protection Agency. Registration Standard (Second Round Review) for the Reregistration of Pesticide Products Containing Chlorpyrifos. Office of Pesticide Programs, US EPA, Washington, DC, 1989b.

US EPA, U.S. Environmental Protection Agency, 2010, Solid waste and emergency response glossary--Biomagnification: U.S. Environmental Protection Agency, 2010. Acesso em outubro de 2015.

VELISEK, J. *et al.* Effects of long-term exposure to simazine in real concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 76, p. 79-86, 2012.

VERDES, J. A. A., *et al.* **Plaguicidas organoclorados**. ECO, 1990.

VILLA, R. D.; DE OLIVEIRA, A. P.; NOGUEIRA, R. F. P. Avaliação dos parâmetros de solubilidade de Hildebrand/Hansen na seleção de solventes para a extração de pesticidas organoclorados do solo. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1501-1506, 2011.

WALISZEWSKI, S. M. *et al.* Levels of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Tabasco, Mexico. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 89, n. 5, p. 1062-1067, 2012.

WAN, M. T.; KUO, J. N.; PASTERNAK, J. Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. **Journal of environmental quality**, v. 34, n. 4, p. 1186-1193, 2005.

WEXLER, P. *et al.* **Encyclopedia of toxicology**. Academic Press, 2005.

WHO, World Health Organization, Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. EHC 63. Geneva; p. 181, 1986.

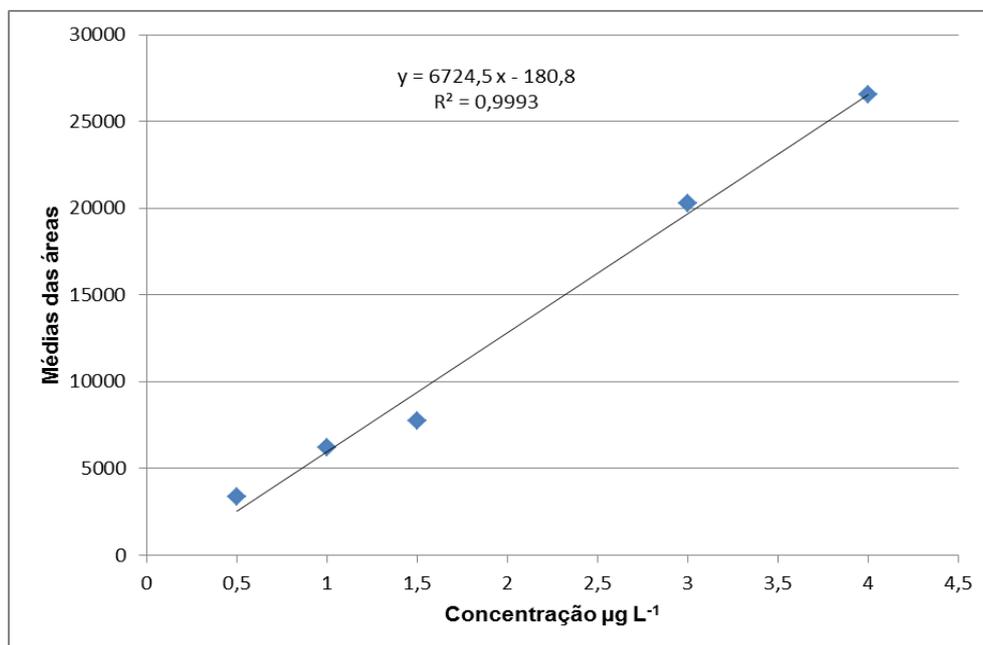
XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, n. 1, p. 7-18, 2008.

YE, L. *et al.* Effects of methoxychlor and its metabolite 2, 2-bis (p-hydroxyphenyl)-1, 1, 1-trichloroethane on human and rat 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase activity. **Toxicology letters**, v. 225, n. 3, p. 407-412, 2014.

ZHANG, H. *et al.* Simultaneous trace determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in purified water, tap water, juice, soda and energy drink by hollow fiber-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 109, p. 177-184, 2013.

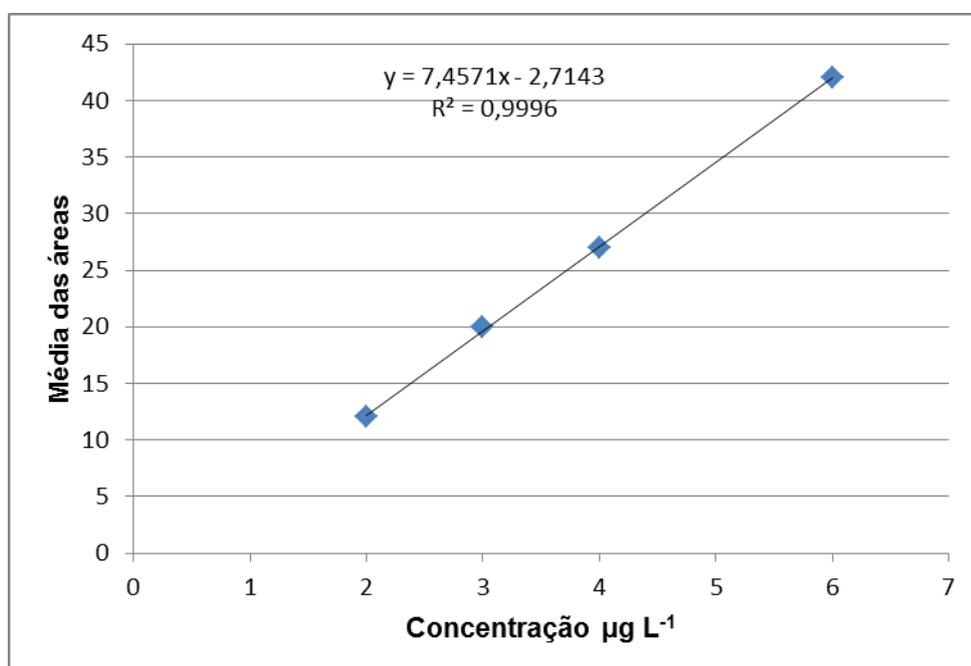
ANEXOS I

Figura 27 Gráfico, equação da reta e r^2 do alacloro



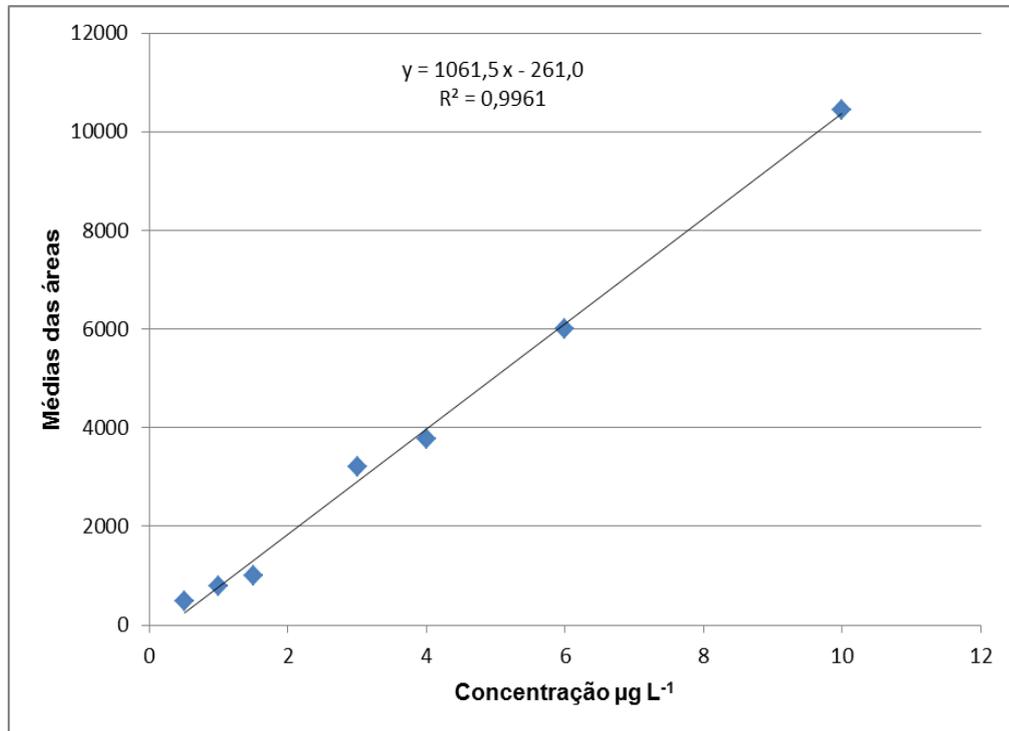
Fonte: Próprio autor

Figura 28 Gráfico, equação da reta e r^2 do clorpirifós



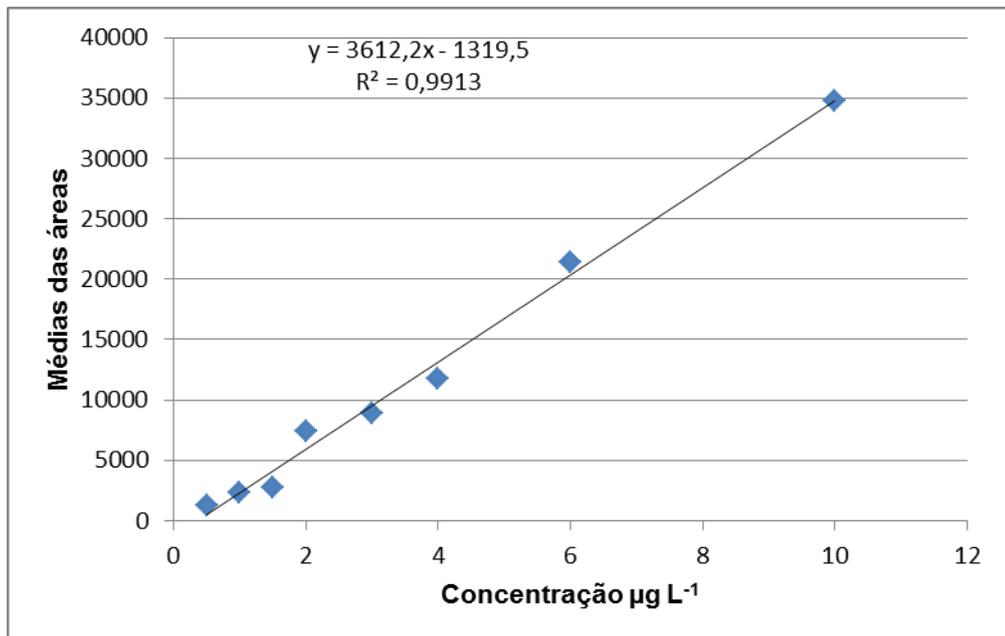
Fonte: Próprio autor

Figura 29 Gráfico, equação da reta e r^2 do endossulfan I



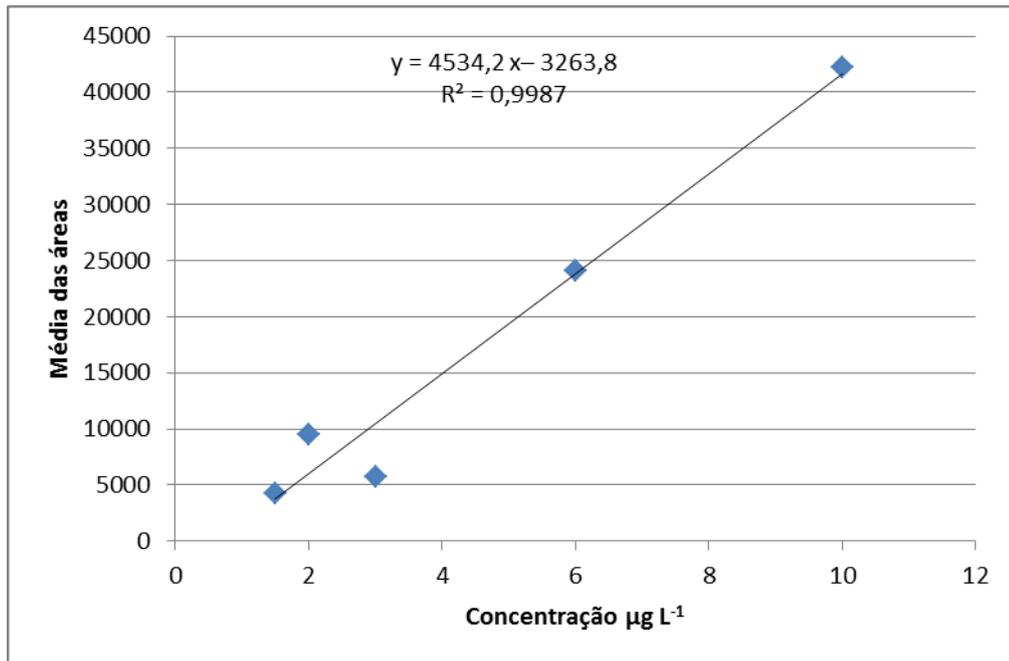
Fonte: Próprio autor

Figura 30 Gráfico, equação da reta e r^2 do hexaclorobenzeno



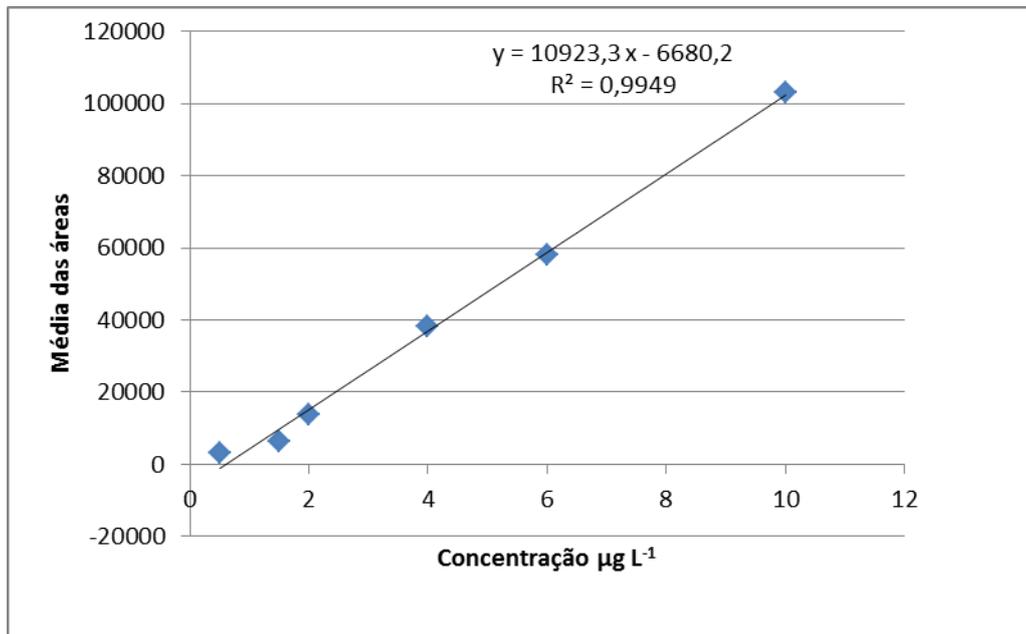
Fonte: Próprio autor

Figura 31 Gráfico, equação da reta e r^2 do malation



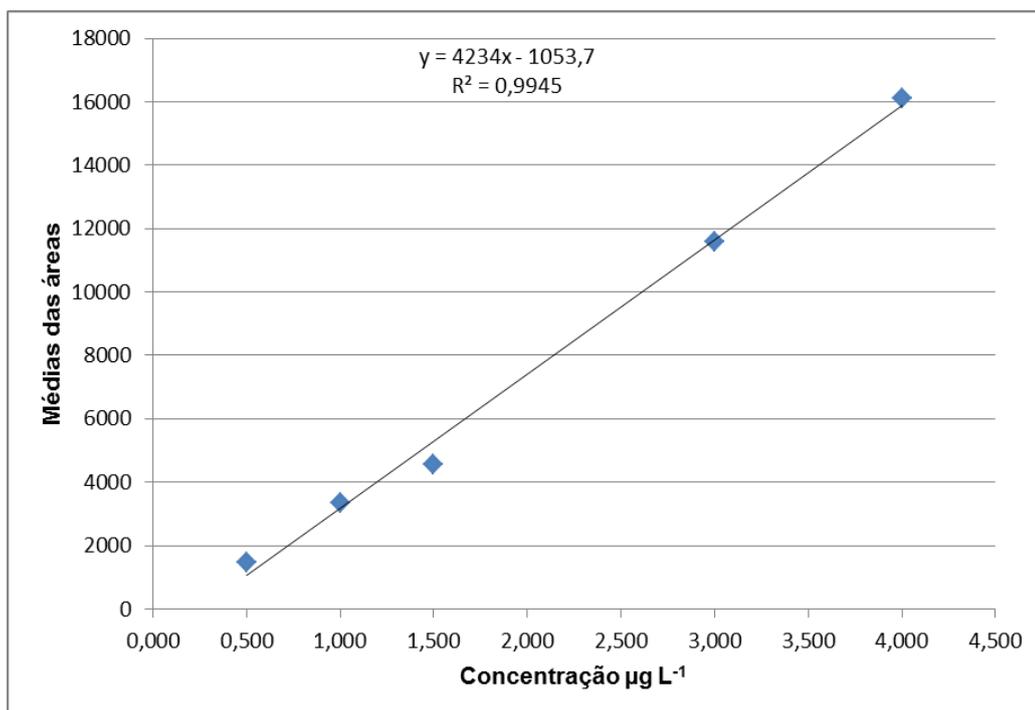
Fonte: Próprio autor

Figura 32 Gráfico, equação da reta e r^2 do metoxicloro



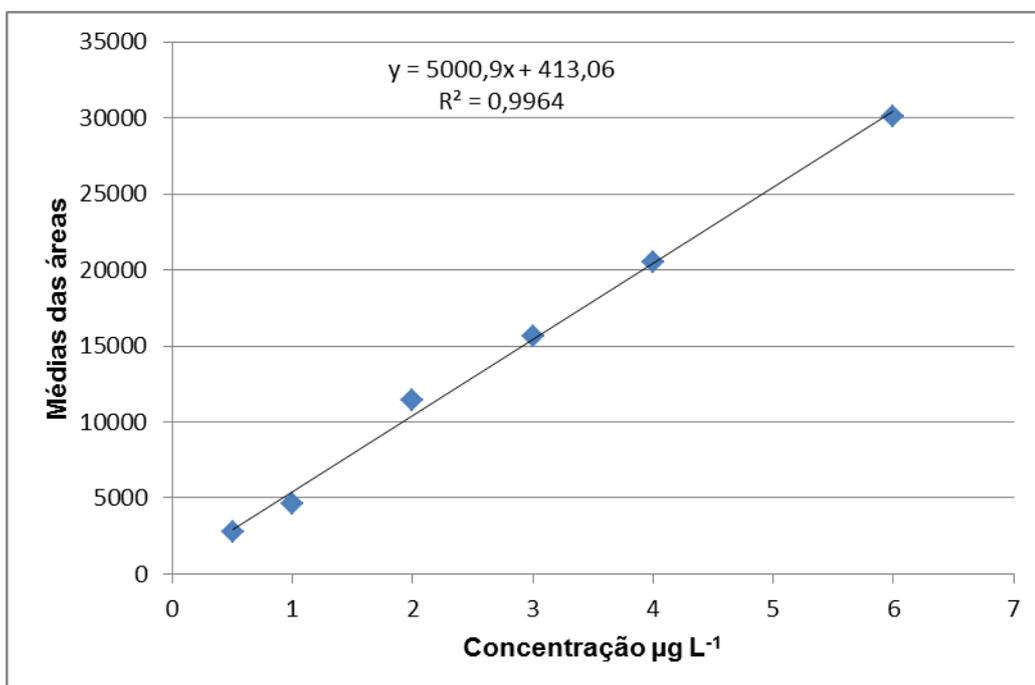
Fonte: Próprio autor

Figura 33 Gráfico, equação da reta e r^2 do molinato



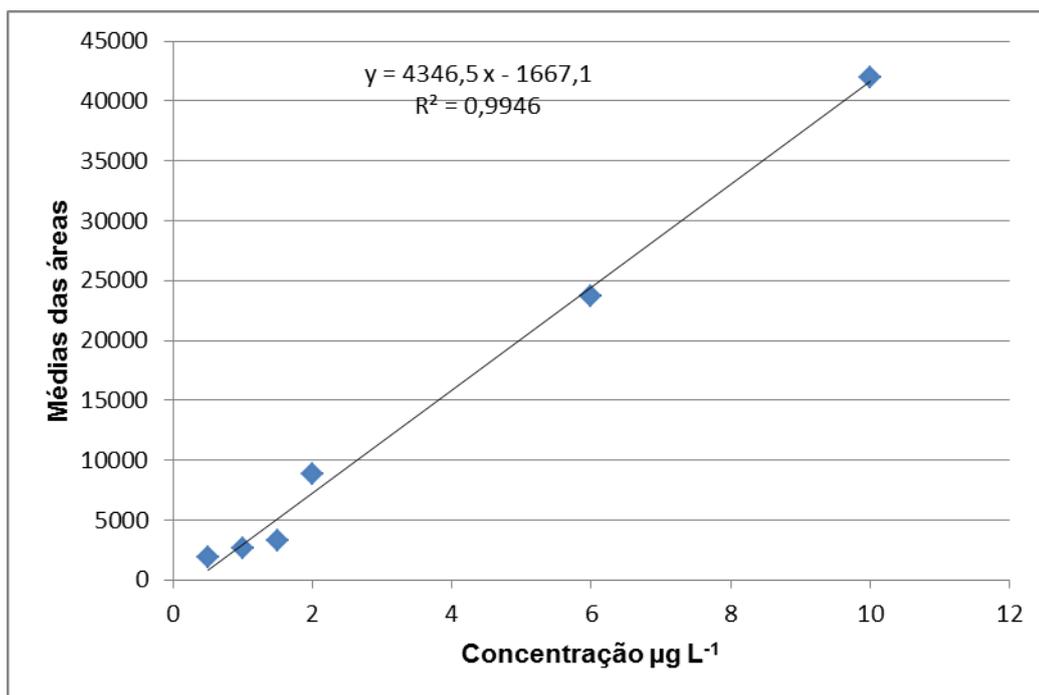
Fonte: Próprio autor

Figura 34 Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDD



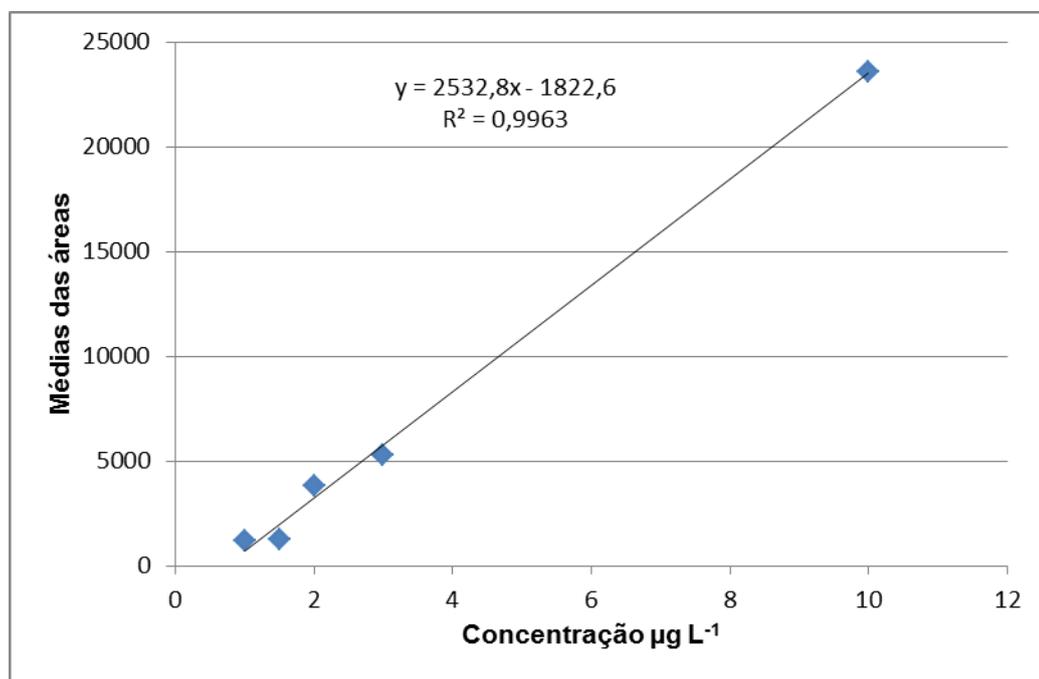
Fonte: Próprio autor

Figura 35 Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDE



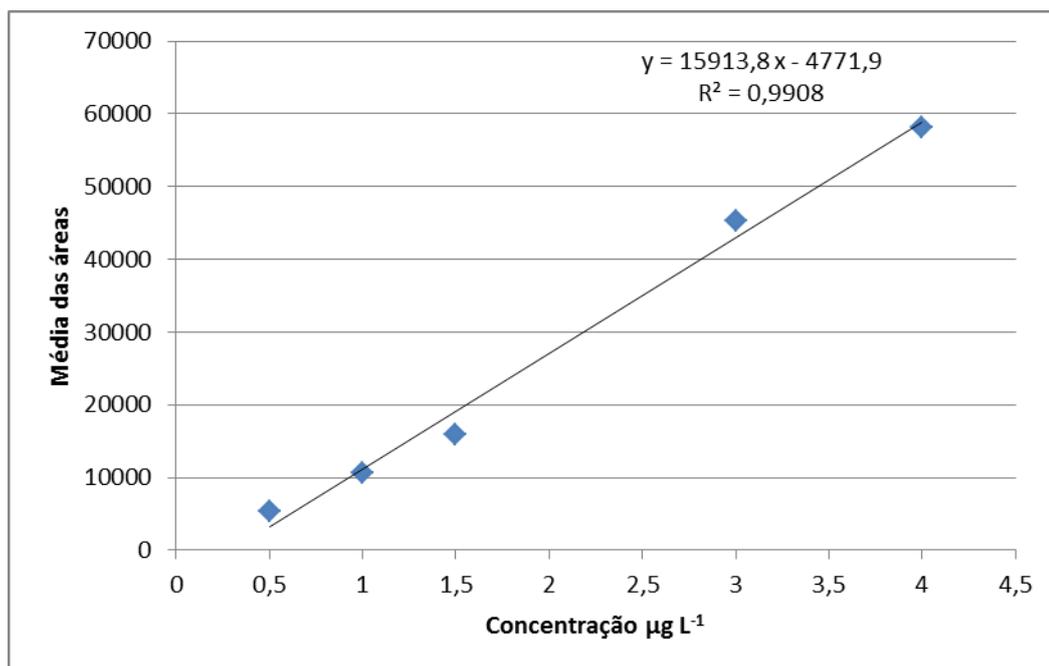
Fonte: Próprio autor

Figura 36 Gráfico, equação da reta e r^2 do p,p'-DDT



Fonte: Próprio autor

Figura 37 Gráfico, equação da reta e r^2 da trifluralina



Fonte: Próprio autor