AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SORVENTES NA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE PESTICIDAS EM ÁGUA. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO JARDIM DA SILVA FARIA

Orientadora: Prof[a] Dr[a] ISABEL CRISTINA SALES FONTES JARDIM

Agosto/2004

Instituto de Química

“Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida. Meus pais: Vera Lúcia e Domingos e meus irmãos: Felipe e Ana Paula.”

Se algo der errado na sua vida,

nunca desanime,

pois o sol ao nascer oferece um espetáculo tão lindo,

que a maioria das pessoas ainda estão dormindo.

Agradecimento Especial

Gostaria de agradecer a Profª. Drª. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela sua orientação essencial para o desenvolvimento desta dissertação e pela oportunidade que me deu para que eu pudesse realizar este mestrado. Muito Obrigado.

Agradecimentos

Às professoras da UNICAMP, Carol H. Collins e Suzane Rath pelas suas colocações no exame de qualificação para a melhoria desta dissertação.

Ao funcionários da CPG, biblioteca e xerox do Instituto de Química e do Grupo de Planejamento e Pesquisas (GPP).

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Aos meus avôs : Antônio, Maria e Eniette.

Aos meus tios e tias: Mauro, Virgílio, Laura, Antônio, Cecília, Emerita, Jorge e Manoel.

À minha querida sobrinha Nathália.

À uma pessoa muito querida por mim : Patrícia.

À um amigo papagoiaba que eu vim conhecer aqui em Campinas: Marco Aurélio Guimarães (Marquinho GPP), sua esposa Dani e seu irmão Paulo Abuda.

Aos meus amigos da casa (F7) mais acolhedora da Moradia Estudantil da UNICAMP: Márcio, Tibério, Charles, João Paulo, Eriberto e Lucas Barata.

Aos meus colegas de UNICAMP: Ênio, Janai, Espanhol, David, Hard, Rodrigão, Julião, Rinaldo, Toninho, Nelsão, Magda, Nalha, Chico, Cleyton, Simone (IEL), Kassandra e Daniel (I2), Lily, Hayda, Ana Maria, Raquel, Fabinho, Junior (Athirson), Maria Ivone, Daniel,

Nilva, Carla, César, Mayer (Topete), Marcelo, Ralf, Fabiano, Ana, Alexandre, Rogério e toda a galera do NEP.

Aos meus amigos: o Flamenguista Dudu e ao zabumbeiro mais famoso de Campinas Marquinhos.

Ao amigo Ivan que está em Maceió.

Aos meus amigos do RJ: Luciana, Alexandre, Luciene, Luciane, Xandão, Alexandra, Palha, Alessandro, Luís Cláudio, Fabinho, Luís Felipe, Fred, Birigui, Touro, Denise, Alex, Verônica, Álissa, Luís (cantina), Leandro, Beto e Julio.

Aos professores da UFF e amigos Sérgio Pinheiro e Bira.

Ao meus amigos do IFCH-UNICAMP: Nilsão, Sr. Luís, Dete, Benê e o pessoal da cantina.

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Leonardo Jardim da Silva Faria
Naturalidade: Rio de Janeiro
Nacionalidade: Brasileiro
Data de Nascimento: 13 de junho de 1975

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Pós Graduação: Mestrando em Química Analítica na Universidade Estadual de Campinas
Título do Projeto de Pesquisa: "Avaliação de Diferentes Sorventes na Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. Desenvolvimento e Validação de Metodologia.
Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Graduação em Química Industrial na Universidade Federal Fluminense – 2001

3. INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MONITORIA:

Auxiliar Didático na disciplina de Química Analítica Clássica do IQ da UNICAMP – 2002

Iniciação científica no LADETEC-UFRJ - 2000
Desenvolvimento de métodos de análise utilizando GC-MS
Orientador: Profo. Dr. Francisco Radler de Aquino Neto

Monitoria em Química Analítica na Universidade Federal Fluminense – 1998

4. CURSOS E TRABALHOS

XII Encontro Nacional de Química Analítica – Maranhão 2002

1- Comparação de tubos C18 e de DVB para extração em fase sólida de pesticidas em água.

2- Determinação de triazinas em água utilizando tubos de extração em fase sólida de DVB.

Reações Biocatalíticas em Química Orgânica – UFSCar – 2001

Produtos Naturais no Controle de Insetos – UFSCar – 2001

Combinatorial Chemistry, High-Troughput Parallel Synthesis and Polymer-Supported Chemistry – UFSCar – 2001

Introdução a Química Forense – UFRJ – 2000

Geologia e Geoquímica do Petróleo – UFRJ – 2000

Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas – UFSC - 1999

RESUMO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SORVENTES NA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE PESTICIDAS EM ÁGUA. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.

Palavras chaves: Extração em Fase Sólida (EFS), Pesticidas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Muitos contaminantes orgânicos estão presentes em água em baixas concentrações. Devido a isso, tem crescido o interesse em desenvolver técnicas de preparo de amostra que possibilitem pré-concentrar os analitos presentes na matriz para adequação ao sistema de detecção.

Neste trabalho foi empregada a extração em fase sólida (EFS) com diferentes sorventes, tubos de extração C-18 e de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) e coluna de PS-DVB, para extrair pesticidas presentes em água. Os pesticidas estudados foram: bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron e linuron. Para a separação dos pesticidas utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna analítica C-18 Nova Pak-Waters, 150 mm x 3,9 mm d.i., tamanho de partícula de 4 μm e 6 nm de diâmetro de poro. A fase móvel utilizada foi MeOH:H_2O 50:50 v/v pH 3,75 (ajustado com ácido fosfórico) e a detecção foi feita por um detector por arranjo de diodos.

Na separação cromatográfica obtiveram bons valores de resolução, maiores que 3,0 para todos os pesticidas, os fatores de retenção também foram adequados, estando numa faixa de 1,0 a 14.

Os melhores volumes de amostras utilizados na extração foram de 200 mL para tubos C18 (fator de pré-concentração de 400 vezes) e de 750 mL para tubos e colunas de PS-DVB (fator de pré-concentração de 1500 vezes). A adição de sal na amostra não melhorou os resultados de recuperação para todos os pesticidas em comparação com a amostra isenta de sal.

A extração com tubos e colunas de PS-DVB mostrou-se mais adequada para recuperações de pesticidas polares do que os tubos C18, além de alcançar uma pré-concentração maior o que permite determinar pesticidas em concentrações mais baixas. Outro fator importante em comparação aos tubos C18 é uma faixa mais ampla de pH da amostra que se pode trabalhar sem ter perdas na recuperação.

Os limites de detecção e quantificação estiveram entre 0,007 a 0,043 μg/L e 0,024 a 0,144 μg/L, respectivamente, utilizando tubos C-18, 0,001 a 0,005 μg/L e 0,006 a 0,038 μg/L, respectivamente, utilizando tubos e colunas de PS-DVB.

Os métodos desenvolvidos permitem a determinação destes pesticidas em amostras de água em concentrações que atendem a legislação vigente.

ABSTRACT

EVALUATION OF DIFFERENT SORBENTS FOR THE SOLID PHASE EXTRACTION OF PESTICIDES IN WATER. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY.

Key-words: Solid Phase Extraction (SPE), Pesticides, High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Many organic contaminants are present in water in low concentrations, thus, the interest in developing techniques of sample preparation has increased to make possible pre-concentration of these analytes from this medium to be adequate for the detection system to be used.

In this work solid phase extraction (SPE) with different sorbents was used: tubes of C18 and divinilbenzene-polystyrene (PS-DVB) and columns of PS-DVB, to extract pesticides present in water. The pesticides studied were: bentazon, cyanazine, simazine, 2,4-D, atrazine, diuron and linuron. For separation of the pesticides high performance liquid chromatography (HPLC), with an analytical column Waters NovaPak, C18, 150 mm x 3.9 mm d.i., particle size of 4 μm and 6 nm of pore diameter was used. The mobile phase used was MeOH/H_20 50:50 v/v, pH 3.75 (adjusted with phosphoric acid) and the detection used a diode array spectrophotometer.

In the chromatographic separation, good values for resolution, greater than 3.0 for all pesticides, were obtained with retention factors being adjusted in the range of 1.0 to 14.

The best volumes of samples used in the extraction were 200 mL for C18 tubes (pre-concentration factor of 400 times) and 750 mL for tubes and columns of PS-DVB (pre-concentration factor of 1500 times). Salt addition to the sample did not improve the results of recovery for all the pesticides, in comparison with samples free from salt.

The extraction with tubes and columns of PS-DVB was shown to be more adequate for polar pesticide recoveries than that of C18 tubes, besides reaching a greater pre-concentration, which allows determination of the pesticides in lower concentrations. Another important factor, in comparison to the C18 tubes, is a wider range of pH of the sample that can be used without having losses in recovery.

The limits of detection and quantification were between 0.007 to 0.043 μg/L and 0.024 to 0.144 μg/L, respectively, using tubes of C18, 0.001 to 0.005 μg/L and 0.006 to 0.038 μg/L, respectively, using tubes and columns of PS-DVB.

The methods developed allow determination of these pesticides in water samples in concentrations relevant to the current law.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

I- INTRODUÇÃO 1
I.1- A IMPORTÂNCIA DO USO DE PESTICIDAS 1
I.2- O USO DE PESTICIDAS NO BRASIL 2
I.3- O IMPACTO NO MEIO AMBIENTE 2
I.4- DISPERSÃO DOS PESTICIDAS NO MEIO AMBIENTE 4
I.5- CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR PESTICIDAS 6
I.6- ESCOLHA DOS PESTICIDAS 9
I.6.1- 2,4-D *9*
I.6.2- Bentazona *10*
I.6.3- Cianazina *11*
I.6.4- Simazina *12*
I.6.5- Atrazina *13*
I.6.6- Linuron *14*
I.6.7- Diuron *15*
I.7- CONFIABILIDADE NA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS 16
I.7.1- Tratamento da amostra para análise por CLAE *16*
I.7.2- Análise por CLAE *19*
I.8- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ANÁLISE DE PESTICIDAS EM ÁGUA. 23
I.9- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO 25
1.9.1. Exatidão *26*
1.9.2. Precisão *26*
1.9.3. Limite de Detecção (LD) *27*
1.9.4. Limite de Quantificação (LQ) *27*
1.9.5. Linearidade e Faixa Linear *27*
1.9.6. Robustez *27*

CAPÍTULO II

II- OBJETIVO 28

CAPÍTULO III

III- PARTE EXPERIMENTAL 29
III.1- MATERIAIS E MÉTODOS 29
III.1.1- Reagentes e Solventes *29*
III.1.2- Pesticidas Selecionados *29*
III.1.3- Gás utilizado para pré-concentrar amostras *29*
III.1.4- Coluna Cromatográfica *30*
III.1.5- Dispositivos de Extração em Fase Sólida *30*
III.1.6- Equipamentos *30*
III.2- ESTUDO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARAÇÃO DOS PESTICIDAS 31
III.2.1- Preparo da fase móvel *31*

III.2.2- Preparo dos padrões *31*
III.2.3- Avaliação da Separação Cromatográfica *32*
III.2.4- Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos pesticidas *32*
III.2.5- Estudo da Extração em Fase Sólida dos Pesticidas *32*
III.3- VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA 34
III.3.1- Curva Analítica *34*
III.3.2- Dectabilidade *34*
III.3.3- Recuperação *34*
III.3.4- Precisão *35*
III.3.5- Linearidade e Faixa linear *35*
III.3.6- Amostra Real *35*

CAPÍTULO IV

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
IV.1- AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA 36
IV.2- OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DOS PESTICIDAS 37
IV.3- ESTUDO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DOS PESTICIDAS 38
IV.3.1- Avaliação do pH da Amostra e da Vazão de Extração *38*
IV.3.2- Determinação do volume de capacidade do sorvente *40*
IV.3.3- Influência da força iônica através da adição de cloreto de sódio *43*
IV.4- VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA 48
IV.4.1- Curva Analítica, Detectabilidade e Intervalo Linear *48*
IV.4.2- Recuperação e Precisão *49*
IV.4.3- Amostra Real *54*

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÕES 56

CAPÍTULO VI

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Acumulação de DDT na cadeia alimentar.....*3*

Figura 2. Contaminação do ecossistema por pesticidas.....5

Figura 3. Ilustração de tubos de extração em fase sólida.....17

Figura.4.Cromatograma obtido na separação de multirresíduos de pesticidas. Condições cromatográficas: coluna Nova Pak C-18, 4 μm (150 x 3,9 mm d.i); FM MeOH:H_2O 50:50 v/v, pH 3,75 (ácido fosfórico); F=0,8 mL/min; volume de injeção: 10 μL; detecção: DAD.....36

Figura 5. Espectro de absorção na região do UV de todos os pesticidas estudados.....37

Figura 6. Valores de recuperação variando-se a vazão de extração, usando tubos de PS-DVB.....39

Figura 7. Valores de recuperação variando-se o pH da amostra em vazão de 3 mL/min, usando tubos de PS-DVB.....40

Figura 8. Cromatograma do branco sem adição de NaCl, após EFS em tubo C-18. Condições cromatográficas : Idem a Figura 4.....43

Figura 9. Cromatograma do branco com adição de NaCl, após EFS em tubo C-18. Condições cromatográficas : Idem a Figura 4.....44

Figura 10. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma dos pesticidas sem adição de sal, após EFS usando tubo C-18. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....44

Figura 11. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma dos pesticidas com adição de sal, após EFS usando tubo C-18. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....45

Figura 12. Gráficos em barra mostrando os valores de recuperação em amostra isenta de sal e com a adição de 10, 20 e 30 % de sal 47

Figura 13. Cromatograma obtido para o branco, após EFS utilizando tubo de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem à Figura 4.....49

Figura 14. A) Espectro de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma obtido para uma amostra controle. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....50

Figura 15. A) Espectro de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma obtido para amostra fortificada com os pesticidas (0,4 μg), após EFS utilizando tubo de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....50

Figura 16. Cromatograma obtido na análise de água da pia do LABCROM, após EFS com coluna de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....54

Figura 17. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV e B) Cromatograma obtido na análise de água da torneira do LABCROM fortificada com a mistura de pesticidas, utilizando EFS com coluna de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.....55

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do DL_{50}.....7

Tabela 2. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo o Brasil.....8

Tabela 3. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo a EPA.....8

Tabela 4. Pesticidas incluídos na Diretriz 76/464/EEC (Lista Negra).....9

Tabela 5.Pesticidas selecionados e seus respectivos fornecedores, grau de pureza e a família química.....29

Tabela 6. Volumes e respectivas concentrações das soluções de pesticidas empregados na determinação do melhor volume de extração.....33

Tabela 7. Valores de t_R, k, Rs e α para a separação da mistura de pesticidas utilizando FM MeOH:H_2O 50:50, v/v pH 3,75 (ácido fosfórico) a 25^oC.....36

Tabela 8. Valores de comprimento de onda de absorção máxima para os pesticidas estudados.....38

Tabela 9. Valores de recuperação variando-se a vazão de extração, usando tubos de PS-DVB.....38

Tabela 10. Valores de recuperação variando-se o pH da amostra em vazão de 3 mL/min, usando tubos de PS-DVB.....39

Tabela 11. Resultados de recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando tubo C-18..... 41

Tabela 12. Resultados de recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando tubo PS-DVB.....41

Tabela 13. Resultados de recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando coluna PS-DVB.....42

Tabela 14. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (200 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando tubo C-18.....45

Tabela 15. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (750 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando tubo PS-DVB.....46

Tabela 16. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (750 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando coluna DVB.....46

Tabela 17. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com tubos C-18 (N=3) e determinação por CLAE.....48

Tabela 18. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com tubos PS-DVB (N=3) e determinação por CLAE.....48
Tabela 19. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com coluna de PS-DVB (N=3) e determinação por CLAE.....49
Tabela 20. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).....51
Tabela 21. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).....51
Tabela 22. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).....51
Tabela 23. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3)..... 52
Tabela 24. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3).....52
Tabela 25. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3).....52
Tabela 26. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).....53
Tabela 27. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).....53
Tabela 28. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).....53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta

CG – Cromatografia gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CG-DCE – Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons

CG-DNF – Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

C8 - Grupo octil

C18 - Grupo octadecil

CEDMSDEA – 2-cianoetildimetil (dietil) aminossilano

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

2,4-D – ácido 2,4 diclorofenoxiacético

DAD – detector por arranjo de diodos

DDT- Diclorodifeniltricloro-etano

DFI - detector de fotoionização

DL_{50} – Dose Letal para 50% da espécie testada

DNF- Detector de Nitrogênio-Fósforo

DVB – divinilbenzeno

EFS - Extração em Fase Sólida

ELL – Extração líquido-líquido

EPA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

EC – Comunidade Européia

F - Vazão

FDA – Agência para alimentos e drogas dos Estados Unidos

FM – Fase móvel

HFBA – Ácido heptafluorbutírico

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ICH – Internacional Conference on Harmonization

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

Labcrom – Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida

MEFS - Micro Extração em Fase Sólida

n - Número de medidas

PDMS/DVB - Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PS/DVB – Poliestireno/divinilbenzeno

PLRP-S - pré-colunas poliméricas

R - Recuperação

r - Coeficiente de correlação

SPD - Sistema de Plantio Direto

t_M - Tempo de retenção de um composto não retido

TFE – 2,2,2 – Trifluoretanol

UV – Ultra-violeta

CAPÍTULO I

I- INTRODUÇÃO

I.1- A importância do uso de pesticidas

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define agrotóxicos e afins como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento [1,2].

A agricultura praticada em nosso País ainda é altamente dependente de insumos químicos, dentre os quais os pesticidas, mais comumente denominados de agrotóxicos ou defensivos agrícolas. Os pesticidas têm sido usados por mais de quarenta anos devido a sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que infestam as lavouras, garantindo assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, o retorno econômico da atividade agrícola. Sem o uso de pesticidas, a produção e a qualidade dos alimentos seria drasticamente afetada, além dos riscos de gerar a falta de alimentos e de promover alta nos preços dos produtos agrícolas. Entretanto, muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização destes produtos na agricultura para gerar uma maior produção de alimentos, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente em geral, oriundos da sua utilização inadequada.

Os riscos maiores causados pelo emprego de pesticidas, tais como: saúde da população e contaminação do meio ambiente, muitas vezes passam despercebidos pela sociedade diante dos benefícios econômicos gerados, por isso é importante utilizá-los na agricultura somente quando não existir outro recurso economicamente eficaz.

No entanto, tem-se observado ao longo dos anos, que o uso indiscriminado dos pesticidas tem levado ao aparecimento de resíduos desses compostos nos diferentes compartimentos do meio ambiente (água, solo e ar) e em produtos alimentícios. Diante desse fato e da periculosidade que os pesticidas apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, há hoje uma necessidade urgente de se intensificarem os estudos que possibilitem um monitoramento eficiente de possíveis

contaminações do ambiente. Tais estudos são fundamentais para que se estabeleçam estratégias visando à redução dos riscos de contaminação.

Muitas pessoas debatem sobre a não utilização destes produtos na agricultura, mas um estudo realizado por C. R. Taylor da Universidade de Aubum e R. Knutson, da Texas A&M- USA, concluiu que o uso de pesticidas na agricultura evita a perda de US$ 20 bilhões anuais na economia norte-americana. Devido a este estudo, muitas pessoas defendem a importância do uso adequado dos pesticidas como uma ferramenta útil para proteger a saúde da população e do meio ambiente e evitar também problemas econômicos ao país [3].

I.2- O uso de pesticidas no Brasil

O consumo de pesticidas no Brasil é de aproximadamente 3,2 kg de ingredientes ativos por hectare, ocupando, assim, a décima posição em um "ranking" liderado pela Holanda, que consome, aproximadamente, 10 kg de ingredientes ativos por hectare. Cerca de 88% do total de pesticidas que são comercializados no Brasil vai para os Estados de São Paulo (22%), Paraná (16%), Rio Grande do Sul (13%), Mato Grosso (12%), Minas Gerais (10%), Goiás (9%) e Mato Grosso do Sul (6%). As culturas de soja, milho, citros e cana-de-açúcar consomem cerca de 66% do total, sendo que apenas a cultura da soja é responsável pelo consumo de 33% desse montante [1].

I.3- O impacto no meio ambiente

O crescimento da população mundial nos últimos anos tem acarretado uma demanda cada vez maior por alimentos, e isso requer que a agricultura produza quantidades maiores de alimentos por área cultivada, para poder alimentar populações futuras da mesma forma que nos dias atuais. Mas isso requer um aumento drástico das áreas cultivadas e uma redução das florestas naturais, uma vez que em muitas partes do mundo não se encontra mais terras aráveis disponíveis para o plantio. Em algumas áreas, uma expansão da área cultivada é praticamente inaceitável do ponto de vista ambiental. Sendo assim, surge a idéia do aumento da produção a partir da área atual com o uso das chamadas boas práticas agrícolas para combater as perdas causadas na época de colheita.

A boa prática agrícola é o conjunto de medidas adotadas pelo agricultor com o objetivo de produzir alimentos saudáveis, com qualidade, economicamente viável e de forma a preservar a saúde da população e o meio ambiente. Exemplos de medidas são listadas a seguir [3]:

- Preservação dos recursos hídricos
- Uso correto e seguro de produtos fitossanitários
- Aquisição de produtos somente sob receituário agronômico
- Uso das doses recomendadas na rotulagem
- Utilização de equipamentos de segurança
- Realização da tríplice lavagem das embalagens
- Descarte adequado das embalagens vazias

Os pesticidas quando são aplicados na lavoura, eventualmente, são transportados para as águas superficiais, através de vários mecanismos e seus resíduos podem permanecer no meio ambiente, devido a sua persistência, causando riscos potenciais à saúde humana [4,5]. Os pesticidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos: fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação a concentração inicial de pesticidas, como o leite, os peixes de água doce ou salgada, os crustáceos e os vegetais. A cadeia alimentar aquática é um bom exemplo de como ocorre a acumulação. Se for considerada uma concentração arbitrária de 1 para concentrações baixas (traços) de um inseticida em água, então a concentração em um plâncton será de 10, em um crustáceo será de 500, em um peixe pequeno será de 2500, em um peixe carnívoro será de 5000 e em um pássaro, que come peixes, será de 125000 [6]. Um exemplo pode ser visualizado na Figura 1, que mostra o acúmulo de diclorodifeniltricloroetano (DDT) na cadeia alimentar.

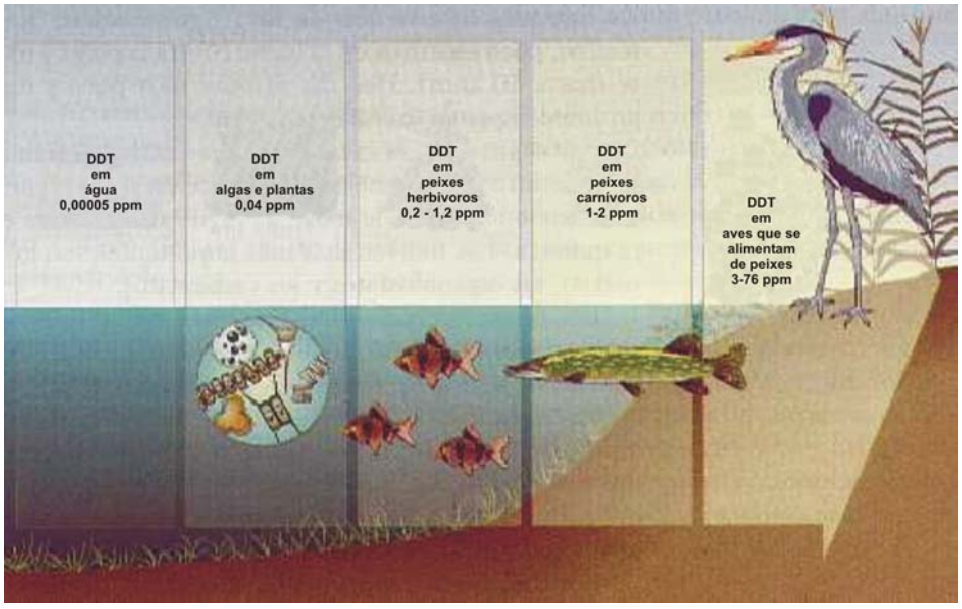


Figura 1: Acumulação de DDT na cadeia alimentar.

I.4- Dispersão dos pesticidas no meio ambiente

Alguns pesticidas foram utilizados indiscriminadamente na agricultura, na década de 60, em razão da elevada eficiência destes no controle de pragas, obtendo assim maior produtividade na época de colheita [7].

Os pesticidas são comumente aplicados sobre as plantas ou diretamente no solo. Mesmo quando aplicados sobre as plantas, cerca de 50% da dose total aplicada poderá ter como destino final o solo, independentemente da forma como foi realizada essa aplicação. Após chegar ao solo, o pesticida pode ter seu destino influenciado por três formas principais de transporte: (1) volatilização; (2) lixiviação e (3) escoamento superficial [1,8]. A Figura 2 mostra como ocorre a contaminação do ecossistema por pesticidas.

A volatilização corresponde à transferência do pesticida do solo para a atmosfera. Os pesticidas mais voláteis necessitam ser incorporados ao solo para diminuir sua perda por volatilização. Embora o número de pesticidas voláteis atualmente utilizados na agricultura seja pequeno, diversos estudos têm mostrado que as perdas por volatilização, logo após a aplicação, podem chegar a 90% da dose aplicada. Com relação à contaminação dos recursos hídricos (água superficial), a volatilização de pesticidas possibilita o carreamento desses compostos através da atmosfera e, posteriormente, sua deposição nas águas superficiais (rios, lagos , etc.) através da chuva. Um estudo publicado no ano de 2000, envolvendo 10 países europeus, mostrou que, de um total de 99 pesticidas monitorados, 48 pesticidas diferentes foram detectados na água da chuva. Outra conclusão importante desse estudo foi que alguns desses pesticidas detectados não eram utilizados nas áreas agrícolas em que as amostras da água da chuva foram coletadas, evidenciando o transporte a grandes distâncias desses compostos pela atmosfera [1].

A lixiviação corresponde ao transporte vertical dos pesticidas no perfil do solo juntamente com a água da chuva ou irrigação que desce pelos poros. Esta forma de transporte tem sido apontada como a principal causadora da contaminação de águas subterrâneas (lençol freático). Estudos têm demonstrado que, de uma maneira geral, o transporte de pesticidas por lixiviação chega a 1% da dose aplicada podendo, em casos excepcionais, chegar a 5%. É importante mencionar que diversos fatores relacionados ao solo, ao clima e à molécula do pesticida influenciam essa descida no solo. Por exemplo, solos com maior teor de matéria orgânica tendem a reter maior quantidade de pesticidas na camada superficial, diminuindo assim a sua movimentação. Além disso, solos com maior teor de matéria orgânica possuem maior atividade microbiana, o que possibilita uma degradação mais rápida dos pesticidas pela ação dos microorganismos. No entanto, alguns pesticidas

possuem baixa afinidade com a matéria orgânica do solo e, portanto, apresentam um alto potencial de lixiviação, devido a uma menor retenção pelo solo. Diante disso, ao se analisar a possibilidade de contaminação do lençol freático por pesticidas é necessário que se leve em conta todos os fatores envolvidos [1].

O escoamento superficial corresponde ao transporte dos pesticidas através da água de enxurrada na superfície do solo, que poderá ter como destino final os rios e lagos, ocasionando suas contaminações. Chuvas mais intensas podem causar perdas substanciais de pesticidas por escoamento superficial. Estudos têm mostrado que perdas em torno de 1% a 2% da dose aplicada de um pesticida têm sido comum, considerando-se apenas uma única chuva. Medidas que visam diminuir a formação de enxurradas terão efeito direto na diminuição do escoamento superficial de pesticidas e, conseqüentemente, na poluição dos rios e lagos. Um exemplo dessas medidas na agricultura moderna é a adoção da prática do Sistema de Plantio Direto (SPD), que preconiza a permanência constante de cobertura vegetal no solo. No entanto, vale a pena ressaltar que, devido à tendência do aumento da adoção da prática do SPD, haverá também um aumento no consumo de herbicidas, já que o SPD ainda é altamente dependente desse insumo químico [1].

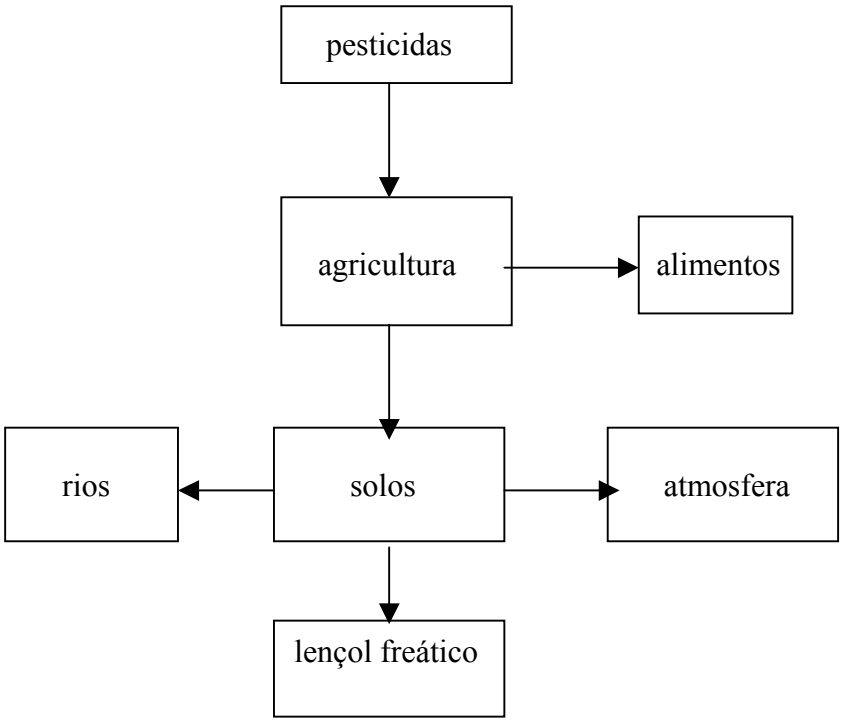


Figura 2 : Contaminação do ecossistema por pesticidas.

Estudos no Brasil para monitoramento da presença de resíduos de pesticidas no lençol freático ainda são incipientes. Um amplo monitoramento de resíduos de pesticidas em água do lençol freático, realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estado Unidos (EPA) em 1988, relatou que 46 pesticidas diferentes foram encontrados no lençol freático de 26 Estados Americanos. No entanto, desses 46 pesticidas, 32 foram encontrados no lençol freático de 12 Estados devido à utilização inadequada, ou seja, violação das restrições contidas nos rótulos dos produtos. Em 1992, outro monitoramento foi realizado pela EPA, no qual se investigou a presença de resíduos de pesticidas por cinco anos em poços utilizados para consumo de água pela população de 50 Estados Americanos. Os resultados desse estudo revelaram que 10,4% dos sistemas de água comunitários e 4,2% dos poços da área rural estavam contaminados com a presença de, pelo menos, um pesticida [1].

I.5- Contaminação das águas por pesticidas

A água é um dos elementos de maior importância para todas as formas de vida na terra. Ela está presente em todos os organismos vivos, fazendo parte de uma infinidade de substâncias e órgãos. Além disso, transporta diversos compostos nutritivos para o interior do solo, ajuda a controlar a temperatura da atmosfera e apresenta uma série de funções de extremo valor.

Três quartos da superfície terrestre são cobertos por oceanos. De toda água do planeta apenas 1% é constituída pelas águas superficiais, as dos rios, lagos, lagoas e as subterrâneas, que são chamadas de lençóis freáticos.

O despejo de substâncias tóxicas pela agricultura é uma das fontes de contaminação das águas, pois cada vez mais se utilizam inseticidas, herbicidas, fungicidas e toda uma série de praguicidas (substâncias que matam pragas).

Mesmo que estas substâncias cheguem aos rios e lagos em pequenas quantidades, a bioacumulação fará com que a sua ação seja altamente prejudicial ao longo das cadeias alimentares, no final das quais estamos nós, seres humanos. Os lençóis de água podem se contaminar, sempre apresentando algum tipo de substância nociva ao ser humano.

Para agravar o quadro, em muitas regiões do Brasil são feitas aplicações de pesticidas diretamente nas águas superficiais, para combater as larvas de insetos transmissores de doenças como a malária. Muitas vezes são os próprios rios que abastecem as cidades.

A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em termos do valor da Dose Letal (DL_{50}), por via oral, representada por miligramas do produto tóxico por quilo de peso vivo, necessários para matar 50% de ratos e outros animais testes.

Assim, para fins de prescrição das medidas de segurança contra riscos para a saúde humana, os produtos são enquadrados em função do DL_{50}, inerente a cada um deles, conforme mostra a Tabela 1 [9].

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do DL_{50}.

Classe toxicológica	Descrição
I	Extremamente tóxicos (DL_{50} < 50 mg/kg de peso vivo)
II	Muito tóxicos (DL_{50} – 50 a 500 mg/kg de peso vivo)
III	Moderadamente tóxicos (DL_{50} – 500 a 5000 mg/kg de peso vivo)
IV	Pouco tóxicos (DL_{50} > 5000 mg/kg de peso vivo)

Órgãos internacionais como a EPA dos Estados Unidos e a Comunidade Européia (EC) iniciaram um controle, estabelecendo limites em relação às concentrações de pesticidas encontradas em águas. Além disso, estes órgãos também organizaram listas de periculosidade de tais compostos.

Os níveis permitidos pela EC são determinados pela Drinking Water Directive (80/778/EEC), que estabeleceu que a concentração máxima tolerável (Maximum Admissible Concentration, MAC) de um pesticida individual não deve exceder 0,1 μg/L e que a concentração total de pesticidas não deve exceder 0,5 μg/L, em água potável [10].

O Brasil apresenta uma legislação que também regulamenta os níveis máximos de pesticidas em água potável, baseados em sua periculosidade, similarmente a EPA. A Tabela 2 apresenta os dados da Portaria n^{o} 1469, de 29 de dezembro de 2000, que estabelece os padrões de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos à saúde [11].

Tabela 2. Níveis permitidos para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo o Brasil [11].

Pesticida	Nível (μg/L)	Pesticida	Nível (μg/L)
Alaclor	20	Hexaclorobenzeno	1
Aldrin e Dieldrin	0,03	Lindano	2
Atrazina	2	Metacloro	10
Bentazona	300	Metoxicloro	20
Clordano	0,2	Molinato	6
2,4-D	30	Pendimetalina	20
DDT	2	Pentaclorofenol	9
Endossulfam	20	Permetrina	20
Endrin	0,6	Propanil	20
Glifosato	500	Simazina	2
Heptacloro	0,03	Trifluralina	20

Na tabela 3 estão os níveis permitidos para alguns pesticidas presentes em água potável, segundo a EPA [12].

Tabela 3: Níveis permitidos para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo a EPA [12].

Pesticida	Nível (μg/L)	Pesticida	Nível (μg/L)
Alaclor	2	Diquate	20
Aldicarbe	10	Endotal	100
Aldicarbe sulfóxido	10	Endrin	2
Aldicarbe sulfone	10	Glifosato	700
Atrazina	3	Metomil	200
Bromacil	80	Metilparationa	2
Carbofurano	40	Metolaclor	10
Clorotalonil	2	Oxamil	200
Cianazina	9	Picloram	500
2,4-D	70	Simazina	4
Dalapon	200	Trifluralina	2
Dinoseb	7	-----	-----

Além disso, tanto a EC quanto a EPA desenvolveram listas de prioridades, também chamadas de listas vermelhas e/ou negras, nas quais os pesticidas de maiores periculosidades (avaliados de acordo com a toxicidade, persistência e uso) estão incluídos. A Tabela 4 apresenta a lista negra desenvolvida pela Diretriz 76/464/EEC [13].

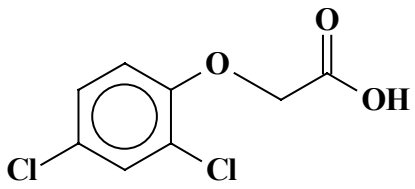
Tabela 4: Pesticidas incluídos na Diretriz 76/464/EEC (Lista Negra) [13].

Aldrin	Disulfoton	Monolinuron
Atrazina	Endosulfam	Ometoato
Azinfos-etil	Endrin	Oxidemeton-metil
Azinfos-metil	Fenitrotion	Paration-etil
Clordane	Fention	Paration-metil
Coumafos	Heptaclor	Foxim
2,4-D	Hexaclorobenzeno	Propanil
DDT	Linuron	Pirazon
Demeton	Malation	Simazina
Diclorprop	MCPA	2,4,5-T
Diclorvos	Mecoprop	Triazofos
Dieldrin	Metamidofos	Triclorfon
Dimetoato	Mevinfos	Trifluralina

I.6- Escolha dos Pesticidas

Para escolher os pesticidas a serem estudados neste trabalho foram avaliados alguns parâmetros tais como a frequência de aplicação destes na agricultura e as suas propriedadades físico-químicas variadas, para que o método de análise desenvolvido pudesse ser avaliado de uma maneira mais completa. A seguir são listados os pesticidas escolhidos:

I.6.1- 2,4-D



- ✓ Grupo químico: ácido fenóxiacético
- ✓ Nome químico: ácido 2,4 diclorofenoxiacético
- ✓ Fórmula Molecular: $C_8H_6Cl_2O_3$
- ✓ Massa Molar: 221,04 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe II, muito tóxico
- ✓ Irritabilidade: pele - moderada; olhos - irritante

- ✓ Sintomas de envenenamento: mal-estar, vômito, enfraquecimento muscular, dificuldade respiratória, suor excessivo, pessoas diabéticas são mais sensíveis.
- ✓ Dose Letal: 375 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Nomes Comerciais: Aminol, DMA 806 BR, 2,4-D Isamina, Esteron 400 BR.

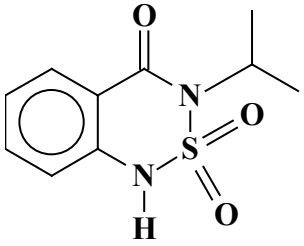
Este herbicida foi desenvolvido durante a guerra do Vietnã, e juntamente com o 2,4,5-T e com o pentaclorofenol ficou conhecido como agente laranja, sendo um grande agente desfolhante utilizado pela força aérea americana. Após a segunda guerra mundial, em 1947, ele se tornou o herbicida mais usado no mundo, substituindo a capina mecânica. Depois de cinquenta e um anos de uso, o 2,4-D ainda é o terceiro herbicida mais usado nos Estados Unidos.

No Brasil, e em outros países, é utilizado em culturas de café, cana de açúcar, cereais, milho, trigo e controle de ervas aquáticas.

Existem alguns estudos sobre a toxicidade deste herbicida que relatam o seu poder carcinogênico, mutagênico e neurotóxico, entretando outros estudos afirmam que este herbicida não apresenta esses males.

O 2,4-D é um herbicida ácido de características altamente polar, sendo analisado diretamente por CLAE ou por cromatografia gasosa (CG), após uma etapa de derivatização, geralmente por metilação [14].

I.6.2- Bentazona



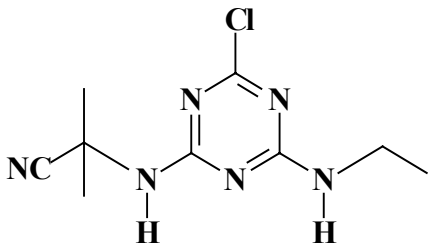
- ✓ Grupo químico: Tiodiazinas
- ✓ Nome químico: 3 – isopropil – 2,1,3 benzotiodiazina – (4) – 2,2 – dióxido
- ✓ Fórmula Molecular: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$
- ✓ Massa Molar: 240,3 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele - não irritante, olhos - moderada.

- ✓ Sintomas de envenenamento: apatia, prostação, tremores, irritação central, cãimbras, vômito e diarréia.
- ✓ Dose Letal: 1100 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 500 mg/L a 20 ^{o}C.
- ✓ Nomes Comerciais: Banir e Basagran.

No Brasil, ele é aplicado principalmente em culturas de amendoim, arroz, feijão, milho e trigo. Em outros países é utilizado em diversas culturas de gramíneas, leguminosas e outras dicotiledônias.

Os principais produtos de degradação da bentazona são os 6 e 8 hidroxi derivados. A bentazona, por ser um composto bastante polar, é analisada por CG após uma etapa de derivatização com diazometano, gerando a N-metil bentazona, mas este herbicida pode ser analisado diretamente por CLAE [14].

I.6.3- Cianazina

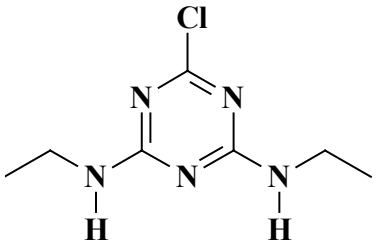


- ✓ Grupo químico: Triazinas
- ✓ Nome Químico: 2–(4-cloro–6–etilamino-1,3,5-triazina-2-ilamino)-2- metilpropionitrila.
- ✓ Fórmula Molecular: $C_9H_{13}ClN_6$
- ✓ Massa Molar: 240,7 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe II, muito tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele e olhos - não irritante.
- ✓ Sintomas de envenenamento: letargia, respiração rápida, queda de pressão arterial e redução da tensão muscular.
- ✓ Dissociação ácida (pKa): 0,63 (T = 25 ^{o}C)
- ✓ Dose Letal: 182 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 171 mg/L a 20 ^{o}C.
- ✓ Nomes Comerciais: Bladex 500.

No Brasil é utilizada em culturas de algodão, café, cana de açúcar, milho e soja, e em outros países também é utilizada em culturas de ervilha, cevada, amendoim, batata, cebola e fruticultura. É mais eficaz no controle de ervas de folhas largas que de gramíneas.

A cianazina é um composto de caráter pouco polar e fracamente básico. Este herbicida pode ser analisado diretamente por CG ou por CLAE [14].

I.6.4- Simazina



- ✓ Grupo químico: Triazinas
- ✓ Nome químico: 2-cloro-4,6-bis-etilamino-S-triazina
- ✓ Fórmula Molecular: $C_7H_{12}ClN_5$
- ✓ Massa Molar: 201,66 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele - levemente irritante, olhos - moderadamente irritante.
- ✓ Sintomas de envenenamento: ataxia, dispnéia e convulsões.
- ✓ Dissociação ácida (pKa): 1,62 (T = 25 ^oC)
- ✓ Dose Letal: >5000 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 5 mg/L a 20 ^oC.
- ✓ Nomes Comerciais: Gesatop 800 PM, Herbazin 800 PM, Sipazina 800 PM, Simanax SC.

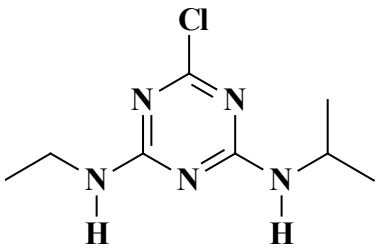
No Brasil é utilizado em culturas de milho, plantações de abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, citrinos, macieira, videira, roseira e seringueira. Em outros países é utilizada também em feijões, milho, aspargo, morango e plantas ornamentais.

A simazina é uma das mais importantes triazinas, sendo um dos herbicidas mais usados na agricultura atual. Sua persistência no solo é bastante acentuada e seu transporte no meio ambiente causa poluição do sistema aquático.

As triazinas são degradadas por processos químicos e biológicos. No solo, a degradação das triazinas ocorre devido a hidrólise, radiação UV, oxidação e microorganismos. Seu principal produto de decomposição no solo e na água são as respectivas hidroxi-triazinas, as quais são formadas principalmente por reações hidrolíticas quimicamente induzidas.

A simazina é um composto de caráter apolar e fracamente básico. Este herbicida pode ser analisado diretamente por CG ou por CLAE [14].

I.6.5- Atrazina

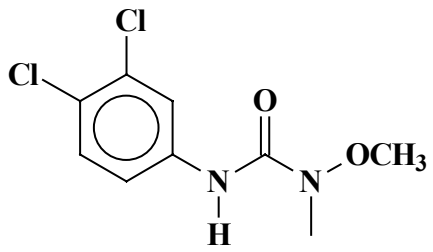


- ✓ Grupo químico: Triazinas
- ✓ Nome químico: 2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-S-triazina
- ✓ Fórmula Molecular: $C_8H_{14}ClN_5$
- ✓ Massa Molar: 215,68 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele e olhos - levemente irritante
- ✓ Sintomas de envenenamento: fraqueza muscular, apatia, dispnéia e prostação.
- ✓ Dissociação ácida (pKa): 1,70 (T = 25 ^oC)
- ✓ Dose Letal: 1750 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 28 mg/L a 20 ^oC.
- ✓ Nomes Comerciais: Atrazinax 500, Gesaprim 800 PM, Herbitrin 800, Siptran 800 PM, Stauzina 800 PM.

No Brasil é utilizada em culturas de abacaxi, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, manga, milho, pêssego, pimenta do reino, etc. Em outros países é utilizada em sisal e pastagem de alfafa, fazendo o controle essencialmente de ervas de folhas largas e de algumas gramíneas.

A atrazina é a mais utilizada das triazinas, sendo uma triazina de caráter fracamente básico e pouco polar. Juntamente com a simazina é a mais persistente no meio ambiente. Este herbicida pode ser analisado diretamente por CG ou por CLAE [14].

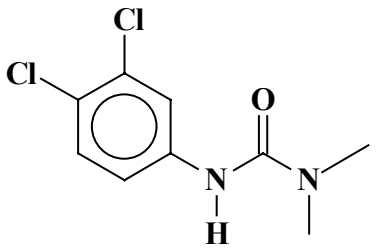
I.6.6- Linuron



- ✓ Grupo químico: Uréia Substituída
- ✓ Nome químico: 3-(3,4 diclorofenil)-1-metoxi-1-metil uréia
- ✓ Fórmula Molecular: $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$
- ✓ Massa Molar: 249,1 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele e olhos - moderadamente irritante
- ✓ Sintomas de envenenamento: não conhecidos.
- ✓ Dose Letal: 4000 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 81 mg/L em 25 ^{o}C.
- ✓ Nomes Comerciais: Afalon 500 SC, Linurex 50 PM, Lorox 500.

É utilizado no Brasil em culturas hortícolas (aipo, alho, alho-poró, ervilha, dentre outros), culturas anuais (algodão, amendoim, mandioca, milho, soja e trigo) e plantações de abacaxi, cacau, café, cana-de-açúcar, eucalipto, pera e em outros países é utilizado em culturas de beterraba e feijão. Pode ser analisado diretamente por CLAE ou por CG após etapa de derivatização por acelilação ou metilação [14].

I.6.7- Diuron



- ✓ Grupo químico: Uréia Substituída
- ✓ Nome químico: 3-(3,4 diclorofenil)- 1,1-dimetiluréia
- ✓ Fórmula Molecular: $C_9H_{10}Cl_2N_2O$
- ✓ Massa Molar: 233,1 g/mol
- ✓ Classe toxicológica: classe II, muito tóxico.
- ✓ Irritabilidade: pele – não irritante e olhos - levemente irritante
- ✓ Sintomas de envenenamento: não conhecidos.
- ✓ Dose Letal: 3400 mg/kg (oral / ratos).
- ✓ Solubilidade em água : 42 mg/L a 25 ^oC.
- ✓ Nomes Comerciais: Cention 800, Diuron 500 SC, Diuron Nortox, Diuromex, Herburon, Karmex 800b e Staron SC.

No Brasil e em diversos países este herbicida é utilizado em culturas anuais (alfafa, algodão e soja), plantações perenes (abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, citrinos, pimenta-do-reino, seringueira e videira), áreas não cultivadas e canais de irrigação e drenagem.

Este herbicida é considerado o terceiro mais perigoso pesticida para fontes de águas subterrâneas. O diuron degrada por N-demetilação, sob condições aeróbicas, resultando em metabólitos que incluem o N'-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia, 3,4-diclorofeniluréia e 3,4-dicloroanilina. Sob condições anaeróbicas do solo ocorre a formação dos produtos declorinados.

As uréias substituídas são quimicamente persistentes e podem permanecer no solo por vários meses após a aplicação, além disso as feniluréias são solúveis em água, tendo grande capacidade de migração para o solo e de entrar na cadeia alimentar, onde são degradadas e metabolizadas por mamíferos.

Considera-se que a sua detecção direta por CG seja dificultada devido a sua instabilidade térmica, resultando em isocianatos e aminas alifáticas, dessa forma o diuron precisa ser derivatizado

por acetilação ou por metilação, para que se possa determiná-lo por CG enquanto análises por CLAE podem ser realizadas diretamente [14].

I.7- Confiabilidade na Detecção e Identificação de Resíduos de Pesticidas

I.7.1- Tratamento da amostra para análise por CLAE

Muitos contaminantes orgânicos estão presentes na água em nível de traços. Devido a isso, nos últimos anos tem crescido o interesse em se desenvolver técnicas de preparo de amostra que possibilitem pré-concentrar os analitos da matriz para adequação ao sistema de detecção. A extração em fase sólida é hoje o método mais popular de preparo de amostras [15].

Existem vários procedimentos de tratamento de amostra por extração em fase sólida em cartuchos, que variam no emprego de sorventes, nos volumes de amostra, assim como nos volumes de solvente para ativação dos cartuchos e de eluição dos analitos. As etapas da extração em fase sólida resumem-se na ativação dos cartuchos, adsorção dos analitos ao sorvente, eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos e posterior concentração do composto de interesse.

Cartuchos para extração em fase sólida têm sido desenvolvidos por mais de vinte anos. Os primeiros cartuchos foram utilizados em 1978, cartuchos com formato de seringa em 1979 e como pré-coluna para acoplamento “on-line” com cromatografia líquida em 1980 [15]. Durante os últimos cinco ou seis anos tem crescido o desenvolvimento com melhoria do formato, automação e com a introdução de novos sorventes com capacidadade de melhorar a extração de analitos polares [16].

A necessidade de se extrair analitos mais polares tornou a extração em fase sólida um dos métodos da EPA, para análise de compostos orgânicos em água, em uma alternativa ao método de extração líquido-líquido, pois muitos analitos polares são parcialmente solúveis em água e, como consequência disso, a extração líquido-líquido não apresenta boas recuperações para estes analitos. A extração em fase sólida além de apresentar melhor recuperação, o tempo gasto na extração é menor, requer menor consumo de reagentes e permite uma maior seletividade que a extração líquido-líquido [15].

O sorvente mais popular de EFS para extração de pesticidas em água é o grupo octadecil (C-18) ligado à sílica. Os dois principais mecanismos de retenção dos compostos são a adsorção do analito sobre o suporte e a partição devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C-18 e a C-H do analito [17].

A extração com resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio de forças de van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero poliestireno-divinilbenzeno [17].

I.7.1.1- Príncipios da extração em fase sólida

Como etapas do desenvolvimento do método de extração em fase sólida, o analista tem que primeiramente selecionar o tipo de sorvente que vai ser utilizado na análise em questão, de acordo com as características físico-químicas dos analitos de interesse, sendo que por muitos anos o n-alquilsílica (C-18) foi considerado o sorvente universal [15].

Os princípios relacionados com as técnicas de EFS e ELL são semelhantes entre si e envolvem a partição dos compostos de interesse entre duas fases. Na EFS o analito de interesse, para ser extraído, é dividido entra a fase líquida, a qual está contida na fase sólida (sorvente) e o solvente de eluição, como se fosse entre dois líquidos imiscíveis similar ao que ocorre na ELL. O analito de interesse na amostra terá menor ou maior afinidade pela fase líquida do sorvente, determinando assim o grau de retenção deste analito. Posteriormente este analito é extraído por um solvente orgânico no qual ele tenha maior afinidade que na fase líquida do sorvente.

Os mecanismos de retenção e eluição dos analitos pela fase sólida ocorrem através de forças intermoleculares entre o analito e a superfície da fase sólida, envolvendo interações tipo van der Waals, tipo eletrostáticas, dipolo - dipolo, dipolo – dipolo induzido, íon – dipolo, íon – íon e ligação de hidrogênio.

Na extração em fase sólida, o sorvente é colocado num tubo de polipropileno entre dois discos de polietileno, compactando esta fase, como mostra a Figura 3.

Figura 3: Ilustração de tubos de extração em fase sólida.

A fase líquida é eluída sob pressão ou vácuo e o processo consiste de cinco etapas:

1. Ativação do sorvente através da passagem de um solvente que condicione a superfície do sólido, removendo quaisquer substâncias que estejam presas.
2. Remoção do solvente responsável pela ativação.
3. Aplicação da amostra:

   3.a) O analito de interesse e os interferentes ficam retidos na fase sólida.

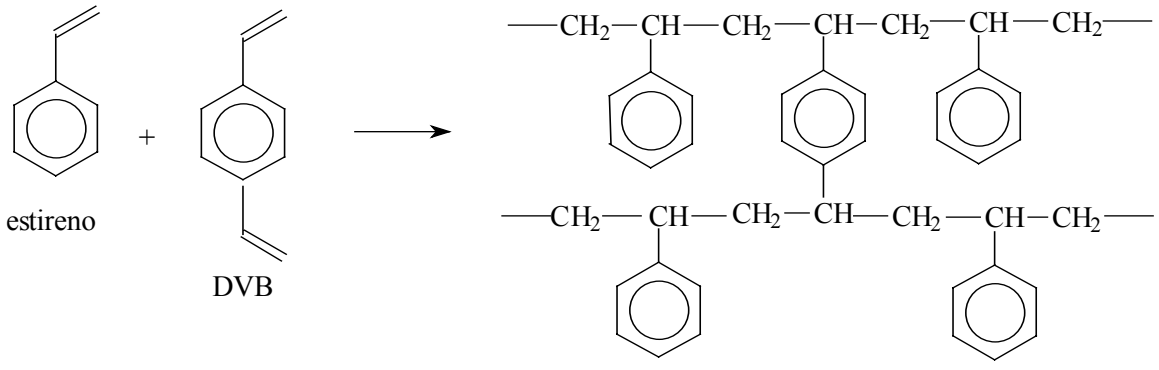
   3.b) O analito de interesse fica retido e parte dos interferentes passam pela fase sólida.

   3.c) O analito de interesse passa pelo sólido e os interferentes ficam retidos na fase sólida; neste caso a fração de interesse é imediatamente coletada.

4. A fase sólida é lavada com um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte delas, sem eliminar os analitos de interesse (no caso 3a), no caso 3b a fase sólida não precisa ser lavada com um solvente apropriado para a remoção dos interferentes.
5. Eluição do analito de interesse do sorvente com um solvente apropriado.

I.7.1.2- Copolímeros de poliestireno divinilbenzeno

Poliestireno entecruzado com DVB é um sorvente versátil, que resulta da copolimerização do estireno com divinilbenzeno (DVB), como mostra a reação abaixo:



estireno divinilbenzeno

A quantidade de divinilbenzeno adicionada na reação vai determinar o grau de entrecruzamento e a estrutura do poro do polímero formado. Quando o polímero formado apresenta menos de 6% de divinilbenzeno ele é instável à pressão. Poliestirenos com cerca de 8% de divinilbenzeno já são estáveis à pressão de aproximadamente 6000 psi. Os poliestirenos rígidos são

materias de alto desempenho, sendo que a grande força da ligação cruzada faz com que sejam resistentes à pressão de 35000 psi.

Os sorventes de poliestireno-divinilbenzeno são sólidos rígidos microporosos ou apresentam uma mistura de microporos e mesoporos, sendo que a presença de mesoporos com diâmetro em torno de 10 nm e volume de 1,9 mL/g, facilitam o acesso de moléculas grandes a estes sítios ativos.

Em contraste com a sílica, o poliestireno-divinilbenzeno é estável em uma faixa de pH de 1-13, é bastante usado como material de fase reversa e para a extração de compostos polares de diversas matrizes, alcançando maiores recuperações do que a sílica [18].

I.7.1.3- Volume de "Breakthrough"

O volume de "breakthrough" pode ser definido como sendo o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas do analito de interesse e portanto diminuição da sua recuperação, ou seja, é o volume que permite que uma recuperação teórica igual a 100% seja obtida.

O volume de "breakthrough" depende das interações entre o analito, o solvente da amostra e o tipo de sorvente e, para fase reversa, ele depende da hidrofobicidade do analito e da massa de sorvente usada. Este é um parâmetro importante em EFS, pois indica qual o volume máximo de amostra que pode pré-concentrado, sendo que dois fatores podem ser responsáveis pelo volume de breakthrough: retenção insuficiente do analito pelo sorvente e sobrecarga do sorvente.

I.7.2- Análise por CLAE

A maioria dos métodos de extração em fase sólida desenvolvido para análise de compostos polares utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) como técnicas instrumentais para determinação dos analitos de interesse numa amostra, entretando métodos como cromatografia em calmada delgada (CCD) e cromatografia por fluido supercrítico já estão bem desenvolvidos [19].

A detecção feita na região do ultra- violeta (UV) em um único comprimento de onda ou em vários comprimento de onda utilizando um detector por arranjo de diodos (DAD), é comumente empregada em CLAE. A detecção eletroquímica [20] e por espectrometria de massas [21] também é relatada na literatura.

As detecções por captura de elétrons e espectrometria de massas são bastante utilizadas em cromatografia gasosa para análise de herbicidas ácidos.

Os limites de detecção alcançados em CLAE são a níveis de μg/L e são usualmente comparáveis aos obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) [19].

Para análise de amostras ambientais, que contenham herbicidas ácidos, a CLAE apresenta uma certa desvantagem por ser bastante sensível a interferentes como ácidos húmicos e fúlvicos, que são co-extraídos com os analitos em questão, na etapa de extração em fase sólida, podendo assim interferir na detecção dos analitos [20,22,23]. A eluição dos ácidos húmicos e fúlvicos é observada pela larga assimetria do pico no início do cromatograma, o que torna a quantificação dos analitos de interesse que eluem nesta região bastante difícil. Por isso, a análise de compostos muito polares em amostras ambientais precisa passar por um procedimento de limpeza "clean – up" antes da análise por CLAE, para que seja minimizada esta interferência [19].

Alternativamente, as análises de amostras ambientais que contenham herbicidas ácidos feitas por CG evitam a interferência de ácidos húmicos e fúlvicos, mas por outro lado compostos de alta polaridade não podem ser injetados diretamente no cromatógrafo a gás e antes precisam passar por um processo de derivatização, transformando-os em compostos menos polares e de maior volatilidade, permitindo assim que seja feita a injeção no cromatógrafo a gás.

Abaixo estão os métodos de análise mais relatados na literatura para cada classe de pesticida estudado:

1.7.2.1. Herbicidas Triazínicos

Pertencem a esta classe os seguintes herbicidas estudados: cianazina, simazina e atrazina.

Boas recuperações são alcançadas realizando extrações de compostos triazínicos presentes em amostras aquosas usando diclorometano, sendo em seguida feita a limpeza da amostra utilizando Florisil. Também é relatado na literatura extrações em fase sólida de resíduos triazínicos utilizando cartuchos C18 ou discos de C8 e C18 [24].

Land descreveu a extração de compostos triazínicos utilizando troca catiônica (tipo ácido sulfônico), para posterior análise por cromatografia líquida com detecção na região do ultra-violeta, com limite de quantificação em torno de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ [25].

As triazinas simétricas são bem cromatografadas por CG, apresentando ótima resposta quando se utiliza detector de nitrogênio-fósforo (DNF), devido ao grande número de átomos de

nitrogênio na molécula. A baixa detectabilidade de determinação por cromatografia líquida com detector por arranjo de diodos comparada a cromatografia gasosa com detector de DNF é relatado por Durand et al. [26].

1.7.2.2- Herbicida Fenóxiácido

Pertence a esta classe de herbicida o composto 2,4-D estudado.

Devido a sua característica altamente polar e por apresentar baixa volatilidade, este composto não é analisado diretamente por CG, precisando ser derivatizado, sendo que geralmente, é transformado em éster utilizando diazometano [27] ou 2,2,2 trifluoretanol [28]. O resíduo de fenoxiácido em forma de éster é então determinado por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE), ou então é derivatizado utilizando 2-cianoetildimetil(dietil)aminossilano (CEDMSDEA), sendo facilmente determinado por CG-DNF.

Os resíduos de fenóxiácidos são extraídos de amostras aquosas com diclorometano e dietil éter após acidificação da amostra a pH 2 [29].

Extrações em fase sólida de 2,4-D, utilizando cartuchos de C18, apresentam boas recuperações somente após acidificação da amostra a pH 2 [30]. Geerdink et al. reportaram a pré-concentração “off-line” de alguns fenoxiácidos utilizando pré-colunas poliméricas (PLRP-S) [31].

Para fenoxiácidos os métodos de CLAE-UV ou CLAE-DAD são geralmente preferidos em relação a CG e são rotineiramente empregados na determinação destes compostos [32].

1.7.2.3- Herbicidas Tiodiazinonas

Pertence a esta classe de herbicida o composto bentazona estudado.

A bentazona é o composto mais representativo dos herbicidas tiodiazinônicos.Geralmente os resíduos são isolados da matriz aquosa utilizando ELL com diclorometano [26]. No caso da bentazona, a amostra tem que ser acidificada a pH 2, porém cartuchos de carbono grafitinizado são usados na extração das tiodiazinonas de amostras aquosas sem a necessidade do ajuste de pH [33].

A bentazona pode ser extraída utilizando cartuchos de C18 ou discos de poliestireno divinilbenzeno [27] ou com pré-coluna polimérica PLRP-S em pH 3 [31].

O método de análise frequentemente mais utilizado para determinação de tiodiazinonas é a CLAE-UV [33] ou CLAE-DAD [26], entretanto a bentazona também foi determinada por CLAE usando detector por fluorescência ou espectrômetro de massas com ionização termospray[27].

1.7.2.4- Herbicidas Feniluréicos

Pertencem a esta classe de herbicida os compostos estudados: linuron e diuron.

É relatado na literatura a extração líquido-líquido utilizando diclorometano ou uma mistura de n-pentano com dietil éter (1:1 , v/v) para pré-concentrar resíduos feniluréicos de amostras aquosas em pH neutro ou ligeiramente alcalino [29].

A extração em fase sólida também é relatada na literatura, na qual se faz uso de cartuchos de Carbopack B para isolar compostos parecidos em presença dos seus produtos de degradação (anilinas substituídas), não sendo necessário acidificar previamente a amostra aquosa [33].

Hatrik et al. [32] empregaram a pré-concentração "on-line" com pré-colunas de C-18 de pequeno tamanho e posterior determinação de monolinuron, metobromuron e linuron através da CLAE em água superficial. Os compostos foram detectados por UV e por amperometria em níveis de concentração de ng/L.

A determinação de cinco feniluréias em microcoluna de CLAE com detecção por UV e eletroquímica foi relatada por Boussenadji et al. [34].

de Kok et al. [35] descreveram a determinação de feniluréias por CG-DCE ou CG-DNF após hidrólise catalítica da sílica e derivatização da função amina com ácido heptafluorbutírico.

A detecção na região do UV é relatada na literatura como sendo a melhor região para análise de pesticidas por CLAE. Na maior parte das análises, o detector por arranjo de diodos (DAD) é usado a fim de monitorar simultaneamente diferentes comprimentos de onda, podendo obter o espectro de UV de cada composto e comparar com os espectros obtidos para cada padrão puro, tornando mais fácil a identificação dos picos detectados.

I.8- Revisão Bibliográfica sobre Análise de Pesticidas em Água.

Finalidade do Método	Observações	Resultados	Ref.
Determinação simultânea de simazina, tiuram e bentiocarbe em águas de rios por EFS-CLAE.	Foram utilizados cartuchos de carbono ativado e eluição com acetona.	Foram obtidas recuperações entre 89 e 94%, com precisão na faixa de 4,9-5,3%. LD em torno de 1-6,5 μg/L.	36
Método rápido e sensível para determinar atrazina e 4 pesticidas organofosforados em amostras de água.	Foi usado a SPME com espessura da fibra de PDMS/DVB de 65 μm	O tempo de análise foi de 30 min e o LD ficou entre 2-8 μg/L.	37
Método de EFS "on-line" para determinação de 9 pesticidas em água.	Foram analisados 5 sorventes comerciais.	Foram conseguidas recuperações de 60,4-98,3%, com precisões de 6,9% e LD de 0,01μg/L.	38
Avaliar a contaminação por pesticidas em águas de 2 áreas agrícolas de Portugal.	Foram coletadas amostras de 79 pontos e usados discos de extração para concentrar os pesticidas. A análise foi feita por CG-EM.	A atrazina foi o pesticida mais encontrado nas análises. O LD foi menor que 0,023 μg/L.	39
Análise de pesticidas polares em água de chuva na Dinamarca por LC-MS-MS.	As amostras foram extraídas com a coluna Oasis HLB. O método desenvolvido foi validado para 53 pesticidas.	A atrazina e terbutilalazina foram encontradas em concentrações em torno de 0,1 ng/L durante o período de uso na agricultura..	40
Monitoramento de pesticidas clorados em em águas superficiais em Hanoi, Vietnam.	Foram determinados 15 pesticidas em amostras de água por EFS-CG-DCE e confirmadas por CG-EM.	O tempo de análise foi de 40 min. O LD ficou entre 0,025 e 1,25 ng/L.	41
Determinação de herbicidas e metabólitos por EFS e CLAE em água.	CLAE/DAD foi o sistema usado para a separação, identificação e quantificação de todos os analitos.	Os melhores resultados foram obtidos com cartuchos de DVB e MeOH/acetato de etila como solventes de eluição. O LD obtido foi de 0,1 μg/L para DIHA e DEDIA e 0,02 μg/L para os outros analitos.	42

Determinação de triazinas e N-metilcarbamatos em água por CLAE-DAD.	500 mL de amostra foi concentrada com cartuchos de C18 e eluídos com metanol.	As recuperações ficaram entre 85-102% com LD em torno de 0,005-0,012 μg/L.	43
Determinação de pesticidas em água.	Uma variedade de pesticidas organoclorados, fosforados, cloronitrilas e triazinas foram identificados e quantificados usando a EFS-CLAE com cartuchos C18.	Os valores de limite de detecção, recuperação e precisão foram determinados para cada produto.	44
Determinação de traços de carbamatos em água usando EFS-CLAE-EM.	Foram utilizados cartuchos de PS-DVB, ODS e N-Vinilpirrolidina-DVB.	Intervalo linear de 1-50 μg/L e LD do método na faixa de 0,5-3 ng/L.	45
Detecção de resíduos farmacêuticos e contaminantes polares em água usando EFS-CG-EM.	Foram descritos 2 métodos analíticos para determinação de resíduos farmacêuticos e contaminantes polares em amostras de água.	Os LD e LQ do método foram 1-10ng/L e 1-40 ng/L, respectivamente. Recuperações entre 70-110%, com precisões menores que 15%.	46
Comparar a EFS e MEFS para análise de pesticidas em água.	Foram testados sorventes de C18 e de carbono grafitinizado.	As melhores recuperações foram obtidas com SPME e o LD para os dois métodos foi de 0,1 μg/L.	47
Otimização da EFS-CLAE para determinar pesticidas organofosforados em amostras ambientais.	Foram usados discos C18 (47 mm de diâmetro) e testados efeitos como: composição de FM, força iônica, pH, temperatura e volume de "breakthrough".	Foram conseguidos LD de 5 μg/L para o metilparation e de 2,5 μg/L para o paration.	48
Comparação interlaboratorial da eficiência de extração de pesticidas em água usando discos de EFS.	Todas as amostras foram extraídas com discos Empore C18. Participaram do projeto 7 laboratórios.	3 laboratórios mostraram discrepância na recuperação do metalaclor e em 2 laboratórios a recuperação do Bromacil foi menor que 65%, nos demais laboratórios essa recuperação foi > 75%.	49

2 anos de monitoramento de pesticidas em águas da Bélgica.	Foram analisados os principais pesticidas usados nas principais áreas de cultivo da região.	Os resultados mostraram LD de 0,14 μg/L para a bentazona e de 1,54 μg/L para o diuron .	50
Procedimento simples e rápido para determinar pesticidas organofosforados em água, usando EFS-CG.	Foram utilizados na extração sorventes C18.	As recuperações foram de 93,8 a 104,5% com precisão de 2,9 a 4,3%. O LD usando detecção por DNF foi de 50-130 ng/L e usando DFI foi de 4,5-11,7 μg/L.	51
Método multirresíduo para analisar traços de pesticidas neutros em amostras de água, usando EFS–CLAE.	Foram utilizados cartuchos C18.	As recuperações foram de 65,0-97,8% com precisão de 12,6% e LD em torno de 0,5-3,0 ng/L.	52

I.9- Validação do Método Cromatográfico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado [53].

No Brasil existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) [53].

Em 1987, o FDA, através do "Guideline for Submiting Samples and Analytical Data para validação de método", reconheceu as especificações descritas a seguir, como as principais fases da validação de métodos. Esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou figuras analíticas de mérito [54].

1.9.1. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida, geralmente padrões certificados.

Para avaliar a exatidão, as diretrizes da ICH (International Conference on Harmonization) em metodologia recomendam a coleta de dados referentes a um mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes concentrações cobrindo a variação especificada (por exemplo, três concentrações, análise em triplicata de cada). Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com os respectivos intervalos de confiança.

1.9.2. Precisão

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Normalmente é expressa através do coeficiente de variação (CV) em um número estatisticamente significativo de amostras.

De acordo com a ICH, a precisão deve ser medida em três diferentes níveis:

- ✓ Repetitividade
- ✓ Precisão intermediária
- ✓ Reprodutibilidade

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos através de várias reproduções de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão entre ensaios). Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% do teste ou a concentração teórica. A composição teórica é definida como a concentração do composto de interesse descrita no método.

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias de análise, analistas, equipamentos, etc.

A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios.

1.9.3. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente três vezes, e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.9.4. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ assim como o LD também pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente dez vezes, e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.9.5. Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão. A faixa linear corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda os requisitos de precisão, exatidão e linearidade através do método. A faixa de variação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método em questão.

1.9.6. Robustez

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição da fase móvel, pH, força iônica, temperatura, etc., e a respectiva determinação do seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia.

CAPÍTULO II

II- OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um método simples, rápido e eficiente para determinação simultânea de multirresíduos de pesticidas em água: bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron, linuron, empregando a extração em fase sólida "off-line" e posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos.

Para poder atingir o objetivo deste trabalho, este foi dividido em duas partes:

- ✓ Avaliar o uso de diferentes sorventes, seringas recheadas com C-18 quimicamente ligado a sílica, tubos de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno e coluna de divinilbenzeno, para extrair e pré-concentrar pesticidas em amostras de água.

- ✓ Desenvolver e validar metodologias de determinação destes multirresíduos de pesticidas em água, através das seguintes figuras de mérito: precisão (repetitividade e precisão intermediária), recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limite de detecção e quantificação), utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos.

CAPÍTULO III

III- PARTE EXPERIMENTAL

III.1- Materiais e Métodos

III.1.1- Reagentes e Solventes

- ✓ Metanol – grau cromatográfico, Tedia (Merck).
- ✓ Ácido Fosfórico – PA, Synth.
- ✓ Água Milli-Q, sistema Millipore.
- ✓ Cloreto de sódio – PA, Nuclear

III.1.2- Pesticidas Selecionados

Os pesticidas selecionados neste trabalho estão listados na Tabela 5, juntamente com os respectivos fornecedores, grau de pureza e classe química.

Tabela 5: Pesticidas selecionados e seus respectivos fornecedores, grau de pureza e a classe química.

Pesticida	Fornecedor	Grau de pureza (%)	Classe química
bentazona	Basf	99,9	tiodiazinona
cianazina	Cyanamid	98,0	triazina
simazina	Novartis	98,3	triazina
2,4-D	Dow	+99,0	fenoxiacético
atrazina	Novartis	97,7	triazina
diuron	Du Pont	99,3	uréia substituída
linuron	Hoechst	99,5	uréia substituída

Obs: Todos os padrões foram estocados em geladeira a 4 ^{o}C.

III.1.3- Gás utilizado para pré-concentrar amostras

- ✓ Nitrogênio, 99,999% de pureza, super seco, Aga.

III.1.4- Coluna Cromatográfica

- ✓ Coluna Cromatográfica Analítica Nova Pak – Waters, 150 mm x 3,9 mm d.i., recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica, tamanho de partícula de 4 μm e 6 nm de diâmetro de poro.
- ✓ Coluna de Guarda Nova Pak – Waters, 20 mm x 3,9 mm d.i., recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica, tamanho de partícula de 4 μm e 6 nm de diâmetro de poro.

III.1.5- Dispositivos de Extração em Fase Sólida

- ✓ Tubos de 3 mL, tipo seringa, Supelclean^{TM} Envi C-18, 500 mg, Supelco.
- ✓ Tubos de 3mL, tipo seringa, Lichrolut EN, poliestireno divinilbenzeno, 200 mg, Merck.
- ✓ Pré-coluna de 1 mL, Resource RPC, 30 mm x 6,4 d.i., leito monodisperso, não derivatizado de poliestireno-divinilbenzeno, Amersham Pharmacia Biotech AB.

III.1.6- Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo a Líquido marca Waters, composto por:
    - Bomba de alta pressão, recíproca, tipo pistão duplo, modelo 515.
    - Injetor Rheodyne, 7725i, com alça amostradora de 10 μL.
    - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, caminho ótico de 10 mm, modelo 996.
    - Computador Digital Pentium II de 300 MHz, contendo software Millenium instalado para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos.

- ✓ Bomba de vácuo – Primar, modelo 141.
- ✓ Banho ultrassônico – Thornton, modelo T14.
- ✓ pHmetro, DM 21 – Digimed, utilizado com os seguintes eletrodos:
    - Eletrodo de vidro combinado, Digimed.
    - Eletrodo Termocompensador, Digimed.
- ✓ Conjunto para múltiplas extrações em fase sólida da Supelco.

III.2- Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Pesticidas

III.2.1- Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada nas proporções indicadas com o máximo de cautela, pois quaisquer alterações na composição da fase móvel ou no pH poderiam gerar resultados diferentes, uma vez que em trabalhos anteriores do nosso grupo [14] verificou-se que esse método é bastante sensível à pequenas variações de pH da fase móvel.

Foram ajustadas a composição da fase móvel na proporção indicada e o valor de pH, em seguida a fase móvel foi filtrada em membrana de filtração Millipore (GVWP 04700) de porosidade 0,22 mme diâmetro de 47 mm) para solventes orgânicos e água e permaneceu por 24 minutos no ultrassom para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. A solução foi armazenada em garrafas próprias para solventes e foi rotulada com informações a respeito da sua composição e o valor de pH. As soluções foram feitas diariamente antes de iniciar os trabalhos.

Para realizar a separação dos pesticidas estudados foi utilizada uma fase móvel, idêntica a empregada por Pinto [14], MeOH:H_2O 50:50 v/v , pH 3,75, ajustado com ácido fosfórico.

III.2.2- Preparo dos padrões

Os padrões foram preparados individualmente em metanol na concentração de 0,1 g/L (solução estoque). As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4 ^oC, para evitar degradação da amostra.

Solução padrão dos pesticidas, solução estoque C= 0,1g/L.

Pesa-se 10 mg de cada pesticida e transfere-se quantitativamente com metanol para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume final. Após total dissolução, transfere-se para um frasco âmbar com tampa de rosca para ser estocado.

Solução de trabalho para os pesticidas analisados, C= 10 – 1000 μg/L.

As soluções de trabalho foram preparadas, individualmente, a partir de diluições da solução estoque, em concentrações de 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 μg/L.

III.2.3- Avaliação da Separação Cromatográfica

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos pesticidas foram: tempo de retenção (t_R),fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de separação (α).

III.2.4- Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos pesticidas

Para se obterem os espectros de absorção na região do ultravioleta, injetou-se uma mistura dos pesticidas em um cromatógrafo a líquido Waters acoplado a um detector por arranjo de diodos. Com este detector também foi avaliada a pureza do pico pela comparação dos espectros de UV em três regiões do pico, no início, no meio e no fim. Se os espectros obtidos fossem coincidentes este era considerado puro. A fase móvel utilizada foi MeOH:H_2O 50:50 v/v, pH 3,75 (ajustado com H_3PO_4), vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção de 10 μL.

III.2.5- Estudo da Extração em Fase Sólida dos Pesticidas

III.2.5.1- Avaliação do pH da Amostra e da Vazão de Extração.

O procedimento de extração utilizando tubo C-18 já tinha sido desenvolvido em estudo anterior do nosso grupo [14] e este foi adotado neste trabalho, mas na literatura não existe relato de um procedimento de extração dos pesticidas estudados neste trabalho quando se utiliza tubo ou coluna de PS-DVB. Por isso foi feita uma avaliação dos parâmetros de vazão de extração e do pH da amostra fortificada com os pesticidas, para que se pudesse ter uma melhor recuperação destes pesticidas.

Foram avaliadas vazões de 1 mL/min à 5 mL/min e pH numa faixa de 1 à 6.

III.2.5.2- Procedimento de Extração para todos os dispositivos de extração utilizados

1. Condiciona-se o cartucho de extração, passando-se 10 mL de metanol;
2. Equilibra-se o cartucho pela passagem de 10 mL de água Milli-Q;
3. Ajusta-se o pH da amostra em 2; força-se a amostra a percolar através do cartucho, com auxílio de uma bomba de vácuo, na vazão em estudo;
4. Lava-se o cartucho com 5 mL de água Milli-Q;
5. Descarta-se o eluato e seca-se o leito sorvente pela passagem de ar;

6. Elui-se o analito com 1 mL de metanol;
7. Evapora-se o eluato até a secura, em capela;
8. Ressuspende-se o resíduo com volume total de 0,5 mL de fase móvel.

III.2.5.3- Regeneração dos Tubos

Os tubos foram regenerados pela passagem de volumes de solventes iguais aos usados nas etapas de condicionamento e equilíbrio. Nos tubos de C18 foram feitas duas regenerações, enquanto que nos tubos de PS-DVB foram feitas 4 regenerações.

III.2.5.4- Determinação do Volume de Capacidade do Sorvente

Para a determinação do volume de capacidade do sorvente, soluções aquosas de pesticidas com diferentes volumes e concentrações, mas as mesmas massas (0,2 μg para tubos C-18 e 0,4 μg para tubo PS-DVB e coluna PS-DVB) mostrados na Tabela 6, foram submetidas ao procedimento de extração. Com os resultados de recuperação obtidos foi possível avaliar o volume ideal de amostra que forneceria melhores recuperações dos pesticidas.

Tabela 6. Volumes e respectivas concentrações das soluções de pesticidas empregados na determinação do melhor volume de extração.

Tubo C-18		Tubo PS-DVB		Coluna PS-DVB	
V (mL)	C (μg/L)	V (mL)	C (μg/L)	V (mL)	C (μg/L)
50	4,0	100	4,0	100	4,0
150	1,3	200	2,0	200	2,0
200	1,0	300	1,3	300	1,3
300	0,7	500	0,8	500	0,8
		750	0,5	750	0,5
		1000	0,4	1000	0,4

III.2.5.5- Influência da força iônica através da adição de cloreto de sódio

Escolhido o melhor volume de extração para cada dispositivo de extração, a este foi adicionado 10, 20 ou 30 % de cloreto de sódio e submetido ao procedimento de extração, a fim de se avaliar a influência da variação da força iônica na recuperação dos pesticidas.

III.3- Validação do Método de Determinação de Pesticidas em Água

III.3.1- Curva Analítica

Obtiveram-se as curvas analíticas dos pesticidas na faixa de 10 – 1000 μg/L, injetando-se 10 μL de cada concentração, em triplicata, e plotando o gráfico de área x concentração dos herbicidas. As curvas analíticas foram traçadas com o auxílio do programa Origin 3.5, o qual forneceu os coeficientes de correlação das retas obtidas, os coeficientes angulares e lineares e as respectivas estimativas de desvio padrão.

III.3.2- Dectabilidade

No presente trabalho para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do instrumento foram construídas as curvas analíticas com soluções nas concentrações de 60, 75, 100, 200 e 500 μg/L e obtiveram-se os valores de equação da reta para cada pesticida. Estes valores foram utilizados nas equações 1 e 2 e calcularam-se os limites de detecção e quantificação do instrumento. Para o cálculo do limite de detecção do método (LD*) e do limite de quantificação do método (LQ*) dividiu-se o LD e LQ do instrumento pelo fator de pré-concentração alcançado para cada dispositivo de extração utilizado.

$LD = 3{,}3 \times SD/a$ (1) ; onde: SD = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear

$LQ = 10 \times SD/a$ (2) a = coeficiente angular

III.3.3- Recuperação

As amostras de água Milli-Q fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração e os valores de recuperação foram obtidos pelo método de padronização externa, sendo cada experimento realizado em triplicata.

A recuperação (R) foi calculada através da equação 3:

$$R = \text{massa obtida} \times 100 / \text{massa esperada} \quad (3)$$

III.3.4- Precisão

Neste trabalho só foram obtidas as medidas de repetitividade e de precisão intermediária. Essas determinações foram feitas a partir de um mínimo de nove determinações (ex: três níveis de fortificação, três repetições cada um).

As fortificações foram feitas em concentrações no limite de quantificação, duas vezes e dez vezes esse limite para cada método.

III.3.5- Linearidade e Faixa linear

A faixa linear foi obtida traçando-se a curva analítica (concentração x área do pico) e quando a reta começou a sofrer um desvio de linearidade, este valor de concentração foi tomado como sendo o valor máximo a ser determinado, o valor mínimo da faixa corresponde ao limite de quantificação de cada método.

III.3.6- Amostra Real

Foram analisadas amostras reais de água, água de torneira do LABCROM, sem fortificação e fortificada com 0,4 µg da mistura de pesticidas estudados, utilizando EFS com tubos C-18 e PS-DVB e colunas de PS-DVB.

CAPÍTULO IV

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1- Avaliação da Separação Cromatográfica

A Tabela 7 apresenta os valores de tempo de retenção (t_R), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de separação (α), para todos os picos do cromatograma obtido com uma amostra de padrão dos pesticidas, eluidos com FM MeOH:H_2O 50:50, v/v, pH 3,75 (ácido fosfórico), Figura 4.

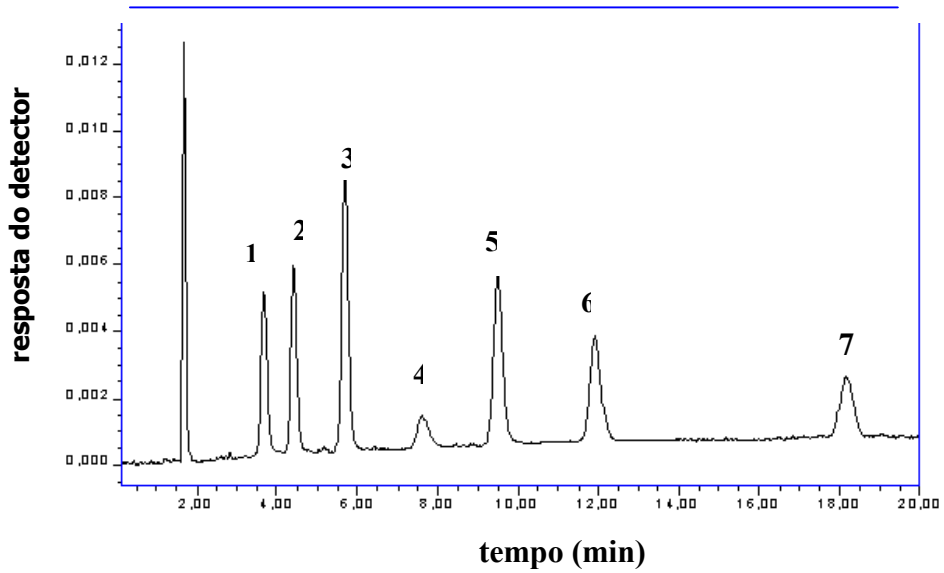


Figura 4. Cromatograma obtido na separação de vários pesticidas. Condições cromatográficas: coluna Nova Pak C-18, 4 µm (150 x 3,9 mm d.i); FM MeOH:H_2O 50:50 v/v, pH 3,75 (ácido fosfórico); F = 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; detecção: DAD 200-400 nm; identificação dos picos: 1) bentazona, 2) cianazina, 3) simazina, 4) 2,4-D, 5) atrazina, 6) diuron e 7) linuron.

Tabela 7. Valores de t_R, k, Rs e α para a separação da mistura de pesticidas utilizando FM MeOH:H_2O 50:50, v/v pH 3,75 (ácido fosfórico) a 25 ^oC.

Pesticidas	t_R	k	R_s	α
Bentazona	3,7	1,8		
Cianazina	4,3	2,3	3,7	1,2
Simazina	5,5	3,2	7,2	1,4
2,4-D	7,5	4,7	12,2	1,5
Atrazina	9,4	6,2	5,8	1,3
Diuron	12,0	8,2	15,6	1,3
Linuron	18,5	13,2	25,9	1,6

t_M = 1,3 , obtido para o metanol.

As resoluções (Rs) foram muito boas, já que todos os valores obtidos foram maiores que 2,0. Os valores de k também foram adequados, pois em uma separação de vários analitos são aceitos para desenvolvimento de método valores de k na faixa de 1 a 15 [55].

IV.2- Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos Pesticidas

Na Figura 5 e na Tabela 8 são apresentados os espectros de absorção na região do UV e o comprimento de onda de absorção máximo, respectivamente, obtidos na faixa de 200 a 400 nm para todos os herbicidas estudados, utilizando para tal fim um detector por arranjo de diodos.

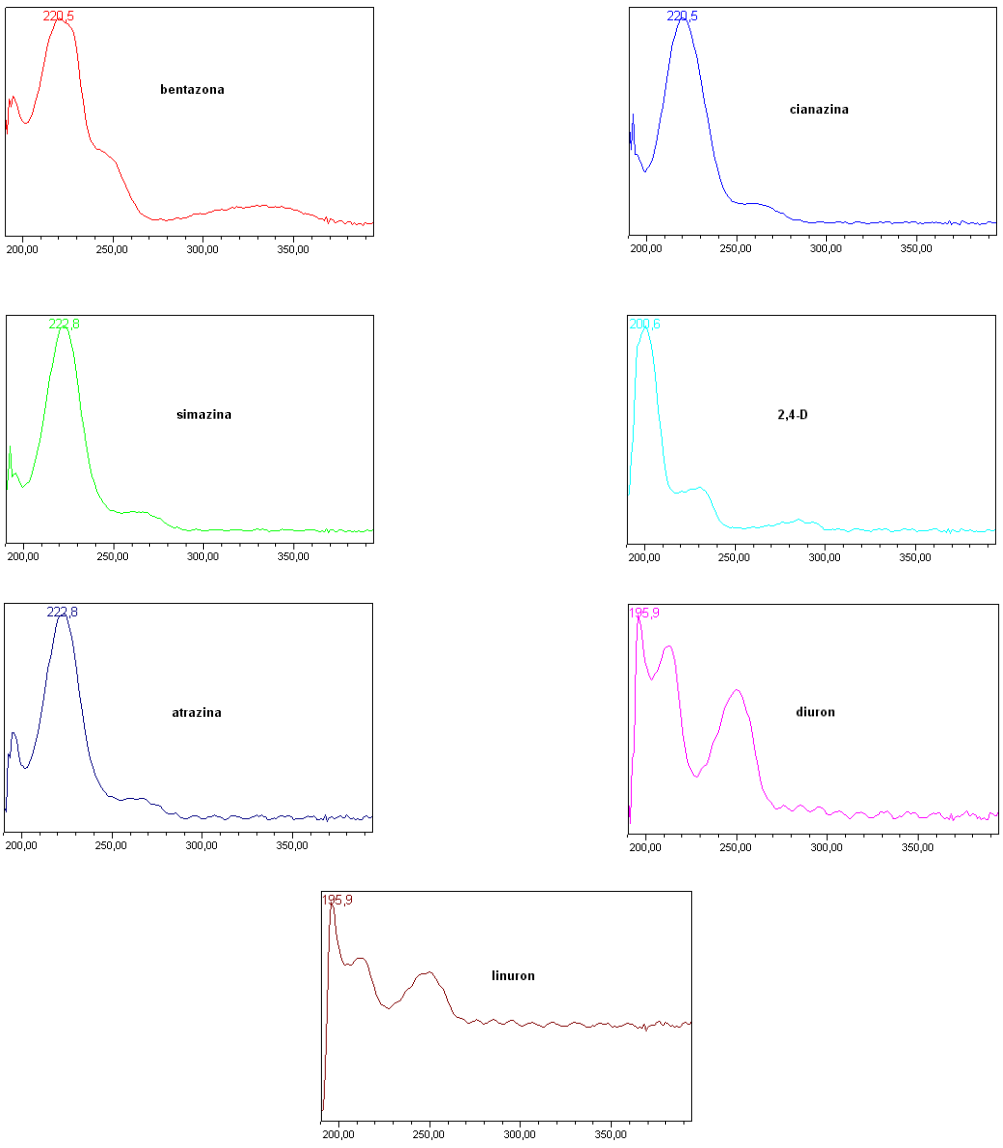


Figura 5. Espectro de absorção na região do UV de todos os pesticidas estudados.

Tabela 8. Valores de comprimento de onda de absorção máxima para os pesticidas estudados.

Pesticidas	λ máx (nm)
bentazona	220,5
cianazina	220,5
simazina	222,8
2,4-D	200,6
atrazina	222,8
diuron	195,3
linuron	195,9

IV.3- Estudo da Extração em Fase Sólida dos Pesticidas

IV.3.1- Avaliação do pH da Amostra e da Vazão de Extração

As Tabelas 9 e 10 apresentam os valores de recuperação (R) obtidos para o método de extração utilizando tubos de PS-DVB variando-se a vazão de extração e o pH da amostra, respectivamente. Foram utilizados neste estudo o volume de amostra de 750 mL, fortificada com 0,4 μg da mistura de pesticidas. As Figuras 6 e 7 mostram, os valores de recuperação num gráfico, para melhor visualização.

Tabela 9. Valores de recuperação variando-se a vazão de extração, usando tubos de PS-DVB, pH 2.

Pesticida	Recuperação nas Vazões (mL/min)				
	1	2	3	4	5
bentazona	94	93	93	89	87
cianazina	93	93	93	91	89
simazina	90	89	89	86	84
2,4-D	91	91	91	88	86
atrazina	87	85	86	83	82
diuron	90	89	89	86	84
linuron	77	76	75	72	70

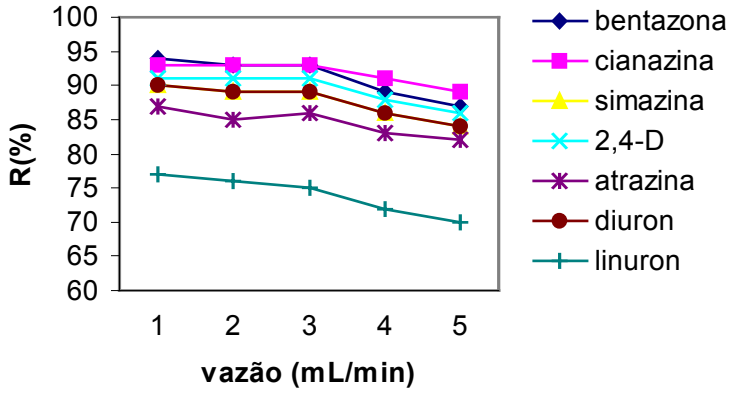


Figura 6. Valores de recuperação variando-se a vazão de extração, usando tubos de PS-DVB.

Analisando a Tabela 9 e o gráfico da Figura 6, verifica-se que os valores de recuperação são bons para todos os pesticidas, porém acima de 3 mL/min ocorre uma pequena diminuição da recuperação de todos os pesticidas. Isto pode ter acontecido devido a formação de canais preferenciais por onde a amostra estaria percorrendo, sem ter o tempo necessário para que pudesse ocorrer a adsorção dos analitos no sorvente de forma mais eficiente, causando assim perdas de recuperação. Foi escolhido então a vazão de 3 mL/min no procedimento de extração utilizando tubo de PS-DVB.

Tabela 10. Valores de recuperação variando-se o pH da amostra, em vazão de 3 mL/min, usando tubos de PS-DVB.

Pesticida	Recuperação nos pH					
	1	2	3	4	5	6
bentazona	92	93	85	82	77	75
cianazina	91	93	85	82	75	73
simazina	89	89	75	70	68	68
2,4-D	90	91	83	79	72	70
atrazina	86	86	80	77	72	69
diuron	89	89	80	78	70	68
linuron	74	75	67	64	58	56

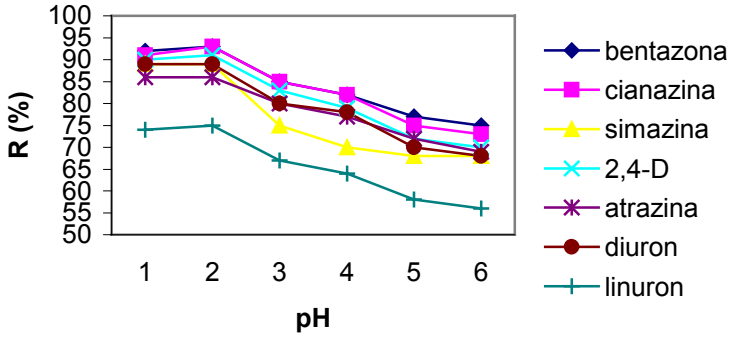


Figura 7. Valores de recuperação variando-se o pH da amostra, em vazão de 3 mL/min, usando tubos de PS-DVB.

Analisando a tabela 10 e a figura 7, verifica-se que as recuperações foram boas até o pH 2 da amostra. Aumentando-se o valor do pH ocorre uma queda nos valores de recuperação para todos os pesticidas. Quando o pH da amostra torna-se menor, os compostos ácidos passam a ter maiores interações com o sorvente e por este motivo tendem a ficarem mais retidos no sorvente. Quando o pH é aumentado, diminui esta interação do sorvente com o analito e ocorre perdas na recuperação. Devido a isso foi adotado no procedimento de extração o valor de pH da amostra igual a 2.

Estes valores de vazão de extração e de pH da amostra para tubo DVB foram coincidentes com os valores de vazão de extração e de pH da amostra para tubo C-18. Dessa forma usou-se o mesmo procedimento de extração tanto para os tubos C-18 como os tubos de PS-DVB e coluna PS-DVB.

IV.3.2- Determinação do volume de capacidade do sorvente

As Tabelas 11 à 13 apresentam os resultados de recuperação e coeficiente de variação obtidos para todos os pesticidas estudados, utilizando diferentes volumes de amostra fortificadas (Tabela 6) e empregando os diferentes dispositivos de EFS, utilizando uma vazão de 3 mL/min.

Tabela 11. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando tubo C-18.

Volume de Amostra	50 mL		150 mL		200 mL		300 mL	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	75	1	72	2	80	3	67	7
cianazina	80	1	76	5	97	2	73	1
simazina	85	1	77	1	91	4	80	3
2,4-D	45	10	54	7	83	8	57	4
atrazina	80	1	77	10	89	2	87	2
diuron	83	5	79	9	89	4	85	6
linuron	79	2	72	9	84	3	80	9

Tabela 12. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando tubo PS-DVB.

Volume de Amostra	100 mL		200 mL		300 mL		500 mL	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	94	5	102	2	109	4	98	8
cianazina	87	8	109	1	99	4	101	4
simazina	89	5	75	1	75	5	92	3
2,4-D	98	1	92	1	99	2	97	5
atrazina	90	1	90	2	91	8	92	4
diuron	94	7	90	4	78	8	71	4
linuron	94	6	68	2	68	7	52	2

Volume de Amostra	750 mL		1000mL	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	92	4	71	3
cianazina	92	1	64	2
simazina	88	5	90	2
2,4-D	91	5	80	1
atrazina	86	3	88	1
diuron	89	2	80	6
linuron	75	5	53	1

Tabela 13. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) para diferentes volumes de amostras, utilizando coluna PS-DVB.

Volume de Amostra	100 mL		200 mL		300 mL		500 mL	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	90	7	99	4	98	6	99	10
cianazina	100	10	90	3	92	6	102	6
simazina	94	7	92	2	93	7	96	5
2,4-D	97	3	90	2	89	4	90	7
atrazina	100	2	94	4	94	10	96	6
diuron	98	9	95	6	95	10	97	6
linuron	94	8	60	4	66	9	68	4

Volume de Amostra	750 mL		1000mL	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	99	6	99	5
cianazina	102	3	102	4
simazina	95	7	94	4
2,4-D	90	7	88	3
atrazina	94	5	90	3
diuron	96	4	96	8
linuron	68	7	70	2

Analisando a tabela 11, nota-se que utilizando tubos C-18 o volume que permite obter melhor recuperação encontra-se próximo de 200 mL para todos os pesticidas estudados. Para as EFS realizadas tanto com tubos ou colunas de PS-DVB, tabelas 12 e 13, respectivamente, nota-se que uma faixa mais ampla de volume de amostra apresenta boas recuperações, estendendo até 1000 mL, com exceção do linuron utilizando tubo ou coluna de PS-DVB e diuron com tubo de DVB. Este fato está relacionado com o tipo de interação do analito com o sorvente, pois o PS-DVB é altamente entrecruzado, possui uma alta porosidade, que aumenta bastante a sua área superficial em comparação aos tubos C18, aumentando assim as interações do tipo π-π [56,57].

O melhor volume de extração é sempre menor que o volume de "breakthrough", assim determinou-se que os melhores volumes de amostra a serem utilizados nos experimentos seriam de 200 mL para tubos de C-18 e de 750 mL para tubos e colunas de PS-DVB, o que permite um fator de pré-concentração em torno de 400 para tubos C-18 e de 1500 para tubos e colunas de DVB. Com estes, poderia até ser usado volume de 1000 mL, mas também foi levado em consideração o tempo de análise, para uma análise simultânea de todos os pesticidas estudados.

IV.3.3- Influência da força iônica através da adição de cloreto de sódio

As Figuras 8 a 11 apresentam os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV obtidos para os brancos e para as extrações realizadas com e sem adição de sal (NaCl), utilizando os tubos C18.

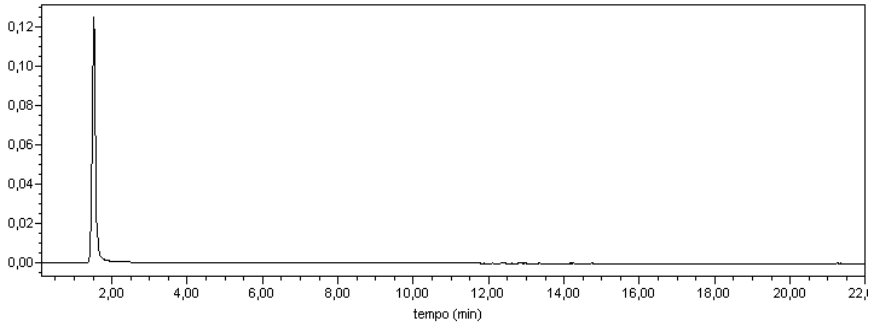


Figura 8. Cromatograma do branco sem adição de NaCl, após EFS em tubo C-18. Condições cromatográficas : Idem a Figura 4.

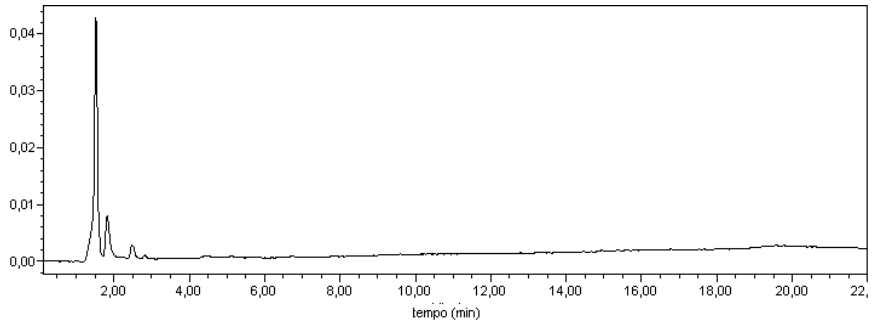


Figura 9. Cromatograma do branco com adição de NaCl, após EFS em tubo C-18. Condições cromatográficas : Idem a Figura 4.

Analisando as figuras 8 e 9, observa-se o aparecimento de alguns picos no início do cromatograma referente ao branco com adição de sal, que não tinha no cromatograma do branco sem adição de sal, usando tubos C-18, mas estes picos não interferem na quantificação dos picos dos analitos, já que eles apresentam tempo de retenção diferentes dos picos dos interferentes. Cromatogramas similares foram obtidos com os tubos e colunas de PS-DVB.

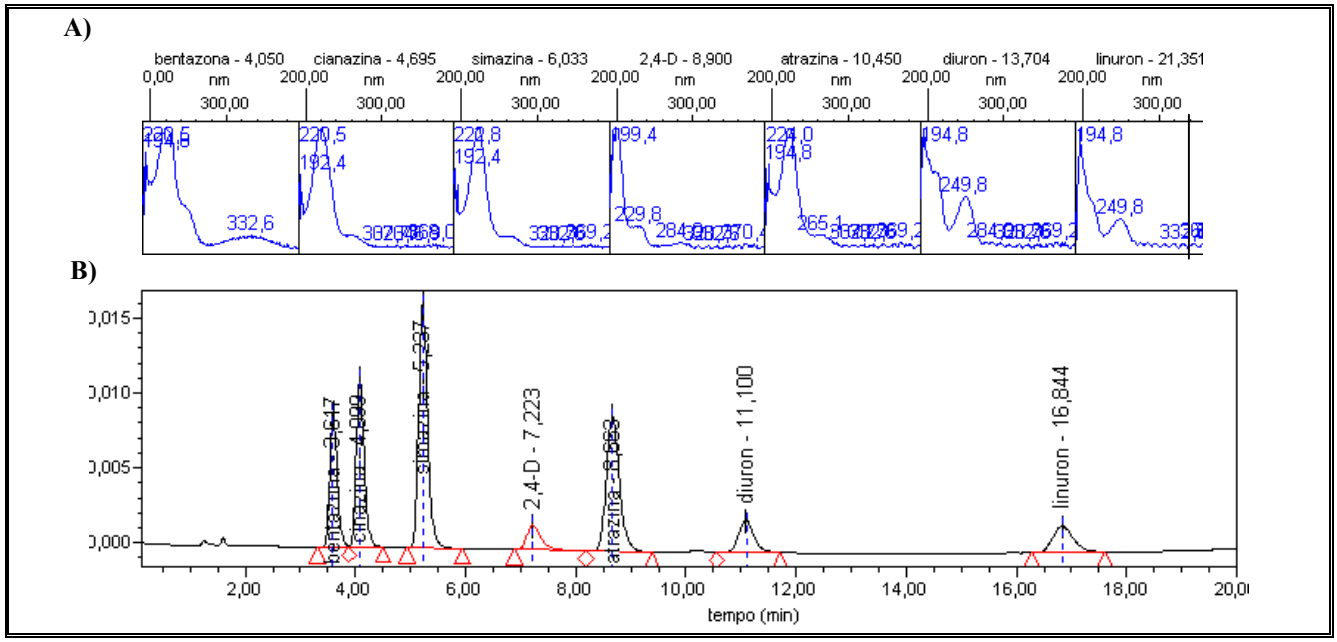


Figura 10. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma dos pesticidas sem adição de sal, após EFS usando tubo C-18. Condições cromatográficas : idem a Figura 4.

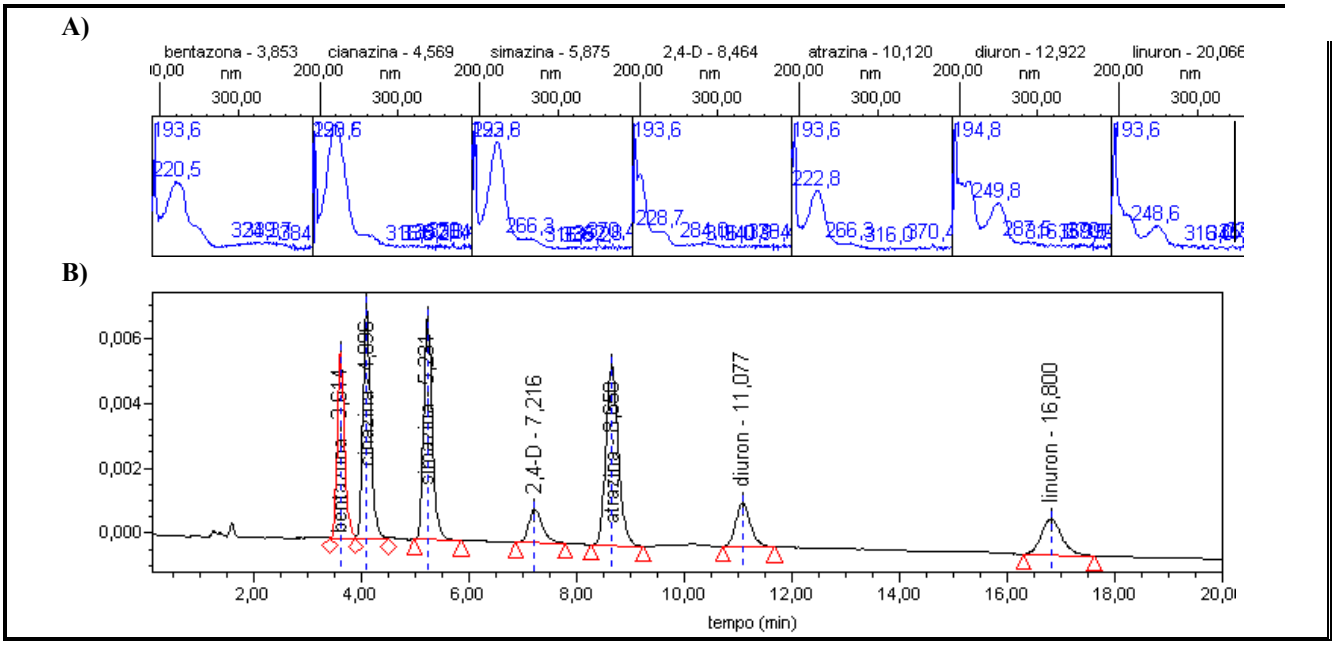


Figura 11. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma dos pesticidas com adição de sal, após EFS usando tubo C-18. Condições cromatográficas : idem a Figura 4.

Os espectros de absorção no UV dos picos cromatográficos foram usados para uma possível confirmação da identidade dos compostos, assim como o tempo de retenção de cada composto.

As tabelas 14 à 16 apresentam os valores de recuperação R (%) e o coeficiente de variação CV (%) obtidos com e sem adição de sal após EFS com os diferentes dispositivos de extração e a Figura 12 apresenta um gráfico, em barras, com os resultados, para uma melhor visualização.

Tabela 14. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (200 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando tubo C-18.

Amostra	sem sal		10% sal		20% sal		30% sal	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	80	3	55	3	57	2	64	1
cianazina	97	2	62	2	63	3	70	5
simazina	91	4	64	2	76	2	74	2
2,4-D	83	8	60	12	94	6	80	4
atrazina	89	2	62	3	80	2	75	1
diuron	89	4	56	3	77	3	83	2
linuron	84	3	45	6	54	2	58	1

Tabela 15. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (750 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando tubo PS-DVB.

Amostra	sem sal		10% sal		20% sal		30% sal	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	92	4	80	3	84	2	84	2
cianazina	92	1	80	3	84	2	85	2
simazina	88	5	79	1	83	1	84	1
2,4-D	91	5	80	6	84	5	85	5
atrazina	86	3	75	6	77	5	77	4
diuron	89	2	69	5	72	5	75	4
linuron	75	5	68	7	69	6	72	5

Tabela 16. Recuperação R (%) e coeficiente de variação CV (%) obtidos com a amostra (750 mL) isenta de sal, e após adição de 10, 20 e 30% de sal usando coluna PS-DVB.

Amostra	sem sal		10% sal		20% sal		30% sal	
Pesticida	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	99	6	83	5	85	4	88	3
cianazina	102	3	85	3	88	2	92	2
simazina	95	7	86	6	88	5	90	4
2,4-D	90	7	80	6	83	5	85	5
atrazina	94	5	84	3	86	2	89	2
diuron	96	4	76	3	79	2	82	1
linuron	68	7	62	6	64	5	65	4

O aumento da força iônica tem como objetivo diminuir as interações do analito com a água (solvente) e assim facilitar a retenção no sorvente e portanto aumentar a recuperação dos analitos. Assim, a adição de sal na amostra deve ter maior influência para pesticidas polares, mas na literatura este ainda é um assunto de muita controvérsia, sendo cada caso examinado de maneira independente, não podendo generalizar. Não se pode dizer que só pela adição de sal à amostra as recuperações serão maiores [58-60].

Os resultados das Tabelas 14 à 16 mostram que a adição de sal em todas as concentrações estudadas é prejudicial em se tratando da recuperação dos pesticidas, pois ocorre uma diminuição dos valores de recuperação para todos os pesticidas usando os dispositivos de extração empregados. Estes resultados concordam com os obtidos por Ruiz et al.[61].

Portanto concluiu-se que não se adicionaria sal nas amostras fortificadas com os pesticidas estudados usando qualquer um dos dispositivos de extração empregados neste trabalho.

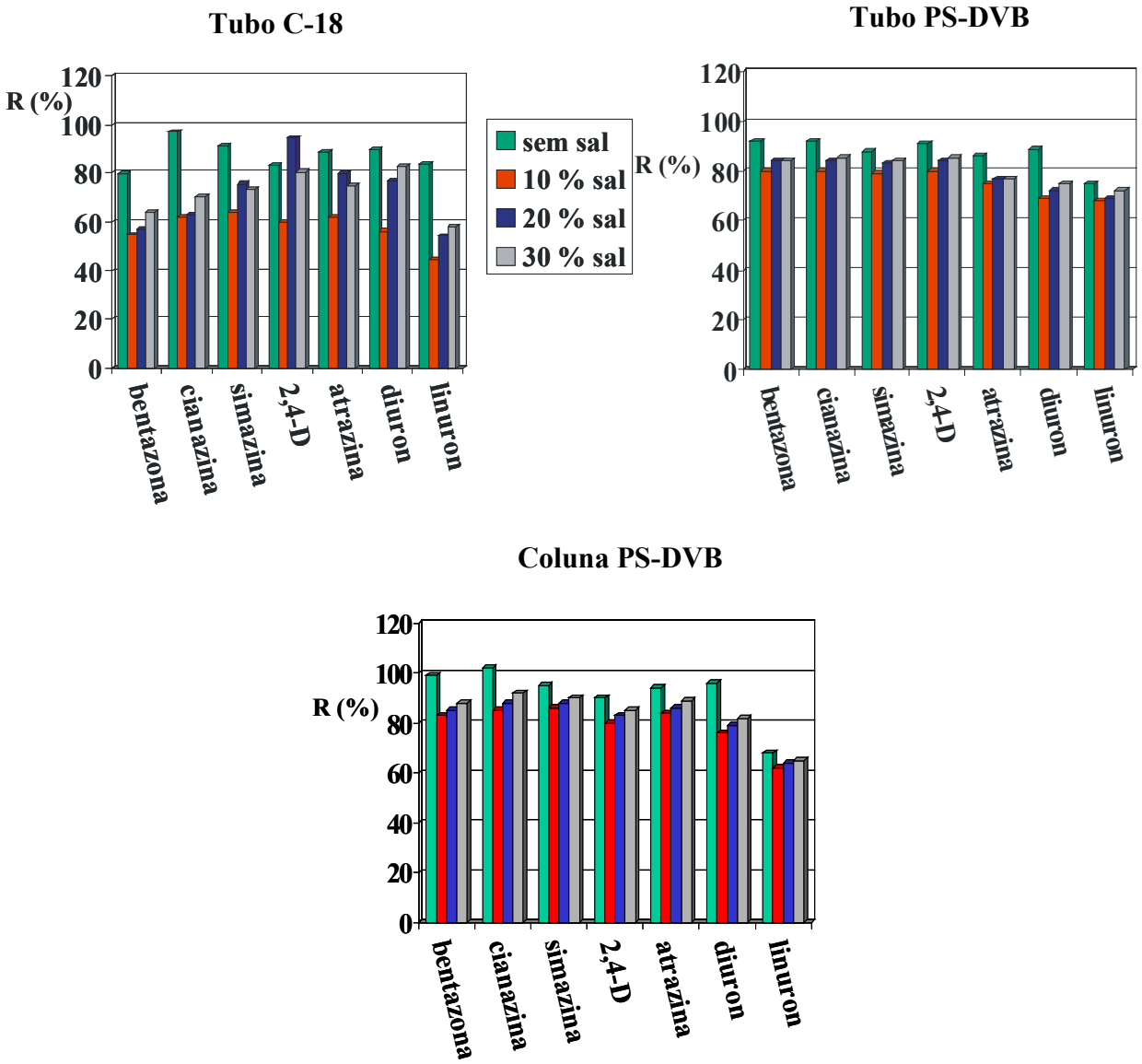


Figura 12. Gráficos em barra mostrando os valores de recuperação em amostra isenta de sal e com a adição de 10, 20 e 30 % de sal.

IV.4- Validação do Método de Determinação de Pesticidas em Água

IV.4.1- Curva Analítica, Detectabilidade e Intervalo Linear

As Tabelas 17 à 19 apresentam os resultados de validação dos métodos desenvolvidos para análise de pesticidas em água, utilizando os diferentes dispositivos de EFS estudados e a quantificação por CLAE.

Tabela 17 : Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com tubos C-18 (N=3) e determinação por CLAE.

Pesticida	Interv.linear µg/L	LD µg/L	LQ µg/L	LD* µg/L	LQ* µg/L	Coef.Linear ($x10^3$)	Coef.Angular	r
bentazona	9,6-840	2,8	9,6	0,007	0,024	1,99	129,8	0,9991
cianazina	22,0-800	6,4	22,0	0,016	0,055	0,62	158,8	0,9977
simazina	16,0-800	4,8	16,0	0,012	0,040	1,30	226,3	0,9976
2,4-D	13,2-840	3,6	13,2	0,009	0,033	-4,8	66,2	0,9987
atrazina	23,6-800	7,2	23,6	0,018	0,059	0,42	226,1	0,9978
diuron	57,6-960	17,2	57,6	0,043	0,144	1,43	116,4	0,9987
linuron	53,6-920	16,0	53,6	0,040	0,134	-0,58	105,3	0,9968

* valores obtidos para o método (fator pré-concentração de 400 vezes).

Tabela 18 : Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com tubos PS-DVB (N=3) e determinação por CLAE.

Pesticida	Interv.linear µg/L	LD µg/L	LQ µg/L	LD* µg/L	LQ* µg/L	Coef.Linear ($x10^3$)	Coef.Angular	r
bentazona	9,6-840	2,8	9,6	0,002	0,006	4,66	124,0	0,9901
cianazina	22,0-800	6,4	22,0	0,004	0,015	3,13	157,3	0,9982
simazina	16,0-800	4,8	16,0	0,003	0,011	3,07	217,3	0,9930
2,4-D	13,2-840	3,6	13,2	0,003	0,009	0,32	52,4	0,9987
atrazina	23,6-800	7,2	23,6	0,005	0,016	2,83	212,1	0,9930
diuron	57,6-960	17,2	57,6	0,011	0,038	1,90	82,2	0,9973
linuron	53,6-920	16,0	53,6	0,011	0,036	0,47	69,1	0,9960

* valores obtidos para o método (fator pré-concentração de 1500 vezes).

Tabela 19: Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de pesticidas em água, usando EFS com coluna de PS-DVB (N=3) e determinação por CLAE.

Pesticida	Interv.linear µg/L	LD µg/L	LQ µg/L	LD* µg/L	LQ* µg/L	Coef.Linear (x10^3)	Coef.Angul.	r
bentazona	9,6-840	2,8	9,6	0,002	0,006	2,72	133,0	0,9998
cianazina	22,0-800	6,4	22,0	0,004	0,015	3,63	159,6	0,9996
simazina	16,0-800	4,8	16,0	0,003	0,011	3,17	225,0	0,9995
2,4-D	13,2-840	3,6	13,2	0,003	0,009	1,32	60,5	0,9997
atrazina	23,6-800	7,2	23,6	0,005	0,016	3,75	219,8	0,9996
diuron	57,6-960	17,2	57,6	0,011	0,038	2,50	93,2	0,9991
linuron	53,6-920	16,0	53,6	0,011	0,036	0,98	86,0	0,9991

* valores obtidos para o método (fator pré-concentração de 1500 vezes).

Observando os resultados das Tabelas 17 à 19, nota-se que todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com todos os coeficientes de correlação maiores que 0,99, e os coeficientes angulares das curvas analíticas mostram a seguinte ordem crescente de sensibilidade: 2,4-D < linuron < diuron < bentazona < cianazina < atrazina < simazina. Os limites de detecção e quantificação do método também foram adequados, permitindo que amostras contendo pesticidas em concentrações próximas a 0,1 µg/L sejam possíveis de serem analisadas.

IV.4.2- Recuperação e Precisão

As Figuras 13 à 15 apresentam os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV obtidos após EFS utilizando tubo PS-DVB para o branco, para uma amostra controle e para uma amostra fortificada com pesticidas na ordem de 0,4 µg, respectivamente.

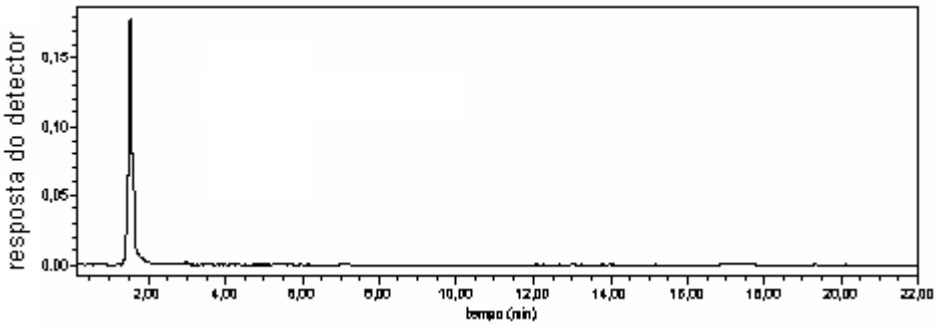


Figura 13.Cromatograma obtido para o branco, após EFS utilizando tubo de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem à Figura 4.

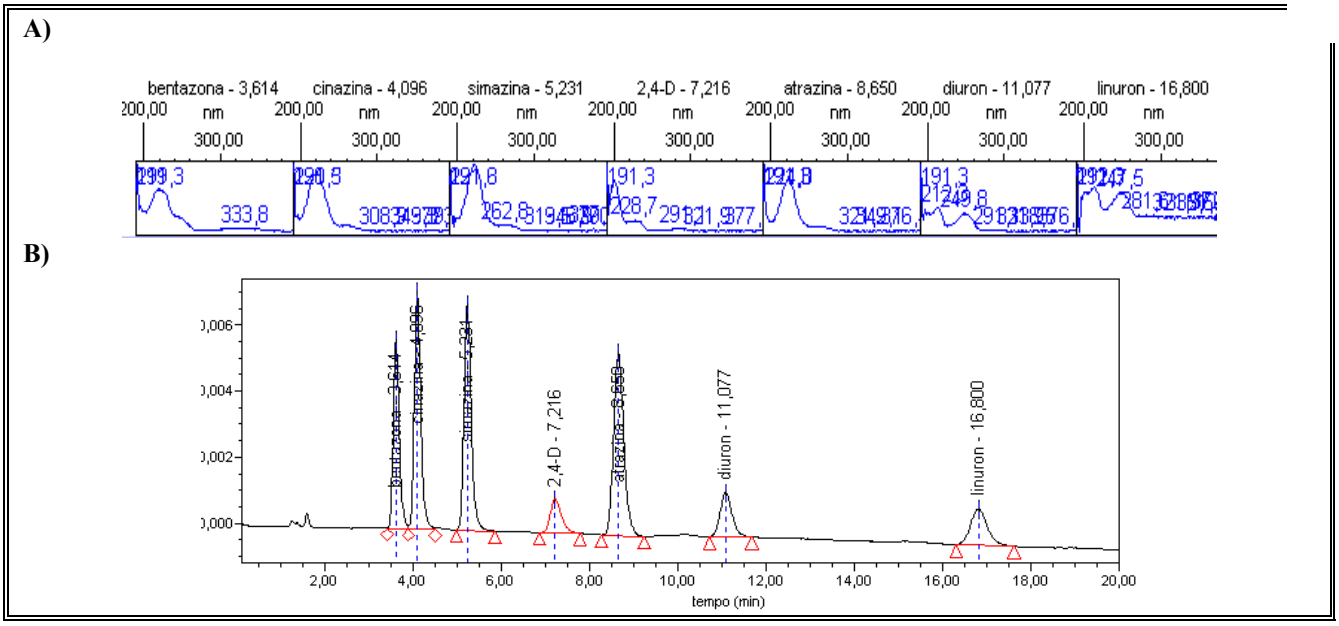


Figura 14. A) Espectro de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma obtido para uma amostra controle. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.

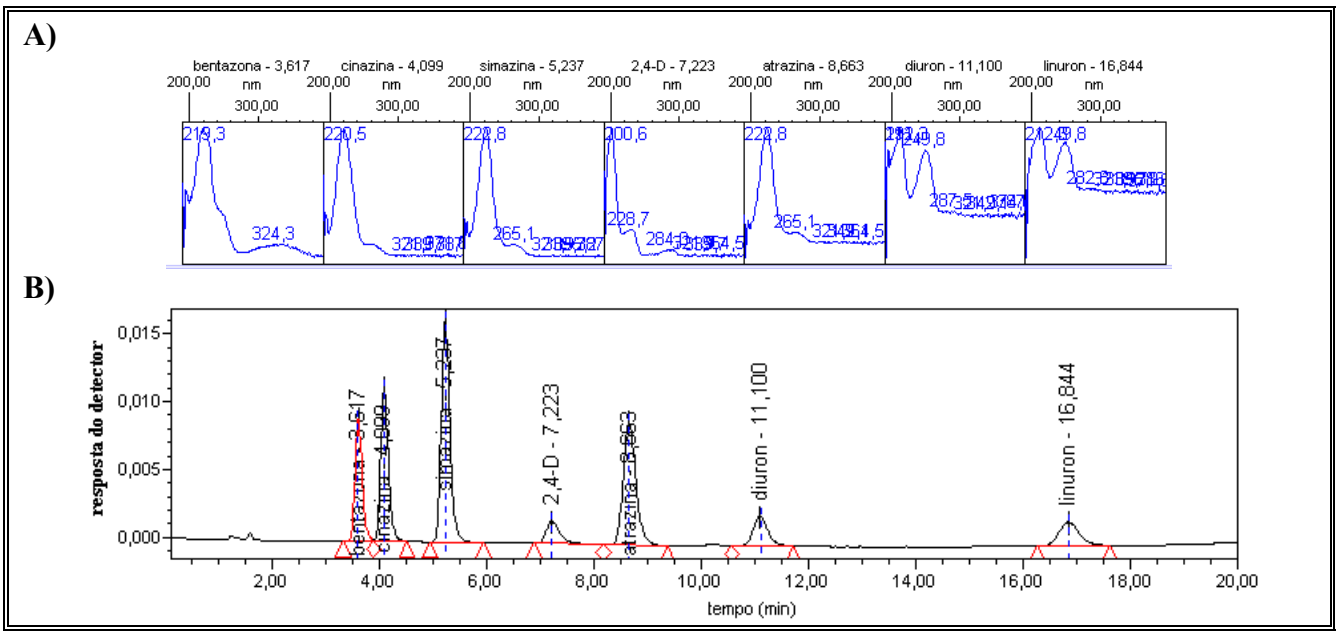


Figura 15. A) Espectro de absorção dos pesticidas no UV. B) Cromatograma obtido para amostra (750 mL), fortificada com os pesticidas (0,4 µg), após EFS utilizando tubo de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.

Observando os cromatogramas da amostra controle e do extrato de EFS da amostra de água Milli-Q fortificada, verifica-se que o método desenvolvido baseado em EFS e determinação por CLAE permite a quantificação de cada analito, sem que ocorra interferências.

As Tabelas 20 à 22 apresentam os valores de recuperação e precisões (repetitividade e precisão intermediária) obtidos para os pesticidas em estudo, submetidos a EFS utilizando tubos C18 e de PS-DVB e coluna de PS-DVB.

Tabela 20. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,15 µg/L) no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	110	8	18
cianazina	89	5	9
simazina	82	7	10
2,4-D	93	8	11
atrazina	96	10	14
diuron	96	8	12
linuron	110	8	12

Tabela 21. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,3 µg/L) em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	101	7	15
cianazina	84	13	23
simazina	93	8	12
2,4-D	90	11	15
atrazina	85	8	12
diuron	97	14	23
linuron	104	14	23

Tabela 22. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (1,5 µg/L) em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo C-18 (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	79	7	4
cianazina	89	7	4
simazina	85	7	4
2,4-D	61	5	14
atrazina	78	3	3
diuron	68	7	10
linuron	77	3	2

Analisando as Tabelas 20 à 22 verifica-se que, de um modo geral, foram obtidos valores de recuperação adequados para todos os pesticidas em estudo, pois estão compreendidos dentro do limite considerado aceitável pela literatura para análise de pesticidas em água que é de 70-120% [9], os valores de precisão, de um modo geral, também foram bons, uma vez que são aceitáveis valores

de até 20%, exceto para a precisão intermediária da cianazina, diuron e linuron numa concentração de duas vezes o limite de quantificação do método. Estes resultados mostram que é possível fazer a determinação conjunta destes pesticidas numa mesma amostra. Observa-se que para o nível de fortificação de dez vezes o limite de quantificação do método os valores de recuperação para o 2,4-D, diuron e linuron estavam bem abaixo dos obtidos em menores níveis de concentração, isto pode estar relacionado com uma possível saturação dos sítios de adsorção do sorvente.

Tabela 23. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,04 µg/L) no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	85	3	5
cianazina	85	1	4
simazina	80	4	7
2,4-D	84	5	8
atrazina	78	2	5
diuron	78	2	5
linuron	74	4	7

Tabela 24. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,08 µg/L) em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	90	4	6
cianazina	90	2	4
simazina	84	6	8
2,4-D	88	8	10
atrazina	80	4	6
diuron	81	4	6
linuron	73	6	8

Tabela 25. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,4 µg/L) em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando tubo PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	91	3	7
cianazina	91	2	6
simazina	88	4	8
2,4-D	90	5	10
atrazina	84	2	7
diuron	88	2	6
linuron	74	4	8

Analisando as Tabelas de 23 à 25, os valores de recuperação e precisão de todos os pesticidas estudados foram bons. Verificou-se uma melhora na recuperação de pesticidas mais polares como bentazona, cianazina, simazina e 2,4-D e uma menor recuperação da atrazina, diuron e linuron com tubos de PS-DVB do que com tubos C-18. Na literatura os sorventes a base de estireno-divinilbenzeno são os mais indicados para a determinação de pesticidas mais polares, como pode ser verificado pela boa recuperação em baixa concentração, mostrando que o método é adequado para a determinação destes pesticidas.

Tabela 26. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,04 µg/L) no limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	90	4	5
cianazina	90	3	4
simazina	85	5	8
2,4-D	87	6	10
atrazina	83	3	5
diuron	88	3	5
linuron	72	5	8

Tabela 27. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,08 µg/L) em duas vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	92	4	4
cianazina	92	1	4
simazina	88	5	7
2,4-D	91	5	8
atrazina	86	3	4
diuron	89	2	4
linuron	75	5	7

Tabela 28. Recuperações e precisões de amostras de água Milli-Q fortificadas (0,4 µg/L) em dez vezes o limite de quantificação do método (LQ*) após EFS, utilizando coluna PS-DVB (N=3).

Pesticida	R(%)	Repetitividade (%)	Precisão Intermediária (%)
bentazona	94	3	4
cianazina	94	1	4
simazina	90	4	6
2,4-D	93	5	7
atrazina	87	2	4
diuron	91	2	4
linuron	78	4	6

Analisando as Tabelas 26 à 28, nota-se que os valores de recuperação e de precisão também foram bons, mas ocorre uma ligeira melhora nos valores de recuperação para todos os pesticidas em comparação com tubos de PS-DVB.

IV.4.3- Amostra Real

As amostras de água da torneira do LABCROM foram analisadas com EFS "off-line" utilizando todos os dispositivos de extração estudados neste trabalho e foi verificado a ausência de pesticidas, mas em seguida as amostras de água foram fortificadas (0,53 μg/L) com a mistura de pesticidas para poder comprovar a eficácia do método desenvolvido.

As Figuras 16 e 17 apresentam, respectivamente, uma análise de água de torneira e uma outra com fortificação dos pesticidas estudados, utilizando EFS com coluna de DVB.

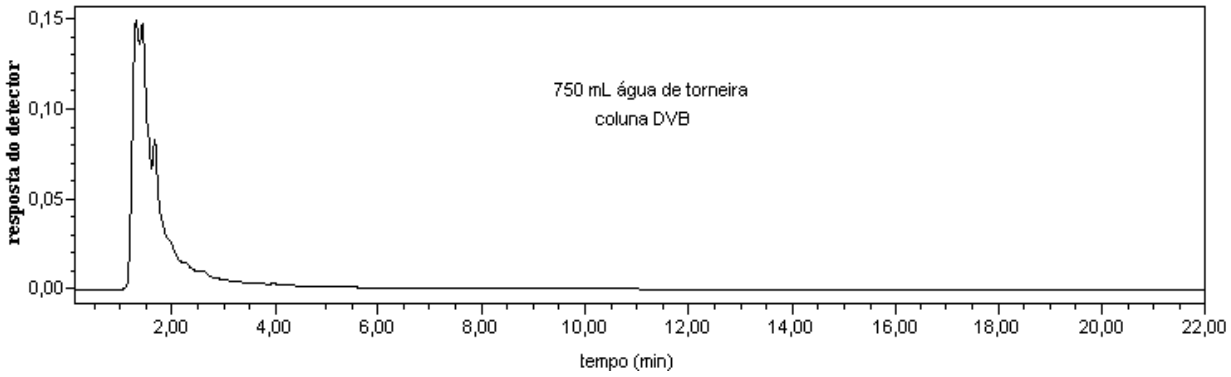


Figura 16. Cromatograma obtido na análise de água da pia do LABCROM, após EFS com coluna de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.

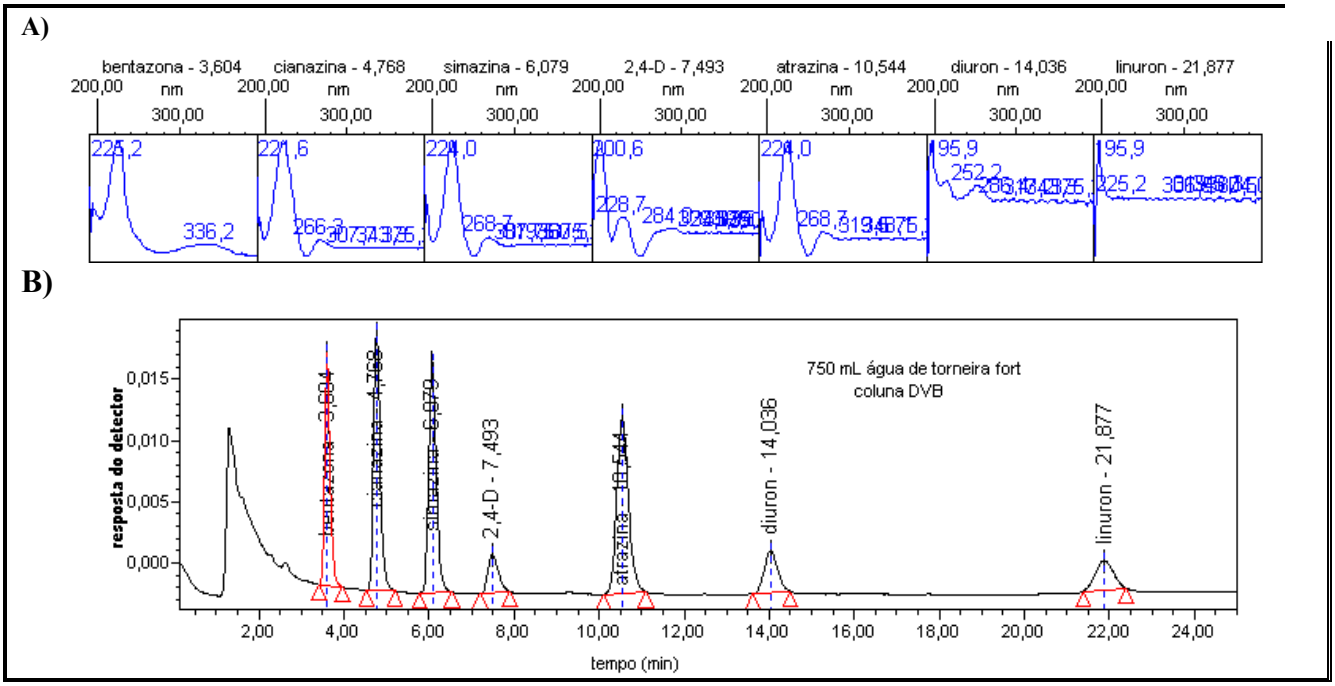


Figura 17. A) Espectros de absorção dos pesticidas no UV e B) Cromatograma obtido na análise de água da torneira do LABCROM fortificada (0,53 µg/L) com a mistura de pesticidas, utilizando EFS com coluna de PS-DVB. Condições cromatográficas: idem a Figura 4.

Analisando a Figura 17, pode-se notar uma boa separação entre os picos dos analitos, podendo facilmente ser quantificado, isso mostra que o método desenvolvido é adequado para ser utilizado em análises de água contendo os pesticidas estudados neste trabalho.

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÕES

Durante todo o desenvolvimento do trabalho foi utilizada a mesma coluna analítica comercial NovaPak C-18, isto comprova que se forem tomados os devidos cuidados mesmo utilizando fase móvel ácida ou até mesmo tampão, a vida útil da coluna analítica torna-se maior, mas o uso da coluna de guarda é imprescindível.

Com a fase móvel MeOH:H_2O 50:50 v/v pH 3,75 (ajustado com ácido fosfórico), pode-se ter uma boa separação cromatográfica de todos os picos cromatográficos, com valores de resolução, fator de retenção e de separação adequados.

Ao se fazer uso do detector por arranjo de diodos foi sempre possível obter os espectros de absorção na região do UV e os comprimentos de onda máximo de todos os pesticidas estudados, o que auxilia em muito na identificação e quantificação dos picos cromatográficos.

O melhor volume de amostra a ser utilizado em cada dispositivo de extração foi determinado sempre tendo em vista a análise multirresíduo e o fator de pré-concentração atingido para que se pudesse analisar amostras que atendessem às exigências da legislação, que é de 0,1 μg/L. Estabeleceu-se, então, que para tubo C-18 o volume de 200 mL foi o que apresentou melhores resultados de recuperação, assim como o volume de 750 mL foi escolhido para o tubo e a coluna de PS-DVB.

Usando tubos e colunas de PS-DVB o volume ótimo de 750 mL é maior que o volume ótimo obtido usando tubos C-18 que é de 200 mL, com isso obtem-se um fator de pré-concentração maior para tubos e colunas de PS-DVB permitindo atingir limites de detecção e quantificação mais baixos, o que representa uma grande vantagem em análises de amostras que se encontram em baixas concentrações.

O ajuste da força iônica para todos os dispositivos de extração mostrou ser uma fator negativo, diminuindo os valores de recuperação de todos os pesticidas em relação a amostra isenta de sal.

Na literatura os sorventes a base de estireno-divinilbenzeno são os mais indicados para a determinação de pesticidas mais polares, como pode ser verificado pela boa recuperação alcançada em baixas concentrações, mostrando que o método é adequado para a determinação destes pesticidas.

Os sorventes a base de estireno-divinilbenzeno suportam variações bem maiores no pH da amostra, maiores volumes de amostra percolada através do cartucho, alcançando assim um fator de pré-concentração maior do que os sorventes a base de sílica.

A validação dos métodos desenvolvidos mostraram bons resultados de linearidade, coeficiente de correlação (>0,99), de recuperação (70%<R<120%) e de precisão (<20%), para todos os dispositivos de extração estudados, exceto para a cianazina, diuron e linuron que apresentou um CV > 20% quando se utilizou tubo C-18 numa concentração de duas vezes o limite de quantificação do método. Os valores de limite de quantificação dos métodos desenvolvidos permitem que sejam atendidos o limite estabelecido pelos órgãos competentes para análise de pesticidas em água.

Foram alcançados limites de detecção e quantificação mais baixose boas recuperações de analitos mais polares em baixas concentrações, utilizando sorventes de PS-DVB do que C18.

Os sorventes de PS-DVB suportam maiores volumes de amostra, alcançando assim um fator de pré-concentração maior do que os sorventes a base de sílica.

Foram feitas duas extrações com tubos C18, cinco extrações com tubos de PS-DVB sem perdas de recuperação, enquanto que com coluna de PS-DVB foram feitas vinte extrações sem verificar perdas de recuperação.

Os sorventes a base de PS-DVB, a coluna foi o dispositivo de extração que apresentou melhores recuperações dos pesticidas do que os tubos em todos os níveis de fortificação.

Os sorventes a base de PS-DVB apresentaram uma maior reprodutibilidade nas extrações do que o sorvente a base de sílica, sendo que a coluna de PS-DVB apresentou maior reprodutibilidae do que o tubo de PS-DVB.

Os limites alcançados com os sorventes de PS-DVB são para atingir concentrações muito baixas de pesticidas, mas isto implica em um tempo de análise muito grande. Muitas vezes, na prática, um limite de quantificação tão baixo não é necessário e o tempo de análise torna-se inviável para uma análise rotineira. Nestes casos, pode-se usar volumes menores que atingem os limites recomendados pelas agências.

CAPÍTULO VI

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] http://www.jornalexpress.com.br , acessado em 02 de junho de 2004.

[2] Agência Nacional de Vigilância Sanitária http://www.anvisa.gov.br , acessado em 05 de junho de 2004.

[3] http://www.andev.gov.br , acessado em 15 de junho de 2003.

[4] C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, LC-GC, 14 (1996) 1048.

[5] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mãnes, J. Chromatogr. A, 728 (1996) 325.

[6] M. Biziuk, A. Przujazny, J. Czerwinski, M. Wiergowiski, J. Chromatogr. A, 754 (1996) 103.

[7] H.M.G. van der Werf; Agric., Ecosyst. Environ.; 60 (1996) 81.

[8] C.R.K. Murti, D. Nag, "Human Health Imapct of Pesticides in the Environment", in Chemistry, Agriculture and the Environment, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1991) 491.

[9] Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); "Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos", 1999.

[10] EEC Drinking Water Guideline 80/779/EEC, EEC No. L229 (1980) 11-29.

[11] Portaria 1469 do Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil, 29 de dezembro de 2000.

[12] Environmental Law Institute Research Report on Opportunities for Advancing Environmental Justice: An Analusis of US-EPA Statutory Authoriries, EPA, Washington, D.C., novembro de 2001.

[13] D. Barceló, J. Chromatogr. A, 643 (1993) 117-143.

[14] Silva, G.M.F; "Determinação de Resíduos de Herbicidas em Águas Utilizando Extração em Fase Sólida Seguida de Separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência"; Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1996.

[15] M.C. Hennion; J. Chromatogr. A, 856 (1999) 5.

[16] V. Pichon; J. Chromatogr. A, 885 (2000) 196.

[17] A. Junker-Buchheit, M. Witzenbacher, J. Chromatogr. A, 737 (1996) 67.

[18] L.L. Lloyd, J. Chromatogr., 544 (1991) 201.

[19] M.J.M. Wells, L.Z. Yu, J. Chromatogr. A, 885 (2000) 241.

[20] O. Jauregui, M.T. Galceran, Anal. Chim. Acta, 340 (1997) 191.

[21] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrul, R.M. Marce, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 794 (1998) 147.

[22] N. Masque, M. Galia, R.M Marce, F. Borrul, Analyst, 122 (1997) 425.

[23] C. Crescenzi, A. Di Corcia, G. Passarielo, R. Samperi, M.I.T. Carou, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 41.

[24] C. Sanchez-Brunete, L. Martinez, J. L. Tadeo, J. Agric. Food Chem., 42 (1994) 2210.

[25] C.C.J. Land, LC-GC Int., 7 (1994) 215.

[26] G. Durand, V. Bouvot, D. Barceló; J. Chromatogr., 607 (1992) 319.

[27] F. Ngan, T. Ikesaki, J. Chromatogr. A, 537 (1991) 385.

[28] M. Adolfsson-Erici, L. Renberg; Chemosphere, 23 (1991) 845.

[29] S. Hatrík, J. Tekel, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 223.

[30] A. Di Corcia, M. Marchetti and R. Samperi, Anal. Chem., 61 (1991) 1363.

[31] R.B. Geerdink, A.M.B.C Graumans, J. Viveen; J. Chromatogr., 547 (1991) 478.

[32] S. Hatrík, J. Lehotay, J. Tekel; J. High Resolut. Chromatogr., 17 (1994) 756.

[33] A.Di Corcia, M. Marchetti, Anal. Chem., 63 (1991) 580.

[34] R. Boussenadji, P. Dufek, M. Porthault; LC-GC Int., 6 (1993) 450

[35] A. de Kok, M. van Opstal, T. de Jong, B. Hoogcarspel, R.B. Geerdink, R.W. Frei, Anal. Chem., 18 (1984) 101.

[36] H. Kitami, T. Watanabe, T. Kitahara, Y. Ishihara, J. Tanano; Bunseki-Kagaku, 51 (2002) 1069.

[37] B.A Tomkins, R.H Ilgner, J. Chromatogr. A, 972 (2002) 183.

[38] Z.L Chen, M. Megharaj, R. Naidu, J. Liq. Chromatogr.Rel.Technol., 25 (2002) 1779.

[39] S. Batista, E. Silva, S. Galhardo, P. Viana, M.J Cerejeira, Int.J.Environ.Anal.Chem., 82 (2002) 601.

[40] R. Bossi, K.V Vejrup, B.B Mogensen, W.A.H Asman, J. Chromatogr. A, 957 (2002) 27.

[41] D.Q Hung, W. Thiemann, Chemosphere, 47 (2002) 357.

[42] R.C. Martinez, E.R. Gonzalo, E.H Hernandez, F.J.S.S. Román, M.G.P. Flores, J. Chromatogr. A, 950 (2002) 157

[43] S. Topuz, B. Alpertunga, Anal. Chem., 83 (2003) 787.

[44] A. Sosa, A. Lenardon, M.L Mattassini, J. Chromatogr. Science, 41 (2003) 92.

[45] J.M.F Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, J. Chromatogr. A, 996 (2003) 133.

[46] K. Reddersen, T. Heberer, J. Sep. Sci., 26 (2003) 1443.

[47] G. Famiglini, H. Trufelli, E. Pierini, E. de Simoni, F. Mangani, A. Cappielo, J.AOAC.Int., 86 (2003) 941.

[48] H.K. Rotich, Z.Y. Zhang, J.C Li; Anal. Chem., 83 (2003) 851.

[49] S.A. Senseman, T.C. Mueller, M.B. Riley, R.D. Wauchope, C. Clegg, R.W. Young, L.M. Southwick, H.A. Moye, J.A. Dumas, W. Mersie, J.D. Mattice R.B Leidy, J. Agric. Food. Chem., 51 (2003) 3748.

[50] S. Beernaerts, M. Gerard, P. Debongnie, J.P. Barthelemy, L. Pussemier, A. Copin, Anal. Chem., 83 (2003) 469.

[51] E. Ballesteros, M.J. Parrado, J. Chromatogr. A, 1029 (2004) 267.

[52] J.M.F Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, Anal.Chim. Acta, 505 (2004) 209.

[53] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S. Jardim, L.F.C. Melo, Quim. Nova, 27 (2004) 771.

[54] Swartz, M.E, Krull, I.S, Pharmaceut. Technol., (1996) 12.

[55] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, 2^{o}ed., New York, 1997, pp33.

[56] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, J. Chromatogr. A, 885 (2000), 217.

[57] I. Liska, J. Chromatogr. A, 885 (2000), 3.

[58] C. Aguilar, F. Borrull, R.M Marcé, LC-GC, 14 (1996) 1048.

[59] C.E. Green, M.H. Abraham, J. Chromatogr. A, 885 (2000) 41.

[60] A. Junker-Buchheit, M. Witzenbacher, J. Chromatogr. A, 737 (1996) 67.

[61] M.J. Ruiz, M.J. Redondo, G. Font, J. Chromatogr. A, 776 (1997) 348.