



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS E INSETICIDAS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO EXTRAÇÃO
LÍQUIDO-SÓLIDO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

DANIEL TEMPONI LEBRE

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Faustino Pires**

**São Paulo
2000**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS E INSETICIDAS EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO – SÓLIDO E
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

DANIEL TEMPONI LEBRE



**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Faustino Pires**

**São Paulo
2000**

*À minha esposa Cecília,
que com seu amor,
carinho e companheirismo
me ajudou a tornar um
sonho realidade.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS que nos dá fé, força, saúde e segurança.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Departamento de Engenharia Química Ambiental (MQA) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Faustino Pires que desde do início confiou no meu trabalho orientando-me com grande incentivo, carinho, compreensão e amizade.

Ao Dr. Jorge Moreira Váz pela “co - orientação” e sugestões que foram de grande importância para realização do trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP pelo financiamento dos equipamentos e infra – estrutura do laboratório.

Ao PADCT/FINEP e RHAE/CNPq pelo apoio e financiamento do projeto.

À Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo pela parceria e colaboração no projeto de pesquisa. Aos funcionários, Mauro, Hirata e Oscar pelo apoio logístico.

Aos meus pais Antonio e Anete pelo amor, carinho, compreensão, confiança incentivo e principalmente pela educação que eles me ofereceram e que é produto desta obra.

À minha avó que sempre diz: “prime libre”.

Ao meu irmão e minha irmã pessoas que eu gosto e admiro muito.

À minha recente família, sogro, sogra e cunhados que sempre me incentivaram.

Ao meu padrinho de casamento Sérgio Luis Graciano Petroni pelo apoio e amizade.

Aos amigos Lídia Katsuoka, Maria Nogueira, Marcos Lemes, Elias Silveira, Ricardo Coelho, Elizabeth Dantas, pessoas que eu considero muito e que me acompanharam desde da época de iniciação científica e muitas vezes me ajudaram.

Aos colegas da Divisão de Diagnóstico Ambiental do Departamento de Engenharia Química, em especial a Marycel, Marlene, Beatriz e Elaine.

À Drá. Noemia M. P. de Moraes e a Msc. Helena Miho que me apresentaram a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

À Divisão de Supervisão de Radioensaios do IPEN em especial a Iara.

À todos os meus amigos e familiares que colaboraram de alguma forma para realização deste trabalho.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS E INSETICIDAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO – SÓLIDO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Daniel Temponi Lebre

RESUMO

Atualmente os defensivos agrícolas, conhecidos como pesticidas, tem sido aplicados em grande escala no mundo inteiro, principalmente no Brasil, onde a agricultura é dominante. Estas substâncias aumentam a produtividade agrícola, porém são altamente prejudiciais a saúde dos seres vivos. No meio ambiente, quantidades significativas dos pesticidas estão sendo encontradas, contaminando os mais diversos recursos naturais como alimentos, águas superficiais e águas subterrâneas. Para determinação dos pesticidas, presentes nestas matrizes em baixas concentrações, faz-se necessário a aplicação de técnicas analíticas com alta sensibilidade. Dessa forma a Extração Líquido - Sólido (*SPE*) tem sido uma boa alternativa para pré - concentração e extração dos compostos pesticidas, em conjunto com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC*) com detecção *UV/vis*, para a separação e quantificação. Neste trabalho amostras de águas, contendo quantidades conhecidas dos herbicidas, atrazina, simazina, trifluralin e inseticidas, aldicarb, carbofuran, carbaryl, compostos bastante utilizados nas práticas agrícolas, foram extraídos pela técnica de *SPE off-line*. Comparou-se a eficiência de extração entre duas colunas preenchidas com diferentes materiais, octadecilsilanol C_{18} (500 mg) e copolímero de estireno - divinilbenzeno (250 mg). Os compostos foram separados e quantificados por *HPLC* em coluna de fase reversa com detecção *UV* à 220 nm. Os resultados foram avaliados através dos níveis de recuperação dos compostos nos diferentes materiais e solventes testados na *SPE*. O melhor resultado, ou seja, a extração que apresentou melhor recuperação dos analitos, acima de 80%, foi verificada na coluna preenchida com C_{18} e extração com 6 mL de acetonitrila. Escolhida a melhor coluna e condições de extração para amostras simuladas de água, o método foi validado através de testes analíticos e estatísticos, aplicando-o para águas superficiais destinadas ao abastecimento público. Este método analítico mostrou-se eficiente na determinação deste compostos, apresentado boa sensibilidade, onde concentrações na faixa de 0,4 a 4,0 μgL^{-1} presentes nas águas superficiais podem ser quantificados, atendendo os limites propostos pelas legislações existentes.

**METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF HERBICIDES AND
INSECTICIDES IN SURFACE WATERS USING SOLID-PHASE EXTRACTION
AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Daniel Temponi Lebre

ABSTRACT

Determination of low concentrations of pesticides in surface and ground waters requires high sensitivity analytical techniques. Solid-Phase Extraction (SPE) has been successfully employed to pre concentrate and extract pesticides compounds from water samples. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with UV/Vis detector was used to separate and quantify the extracted compounds. In this work, samples of surface waters with known concentrations of herbicides (*atrazine, simazine and trifluralin*) and insecticides (*aldicarb, carbofuran and carbaryl*) were extracted by using SPE off-line technique. The compounds were separated and quantified by reverse phase HPLC with UV detection at 220 nm. The extraction efficiency was compared between two columns filled with different materials: C₁₈-bonded silica phase (500 mg) and copolymer styrene-divinylbenzene resin (250 mg). The results were evaluated as the percent recovery of compounds obtained using different solvents at different concentrations. The results showed that recovery of the analytes greater than 80 % were obtained in SPE columns filled with C₁₈-bonded silica phase with 6 mL of acetonitrile. Once the optimum conditions were chosen for simulate water samples, the method was validated through analytical and statistical procedures and applied for surface waters. The suitability of the method was verified for the studied compounds showing good sensitivity, i. e., concentrations within the range of 0.4 to 4.0 µg L⁻¹ of pesticides could be quantified attending the limits proposed by official regulations.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 2	
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS	6
2.1. BREVE HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DOS PESTICIDAS.....	6
2.2. PESTICIDAS E POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	7
2.3. ÁREA DE ESTUDO.....	13
2.4. CLASSIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS.....	17
2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PESTICIDAS.....	20
2.6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.6.1 Métodos Oficiais.....	25
2.6.2. Extração Líquido - Líquido (<i>LLE</i>).....	26
2.6.3. Extração Líquido - Sólido (<i>SPE</i>).....	27
2.6.4. Injeção Direta da Amostra.....	34

CAPÍTULO 3

3.1. PRÍNCÍPIOS BÁSICOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	35
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	35
3.1.2. FASE MÓVEL.....	39
3.1.3. FASE ESTACIONÁRIA.....	40
3.1.4. COLUNAS.....	43
3.1.5. FATORES REACIONADOS À SEPARAÇÃO EM CROMATOGRAFIA.....	44
3.1.6. DETECTOR.....	47
3.2. QUANTIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS.....	50
3.3. CONTROLE DE QUALIDADE PARA ANÁLISE DE PESTICIDAS.....	51
3.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-SÓLIDO (<i>SPE</i>) – Considerações Gerais.....	52
3.5. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	56
3.5.1. Exatidão.....	56
3.5.2. Precisão.....	57
3.5.3. Linearidade.....	58
3.5.4. Limite de Detecção e Quantificação.....	59
3.5.5. Especificidade.....	59
3.5.6. Robustez.....	60
3.5.7. Estabilidade do Sistema.....	60

CAPÍTULO 4

4. PARTE EXPERIMENTAL.....	61
4.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	62
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	63
4.3. SOLUÇÕES-PADRÃO.....	64
4.4. COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	65
4.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	66
4.6. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO - SÓLIDO DOS PESTICIDAS EM ÁGUAS SUPERFICIAL.....	67

4.7. CONDIÇÕES DE ANÁLISE DOS PESTICIDAS NO SISTEMA DE <i>HPLC</i> <i>UV/vis</i>	71
---	----

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
5.1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS PESTICIDAS POR <i>HPLC</i>	73
5.2. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE.....	83
5.3. REPETIBILIDADE E ESTABILIDADE DO SISTEMA.....	89
5.4. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	92
5.5. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO AS COLUNAS DE <i>SPE</i> : C_{18} E COPOLÍMERO DE ESTIRENODIVINILBENZENO.....	93
5.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO (EXTIDÃO) E PRECISÃO DO MÉTODO DE <i>SPE</i>	98
5.7. TESTES DE REUTILIZAÇÃO DAS COLUNAS DE <i>SPE</i>	106
5.8. ROBUSTEZ.....	108

CAPÍTULO 6

6.1. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DAS BACIAS DOS RIOS MOGI-GUAÇÚ E PARDO.....	112
6.2. ESPECIFICIDADE.....	117

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS	130
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Movimento dos pesticidas no meio ambiente através de caminhos abióticos e bióticos.....	8
Figura 2 – Distribuição da utilização dos pesticidas no Mundo e nos Países em Desenvolvimento, segundo dados da “Wood Mackensie Agrochemical Service” de 1988.....	11
Figura 3 – Área de atuação da pesquisa.....	13
Figura 4 – Esquema básico de operação de um sistema de <i>HPLC</i>	36
Figura 5 – Processos fundamentais da cromatografia líquida.....	37
Figura 6 – Migração dos componentes através da coluna cromatográfica.....	38
Figura 7 – Esquema das reações utilizadas para a síntese polimérica ou monomérica da fase estacionária.....	42
Figura 8 – Representação esquemática de um cromatograma.....	44
Figura 9 – Esquema da estrutura molecular das fases estacionárias utilizadas na <i>SPE</i>	53
Figura 10 – Esquema das principais etapas utilizadas em sistema de extração líquido – sólido.....	54
Figura 11 – Rio Jaguari Mirim e Córrego Fartura.....	66
Figura 12 – Esquema do procedimento de extração líquido – sólido.....	68
Figura 13 – Aparatos de <i>SPE</i>	69
Figura 14 – Vidrarias utilizadas na <i>SPE</i>	69
Figura 15 – Aparelhagem para <i>SPE</i> desenvolvida no laboratório.....	70
Figura 16 – Esquema do gradiente de eluição.....	72
Figura 17 – Sistema de <i>HPLC</i>	72
Figura 18 – Separação dos compostos em diferentes composições da fase móvel.....	75
Figura 19 – Separação da mistura dos compostos pesticidas em programação isocrática 70% ACN/ 30% H ₂ O.....	76
Figura 20 – Influência da separação dos compostos em função da composição da fase móvel.....	77
Figura 21 – Cromatograma da separação ótima dos compostos pesticidas.....	79
Figura 22 – Cromatograma da separação da mistura dos compostos pesticidas em programação isocrática 50% MeOH/ 50% H ₂ O.....	80

Figura 23 – Comparação da absorvância dos compostos em dois comprimentos de onda distintos: 220 e 254 nm.....	82
Figura 24 – Comparação da absorvância do composto trifluralin em dois comprimentos de onda distintos: 220 e 254 nm.....	82
Figura 25 – Curvas analíticas.....	83
Figura 26 – Cromatograma amostra branco solução 50% ACN/ 50% H ₂ O.....	85
Figura 27 – Cromatograma amostra padrão, concentração 0,02 mgL ⁻¹	85
Figura 28 – Cromatograma amostra padrão, concentração 0,05 mgL ⁻¹	86
Figura 29 – Cromatograma amostra padrão, concentração 0,08 mgL ⁻¹	86
Figura 30 – Cromatograma amostra padrão, concentração 0,2 mgL ⁻¹	87
Figura 31 – Cromatograma amostra padrão, concentração 0,5 mgL ⁻¹	87
Figura 32 – Fator de resposta vs. concentração dos analitos em mgL ⁻¹	88
Figura 33 – Comparação dos cromatogramas referentes às análises da amostra padrão de concentração 0,08 mgL ⁻¹ em três dias diferentes para estudos da estabilidade do sistema.....	91
Figura 34 – Estudo da eficiência de extração utilizando diferentes colunas de <i>SPE</i> e diferentes solventes.....	94
Figura 35 – Comparação entre os cromatogramas de uma amostra - branco de água ultrapura e uma amostra branco com adição padrão dos compostos na concentração de 1,0 µgL ⁻¹ , utilizando coluna de <i>SPE ENVI-18</i> e extração com 6 mL de ACN.....	95
Figura 36 – Comparação entre os cromatogramas de uma amostra - branco de água ultrapura e uma amostra - branco com adição padrão dos compostos na concentração de 1,0 µg.L ⁻¹ , utilizando coluna de <i>SPE ENVI Chrom-P</i> e extração com 3 mL de MeOH.....	95
Figura 37 – Estudo do volume de eluição em coluna de <i>SPE ENVI-18</i> utilizando acetonitrila.....	96
Figura 38 – Cromatograma da amostra - branco e amostra - branco com adição padrão na concentração de 1,0 µgL ⁻¹ de cada composto.....	99
Figura 39 – Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim (São João da Boa Vista) e amostra água superficial do rio Jaguari Mirim com adição padrão, na concentração de 1,0 µgL ⁻¹ de cada composto.....	100

Figura 40 – Cromatograma da amostra - branco com adição padrão na concentração de $0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.....	104
Figura 41 – Cromatograma da amostra - branco com adição padrão na concentração de $4,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.....	105
Figura 42 – Cromatograma da amostra - branco. Coluna <i>SPE ENVI-18 reutilizada</i>	107
Figura 43 – Cromatograma da amostra - branco com adição padrão dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$. Coluna de <i>SPE ENVI-18 reutilizada</i>	107
Figura 44 – Cromatograma de uma amostra padrão de concentração $0,2 \text{mgL}^{-1}$ analisada no equipamento de <i>HPLC LC-10 vp (Shimadzu)</i>	110
Figura 45 – Cromatograma de uma amostra padrão de concentração $0,2 \text{mgL}^{-1}$ analisada no equipamento de <i>HPLC LC-10 vp (Shimadzu)</i>	111
Figura 46 – Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas..	114
Figura 47 – Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas..	115
Figura 48 – Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas..	116
Figura 49 – Cromatograma da amostra padrão de concentração 60mgL^{-1} de cada composto pesticida, analisados por <i>GC/MS</i>	121
Figura 50 – Espectro de massas dos compostos pesticidas analisados.....	122
Figura 51 – Cromatogramas da amostra padrão de concentração 60mgL^{-1} , analisadas em diferentes temperaturas do injetor.....	123
Figura 52 – Cromatograma de uma amostra - branco extraída por <i>SPE</i> e analisada por <i>GC/MS</i>	126
Figura 53 – Cromatograma da amostra - branco com adição padrão dos compostos pesticidas na concentração de $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$ extraída por <i>SPE</i> e analisada por <i>GC/MS</i>	127
Figura 54 - Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim, extraída por <i>SPE</i> e analisada por <i>GC/MS</i>	128
Figura 55 - Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim com adição padrão dos compostos pesticidas na concentração de $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$ extraída por <i>SPE</i> e analisada por <i>GC/MS</i>	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos pesticidas estudados.....	15
Tabela 2 – Classificação dos pesticidas quanto a toxicidade.....	19
Tabela 3 – Técnicas analíticas aplicadas na análise de grupos pesticidas em águas.....	21
Tabela 4 – Programação do gradiente de eluição utilizando coluna C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm DI 5 µm) e a fase móvel água (A) e acetonitrila (B).....	71
Tabela 5 – Resultados da separação dos compostos aplicando gradiente de eluição....	78
Tabela 6 – Valores obtidos de “m”, “b” e “r” através da regressão linear da curva analítica.....	79
Tabela 7 – Estudo da Repetibilidade e Precisão Intermediária.....	90
Tabela 8 – Limites de Detecção e de Quantificação.....	92
Tabela 9 – Resultados dos estudos de recuperação dos compostos pesticidas em água ultrapura de e em amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim, contendo ambas 1,0 µg de cada composto adicionados.....	98
Tabela 10 – Resultado da análise da amostra - branco com adição padrão na concentração de 1,0 µgL ⁻¹ de cada composto.....	99
Tabela 11 – Resultado da análise da amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim com adição padrão na concentração de 1,0 µgL ⁻¹ de cada composto.....	100
Tabela 12 – Recuperação dos compostos em água ultrapura, em diferentes concentrações.....	103
Tabela 13 – Resultado da análise da amostra - branco com adição padrão na concentração de 0,4 µgL ⁻¹ de cada composto.....	104
Tabela 14 – Resultado da análise da amostra branco com adição padrão na concentração de 4,0 µgL ⁻¹ de cada composto.....	105
Tabela 15 – Recuperação dos compostos em uma amostra - branco com adição padrão concentração de 1,0 µgL ⁻¹ , reutilizando a coluna de <i>SPE ENVI-18</i>	106
Tabela 16 - Localização dos pontos de coleta das amostras de água superficial.....	113
Tabela 17 – Compostos detectados por <i>GC/MS</i>	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CLFR: Cromatografia Líquida de Fase Reversa
- DAD – Diode Array Detector* – Detetor Espectrofotômtrico com Arranjo do Diodo
- ECD: Eletron Capture Detector* – Detector de Captura de Elétrons
- EEA: European Environmental Agency* – Agência Européia de Meio Ambiente
- FID: Flame Ionization Detector* – Detector de Ionização por Chama
- FPD: Flame Photometric Detector* – Detector Fotométrico de Chama
- FL: Fluorimetric Detctor* – Detector Fluoremétrico
- FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations* – Orgão das Nações Unidas para Organização da Agricultura e Alimentos
- IAEA: International Atomic Energy Agency* – Agência Internacional de Energia Atômica
- GC: Gas Chromatography* - Cromatógrafo a Gás
- GE: Gradiente de Eluição
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- LLE: Liquid - Liquid Extraction* – Extração Líquido – Líquido
- MS: Mass Spectrometer* – Espectrometro de Massas
- NPD: Nitrogen - Phosphorus Detector* – Detector de Nitrogênio - Fósforo
- NPS: National Pesticides Survey* – Auditoria Nacional de Pesticidas
- OMS: Organização Mundial da Saúde – *World Health Organization (WHO)*
- SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
- SCA: United Kingdon Standing Committee of Analyst* – Comitê dos Analistas do Reino Unido
- SPE: Solid - Phase Extraction* –Extração Líquido – Sólido ou Extração em Fase Sólida
- SPME: Solid Phase Micro Extraction* – Microextração em Fase Sólida
- US EPA: United States Environmental Protection Agency* – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
- UV/vis: Detector Estctrofotômtrico Ultravioleta/visível*

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA A PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS E INSETICIDAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO – SÓLIDO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A intensiva industrialização dos países tem aumentado a quantidade de despejos de compostos orgânicos e inorgânicos nas águas, reduzindo drasticamente sua qualidade, comprometendo não só a saúde do homem, como todo ecossistema.

Todo ano, aproximadamente 250.000 novos compostos orgânicos são sintetizados e cerca de 1.000 dentre estes são manufaturados industrialmente (DOJLIDO, 1993). Atualmente, 70.000 compostos orgânicos são comercializados, com uma produção anual de 100 a 200 milhões de toneladas. Estima-se que 1/3 de todas as substâncias produzidas têm como seu destino final o meio ambiente, principalmente nas águas. Em trabalhos recentes, mais de 600 compostos orgânicos, alguns biologicamente ativos, foram detectados em amostras de águas (COLEMAN, 1980; PATSIAS, 1996; TANABE, 1996; ALBANIS, 1998, VASSILAKIS, 1998).

Os compostos pesticidas estão entre os poluentes orgânicos mais nocivos ao meio ambiente. A maioria destes compostos apresentam alta toxicidade, são estáveis e acumulam-se na cadeia alimentar. Estas substâncias foram e são largamente utilizadas na agricultura contribuindo para o aumento da produtividade agrícola, através da redução das plantações perdidas por ataques de pragas (ervas daninhas, insetos, fungos). Além disso, são empregados no combate a insetos que transmitem doenças prejudiciais ao homem.

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por pesticidas pode ocorrer de duas maneiras: direta, onde são despejados propositamente para controle das larvas

de mosquitos; plantas aquáticas ou indiretamente, através da drenagem de áreas agrícolas, permeabilidade do solo, acidentes pelo manuseio impróprio, efluentes industriais da produção, esgotos domésticos, entre outros (BÖRNER, 1994).

No Brasil, a utilização de pesticidas em práticas agrícolas aumentou significativamente durante os últimos anos, tendo como consequência o aumento no número de casos de intoxicação e contaminação do meio ambiente, principalmente nos alimentos e nas águas (FOLHA, 1998).

Em países como os Estados Unidos e na Europa, órgãos com intuito de proteger o meio ambiente, como a *EPA* (*Environmental Protection Agency*) e a *EEA* (*European Environmental Agency*), respectivamente, estabeleceram concentrações máximas permissíveis de pesticidas em águas naturais e de abastecimento. A *EEA* estipulou um limite de concentração admissível de $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ para somatória de todos os compostos pesticidas e $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ para cada um encontrado em águas de abastecimento (BARCELÓ, 1993) e para águas superficiais concentrações entre $1,0$ e $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ (AGUILAR, 1997). Já a *EPA* estipula níveis máximos de concentração, de acordo com o grau de toxicidade de cada pesticida (BARCELÓ, 1993). O órgão que controla os Valores Máximos Permissíveis (VMP) em águas para abastecimento público, no Brasil, é o Ministério da Saúde, através da portaria 36GM/90. Esta portaria contempla, somente alguns pesticidas organoclorados, baseada em limites estipulados pela *EEA*. As substâncias estudadas neste trabalho, freqüentemente utilizadas em práticas agrícolas brasileiras, não estão presentes na Portaria 36, tomando-se com referência os valores fornecidos pela *EEA* e *EPA*.

Para a análise e monitoramento dos compostos pesticida nas águas, onde baixos limites de detecção são exigidos, na ordem de μgL^{-1} , é de fundamental importância à aplicação de técnicas de preparação de amostras para remoção de interferentes com instrumentação analítica de alta sensibilidade.

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver e validar um método analítico eficiente e sensível, que atenda os limites recomendados pelos órgãos existentes, para determinação simultânea de seis compostos pesticidas em águas superficiais, são estes compostos: do grupo dos carbamatos, aldicarb, carbofuran e carbaryl (inseticidas); do

grupo das triazinas, atrazina e simazina (herbicidas) e do grupo das nitroanilinas o trifluralin (herbicida).

Na determinação de pesticidas em amostras ambientais as técnicas de cromatografia gasosa (*GC*) e cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC* – *high performace liquid cromatography*) são as mais utilizadas. Em alguns casos é difícil fazer uma escolha entre essas técnicas, pois ambas apresentam características semelhantes, quanto a grande eficiência de separação dos compostos, alta velocidade de análise e viabilidade de acoplar uma série de detectores altamente sensíveis. No entanto, a técnica de *HPLC* vem sendo aplicada com mais frequência para análise de compostos orgânicos polares (triazinas), não voláteis e termoinstáveis (carbamatos), oferecendo melhores resultados em relação a *GC* (HATRÍK & TEKEL, 1996; LISKA & SOLOBODNÍK, 1996).

A *HPLC* tem sido uma importante ferramenta para as análises de pesticidas modernos e seus produtos de transformação (metabólitos) (BARCELÓ, 1993). O uso de um sistema de *HPLC* em conjunto com um pré-tratamento da amostra, através de extração líquido-líquido (*LLE* – *liquid-liquid extraction*) (BARCELÓ, 1992; EDGELL, 1992) ou extração líquido-sólido (*SPE* – *solid-phase extraction*) (BALINOVA, 1993; EISER, 1995; SCHÜLEIN, 1995) são escolhas mais comuns em análises de herbicidas e inseticidas em amostras de águas. Os detectores *UV/vis* são, sem dúvida, os mais utilizados em laboratórios e tradicionalmente acoplados a cromatógrafos líquidos.

A técnica de *HPLC* acoplada com detector espectrofotométrico *UV/vis* para análise dos pesticidas, foi escolhida por suas propriedades citadas anteriormente; por sua seletividade, permitindo uma separação eficiente dos compostos; rapidez, simplicidade; boa sensibilidade e baixo custo. A *SPE* foi escolhida para o pré-tratamento das amostras, pois apresenta algumas vantagens em relação as demais técnicas de extração, dentre estas; utiliza os mesmos materiais que preenchem as colunas de cromatografia líquida; consome menos solventes orgânicos; reduz o manuseio e volume da amostra, além de apresentar rapidez e especificidade para extração dos compostos pesticidas.

O método analítico desenvolvido neste trabalho está sendo aplicado para avaliar, periodicamente, as amostras de águas superficiais coletadas em pontos de captação das bacias dos rios Mogi-Guaçu e Pardo (SP). Os resultados obtidos fornecem dados importantes para a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) avaliar o grau de contaminação destas águas, que após tratamento convencional, abastecem as comunidades próximas. Este trabalho é parte integrante de um projeto maior, parceria IPEN – SABESP, para “**Modelagem, Diagnóstico e Prognóstico da Qualidade da Água em Áreas de Captação**”, financiado pelo PADCT/FINEP; RHAEC/CNPq.

1.1. OBJETIVOS

Gerais

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia visando a determinação de herbicidas (nitroanilinas e triazinas) e inseticidas (carbamatos) em águas superficiais das bacias dos Rios Mogi-Guaçu e Pardo (SP), aplicando o método de extração líquido-sólido (*SPE*) e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*) com detecção espectrofotométrica *UV/vis*.

Específicos

- Otimizar as condições de análise – tempo de retenção, fator de separação, resolução - no sistema cromatográfico com coluna de fase reversa (C_{18}) e detecção *UV/vis*, utilizando amostras padrão de triazinas (atrazina e simazina), nitroanilinas (trifluralin) e carbamatos (aldicarb, carbaryl e carbofuran);
- Verificar a linearidade de resposta do detector através da construção de curvas referência e determinar o limite de detecção da técnica;
- Avaliar, desenvolver e aplicar um método de extração líquido – sólido (*SPE*) para amostras de água;
- Avaliar a recuperação das substâncias e a eficiência do método de *SPE off-line*, em amostras de águas contendo quantidades conhecidas dos compostos, utilizando duas colunas com diferentes materiais extratores: (a) sílica ligada a uma cadeia de dezoito carbonos (C_{18}) e (b) copolímero de estireno divinilbenzeno, disponíveis no comércio;
- Validar o método com testes analíticos e dados estatísticos;
- Aplicar a metodologia para as amostras de água superficial e identificar e quantificar as substâncias presentes, aplicando um controle de qualidade analítico adequado para validação dos resultados.

CAPÍTULO 2

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1. BREVE HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DOS PESTICIDAS

É difícil expressar com exatidão a época que os produtos químicos orgânicos começaram a ser aplicados na agricultura e no combate aos insetos. A séculos atrás, os persas começaram a fabricar extratos da planta conhecida como margarida-do-campo, pois perceberam sua ação contra os insetos. Sabe-se, hoje, que esta planta e outras plantas semelhantes possuem substâncias químicas altamente tóxicas aos insetos, como as piretrinas e ácidos cristêmicos, causando paralisia instantânea seguida de morte (BRANCO, 1995).

Mais tarde os chineses utilizaram para acelerar o amadurecimento das frutas o gás óxido de etileno, os gregos tratavam as uvas com as cinzas devido a sua alcalinidade e os índios da América do Norte utilizavam matéria orgânica para fertilizar a terra.

Mas foi em 1874, que um químico de Estrasburgo, sintetizou o composto orgânico organoclorado (cloro associado a H e C na estrutura) de nome diclorodifeniltricloroetano (DDT), cuja as propriedades inseticidas foram descobertas, somente em 1939, por um químico suíço. O composto passou a ser empregado por ocasião da segunda guerra mundial, tanto na agricultura como no controle de doenças transmitidas por insetos (1943 - combate ao tifo exantemático). Tal foi o sucesso como inseticida que deu ao descobridor destas propriedades o prêmio Nobel de medicina.

Com o passar do tempo as espécies tornaram-se biologicamente resistentes ao DDT, ou seja, seu efeito inseticida começou a diminuir seletivamente sendo desenvolvidas novas fórmulas de inseticidas do mesmo grupo, isto é, os organoclorados sintéticos. Surgiram assim, o BHC (hexaclorobenzeno), o clordano, o aldrin, e outros, porém verificou-se o mesmo problema de resistência biológica e foram aplicados misturados, pois o inseto resistente a um deles dificilmente seria resistente a dois ou três. (BRANCO, 1995).

Visando produzir pesticidas que não criassem resistência biológica surgiram novos grupos de compostos: os organofosforados, os carbamatos, os piretróides, as triazinas entre outros.

Os pesticidas devido às suas propriedades foram aplicados no mundo inteiro, contudo pouca atenção foi dada quanto ao aspecto toxicológico e as implicações de seu uso. A produção e o uso generalizado destes compostos introduziram em todo ecossistema, substâncias tóxicas estáveis (principalmente os organoclorados) e que se acumulam em concentrações cada vez maiores nos solos, nas matas, nas águas e por fim na cadeia alimentar prejudicando inúmeras espécies, inclusive o homem (BRANCO, 1995).

2.2. PESTICIDAS E POLUIÇÃO AMBIENTAL

A grande maioria das pessoas recebe, dependendo das circunstâncias, uma exposição diária a concentrações destas substâncias. Na agricultura o consumo é dominante (aproximadamente 68%); outras fontes incluem indústrias e comércio (17%); casa e jardim (8%) e usos governamentais (7%). As fontes de contaminação ambiental por pesticidas incluem (HAYES, 1997):

- aplicação direta das substâncias na água;
- lixiviação do solo;
- transporte atmosférico;
- contaminação de águas subterrâneas;
- liberação de efluentes industriais;
- usos doméstico e liberação através da água pelo tratamento de plantas;
- despejo de material de descarte.

A Figura 1 apresenta um esquema do movimento dos pesticidas após serem introduzidos na terra e nas águas (HAYES, 1997). Um dos maiores problemas quanto ao uso dos pesticidas, que pode ser verificado no esquema, é a contaminação dos solos e das águas comprometendo todo o ecossistema, transportando diretamente os pesticidas para a cadeia alimentar via fenômenos físico – químicos.

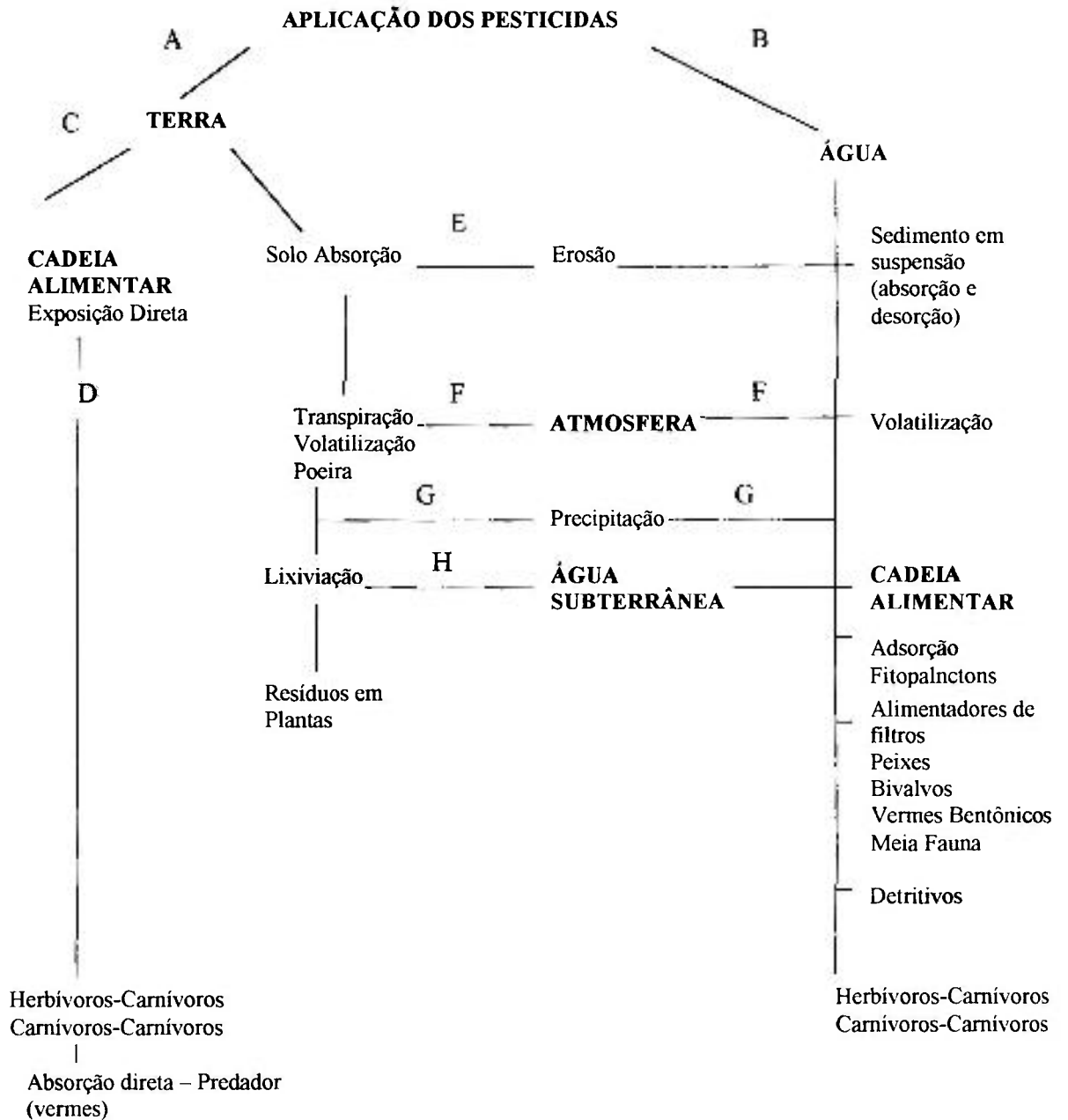


Figura 1. Movimento dos pesticidas no meio ambiente através de caminhos abióticos e bióticos (HAYES, 1997). Os pesticidas são aplicados na terra (A) ou na água (B). Os pesticidas podem entrar na cadeia alimentar (D) via exposição direta ou através de uma fonte alimentar. Há movimentação dos pesticidas na terra e na água pela erosão (E). Os pesticidas podem ser transportados para atmosfera via terra ou água (F). Os Pesticidas podem contaminar novamente a terra e água através da precipitação (G). A lixiviação do solo contaminam as águas subterrâneas (H) comprometendo a cadeia alimentar.

Na Figura 1 podemos observar que os pesticidas podem ser encontrados com facilidade na atmosfera e em águas subterrâneas.

Na natureza, os pesticidas sofrem inúmeras transformações como: hidrólise, biodegradação, oxidação, fotólise, biotransformação, reações metabólicas em organismos vivos, entre outras. Os pesticidas que possuem um potencial bioacumulativo em ecossistemas terrestre e aquático, em geral, são altamente lipofílicos e resistentes a degradação por microorganismos (HAYES, 1997).

A principal fonte de contaminação das águas, além da aplicação direta dos pesticidas, é a lixiviação do solo em áreas agrícolas. Esta fonte de contaminação acarreta em altas concentrações dos compostos pesticidas na coluna de água, causando toxicidade aguda para os organismos aquáticos (HAYES, 1997). Outras fontes de contaminação são atribuídas, ao manuseio impróprio dos produtos químicos, acidentes e aceitação destas substâncias em práticas agrícolas.

O significado para a saúde dos seres vivos depende: da quantidade anualmente aplicada em um país ou dentro de uma área; das propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas dos pesticidas e da persistência destas substâncias no meio ambiente, especialmente no solo e nas águas (BÖRNER, 1994).

A solubilidade dos pesticidas em água pode ser alterada, pelo pH, pela presença de sais dissolvidos e pela temperatura do meio. Os mesmos parâmetros podem modificar a toxicidade de um pesticida para uma espécie. A estrutura química dos pesticidas determina sua estabilidade e sua persistência, existindo componentes que podem ser degradados em poucas horas e componentes que persistem por anos.

Estes compostos em contato com águas que contenham alta quantidade de sólidos em suspensão são absorvidos a estes e sedimentam no fundo. A adsorção e a desorção (Figura 1E) dos pesticidas no sedimento são fatores importantes quanto sua bioatividade. Em sistemas aquáticos existe uma contínua disponibilidade dos pesticidas na terra, sedimento, interface sedimento-água, água intersticial, organismos aquáticos e interface ar-água. A distribuição de um composto pesticida, principalmente os mais estáveis, entre materiais bióticos e abióticos afetará a sua dinâmica no ecossistema.

Nas águas subterrâneas a contaminação ocorre através da lixiviação do solo (Figura 1H), principalmente em solos arenosos ou na direta aplicação dos pesticidas.

A quantidade dos pesticidas presente nas águas dependem da intensidade da produção de alimentos em uma dada região, quantidade de pesticidas aplicado, tipo de plantação, estação do ano, precipitação e fluxo de água liberado (BIZIUK, 1996). A precipitação atmosférica (Figura 1F) é uma importante rota do transporte de pesticidas, resultando em contaminações de reservatórios em águas distantes de áreas agrícolas, lagos de montanhas (BUSER, 1990), chegando até a regiões polares (BIZIUK, 1996).

Alguns trabalhos recentemente publicados confirmam a presença de pesticidas não somente em águas superficiais (BARCELÓ, 1992; PATISIAS, 1996; TANABE, 1996) (ALBANIS, 1998; VASSILAKIS, 1998), como também em águas marinhas, águas subterrâneas (BROOKS, 1990; PARRILLA, 1994; ALBANIS, 1998; VASSILAKIS, 1998) e águas de chuva (BUSER, 1990; ALBANIS, 1998).

Visto que a maioria dos compostos pesticidas são relativamente resistentes a biodegradação, o primeiro contato com as águas contaminadas e posteriormente um efeito cumulativo na cadeia alimentar, pode causar ao homem (último elo da cadeia), dependendo da classe e das concentrações presentes, doenças como câncer e distúrbios mutagênicos. Verifica-se, então, a importância, na determinação destas substâncias nas mais diversas partes do nosso ecossistema (Figura 1), para detectar possíveis contaminações, evitando desastres ecológicos.

Utilização Mundial dos Pesticidas

Hoje, apesar de comprovado os efeitos de toxicidade dos pesticidas, sendo algumas dessas substâncias proibidas ao uso, estes produtos continuam a ser espalhados mundialmente na ordem de 5 milhões de toneladas por ano, com gastos de aproximadamente 26 milhões de dólares (CARVALHO, 1993). A Figura 2 representa a distribuição da utilização dos pesticidas no mundo e nos países em desenvolvimento (KOH, 1996).

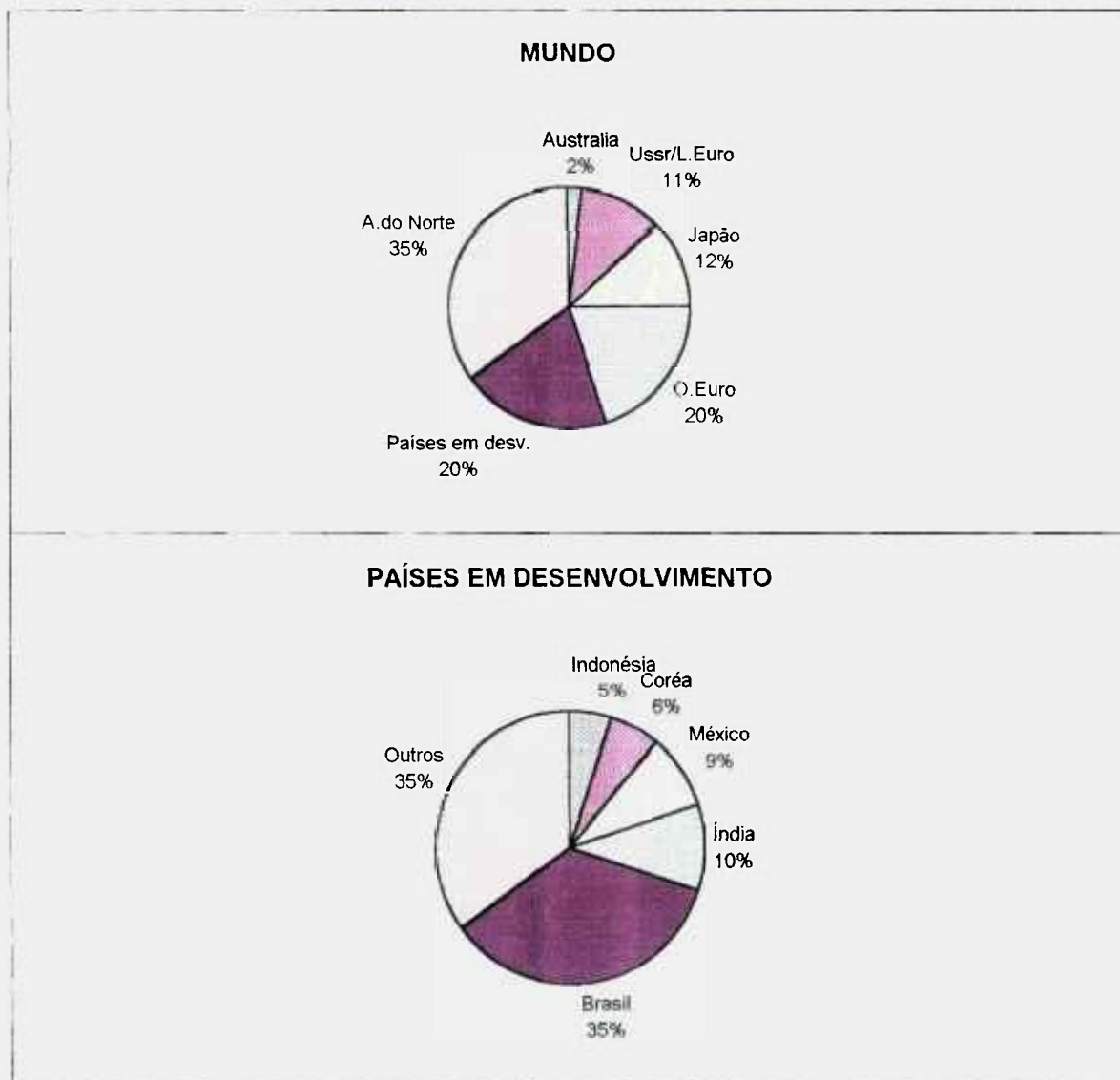


Figura 2. Distribuição da utilização dos pesticidas no Mundo e nos Países em Desenvolvimento, segundo dados do “Wood Mackensie Agrochemical Service” de 1988 (KOH, 1996).

Observa-se que o Brasil contribuiu com 35% da utilização dos pesticidas nos países em desenvolvimento.

Estudos mais recentes, realizados pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agro Pecuária), apontam que o consumo de pesticidas no Brasil cresceu 44% em dez anos, saltando de $1,0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ em 1983, para $1,44 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ em 1993, e entre os anos de 1993 a 1997 as vendas de agrotóxicos aumentaram 104%, de US\$ 1.050 bilhões para US\$ 2.161 bilhões. Em consequência, os casos por intoxicações cresceram 18%, de 1993 a 1995, segundo

dados da Sintox (Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas) (FOLHA, 1998).

Documento da *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, aponta o Brasil como um dos países que mais exageram na aplicação de pesticidas na lavoura, principalmente na horticultura ($10.000 \text{ L} \cdot \text{ha}^{-1}$) (FOLHA, 1998), daí a importância de um monitoramento ambiental para tais substâncias, prejudiciais à saúde.

Para disciplinar o uso dos pesticidas a FAO recomenda a todos os países para introduzir um estatuto obrigatório para proteção da saúde e do meio ambiente, este submetem às indústrias a documentações, descrevendo a ação do ingrediente e sua formulação, incluindo também: **i) caracterização toxicológica, ii) propriedades ecotoxicológicas, iii) comportamento químico e destino no meio ambiente, iiiii) métodos analíticos para detectar a ação do ingrediente, seus subprodutos, metabólitos e impurezas, além de fornecer métodos para detecção de pesticidas espalhados na plantação e acima de tudo em substratos do meio ambiente, determinando resíduos em águas subterrâneas e de superficiais (BÖRNER, 1994).**

No entanto, cada país conta com uma legislação específica para controlar estas substâncias no ambiente. Regulamentações e guias para concentração máxima tolerável em diversas fontes de contaminação (água de abastecimento, solo, alimentos e etc...) são fornecidas por órgãos mundiais que, há alguns anos, estão preocupados com esta problemática espalhada em todo mundo, dentre estes:

- *EEA- European Environment Agency*
- *FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- *IAEA- International Atomic Energy Agency*
- *US EPA- United States Environmental Protection Agency*
- *WHO- World Health Organization (OMS – Organização Mundial da Saúde)*

No Brasil, o CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - estabelece os padrões de qualidade para classificação de corpos de água (CONAMA 20), a Portaria 36GM/90 do Ministério da Saúde fornece o Padrão de Potabilidade - conjunto de valores máximo permitíveis, das características da qualidade da água destinada ao consumo

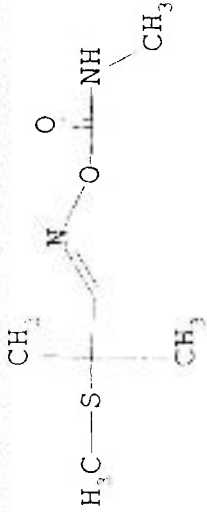
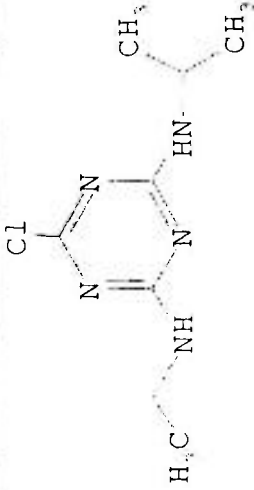
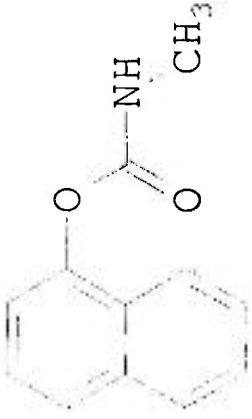
A escolha da área levou em conta vários aspectos sócio - econômicos, bióticos, abióticos e políticos: é a única área do Estado de São Paulo onde as captações são todas superficiais, susceptível à contaminação antrópica; a Bacia do Mogi-Guaçu alimenta o aquífero Guarani (MACROZONEAMENTO, 1995), que ocupa 60% do Estado e constitui na principal reserva de água subterrânea do Estado; a falta de informações sobre os agroquímicos utilizados na região; o grande interesse da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) e das prefeituras locais em obter tal subsídio aliado a parceria IPEN e SABESP. Este último, atuando no apoio logístico para a execução do referido projeto.

A região apresenta uma precipitação média de 1.408 mm/ano, dos quais 40% são convertidos em escoamento superficial. Os 60% restantes alimentam os recursos subterrâneos, que são de extrema importância, pois representam ricas reservas de água. A rede de drenagem da região apresenta algumas nascentes minerais e contaminações pontual e não pontual. Essa região possui uma agricultura diversificada, grandes indústrias de papel e celulose, silvicultura e alimentícia (refinações de milho e laticínios) destacando-se também, a exploração mineral das bacias.

Um inventário preliminar selecionou os produtos registrados no Brasil em função dos produtos aplicados na área piloto, cruzando-se os compostos contemplados pela *WHO* e *FAO*, uma vez que a portaria 36/GM/90/ MS ainda não contempla esses compostos. De tal inventário foram selecionados um total de 06 pesticidas sendo, do grupo dos carbamatos o aldicarb, carbaryl e carbofuran, do grupo das triazinas a simazina e atrazina; do grupo das nitroanilina o trifluralin.

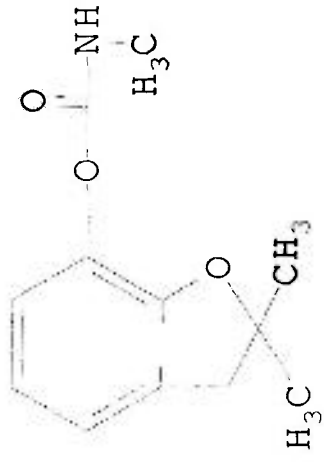
A Tabela 1 apresenta uma relação das substâncias a serem analisadas, bem como fórmula estrutural, propriedades físico-químicas, grupo pesticida a que pertence, classe, toxicidade e nível máximo aconselhado a saúde em águas de abastecimento. As substâncias citadas na Tabela 1 não estão incluídas na Portaria 36, dessa forma tomou-se como referência a *EPA*, que estipula níveis máximos de concentrações aconselhado a saúde em águas de abastecimento e a *EEA*, que fixa o valor de $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ para pesticidas individuais ou $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ para pesticidas totais em água de abastecimento (BARCELÓ, 1993).

Tabela 1. Características físico-químicas dos pesticidas estudados (HAYES, 1997; TOMLIN, 1997).

Composto	Fórmula Estrutural	Propriedades Físico-Químicas	Grupo Pesticida	Classe*	Toxicidade	NM
Aldicarb		<p>Nome: 2-metil-2(metilil)-propionaldeído O-metilcarbamatoioxima F.M. = $C_7H_{14}N_2O_2S$ M.M. = 190,3 Cristal Branco de P.F = 100°C Maior solubilidade em cloroformo e benzeno e solubilidade em água 4,93 gL⁻¹. Estável em condições normais e se decompõe a temp. acima de 100°C. Forma produtos de transformação oxidando para aldicarb sulfoxido e sulfona. λ de absorção máximo = 200, 220, 247 nm Nome Comercial: Temik e Sanacarb</p>	Carbamato	A, I, N	Inibe a Acetilcolinesterase	
Atrazina		<p>Nome: 6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina F.M. = C_8N_4ClN, M.M. = 215,7 Cristal colorido de P.F = 176°C Solubilidade em água 30 mgL⁻¹ a 20°C, metanol 18mg/l e cloroformo 52 mgL⁻¹ Estável em meio neutro, levemente ácido ou básico. Hidrolisa em alcali ou ácidos minerais. Este composto é sensível a luz e altas temperaturas. λ de absorção máximo = 222, 263 nm Nome Comercial: Gesaprin, Primagran, Mebazine</p>	Triazina	H	Possível causador de câncer	
Carbaryl		<p>Nome: 1-naftil-N-metilcarbamato F.M. = $C_{12}H_{11}NO_2$ M.M. = 201,2 Sólido branco de P.F = 142°C Solubilidade em água 40 mgL⁻¹. Moderadamente solúvel em solventes orgânicos polares (dimetilformaldeído, acetona) e pouco solúvel em hexanometanol e benzeno. Estável em condições normais de temperatura e pressão e rapidamente hidrolisado em pH>10 λ de absorção máximo = 220, 270 nm Nome Comercial: Sevin, Carbarneec, Dicarbarn</p>	Carbamato	I	Inibe a Acetilcolinesterase	

Nome: 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato
 F.M. = $C_{12}H_{15}NO_3$
 M.M. = 221,3

Sólido branco cristalino de P.F. = 153,5°C
 A solubilidade do carbofuran (m/m) a 25°C é 0,07% em água, 4% em benzeno ou etanol, 14% em acetona, 15% em acetona e 27% em dimetilformamida. Sua solubilidade é menos que 1% em xileno e éter de petróleo.
 Instável em condições alcalinas e degrada a temperaturas acima de 130°C
 λ de absorção máximo = 200, 225, 279 nm
 Nome Comercial: Furadan

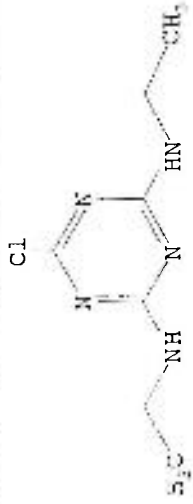


Carbofuran

Carbamato I, N
 Inibe a Acetilcolinesterase

Nome: 6-cloro-N,N'-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
 F.M. = $C_7H_{12}ClN_5$
 M.M. = 201,7

Sólido branco cristalino de P.F. = 226°C
 A solubilidade da simazina em água é de 5 mgL⁻¹ a 20°-25°C, em metanol à 400 mgL⁻¹ e éter de petróleo 2 mgL⁻¹. Simazina é estável em meio neutro ou levemente básico ou ácido. Hidrolisa em meio fortemente ácido ou básico.
 λ de absorção máximo = 223, 244, 263 nm
 Nome Comercial: Gesatop, Herbazin, Primatop

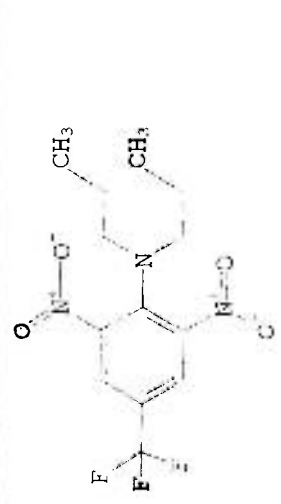


Simazina

Triazina H
 Possível causador de câncer

Nome: α, α -trifluor-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina
 F.M. = $C_{15}H_{16}F_3H_3O_4$
 M.M. = 335,3

Cristal amarelo alaranjado de P.F. = 48,5°C
 Solubilidade em água 0,221 mgL⁻¹ (pH 7), em acetona, cloroformio, acetonitrila >1000 mgL⁻¹ a 25°C. Em metanol 33 - 40 mgL⁻¹, em hezano 50 - 67 mgL⁻¹, ambos a 25°C. Estável a 52°C em pH 3, pH 6, pH 9. λ de absorção máximo = 211, 233 nm
 Nome Comercial: Acert, Treflan, Trifluran



Trifluralin

Nitroanilina H
 Atua na divisão celular

*A = Acaricida, H = Herbicida, I = Inseticida, N = Nematicida
 **NMMAS (Nível Máximo Aconselhado a Saúde)

F.M. = fórmula molecular M.M. = massa molecular
 P.F. = ponto de fusão λ = comprimento de onda

2.4. CLASSIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS

O termo pesticida é definido, pela FAO como qualquer substância ou mistura de substância utilizada para prevenir, destruir ou controlar pragas incluindo vetores que transmitem doenças em humanos e animais. Estes compostos, podem ser utilizados em animais para controle de insetos, aracnídeos e outras pestes no seu corpo.

Os pesticidas podem ser classificados de várias maneiras, de acordo com:

- a peste alvo de destruição, por exemplo, inseticida, herbicida, fungicida, e outros;
- a classe química, por exemplo, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, nitrofenóis e outros;
- o grau ou tipo de prejuízos a saúde (OMS, 1995) (KOH, 1996).

Outro tipo de classificação proposta, relaciona às propriedades funcionais e química dos pesticidas. A estabilidade ou persistência do composto no ambiente é outro fator de importância, como visto anteriormente. Este termo é definido como o tempo requerido para que 75 a 100% do composto seja eliminado do ambiente após a aplicação.

Os pesticidas organoclorados são caracterizados pela presença, na maioria, de átomos de carbono, cloro, hidrogênio e algumas vezes oxigênio em sua estrutura. Estes compostos são apolares, lipossolúveis (acumulam-se no organismo) e são estáveis no meio ambiente (2 a 5 anos). O principal efeito adverso da presença dos organoclorados têm sido sua ação na formação da casca do ovo de algumas espécies de aves, afetando sua reprodução e prejudicado a cadeia alimentar. Utilizados como herbicidas e germicidas, na década de 70, estas substâncias causaram sérios danos à saúde, como má formação do feto e danos cerebrais. Hoje, estão proibidos para uso agrícola praticamente em todo o mundo, tendo exceção somente para uso em campanhas de saúde pública. Exemplo: DDT (diclorodifeniltricloroetano), BHC (hexaclorobenzeno), heptaclor, aldrin, dieldrin, eldrin, clordan, e outros (HAYES, 1997).

Os pesticidas organofosforados são na maioria ésteres dos ácidos fosfóricos e fosfônicos ou derivados dos ácidos tianofosfórico e ditilfosfórico. Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: sistêmicos, inseticidas que penetram nos vegetais, circulam

na seiva e envenenam qualquer inseto que se alimenta da planta, dentre estes, o paration e o malation são os mais conhecidos. Entre os não sistêmicos, que atingem somente a superfície do vegetal - estão o dimeton, edotion e dimefox. Os organofosforados são altamente tóxicos a saúde pois inibem a enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina, transmissor químico ligado ao sistema nervoso central. Estas substâncias por serem hidrofílicas são degradadas e rapidamente eliminadas do meio ambiente (persistência de 1 a 18 meses) e não se acumulam no organismo. A maioria destas substâncias estão proibidas ao uso (HAYES, 1997).

Os carbamatos são ésteres que possuem como estrutura comum: $R-O-C(O)-N-(CH_3)-R'$ ou $R-S-C(O)-N(CH_3)-R'$, onde R é um álcool, oxima, ou fenol e R' hidrogênio ou grupo metila (Ex: aldicarb, carbaryl, carbofuran, metomil, oxamil). Estes compostos inibem a acetilcolinesterase em insetos e mamíferos, que absorvem via dérmica ou oral, não acumulam-se no organismo e são eliminadas pelo meio ambiente (persistência moderada de 1 a 18 meses). Existem outros carbamatos que não inibem a acetilcolinesterase em grau significativo, sendo utilizados como herbicidas e fungicidas (HAYES, 1997).

Os piretróides são ésteres dos ácidos cristêmicos e pirético, possuem baixa toxicidade aos mamíferos apesar de sua eficácia no combate a insetos (Ex: deltametrina e permetrina) são compostos não persistentes, degradados em 1 a 12 semanas.

Além destes grupos de pesticidas citados acima, existe uma variedade de herbicidas que estão sendo largamente utilizados, pois possuem baixa toxicidade aos mamíferos, mas que estão presentes no meio ambiente contaminado, principalmente, as águas. Dentre estes encontram-se: anilidas, coumarin, diazinas, nitrilas, nitroanilinas, fenilureas, triazinas, uracilas e outros.

As triazinas estão entre os herbicidas mais usados na agricultura em todo o mundo. Eles são aplicados em plantações em crescimento, bem como diretamente no solo. Apresentam alta toxicidade ao fitoplâncton, pois inibem a reação de Hill, responsável pela fotossíntese em vegetais, ocorrendo decréscimo na taxa de fotossíntese, atingindo populações de peixes e crustáceos, que alimentam-se destes (HANES, 1997). Estas substâncias são degradadas por processos químicos ou biológicos tendo baixa toxicidade a mamíferos. Sua estrutura é composta de três nitrogênios e três carbonos arranjados

sistematicamente no anel aromático, ocorrendo as substituições nas posições 2 (mais comum cloro, metoxil, metilíol), 4 e 6 (grupo amino). atrazina, cianazina, propazina e simazina são os compostos mais utilizados (HAYES, 1997).

A toxicidade é a propriedade dos agentes tóxicos de promoverem efeitos nocivos as estruturas biológicas, através de interações físico-químicas. A Tabela 2 apresenta a classe, os valores de LD_{50} e tipo de plantação para cada defensivo agrícola, estudado neste trabalho. A OMS classifica os pesticidas dividindo-os em 5 classe de acordo com os níveis de intoxicação, quando administrados para ratos via oral (LD_{50} – concentração nominal que mata 50% dos organismos expostos) (OMS, 1995) (HATRIK, 1996)

Tabela 2. Classificação dos pesticidas quanto a toxicidade (OMS, 1995; HATRIK, 1996);

PESTICIDAS	CLASSE	LD_{50} p/ratos (mg.Kg ⁻¹)	PLANTACÕES
Aldicarb	Ia	0,46-1,23	algodão, beterraba, batata, cenoura, café, cana, milho, cebola, alho poró, vegetais, morango, soja
Atrazina	III	1900-3000	milho, rosas, cana, beterraba, framboesa, morango, trigo
Carbaryl	II	233-850	algodão, maçã, amendoim, soja, arroz, batata, vegetais e frutas em geral, morango, banana
Carbofuran	Ib	5,3-13,2	algodão, arroz, café, milho, cenoura, batata, repolho, soja, fumo, cítricos, banana, morango
Simazina	III+	>5.000	feijão, maçã, pêra, morango, aspargo, soja, tomate, milho, beterraba, café, trigo, cana, cítricos
Trifluralin	III+	>5.000	feijão, cana, cenoura, verduras, cítricas, soja, cebola, alho, tomate, morango, beterraba

Ia Extremamente prejudicial, Ib Altamente prejudicial, II Moderadamente prejudicial, III Levemente prejudicial, III+ Inexistência de prejuízos em usos normais.

Alguns dos compostos citados na Tabela 2 como atrazina, simazina e trifluralin, apesar de apresentarem baixa toxicidade a mamíferos encontram-se na “lista negra” divulgada pela *EEA* como poluentes perigosos, devido suas propriedades de persistência no meio ambiente (2 a 5 anos) e as quantidades utilizadas na agricultura (BARCELÓ, 1993).

O composto trifluralin, do grupo das nitroanilinas, característico pela presença de grupos nitro, bastante reativo, possui baixa toxicidade a mamíferos (Tabela 2). Em baixas doses do composto, administrada a ratos, verificou-se a formação de cálculo renal. Este composto tem sido utilizado como um poderoso herbicida, inibindo a divisão celular das plantas, impedindo o seu crescimento (TOMLIN, 1997).

Dos prejuízos ao ecossistema decorrente da presença dos pesticidas no meio ambiente e o aumento no número de casos de intoxicações, principalmente no Brasil, através da utilização inadequada e do contato diário da população com águas e alimentos contaminados, surge a importância de desenvolver metodologias analíticas, cada vez mais exatas e sensíveis para determinação destes poluentes.

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PESTICIDAS

As técnicas analíticas instrumentais recomendáveis para a determinação de pesticidas são: a cromatografia gasosa (*GC*) com detecções: captura eletrônica (*GC-ECD electron capture detector*), nitrogênio - fósforo (*GC-NPD nitrogen phosphorus detector*), fotométrico de chama (*GC-FPD flame photometric detector*), espectrometria de massas (*GC-MS mass spectrometer*) e *HPLC* acoplado a detetores ultravioleta visível (*UV/vis*), fluorescência (*FL*) ou espectrometria de massas (*MS*).

A cromatografia permite separar os componentes de uma mistura de compostos químicos. A amostra é distribuída entre duas fases, estacionária e móvel, de tal forma que cada um dos componentes da mistura seja seletivamente retido pela fase estacionária. A separação é geralmente realizada em coluna tubular preenchida com material poroso finamente dividido, o qual pode atuar como fase estacionária propriamente dita ou como suporte de uma fase estacionária. A fase móvel, líquida ou gasosa, flui através do material

da coluna arrastando os componentes da amostra que são seletivamente eluídos. O fluxo da fase móvel se mantém constante durante todo o processo, garantindo que cada componente da amostra seja eluído da coluna como um composto puro, dissolvido na fase.

A Tabela 3, a seguir, relaciona as principais técnicas, segundo métodos propostos pela *EPA - National Pesticide Survey (NPS)* e *United Kingdom Standing Committee of Analyts (SCA)*, para a determinação de pesticidas em águas superficiais e de abastecimento (BARCELÓ, 1993).

Tabela 3. Técnicas analíticas aplicadas na análise de grupos pesticidas em águas.

Classe Pesticida	GC			HPLC		
	NPD	FPD	ECD	MS	UV	FL
Organoclorados	---	---	X ⊙	X	---	---
Organofosforados	X	⊙	---	---	X	---
Carbamatos	---	---	---	---	⊙	X
Triazinas	X ⊙	---	X	X	⊙ X	---
Piretróides	---	---	⊙	X ⊙	---	---
Nitroanilinas	---	---	X	X	---	---

X (*EPA-NPS*)

⊙ (*SCA*)

Com relação aos métodos propostos por organizações oficiais (Tabela 3), algumas considerações podem ser feitas: os métodos da *EPA-NPS* utilizam tanto a técnica de cromatografia a gás quanto a líquida (Método 4 e 5 *NPS* e *EPA* 531.1, 547, 548), alguns empregam a extração líquido - sólido (*EPA* 548, 549, 525) em substituição à extração líquido-líquido. A maioria dos métodos da *SCA* aplicam a *GC*, com exceção na determinação de carbamatos e triazinas; todos os métodos aplicam a extração líquido - líquido (BARCELÓ, 1993). Alguns desses métodos oficiais, que forneceram formações importantes para o desenvolvimento deste trabalho, foram revisados e serão descritos mais adiante (item 2.6.1).

Em alguns casos é difícil fazer uma escolha entre as técnicas de cromatografia a gás ou a líquida para análise destes compostos, em geral, o método que oferecer menor manipulação da amostra, boa sensibilidade, baixo custo e rapidez é o preferido.

A técnica de *HPLC* para análise dos pesticidas termicamente lábeis (carbamatos) e polares, incluindo seus produtos de transformação, tem oferecido melhores resultados que a *GC*. A análise destes compostos por *GC* apresenta alguns inconvenientes, pois os picos detectados podem não corresponder ao analito analisado e sim a seu produto de degradação, formado no injetor do cromatógrafo, no qual se aplica altas temperaturas para volatilizar a amostra.

A principal vantagem da cromatografia a líquido sobre a gás é que amostras aquosas podem ser injetadas diretamente no cromatógrafo, onde sistemas de programação da fase móvel e colunas de fase reversa (otimizados) permitem uma separação eficaz de todos os compostos pesticidas presentes.

LISKA & SLOBODNÍK (1996) descreveram as aplicações da cromatografia gasosa e líquida na determinação dos grupos de pesticidas em amostras de águas. Os grupos de pesticidas carbamatos, fenilureas, triazinas, clorofenos e ácidos fenoxialcalóides foram estudados com maior atenção. Comparações entre as duas técnicas são detalhadas em nível de separação e detecção para cada grupo de pesticida mencionado.

HATRÍK & TEKEL (1996) discutiram as vantagens e desvantagens da cromatografia gasosa e líquida na determinação de resíduos de herbicidas, inseticidas, alguns fungicidas e seus produtos de transformação em vários tipos de amostras de águas. As metodologias de extração e purificação das amostras foram discutidas detalhadamente.

A *HPLC* apresenta alta sensibilidade e seletividade quando acoplada à detectores como: *UV/vis*, *FL* e *MS*. O detector *UV/vis* possui boa sensibilidade para compostos com alta absorvidade molar, como os carbamatos, triazinas (Tabela 1) e organosfosforados. Uma modificação nos espectrofotômetros *UV/vis*, possibilitou fornecer informações espectrais do composto detectado. Este detector, conhecido como *UV/DAD* (Diode Array Detector), tem a capacidade de detectar concentrações baixas dos analitos e simultaneamente identificá-los, através dos seus espectros de absorbância – varredura de comprimento de onda. Os espectros são propriedades características de cada composto, evitando, assim, “falsos positivos”. O detector *UV/DAD* é mais suscetível a interferências quando comparado à detectores de espectrometria de massas.

O detector de *FL* tem sido utilizado para análise de carbamatos (*Método 5 NPS e EPA 531,1*) e glicofosfatos (*EPA 547*) (BARCELÓ, 1993). Esta detecção é extremamente específica para estes compostos, que após serem separados da coluna, reagem com NaOH hidrolizando a metilamina e subseqüentemente, reagindo com o-ftaldeído (*OPA o-phthaldeyde*) e 2-mercaptoetanol (*2-mercaptoethanol*) para formação do composto fluorescente (1-hidroxiletiltiol-2-metilisoindole), com excitação em 340 nm e emissão em 455 nm (BLAB, 1991; KOK, 1992; CHIRON, 1993).

O detector de *MS* acoplado a *HPLC*, via interface *thermo eletonspray* ou ionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization*), está sendo muito utilizado para análise de compostos pesticidas (CHIRON, 1993a; BARCELÓ, 1993b; EISER, 1995; SENNERT, 1995). Este detector fornece um espectro de massas característico e correspondente a cada composto, identificando e confirmando sua presença na amostra injetada. No entanto, a utilização deste detector é limitada devido ao custo elevado e dificuldades de operação.

Outro fator importante na determinação de pesticidas em águas são os procedimentos de extração e pré – concentração da amostra. Os métodos mais utilizados são *LLE*, *SPE* e mais recentemente, *SPME* (Microextração em Fase Sólida).

Em geral, os métodos de *LLE* consistem em extrair os compostos orgânicos da fase aquosa utilizando uma porção de solvente orgânico imiscível (diclorometano, dietil-éter, clorofórmio, acetato de etila, éter de petróleo, etc) sob agitação mecânica ou manual, em funis de separação. O extrato obtido passa através de filtro contendo sulfato de sódio, para remoção da água, e em seguida é evaporado em rotaevaporadores, Kuderna -Danish ou com corrente de gás inerte. O resíduo é dissolvido com solvente orgânico (metanol, acetonitrila) para posterior análise em cromatógrafos.

Os métodos de *SPE* apresentam algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais de *LLE* dentre estas: redução no manuseio e volume de amostra; redução no consumo e contato com solventes orgânicos; melhor eliminação de emulsões e interferentes; menor riscos de contaminação da amostra; maior número de parâmetros podem ser ajustados para obtenção de melhor eficiência de extração; fácil automação e custo relativamente baixo (HENNION, 1993).

Este método consiste em: ativar o material (sílica, C₁₈, C₈, CN, NH₂, carbono grafite, resinas de polímeros...) que preenche a coluna ou a membrana de *SPE*, com poucos mililitros de um solvente orgânico, percolar a amostra (de água) na fase estacionária, onde os componentes são retidos por afinidade e extrair os compostos de interesse com poucos mililitros de solvente orgânico. Em seguida, o extrato é evaporado, diluído e analisado no sistema cromatográfico.

A *SPE* pode ser facilmente adaptada *on-line* (em série) em sistema automatizado de *HPLC*. Este sistema acoplado a pré - colunas de *SPE* tem mostrado vantagem adicional nas análises de pesticidas como: perdas da amostra por manuseio excessivo e difícil contaminação da amostra por interferentes. Na técnica de *SPE on-line*, materiais de diferentes empacotamentos têm sido empregados como pré - colunas ou membranas (C₈ e C₁₈), isoladas (*off-line*) ou em série nos sistemas cromatográficos (*on-line*). Através da *SPE on-line* com a *HPLC*, as amostras de água podem ser analisadas diretamente no sistema, que irá extrair, concentrar, separar e detectar os compostos pesticidas em uma única injeção (*EPA 531.1*) (BARCELÓ, 1993; CHIRON, 1993; CHIRON; 1993a; SENNERT, 1995).

FONT et al. (1993) descreveram os mecanismos da *SPE*, tipo de materiais empregados, interferentes, além de citar alguns trabalhos, na determinação de resíduos de pesticidas em águas.

BIZIUK et al. (1996) estudaram os procedimentos de extração de pesticidas em águas naturais e tratadas. Os métodos de *SPE* em colunas e em sistemas de filtração, utilizando membranas foram detalhadamente descritos.

A *SPME*, em síntese, consiste em extrair compostos orgânicos de uma amostra líquida ou gasosa (*headspace*), utilizando fibras de sílica fundida de aproximadamente 1 cm de comprimento (semelhantes as colunas capilares de *GC*), cobertas com adsorventes poliméricos de polidimetilsiloxano (*PDMS*) ou poliacrilato (*PA*), entre outros. A fibra é colocada em contato por alguns minutos, com amostra líquida (5 a 20 mL) ou em *headspace* estático ou dinâmico, após a adsorção dos compostos a fibra é introduzida diretamente no injetor do *GC*, onde os compostos são termodesorvidos e analisados. Mais

detalhes sobre os mecanismos de *SPME* foram descritos por PAWLISZYN (1990). Em 1995, PAWLISZYN et al. (1995) viabilizaram a *SPME* para aplicação em sistemas de *HPLC*. As principais vantagens desta técnica são: a não utilização de solventes orgânicos e a extração e concentração simultânea dos compostos. JINNO et al. (1996) otimizaram a técnica de *SPME* em conjunto com *HPLC UV/vis*, para determinação de alguns pesticidas em amostras de águas de rios, localizados no Japão.

2.6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.6.1. Métodos Oficiais

O Método 4 NPS (*National Pesticide Survey*) é específico para análises de algumas triazinas e carbamatos utilizando *HPLC* com detecção *UV/vis* a 254 nm. Neste método, a *LLE* é aplicada em 1 L de amostra de água, através de agitação mecânica ou manual utilizando diclorometano como solvente extrator. O extrato é isolado, tratado com sulfato de sódio, evaporado e concentrado a um volume de 5 mL após substituir o solvente por metanol. A separação e quantificação das substâncias ocorre em coluna primária de fase reversa C_{18} . Uma segunda coluna de fase normal *CN* é utilizada para confirmação dos picos identificados. Ambas as colunas são de dimensões 250 mm x 4,6 mm ID. O limite de detecção do método está entre 0,06 a 1,00 μgL^{-1} (MUNCH, 1990).

O Método 531.1 proposto pela *EPA* determina carbamatos e seus produtos de transformação (aldicarb sulfoxido e sulfona) em águas por injeção direta. A amostra é pré-concentrada em membranas de *SPE* (C_{18}) *on-line* com o sistema de *HPLC*, que realiza a separação dos componentes em coluna C_8 de fase reversa, seguida de reação pós-coluna com os reagentes o-ftaldeído (*OPA*) e 2-mercaptoetanol e detecção fluorimétrica. Os limites de detecção estão na faixa de 5 a 40 ηgL^{-1} (BARCELÓ, 1993; CHIRON, 1993).

O Método 5 NPS, recomenda a injeção direta da amostra de água (400 μL) no sistema de *HPLC* com derivatização pós-coluna (*OPA* e 2-mercaptoetanol) e detecção por fluorescência para análise de carbamatos e seus produtos de transformação. A separação

dos compostos ocorre em coluna de fase reversa (C_{18}), aplicando uma programação de gradiente de eluição para fase móvel. Uma segunda coluna de fase normal (apolar) é utilizada para confirmação dos picos. O limite de detecção do método é da ordem de $2,0 \mu\text{gL}^{-1}$ e a recuperação da extração de 90 a 100% (MUCH, 1990).

O *Standard Methods for Analysis of Water and Wastewater* (STANDARD METHODS, 1997) propôs um método semelhante ao *Método 5 NPS*. O procedimento de análise de carbamatos por injeção direta no *HPLC* é descrito com detalhes. A separação dos compostos é realizada, com tempo de 15 min., em coluna de fase reversa C_{18} (150 x 4,6 mm), aplicando um gradiente de eluição metanol – água. Uma coluna secundária de fase normal (CN) é utilizada para confirmação dos picos. A detecção é procedida conforme o *Método 5 NPS* descrito, anteriormente. Segundo o procedimento citado, as amostras devem ser coletadas e preservadas em pH 3, adicionando uma solução tampão de acetato de potássio/ácido monocloroacético 2,5 M e mantidas a 4°C . Nestas condições recomenda-se que a análise seja feita em 28 dias.

O método proposto pela *SCA* para determinação de pesticidas carbamatos em amostras de água envolve *LLE* com diclorometano em meio ácido, seguida de evaporação, retomando a amostra em acetonitrila ou metanol, onde $20 \mu\text{L}$ são injetados no sistema de cromatografia líquida, com separação em coluna de fase reversa e detecção no *UV* à 220 nm . O limite de detecção do método está entre $0,02$ e $0,08 \mu\text{gL}^{-1}$. Outro método aplicado pela *SCA* é a determinação de triazinas por *LLE* com uma mistura de diclorometano – etilacetato, contendo $0,2 \text{ M}$ de formiato de amônio. Depois de concentrada, a amostra é injetada no sistema de *HPLC*, com separação em coluna de fase reversa. As substâncias são detectadas no *UV/DAD* (BARCELÓ, 1993).

2.6.2. Extração Líquido - Líquido (*LLE*)

FREI et al. (1974) foram os primeiros a determinar carbamatos em águas, através de *LLE* com diclorometano e análise por *HPLC* em coluna de fase reversa, com detecção por fluorescência.

SPARCINO & HINES (1976) analisaram uma mistura contendo mais de 30 carbamatos, em concentrações na faixa de 0.5 a 1.0 mgL⁻¹ pela técnica de *HPLC* acoplada a um detector *UV/vis*. Estudaram vários parâmetros da técnica para a análise destas substâncias e concluíram que a separação mais eficiente ocorre em coluna de fase reversa (C₁₈) com programação para os solventes acetonitrila e água e detecção entre 190 e 220 nm.

EDGEELL et al. (1992) propuseram uma parceria entre a *EPA* e a *AOAC International*, realizando um estudo analítico, aplicando o *Método 4 NPS* na determinação de pesticidas em águas de abastecimento. Dez laboratórios voluntários analisaram águas ultrapuras e de abastecimento fortificadas com 18 pesticidas e seus metabólitos em seis níveis de concentração, preparadas em triplicata. Os resultados foram analisados, utilizando um programa estatístico fornecido pela *EPA*, que calculou a recuperação e a precisão para cada um dos 18 analitos, comparando a performance do método para cada tipo de água.

BARCELÓ et al. (1992) analisaram atrazina, simazina e trifluralin em concentrações de 2.5 µg.L⁻¹ por *HPLC/UV-DAD* em amostras de águas, realizando *LLE* com diclorometano em meio ácido, obtendo recuperações de 100, 90 e 85%, respectivamente. Estes compostos foram detectados nos rios da Espanha, na ordem de ng.L⁻¹.

2.6.3. Extração Líquido - Sólido (*SPE*)

Um dos primeiros trabalhos, utilizando *SPE off-line* em coluna XAD-4 (resina de estireno-divinilbenzeno) em conjunto com *HPLC* em fase reversa e detecção *UV/vis*, para determinação de carbamatos em águas de chuva e de lagos foi realizado por Brun & Macdonald em 1980 (BRUN & MACDONALD, 1980). BUSHWAY (1981), aplicou a *SPE off-line* com coluna C₁₈, também para análise de carbamatos, utilizando *HPLC/UV*. Em ambos os casos a eficiência de extração dos compostos (recuperação) foi acima de 70%.

DI CORCIA et al. (1987) desenvolveram um método simples, rápido e sensível para quantificação de traços de atrazina e simazina em água. Para tanto, 250 mL da amostra foram extraídas por *SPE* em coluna (6 cm) de carbono grafite (50 mg), onde os compostos foram eluídos com apenas 700 μL de diclorometano-metanol (60:40 v/v). O procedimento de extração ótimo foi alcançado após estudos variando, o volume de amostra, o volume de metanol utilizado na etapa de lavagem da coluna (*clean-up*), fluxo de extração, temperatura de evaporação do solvente e concentração dos analitos. Os compostos foram separados por *HPLC* em coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm ID 5 μm), com programação isocrática, utilizando como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato (5 mmolL^{-1} ; pH 7). A detecção foi em *UV/vis* à 220 nm. Na concentração de 50 ngL^{-1} a recuperação dos compostos foi acima de 95 %. Os autores também verificaram, que após a extração, as colunas podem ser armazenadas a temperatura ambiente, conservando os compostos durante 15 dias.

JUNK & RICHARD (1988) verificaram a eficiência do método de *SPE* para diferentes compostos pesticidas (atrazina, trifluralin, carbaryl, carbofuran e outros). Adicionaram concentrações conhecidas, de 0,1 ngmL^{-1} , para cada composto em 100 mL de água, passando a amostra, através de uma pequena coluna de *SPE* contendo 100 mg de sílica ligada a C_{18} , a um fluxo constante. O extrato obtido foi analisado por *GC-ECD*, obtendo recuperações acima de 85% (recuperações altas também foram obtidas em águas naturais). Os autores comparam o método de extração aplicado, com outro trabalho que utilizou colunas de *SPE XAD-2* (estirenodivinilbenzeno). O método proposto, também foi aplicado para extração *PAH* (compostos hidrocarbonetos poliaromáticos), oferecendo uma ótima alternativa para análise destes compostos em águas.

MARVIN et al. (1990) publicaram um método para determinação de carbamatos em amostras de água. O procedimento consiste em extrair os compostos a partir de 100 mL de amostra, via *SPE* em coluna C_{18} (330 mg) e injeção do extrato no sistema de *HPLC*. A separação dos compostos ocorreu em coluna de fase reversa C_8 (250 x 4,6 mm ID), aplicando um gradiente de eluição (acetonitrila-água) com tempo de duração de 30 min. Os compostos obtiveram uma alta sensibilidade (20 a 300 μgL^{-1}) à 220 nm. carbofuran e

carbaryl apresentaram recuperações de 91 e 93 % em concentrações de 4,35 e 0,42 μgL^{-1} , respectivamente.

JOHNSON et al. (1991) extraíram 13 compostos pesticidas, incluindo atrazina, simazina e trifluralin em amostras de água, utilizando *SPE off-line* em cartuchos C_{18} . Os compostos foram separados e detectados por *GC-MS*. As soluções aquosas foram preparadas contendo quantidades conhecidas dos pesticidas, em presença de material orgânico dissolvido (*MOD*) a concentração de 10 mg de ácido húmico por litro de amostra. A eficiência da *LLE* e *SPE* foram comparadas em presença deste interferente. Notou-se um decréscimo de aproximadamente 25 % na recuperação dos compostos utilizando *SPE*, para águas contendo alta concentração de *MOD*.

SCHELTT (1991) descreveu um método eficiente para análise simultânea de 30 compostos pesticidas de diferentes classes ou grupos em águas de abastecimento e superficiais (análise multiresíduos de pesticidas). Este método, que quantifica os compostos em concentrações abaixo de 0,05 μgL^{-1} , utiliza *SPE off-line* em coluna C_{18} (3 g) e *HPLC/UV-DAD*. Uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm), utilizando um gradiente de eluição (acetonitrila/acetato de sódio 0,002M) foi aplicado para separar os 30 compostos em 70 min. O espectro de absorção de cada composto foi fornecido pelo detector. A absorção máxima nos comprimentos de onda, 220, 223 e 211 nm foram obtidas para os compostos atrazina, simazina e trifluralin, respectivamente.

DI CORCIA & MARCHETTI (1992) desenvolveram um método aplicando a *SPE* para a extração de pesticidas em águas de abastecimento. Oitenta e nove defensivos agrícolas, incluindo carbamatos, triazinas e nitroanilinas foram adicionados em quantidades conhecidas em amostras de águas subterrâneas, de superfície e de abastecimento. As substâncias foram extraídas em coluna contendo 300mg de carbono grafite e analisadas por *HPLC* com detecção *UV/vis*, utilizando para separação colunas de fase reversa (C_{18}) e de fase normal (CN). Estudos de recuperação das substâncias foram realizados para verificar a eficiência do método de extração. Com a utilização da cromatografia líquida como técnica analítica foram obtidos baixos limites de detecção ($<0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$).

KOK et al. (1992) utilizaram a *HPLC* com coluna de fase reversa e detecção *FL* com reação pós - coluna para determinação de 12 N-metilcarbamatos e seus principais metabólitos. Diferentes materiais utilizados na *SPE* (C_8 , C_{18} , C_{18} com grupos OH livres) foram comparados, aplicando de 50 a 100 mL de amostra. A *LLE* com diclorometano e 250 mL também foi aplicada para fins de comparação. Os melhores resultados, ou seja, as melhores recuperações foram observadas para *SPE* C_{18}/OH , acima de 80 % em concentrações de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os limites de detecção foram da ordem de 20 a 30 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

BALINOVA (1993) propôs um método analítico para determinação de herbicidas em águas de abastecimento baseado em *SPE*, utilizando colunas preenchidas com material C_{18} (500 mg) e determinação por *HPLC UV/vis*. Onze componentes foram separados em coluna de fase reversa em apenas 12 min. Para atrazina e simazina foram obtidos limites de detecção na ordem de 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e recuperações acima de 90%.

BARCELÓ et al. (1993a) utilizaram um sistema simples de filtração “Millipore” com membrana de 47 mm de diâmetro por 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sílica ligada a C_{18} , para extração de traços de pesticidas (triazinas, carbamatos, organofosforados) em águas naturais de rio e amostras simuladas (adição de concentrações conhecidas de analitos) de água do mar. Para determinação das substâncias utilizou-se a técnica de *HPLC* acoplada a um detetor *UV/vis* e um segundo detetor de *MS* para evitar identificações errôneas dos picos das substâncias separadas. A separação dos compostos ocorreu em coluna de fase reversa (C_{18}), aplicando uma programação de gradiente para fase móvel, acetonitrila, metanol e água. O método analítico, proposto neste trabalho mostrou-se eficiente, sensível e versátil, pois obteve alta recuperação dos pesticidas na extração, baixos limites de detecção (0,01 a 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e pode ser aplicado em diversas matrizes de água.

CHIRON & BARCELÓ (1993) analisaram carbamatos, seus produtos de transformação e alguns herbicidas em águas de abastecimento utilizando um sistema de membranas ou discos de *SPE on-line* com um cromatógrafo líquido e detecção *UV/vis*. Uma comparação analítica foi realizada entre detecção *UV/vis* e *FL* com derivatização pós - coluna. Estudos de volumes de *breakthrough*, volume de amostra e fluxo de extração

foram realizados. Nota-se maior sensibilidade dos compostos carbamatos com detecção fluorimétrica.

Em outro trabalho, CHIRON et al (1993a) realizaram um estudo comparativo entre os seguintes métodos, *SPE* utilizando sistemas de extração em membrana (C_{18} e estirenodivinilbenzeno) *on-line* com a técnica de *HPLC* com detecção *UV/vis*, *FL* e *MS*. A *LLE* com diclorometano, referenciada em (BARCELÓ, 1992) também foi realizada e comparada. 30 compostos pesticidas, incluindo carbamatos e triazinas, foram separados por coluna de fase reversa, aplicando um gradiente de eluição acetonitrila, metanol e água.

MACGARVEY (1993) citou mais de 100 trabalhos que aplicaram a *HPLC* para determinação de N-metilcarbamatos em diversas amostras ambientais (águas, solos, vegetais e ar). Foram feitas considerações quanto os métodos de extração, clean-up, separação cromatográfica e técnicas de detecção.

PARRILLA et al. (1994) analisaram 21 compostos pesticidas em águas de abastecimento, subterrâneas e marinha, da região da Espanha. Para a determinação utilizaram *SPE off-line* C_{18} (360 mg) e *HPLC* com detecção *UV/DAD*. Os autores estudaram, a adsorção, a eluição e os níveis de recuperação do compostos, extraíndo 400 mL da amostra contendo $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada substância. Também descreveram, com detalhes, a otimização de separação dos compostos em coluna de fase reversa C_{18} (150 x 3,0 mm ID 5 μm). Os compostos foram monitorados a 212, 220, 250 e 350 nm.

VITALI et al. (1994) desenvolveram um método de análise rápido e seletivo para determinação de triazinas e dinitroanilinas em amostras de água natural, sugerindo *SPE off-line*, através de preliminar absorção em cartucho C_{18} e em seguida realizando a separação em *HPLC*, com coluna de fase reversa, utilizando acetonitrila e água como fase móvel e detecção *UV/DAD*. Os limites de detecção do método para atrazina, simazina e trifluralin foram 0,05, 0,03 e 0,14 μgL^{-1} , respectivamente. As recuperações das substâncias, em 250 mL de água natural, foram de 98,9% para atrazina, 95,1% para simazina e 67% para trifluralin, quando adicionados 1,6; 0,84 e 0,8 μgL^{-1} , respectivamente.

EISERT et al. (1995) fizeram um importante estudo comparativo para a determinação de compostos pesticidas termicamente lábeis e polares em amostras de água. Para tanto, utilizaram duas colunas de *SPE*, C_{18} e polímero de estirenodivinilbenzeno, contendo 2,0 g de cada material. 1,0 L de amostra (água ultrapura), contendo $2,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto foi extraído por ambas as colunas, nas mesmas condições experimentais. A técnica de *GC* acoplada a detectores *NPD*, *ECD*, *FID* e *AED* (*atomic emission detector*) foi comparada a *HPLC* (fase reversa) acoplada aos detectores *UV/vis* e *TPS-MS* (*thermoelctronspray mass spectrometer*). As duas técnicas apresentam suas particularidades quando aplicadas, no entanto a *HPLC* com detecção *UV/vis* em 220 nm mostrou-se eficiente na separação e detecção dos compostos aldicarb, carbofuran, carbaryl, atrazina, simazina, entre outros. Os limites de detecção obtidos foram abaixo de 1,0 ng, para os compostos citados. Para o composto trifluralin a técnica mais eficiente foi *GC-ECD*. A *SPE* com coluna C_{18} mostrou-se mais eficiente para a extração dos 30 compostos estudados.

SCHÜLEIN et al. (1995) compararam diferentes técnicas e materiais de *SPE off-line* na determinação de multiresíduos de pesticidas em águas. Amostras contendo quantidades conhecidas de pesticidas foram extraídas por colunas preenchidas com material C_{18} (1000 mg) e carbono grafite (250 mg), discos ou membranas (47 mm, 500 mg) contendo C_{18} e polímero de estirenodivinilbenzeno. Diferentes procedimentos de extração foram aplicados para pesticidas com propriedades básicas e ácidas. A técnica de *HPLC* em fase reversa, aplicando um gradiente de eluição com acetonitrila e solução tampão de acetato de amônia, separou 33 compostos pesticidas com propriedades alcalinas em apenas 70 min.. O volume de injeção foi de 20 μL . O detector *UV/DAD* a 220 nm forneceu baixos limites de detecção.

DEAN et al. (1996) avaliaram os principais métodos analíticos aplicados na determinação de triazinas em amostras ambientais, com ênfase em amostras de água. As metodologias de extração, técnicas cromatográficas, preservação e estabilidade das amostras foram discutidas. Este trabalho fornece uma vasta revisão bibliográfica de metodologias relacionadas à determinação de triazinas.

TANABE et al. (1996) aplicaram a *SPE off-line* utilizando coluna de estirenodivinilbenzeno e a técnica de *GC-MS* para determinação de herbicidas em água de rio. Um volume de 500 mL e um fluxo de 10 mLmin⁻¹ foi utilizado na *SPE*. Neste trabalho foram estudados a eficiência de extração com diferentes volumes e solventes (metanol, acetona e acetato de etila) de eluição. O volume de 6 mL de acetona apresentou melhor resultado na eluição dos compostos. Eles desenvolveram um método singular para extração dos pesticidas em partículas em suspensão.

AGUILAR et al. (1997) também utilizaram *SPE off-line* em coluna de estirenodivinilbenzeno para extração de diferentes grupos pesticidas em amostras de água do rio Ebro – Espanha. A *GC* foi utilizada para separação dos compostos. Os detectores de *ECD* e *MS* foram comparados quanto ao fator de resposta.

JIMÉNEZ et al. (1997) estudaram os principais parâmetros da *SPE off-line* em coluna de C₁₈ (500 mg) como: condicionamento da coluna, solventes de eluição, volume de solvente utilizado para eluição, influência da concentração dos analitos, volume de amostra e recuperação dos analitos em amostras de água de lagos utilizados para irrigação da lavoura. Os compostos pesticidas foram determinados por *GC ECD e NPD* e *HPLC* em coluna de fase reversa ODS (150 x 4,6 mm ID 5 µm) e detecção *UV-DAD*, onde foram estudadas a sensibilidade (limite de detecção), linearidade, exatidão e precisão das técnicas.

VASSILAKIS et al. (1998) desenvolveram um método para determinar compostos organoclorados, triazinas, carbamatos e ácidos herbicidas em águas superficiais e subterrâneas da região da Greta, Grécia. Volumes de 500 a 1000 mL de amostra foram submetidos a *SPE off-line* C₁₈ e *LLE*. As duas técnicas de extração foram comparadas. Para cada grupo pesticida analisado desenvolveu-se um procedimento de *SPE* padrão. Para análise das triazinas utilizou-se a *GC-NPD*, obtendo-se limites de detecção na ordem de 5,0 ngL⁻¹. A *HPLC/FL* com reação pós – coluna foi utilizada para determinação de carbamatos, oferecendo limites na ordem de 60 ngL⁻¹. A concentração de 0,1 µgL⁻¹, todos os compostos extraídos por *SPE*, apresentaram recuperações acima de 70 %. O composto atrazina foi detectado em amostras de água de rio na concentração de 10 ngL⁻¹.

2.6.4. Injeção Direta da Amostra

Uma das vantagens da técnica de *HPLC* na análise de pesticidas em águas, como dito anteriormente, é a injeção direta da amostra no sistema, onde uma programação de gradiente da fase móvel pode ser aplicada em conjunto com colunas de fase reversa permitindo uma separação eficaz de todos os componentes.

KISO et al. (1996) analisaram pesticidas carbamatos e triazinas em amostras de água de abastecimento por injeção direta através de um sistema de *HPLC*, acoplado a detector *UV*. Este método é simples e rápido realizando a separação das substâncias em coluna de fase reversa C_{18} (ODS) utilizando pré - coluna do mesmo material com detecção entre 220 e 250 nm. Neste trabalho estudou-se parâmetros como: tipo de solvente, composição da fase móvel, temperatura ideal de separação, limite de detecção (0.05 a 0.5 μgL^{-1}) e volume de amostra injetada.

CAPÍTULO 3

3.1. PRÍNCÍPIOS BÁSICOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

3.1.1. INTRODUÇÃO

Desde a introdução da cromatografia líquida de alta eficiência, nas décadas de 60 e 70, esta técnica analítica vêm crescendo rapidamente, atuando extensivamente em diversas aplicações, especialmente na determinação de compostos orgânicos (PCBs, pesticidas, surfactantes) em amostras ambientais.

Como resultado do desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, nas quais ocorreram significativas inovações na instrumentação e nos materiais utilizados, como as fases estacionária em métodos cromatográficos, a *HPLC* evoluiu bastante, sendo uma das técnicas mais utilizadas para a separação e quantificação de inúmeros compostos, desde metais até isômeros orgânicos, em diversas matrizes.

As análises em sistemas de *HPLC* modernos são rápidas e eficientes sendo detectados pico gramas (10^{-12} g) dos elementos ou substâncias separadas. Atualmente, poucas técnicas analíticas podem obter especificidade e confiabilidade como a *HPLC*.

A *HPLC* realizada sob pressão, utiliza colunas com enchimento, cujas partículas têm dimensão muito reduzida (3 a 10 μm). Eficaz, oferece uma grande resistência ao fluxo da fase móvel, ou seja, uma queda de pressão. Por esta razão, é necessário empregar sistemas de bombas de alta pressão, que forçam a fase móvel fluir a uma velocidade constante através da coluna, possibilitando análises rápidas.

O sistema pode operar à temperatura e pressão variável. O esquema básico de um sistema de *HPLC* é mostrado na Figura 4.

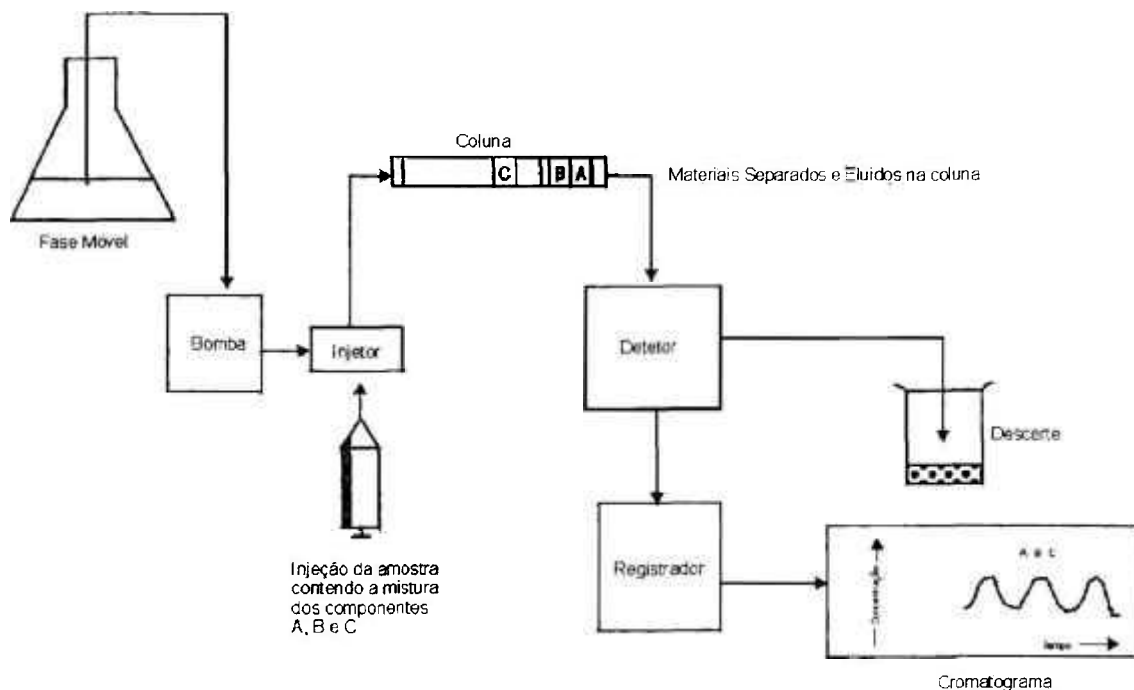


Figura 4. Esquema básico de operação de um sistema de HPLC
(BIDLINGERMEYER, 1992)

A mistura dos compostos a ser analisada é dissolvida em um solvente apropriado e introduzida, através de válvulas injetoras, na entrada da coluna cromatográfica e distribuída na mesma, por um fluxo contínuo de um solvente ou uma combinação de solventes adequada (fase móvel). A separação dos componentes da mistura é realizada por partículas adsorvedoras de grande área superficial (fase estacionária), contidas na coluna. A fase móvel (também chamada de eluente) é bombeada através da fase estacionária utilizando bombas peristálticas. Com a escolha adequada da fase móvel e da fase estacionária, os componentes da mistura terão diferentes velocidade de migração na coluna permitido, assim, suas separações. Um detector é colocado na saída da coluna proporcionando um registro contínuo do eluente, permitindo a obtenção de cromatogramas utilizados para identificar e quantificar os componentes da amostra. O cromatograma está relacionado com o tempo de retenção e o sinal proporcionado pelo detector, indicando a presença de um analito registrado na forma de um pico cromatográfico.

Existem três passos nas análises por cromatografia líquida: injeção, separação e eluição, ilustrados na Figura 5.

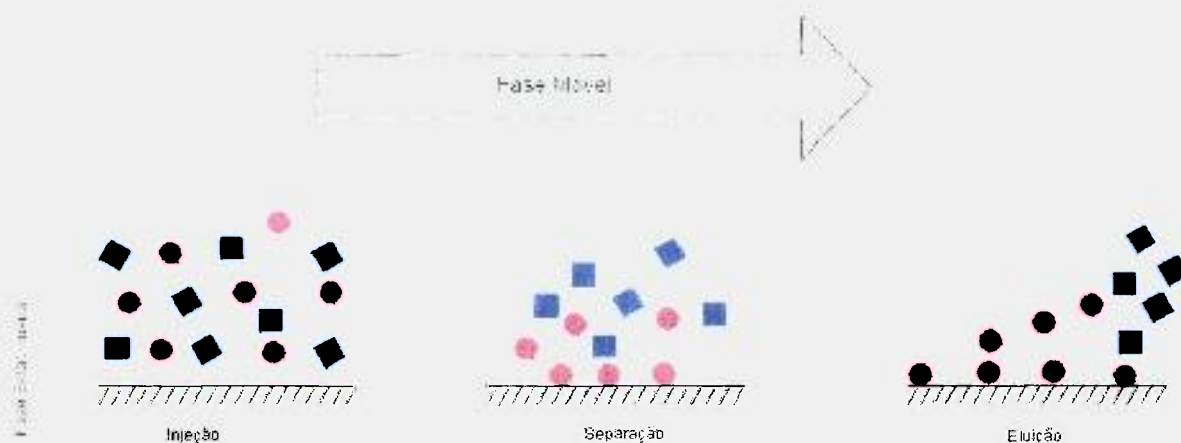


Figura 5. Processos fundamentais da cromatografia líquida (BIDLINGERMEYER, 1992)

Na injeção da amostra as substâncias presentes são misturadas à fase móvel, a migração destas substâncias, através da fase estacionária é o resultado de duas forças – o fluxo da fase móvel e a retenção exercida pela fase estacionária. As moléculas da amostra são retidas pela fase estacionária e transportadas pela fase móvel. Estas duas forças opostas são expressas, matematicamente, pela constante de distribuição entre as duas fases (característica de cada componente presente) dada por:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} \quad (3.1)$$

K_D = constante de distribuição

$[A]_s$ = concentração do analito na fase estacionária

$[A]_m$ = concentração do analito na fase móvel

A retenção de um analito em particular depende das relações soluto – soluto, soluto – fase móvel, soluto – fase estacionária, fase móvel – fase estacionária. Os tipos de interações entre o soluto e a fase estacionária envolvem: pontes de hidrogênio, forças de van der Waal's, forças eletrostáticas e forças hidrofóbicas.

Quando uma amostra é injetada na coluna de um cromatógrafo líquido forma-se uma banda estreita no início da coluna, conforme ilustra a Figura 6. Se o coeficiente de distribuição entre dois componentes for diferente, resultará em velocidades de migração diferentes na coluna cromatográfica. A medida que, a fase móvel passa através da coluna, a banda inicial separa-se das bandas individuais dos solutos, onde cada um deles migram com um fluxo diferente, governado pelo “ K_D ” do soluto entre a fase móvel e a superfície da fase estacionária. Finalmente, o segmento dos componentes são definidos e separados, eluídos continuamente da coluna em zonas ou bandas, que passam através do detector. A quantidade de cada componente presente na amostra, eluído separadamente é medida pelo detector, que registra um pico, onde sua área ou altura é proporcional a sua concentração.

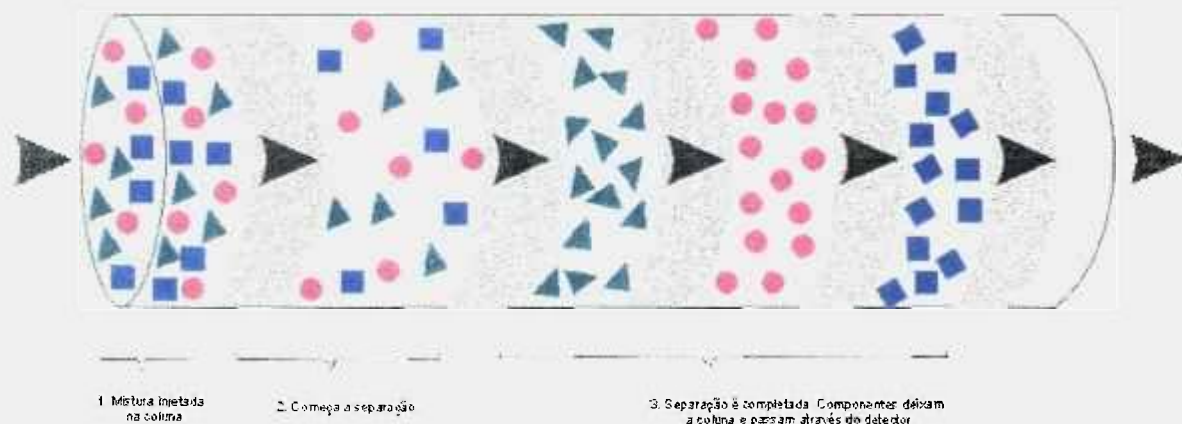


Figura 6. Migração dos componentes através da coluna cromatográfica
(BIDLINGERMEYER, 1992)

Pelo ajuste da composição da fase móvel e a escolha apropriada da fase estacionária, uma grande variedade de composto de diferentes polaridades podem ser separados facilmente.

A cromatografia líquida de alta eficiência apresenta algumas vantagens sobre outros métodos cromatográficos de análise, dentre estas :

- Separação em curto espaço de tempo, utilizando fase estacionária de porosidade reduzida e separação dinâmica, isto é, à alta pressão.

- Rapidez (vazão rápida da fase móvel), seletividade (devido a alta eficiência da coluna), sensibilidade e versatilidade, podendo ser acoplados os detectores espectrofotométricos-ultravioleta (*UV/Vis*), fluorescência (*FL*) e espectrometria de massas (*MS*).
- Aplicada para a maioria dos compostos orgânicos permitindo também a separação de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis a altas temperaturas, além de analisar e quantificar multi - componentes em uma única injeção.
- Precisão, exatidão, limite de detecção, resolução e reprodutibilidade superiores.
- Os composto separados, eluem da coluna como uma substância pura, dissolvida na fase móvel podendo ser coletada por um sistema de coletor de frações. Esta aplicação tem grande utilidade, pois as frações coletadas dos compostos separados podem ser analisadas por outras técnicas analíticas, como detectores espectrométricos de massas (*GC-MS*), para confirmação dos componentes eluídos da coluna, evitando, assim, “falsos positivos”.
- Possui uma maior variedade de mecanismos de separação.
- Pode-se utilizar a técnica de gradiente de eluição variando a composição da fase móvel durante a separação cromatográfica, para um adiantamento ou retardamento do tempo de retenção de um elemento, levando a uma melhora na resolução e seletividade da separação.
- Abrange aplicações em toda gama de produtos químicos sintéticos e naturais. Entre as classes de compostos largamente analisados por *HPLC* temos: vitaminas, proteínas, carboidratos, pesticidas, PCB's, surfactantes, fármacos em geral, aditivos para plásticos e borrachas, explosivos, organometálicos, corantes, metais, cátions, ânions, etc.

As principais características e parâmetros a serem estudados na técnica de cromatografia líquida são descritos a seguir.

3.1.2. FASE MÓVEL

As principais características e pré-requisitos da fase móvel utilizada na cromatografia líquida são:

- dissolver todos os componentes da amostra para que possa ser transportada através da coluna;
- não reagir com a amostra nem com o sistema cromatográfico;
- não conter impurezas;
- ser previamente filtradas e desgaseificadas;
- ter polaridade adequada, permitindo uma separação conveniente dos componentes da amostra.

Os solventes mais empregados em separações por *HPLC* são: metanol, etanol, acetonitrila, hexano, éter etílico, acetato de etila e tetrahidrofurano. Porém, para cada espécie a analisar e fase estacionária empregada temos uma grande variedade de solventes e misturas de solventes. Um dos principais parâmetros da cromatografia líquida é a escolha e o ajuste da composição da fase móvel, que fornecerá condições ideais para separação dos componentes.

3.1.3. FASE ESTACIONÁRIA

Como foi mencionado anteriormente, a técnica de *HPLC* utiliza como fase estacionária materiais de partículas reduzidas (3 a 10 μm) e de forma regular. Essas partículas favorecem o processo de transferência de massa e de difusão das moléculas, permitindo obter análises rápidas e sem perdas de resolução.

Dentre os materiais utilizados como suporte da fase estacionária encontram-se as de sílica de fase normal ou reversa (separação por polaridade) e materiais de troca iônica (resinas de troca iônica) preparadas a partir de poliestireno-divinilbenzeno.

Há cinco tipos diferentes de fases estacionárias, que implicam em cinco mecanismos diferentes de realizar a cromatografia líquida (COLLINS, 1997). Mediante a simples troca de coluna e fase móvel é possível utilizar cada um deles:

- cromatografia líquido - sólida (adsorção)
- cromatografia líquido - líquido (partição)
- cromatografia líquida com fase ligada (CLFL)

- cromatografia por exclusão
- cromatografia de troca – iônica

Neste trabalho foi utilizada a cromatografia líquida de fase ligada, mais propriamente dita, a cromatografia líquida de fase reversa (CLFR), já que existe, também, a cromatografia líquida de fase normal (CLFN). A cromatografia líquida de fase reversa é o processo de separação mais utilizado para componentes de interesse químico, biológico e farmacêutico, além de resolver aproximadamente 80% dos problemas de separação de compostos orgânicos, entre outros (BIDLINGERMEYER, 1992).

A cromatografia líquida de fase reversa foi escolhida para separação dos compostos triazínicos, carbamatos e nitroanilina, pois verificou-se, através de levantamento bibliográfico, que sua aplicação é unânime em trabalhos recentemente publicados. Organizações como a *EPA* e a *SCA* a utilizam em métodos padrão. Além disto, a fase reversa utiliza como fase móvel uma mistura de água e solvente orgânico (metanol, acetonitrila, etc), onde os compostos, na maioria, são solúveis, possibilitando a injeção direta das amostras de água, sem um pré - tratamento.

O termo cromatografia líquida de fase reversa está relacionado com o fato que a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária, onde o oposto acontece com a cromatografia líquida de fase normal. Na cromatografia líquida de fase reversa os componentes polares eluem primeiro, ocorrendo o inverso na cromatografia de fase normal (SNYDER et al, 1997).

As colunas de fase reversa são empacotadas com materiais de grupos funcionais octil ($-C_8H_{17}$), octadecil ($-C_{18}H_{37}$) ou fenil ($-C_6H_5$ -fenil), fornecendo uma superfície apolar, enquanto os solventes empregados como fase móvel são polares. A sílica gel é o substrato reativo, onde os grupos funcionais são ligados ou fixados. Existem várias formas de fixar os grupos funcionais à sílica gel, por exemplo, através de ligações covalentes. As reações com clorodimetilalquilsilano ou tricloroalquilsilano são as mais utilizadas, formando produtos monoméricos e poliméricos, respectivamente. A Figura 7, apresenta as reações envolvidas e alguns dos possíveis grupos funcionais (R) ligados.

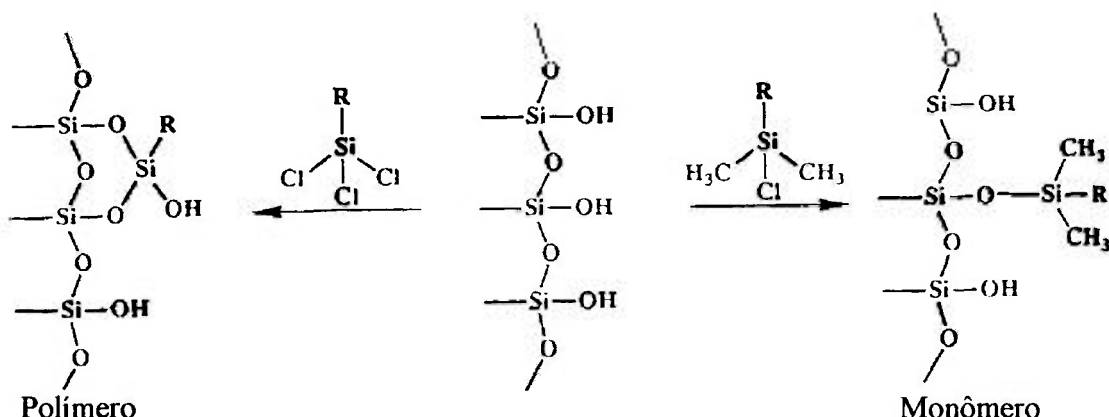


Figura 7. Esquema das reações utilizadas para a síntese polimérica ou momérica da fase estacionária ligada (LOUGH et al, 1995).

Octadecilsilil sílica (C₁₈ ou ODS) R = -C₁₈H₃₇

Octilsilil sílica (C₈) R = -C₈H₁₇

Fenilsilil sílica (Fenil) R = -C₆H₅-Fenil

Propilsilil sílica (C₃) R = -C₃H₇

(Tri)metilsilil sílica (C₁) R = -CH₃

1-Aminopropilsilil sílica (Aminopropil) R = -C₃H₆-NH₂

1-Cianopropilsilil sílica (Cianopropil) R = -C₃H₆-CN

O mecanismo de separação baseia-se na diferença de solubilidade entre os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. A principal força envolvida na retenção dos compostos é o efeito hidrofóbico. A retenção exercida pela fase estacionária é dada pela repulsão de regiões apolares (hidrofóbicas) das moléculas do soluto pelas moléculas de água da fase móvel. Estas interações hidrofóbicas são ajustadas por interações específicas soluto – solvente entre a fase móvel e a fase estacionária.

Em resumo, aumentando-se a polaridade do meio, as substâncias que possuem maior afinidade com a superfície apolar (fase reversa) serão fortemente ligadas. Diminuindo-se a polaridade aumenta a competição e reduz a interação entre o grupo trocador da coluna (apolar) com as substâncias da amostra, que serão, assim, eluídas. A composição da fase móvel pode-se manter constante durante uma análise (isocrática) ou variar, linearmente ou não linear (gradiente).

A cromatografia líquida de fase reversa demonstra alguns comportamentos típicos, são estes:

- (a) os componentes da amostra são eluídos dos mais polares para os apolares;
- (b) sendo o eluente mais polar (composição da fase móvel rica em água), os componentes da amostra são menos solúveis na fase móvel, portanto maior afinidade com a fase estacionária, ocasionado um aumento do tempo de retenção dos componentes na coluna;
- (c) um alto grau de seletividade pode ser introduzido na separação pelo ajuste da polaridade, pH e força iônica da fase móvel;
- (d) para cada componente e fase estacionária escolhida, uma variedade de misturas de solventes podem ser utilizadas como fase móvel, eluindo o componente com aproximadamente o mesmo fator de capacidade k' (ponto isoeluotrópico) (BIDLINGERMEYER, 1992; LOUGH et al, 1995).

3.1.4. COLUNAS

As colunas cromatográficas são fabricadas depositando-se um filme, da fase estacionária líquida escolhida, sobre um material inerte chamado suporte, de granulometria, porosidade, área superficial e superfície conhecida. Este material obtido é empacotado com técnicas especiais nos tubos de aço inoxidável ou de polipropileno.

As dimensões das colunas variam bastante, dependendo da sua aplicação, mas a maioria encontram-se na faixa de 15 a 30 cm de comprimento com 2 a 5 mm de diâmetro otimizados, para análises dos compostos de interesse.

A capacidade da coluna depende do seu comprimento, diâmetro e material trocador. Em geral as colunas mais eficientes são de diâmetro pequeno (2 a 4 mm), que efetuam análises muito rápidas; sua capacidade é limitada e a quantidade de amostra injetada deve ser pequena, o que exige um detector muito sensível.

3.1.5. FATORES RELACIONADOS À SEPARAÇÃO EM CROMATOGRAFIA

Quando se realiza uma separação por cromatografia líquida algumas informações importantes podem ser obtidas do cromatograma. Primeiro, pelo número de picos contados estima-se a quantidade de componentes presentes na amostra. Segundo, utilizando-se uma amostra padrão pode-se identificar e quantificar cada componente presente e por último, se os componentes forem desconhecidos, os picos podem ser coletados de acordo com seus tempos de retenção e identificados por outros métodos analíticos (ex: infravermelho, ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massas).

Para uma análise qualitativa e quantitativa por cromatografia líquida é necessário que todos os elementos presente na amostra estejam completamente separados, proporcionando picos definidos no cromatograma obtido. Portanto, alguns fatores importantes estão relacionados com as condições de separação dos componentes dentro da coluna cromatográfica. O cromatograma da Figura 8 ilustra os parâmetros que caracterizam uma separação cromatográfica. À partir destes, algumas definições foram desenvolvidas e serão descritas, a seguir.

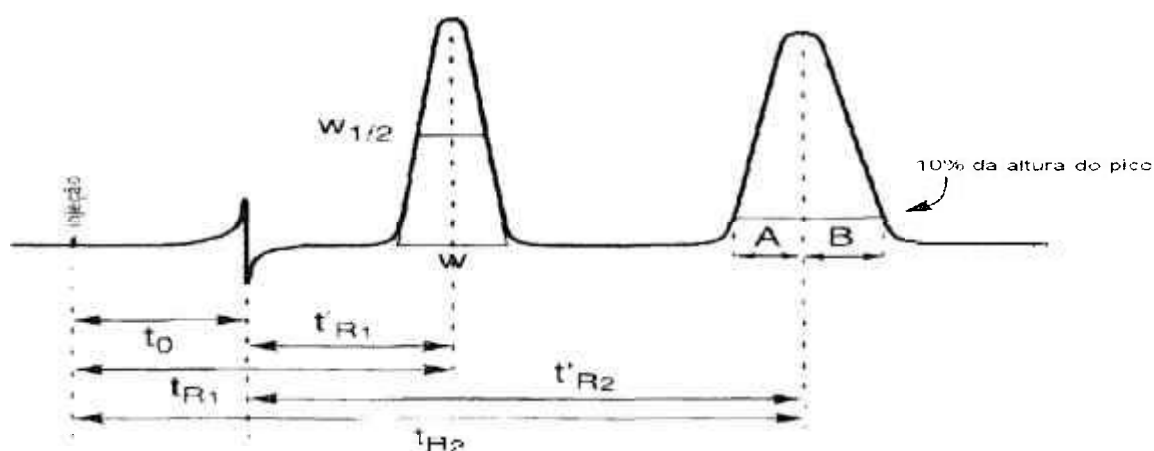


Figura 8. Representação esquemática de um cromatograma (LOUGH, 1995)

- w = largura do pico na base do cromatograma;
- $w_{1/2}$ = largura do pico a meia altura;
- t_0 = tempo morto. É o tempo necessário para um composto inerte migrar do início (injeção) ao fim da coluna (detector), sem sofrer qualquer interação com a fase estacionária;
- A e B = simetria do pico (medida à 10% da altura do pico). O valor da relação A/B deve aproximar-se de 1;
- $t_{R1}, t_{R2} \dots$ = tempo de retenção. É o tempo decorrido para um componente da amostra migrar do início (injeção) da coluna até o detector;
- $t'_{R1}, t'_{R2} \dots$ = tempo de retenção ajustado. É definido como o tempo médio que um composto permanece retido na fase estacionária. Calcula-se pela diferença entre o tempo de retenção e o tempo morto:

$$t'_{R1} = t_{R1} - t_0 \quad t'_{R2} = t_{R2} - t_0 \quad (3.2);$$

- k = fator de capacidade ou retenção. É a razão molar do composto nas fases estacionária e móvel, mede quanto tempo um componente permanece retido na fase estacionária comparado com o tempo que passa migrando na fase móvel durante a corrida. O k indica o grau de afinidade que a coluna e a fase móvel possuem para aquele componente. Quanto maior k mais longa a análise. O k depende exclusivamente da fase estacionária utilizada e dos solventes empregados como fase móvel e sua composição. O valor de k pode ser expresso de várias formas através de relações matemáticas, dentre estas, duas relação são destacadas para um melhor entendimento do k ,

$$k_1 = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \quad (3.3) \text{ onde,}$$

V_1 = volume de eluição do componente

V_0 = volume de eluição da fase móvel

$$\text{ou, } k_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0} \quad (3.4)$$

- α = seletividade ou coeficiente de separação. É a medida do potencial do sistema cromatográfico para separar dois componentes, isto é, compara a retenção de um componente com a retenção de outro, indica até que grau o sistema químico (coluna e fase móvel) está diferenciado entre um e outro. Se α for igual a uma unidade, os picos são coincidentes não ocorrendo a separação. Sendo o valor de α igual a 1,3; por exemplo, a coluna retém um componente em 30% a mais que o outro. Quanto maior o valor de α , mais facilmente os componentes são separados, no entanto valores entre 1,1 e 1,4 são recomendados.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \quad (3.5)$$

- N = eficiência / números de pratos. Caracteriza a eficiência da coluna, a qualidade do material que a preenche e o fenômeno de transferência de massas. Mede o alargamento do pico de um componente causado pelo sistema. Os fatores que influenciam no número de pratos são: comprimento da coluna, diâmetro da partícula da fase estacionária, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. Valores altos de N são em função de um melhor empacotamento, colunas com maior comprimento e condições ótimas de fluxo e fase móvel.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_{R1}}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \cdot \left[\frac{t_{R1}}{W_{1,\sigma}} \right]^2 \quad (3.6)$$

- H = altura equivalente a um prato teórico, compara a eficiência de duas colunas de diferentes comprimentos.

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{onde, } L \text{ é comprimento da coluna em cm} \quad (3.7)$$

- R_s = a resolução. É a medida da distância entre dois picos adjacentes comparado com a média da largura dos mesmos. Quando o valor de R_s for igual ou maior que 1, os picos estão totalmente separados. A resolução é o resultado das interações físico – químicas que ocorrem com a amostra, quando está fluí através da coluna cromatografica. A resolução depende de três fatores importantes: coeficiente de separação, fator de capacidade e eficiência da coluna.

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \cdot (w_1 + w_2)} \quad R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k_1}{(k_1 + 1)} \cdot (\alpha - 1) \quad (3.8)$$

Ao estabelecer as condições de análise no sistema de *HPLC*, para separação dos pesticidas utilizando coluna de fase – reversa C_{18} de comprimento definido, a escolha, a composição (razão solvente orgânico – água) e o fluxo da fase móvel deverão ser otimizados para obtenção de:

- aceitáveis tempos de retenção dos componentes na coluna, proporcionando análises rápidas;
- satisfatória separação dos componentes;
- valores de k entre 2 e 10;
- ajuste da seletividade para conseguir valores de R_s maiores ou iguais a 1,5 (LOUGH, 1995).

3.1.6. DETECTOR

Os detectores podem ser agrupados em dois tipos:

- Gerais: medem uma propriedade física global da fase móvel, isto é, do conjunto eluente - amostra.
- Seletivos: medem uma propriedade específica do composto e não do eluente puro (índice de refração, condutividade elétrica, calor de absorção, espectro na região do visível, constante dielétrica, fluorescência e radiatividade).

O sistema de *HPLC* utilizado nesta pesquisa está acoplado a um detector espectrofotométrico *UV/vis* de comprimento de onda variável. A escolha deste detector dá-se pelo fato, que a maioria dos compostos orgânicos estudados neste trabalho absorvem fortemente a luz eletromagnética (absorbância) em comprimento de onda na região do ultravioleta (abaixo de 400 nm). A Tabela 1, apresenta os comprimentos de onda de absorção máxima para cada um dos composto em questão, segundo os dados da literatura. Em alguns trabalhos publicados é freqüente a utilização do detector espectrofotométrico *UV/vis* para a quantificação dos pesticidas. As principais vantagens na utilização do detector *UV/vis* para estas análises são: seu baixo custo; fácil manuseio, simplicidade e para um comprimento de onda escolhido, geralmente em 220 nm, os compostos têm boa sensibilidade, mesmo à baixas concentrações.

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos são baseados na lei de Beer-Lambert, que relaciona a concentração do composto na solução com a absorção da radiação eletromagnética incidida sobre esta. A absorção da luz é proporcional à concentração do composto absorvedor em comprimento de onda adequado, segundo:

$$A = \xi \cdot b \cdot c \quad (3.9)$$

onde :

A = absorbância;

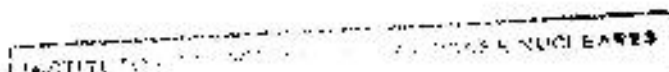
ξ = absortividade molar da substância;

b = comprimento do percurso da célula;

c = concentração molar do componente.

A resposta deste detector será seletiva, já que só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que se está operando, mas deve-se levar em conta que dentro de uma faixa de comprimento de onda teremos respostas de diversos compostos.

O espectrofotômetro de comprimento de onda variável *UV/Vis* oferece várias vantagens sobre os instrumentos de comprimento de onda fixo :



- apresenta alta absorvância para os componentes, devido a escolha do comprimento de onda e consequentemente, maior sensibilidade;
- permite maior seletividade;
- permite que se encontre um comprimento de onda, onde um determinado gradiente de eluição não apresente problemas de detecção;
- permite a determinação do espectro de absorvância de cada componente em separado.

Algumas substâncias tem sua absorvância fora da faixa operada pelos detectores, sendo necessária uma reação colorimétrica pós coluna que permite a detecção do analito na faixa do visível (190 a 800 nm), livre de interferentes. A este processo dá-se o nome de “derivatização”.

Os detectores *UV/vis* apresentam, em geral, boa sensibilidade, sendo fracamente sensíveis a variação de fluxo e temperatura, operando do seguinte modo: uma lâmpada transmite luz para as células de referência e da amostra. Dois fotodiodos medem a intensidade da luz de ambas as células e um sistema eletrônico compara estes sinais, que são amplificados e transmitidos ao registrador.

A detecção pode ser feita em dois canais com comprimento de onda e valores de absorção distintos, adequados a análise de interesse.

No integrador/registrator são traçados os cromatogramas, relacionados aos canais do detector, onde a quantificação e identificação dos picos dos elementos a serem analisados são registrados de acordo com a área e altura.

Também se empregam sistemas de computação que proporcionam ou são capazes de apresentar diretamente resultados e dados completos de análises, tais como tempo de retenção, áreas, fatores de correção, porcentagens ou composição, etc...

3.2. QUANTIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS

Para saber se a faixa de resposta do detector é linear com a concentração das espécies em estudo e se as condições são as mais adequadas para a quantificação é necessário construir curvas analíticas para cada espécie. Dessa forma, foi verificado a linearidade de resposta do detector para cada substância individualmente e em soluções multi - elementares.

A quantificação dos pesticidas depende do uso de padrões especificados de alta pureza (ao redor de 99,9%), acompanhados de certificados de procedência. Os padrões de pesticidas utilizados para análise em *HPLC* devem ser diluídos em solventes orgânicos de grau analítico, de modo a obter-se soluções estoque, intermediária e de trabalho.

Todas estas soluções deverão ser discriminadas de acordo com, procedência, identidade, concentração, estabilidade, data de preparação, prazo de validade, temperatura de armazenamento e solvente utilizado na diluição. A solução de trabalho deverá ser preparada em concentrações próximas a faixa de linearidade do detector.

A identificação dos compostos é realizada através do tempo de retenção. A quantificação dos compostos é realizada comparando-se a área ou altura dos picos obtidos nos cromatogramas com uma amostra padrão, utilizando-se calibração externa ou interna. Na calibração externa compara-se a área ou altura da substância a ser quantificada na amostra, com as áreas ou alturas obtidas da mesma substância em soluções padrão de concentrações conhecidas. Na padronização interna adiciona-se uma quantidade conhecida de uma substância padrão na amostra analisada, relacionando as duas áreas. Este último método é menos sensível a erros de injeção e a variações instrumentais.

3.3. CONTROLE DE QUALIDADE PARA ANÁLISES DE PESTICIDAS

Para validar um método de análise em amostras de água contendo pesticidas a *EPA* recomenda alguns critérios para obtenção de resultados confiáveis (COFINO, 1993):

- a recuperação para cada substâncias, aplicando um método de extração, deve estar entre 70% a 130% com no máximo 30% de desvio relativo padrão;
- preservação e armazenamento da amostra a 4°C, sendo analisadas antes de 14 dias;
- descrição da aparelhagem, materiais, reagentes, soluções padrão utilizadas e procedimento;
- utilização de duas colunas de diferentes polaridades em métodos cromatográficos, por exemplo, na cromatografia líquida utiliza-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (coluna primária apolar) e uma segunda coluna de fase normal contendo grupos cianopropil ligados (coluna secundária polar) para confirmação do picos;
- proceder com análises de amostras em branco para identificação de contaminações;
- controle estatístico utilizando materiais de referência ou análises em replicatas;
- utilização de padrão interno e *surrogate* (substância de característica e concentração conhecida é adicionada na amostra e analisada para verificação da eficiência do método aplicado);
- determinação dos limites de detecção para cada substância analisada.

3.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO - SÓLIDO (*SPE*) – Considerações Gerais

A *SPE* é uma das técnicas mais utilizadas no pré - tratamento de amostras para análises em *HPLC*. Este procedimento de extração vem sendo utilizado por inúmeros pesquisadores em análises de traços de compostos orgânicos, incluindo pesticidas em águas naturais, conforme visto na revisão bibliográfica realizada.

O principal objetivo da extração líquido-sólido é isolar seletivamente os analitos presentes em uma amostra líquida, através de uma completa adsorção e posterior eluição, envolvendo mecanismos de adsorção e partição. A retenção dos compostos, em síntese, é governada por interações hidrofóbicas nas fases apolares como C_{18} e resinas poliméricas, podendo ocorrer, neste último interações do tipo π - π entre os anéis aromáticos (HENNION, 1993; FONT, 1993). Como na cromatografia líquida, a adsorção líquido - sólido depende de dois fatores, da polaridade da molécula e da adsorção física dos seus grupos funcionais nos sítios ativos. Se a molécula tem um momento dipolo permanente, esta será atraída por interações dipolo-dipolo. Ainda que a molécula apresente um determinado tamanho, um dipolo poderá ser induzido por outro dipolo, possivelmente do sólido. Isto é conhecido como “polarizabilidade” da molécula e seu movimento dentro da coluna de *SPE* (ou cromatográfica) será retardado por estes mecanismos, resultando na sua retenção (BIDLIGMEYER, 1992).

A *SPE* envolve colunas ou membranas, as quais contêm poucas miligramas (100–1000mg) de adsorvedores de diferentes polaridades como sílica ligada a cadeias abertas de oito carbonos C_8 (octil), dezoito carbonos C_{18} (octadecil), cianopropil (CN), fenil, aminopropil, entre outros materiais, incluindo, carbono grafite e resinas de copolímeros de estirenodivinilbenzeno. Estas colunas ou cartuchos têm grande semelhança com as colunas empregadas em *HPLC*, visto que os mesmos materiais são utilizados, seguindo os mesmos princípios de retenção e desorção dos analitos, diferindo, apenas no tamanho das partículas. As principais fases utilizadas na extração de pesticidas em águas são: C_{18} , Carbono Grafite e resinas de copolímeros de estirenodivinilbenzeno.

A Figura 9 apresenta um esquema da estrutura molecular dos materiais C_{18} e do copolímero de estirenodivinilbenzeno, utilizados neste trabalho.

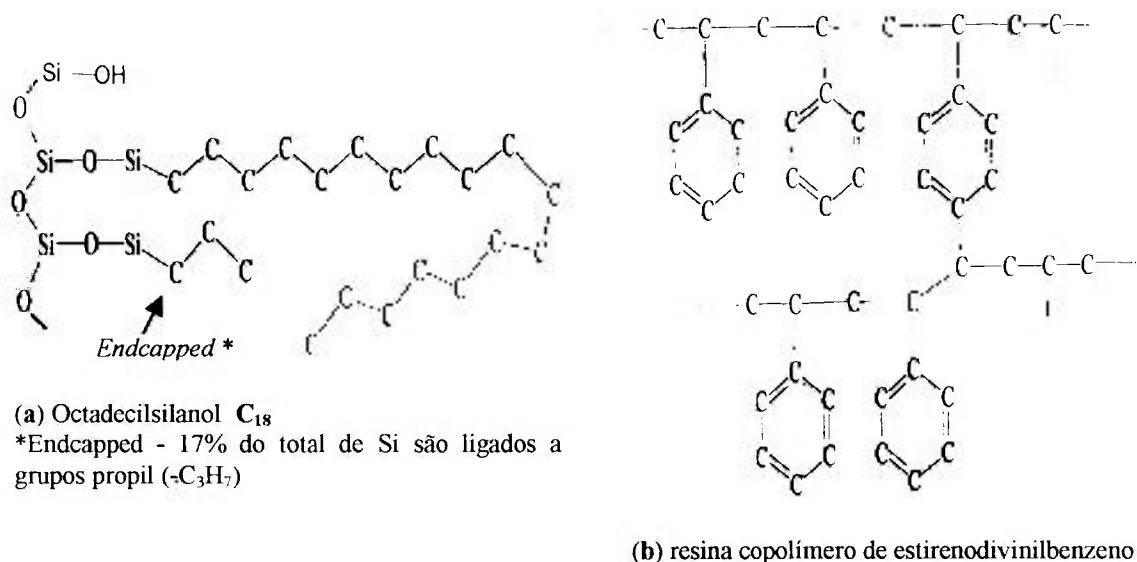


Figura 9. Esquema da estrutura molecular das fases estacionárias utilizada na *SPE*.

Os métodos de *SPE* podem ser empregados de duas maneiras *off-line*, onde a amostra é extraída separadamente e subsequente uma alíquota do extrato é injetada no cromatógrafo ou *on-line*, onde os cartuchos ou membranas utilizados na *SPE* são adaptados em série a um sistema automatizado de *HPLC*, como dito anteriormente. Neste trabalho será discutido com mais detalhe, o método de *SPE off-line* em coluna.

Hoje há uma infinidade de fabricantes que produzem aparatos para realizar os procedimentos de *SPE*, sendo facilmente disponíveis no mercado. As colunas ou cartuchos para *SPE* são feitos de polipropileno ou vidro com volumes que variam de 1 a 20 mL, contendo de 100 a 1000 mg do material adsorvedor. Para grandes volumes de amostras, os reservatórios podem ser ligados a coluna via adaptadores e cânulas apropriadas, aspiradas para a coluna utilizando vácuo. Devido ao tamanho das partículas da fase sólida (30 a 75 μm) um alto fluxo (5 a 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) pode ser aplicado, proporcionando extrações rápidas. Existem vários sistemas de extração a vácuo disponíveis no mercado, podendo extrair até 24 amostras (com 24 cartuchos) simultaneamente, no entanto o custo é elevado. No trabalho proposto, um sistema de extração foi desenvolvido e será descrito com mais detalhe na parte experimental.

Um total de quatro procedimentos fundamentais são necessários para realização da *SPE* em coluna.

- 1- Condicionamento: a coluna é ativada ou umedecida com um solvente orgânico apropriado (metanol ou acetonitrila) e em seguida condicionada com um volume de água, fornecendo uma superfície adequada para adsorção dos analitos. O material extrator não deve secar antes de percolar a amostra.
- 2- Percolação da amostra: um volume que pode variar de 200 a 1000 mL da amostra é introduzido na coluna, mantendo um fluxo entre 5 a 10 mLmim⁻¹. Nessa etapa, os analitos de interesse serão retidos juntamente com outros interferentes indesejáveis.
- 3- *Clean-up*: após a retenção dos analitos, os interferentes podem ser removidos com solventes de diferentes polaridades. Por exemplo: para a maioria das fases apolares utiliza-se água para remoção de alguns constituintes polares, sem a eluição de compostos pesticidas. Compostos menos polares podem ser removidos adicionando-se uma solução tampão ou misturas metanol-água ou acetonitrila-água. Após o *clean-up* o adsorvente é seco utilizando vácuo ou se preferir um fluxo de nitrogênio.
- 4- Eluição: a extração dos analitos de interesse ocorre adicionando-se um pequeno volume de solvente orgânico, corretamente escolhido para que a interação fase - analito enfraqueça, permitindo que o analito seja eluído da coluna como um composto puro dissolvido no eluente.

A Figura 10, apresenta um esquema das principais etapas seguidas na *SPE*.

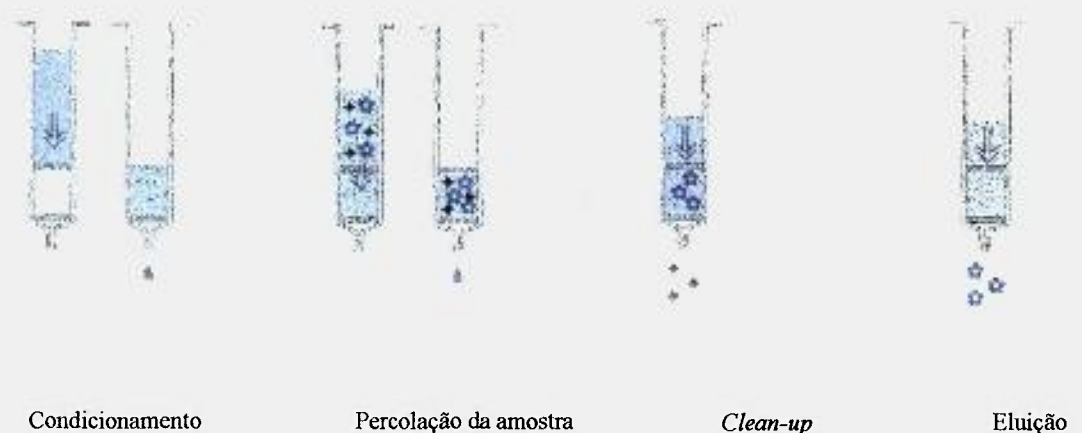


Figura 10. Procedimento padrão de *SPE*

Os fatores que afetam a eficiência da *SPE* são: volume de amostra, pH, força iônica, tratamento da fase e interferentes presente na matriz (HENNION & SCRIBE, 1993; FONT et al, 1993). Escolhido o tipo de material adsorvedor, a seleção dos solventes utilizados nos procedimentos de extração, para obtenção de altas porcentagens de recuperação, dependem exclusivamente do conhecimento das propriedades dos analitos e de interferentes presentes na matriz.

A escolha do volume da amostra utilizado para extração é um fator de crucial importância para recuperação dos compostos, volumes entre 200-1000 mL são geralmente aplicados para análise de traços de pesticidas em águas.

O pH da amostra deve ser ajustado para que os compostos estejam em uma forma apropriada para melhor eficiência de retenção na fase sólida. Os valores de pH recomendados estão entre 2 e 8.

O ajuste da força iônica da água diminui a solubilidade dos compostos orgânicos na mesma, aumentando a eficiência de extração, no entanto este fator tem pouca influência na extração de pesticidas em água, como observado em muitos trabalhos (SCHLETT, 1991; EISERT et al, 1995; SCHÜLEIN et al, 1995; JIMÉNEZ et al, 1997).

Os principais interferentes na *SPE* de pesticidas em águas naturais é a presença de altas concentrações de matéria orgânica, que competem com sítios ativos do material adsorvedor. O ácido húmico presente nas águas forma complexos fortemente ligados com compostos pesticidas. Esta associação, quando adsorvida na coluna é dificilmente desorvida por solventes orgânicos (JUNK & RICHARD, 1988; JOHNSON et al, 1991; FERRER et al, 1999).

3.5. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O primeiro passo para validação de um método cromatográfico é separar e identificar cada composto a ser quantificado. Como discutido anteriormente, ao ser estabelecida as condições de análise no sistema de *HPLC*, utilizando coluna de fase reversa C_{18} de comprimento definido, a escolha, da composição (razão solvente orgânico-água) e o fluxo da fase móvel, entre outros parâmetros como, pH e força iônica da fase móvel e temperatura da coluna, deverão ser otimizados para obtenção de alta resolução de separação dos compostos.

A validação de todo e qualquer método de análise consiste em realizar uma série de testes analíticos e estudos estatísticos, comparando os resultados com critérios pré - estabelecidos. Para validação de um método quantitativo em *HPLC* alguns parâmetros devem ser estudados e definidos como: exatidão; precisão; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; especificidade; robustez e estabilidade do sistema (BIDLINGMEYER, 1992; LOUGH et al, 1995).

3.5.1. Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o resultado da determinação e o valor verdadeiro, ou mais provável (SNYDER et al, 1997). Em um método, dito exato, uma amostra de concentração conhecida é analisada, o valor obtido da concentração, medida por determinada técnica, deverá ser igual ou próximo ao valor real ou conhecido. Em geral, a exatidão é representada e determinada por estudos de recuperação dos composto utilizando determinada metodologia analítica, no entanto existem três maneiras para tal determinação: comparação com padrões de referência; recuperação do analito adicionado em um branco e adição padrão. Resumindo, a exatidão está relacionada com a veracidade das medidas. Um valor exato em *HPLC* pode ser obtido através de técnicas adequadas de calibração e/ou minimizando possíveis fontes de erros.

A exatidão é expressa em termos de erros:

$$\text{Erro Absoluto} = \text{valor experimental} - \text{valor correto} \quad (3.10)$$

$$\text{Erro Relativo} = \text{Erro absoluto/valor correto} \times 100 \quad (3.11)$$

Para o estudo da exatidão do método proposto neste trabalho, curvas analíticas foram construídas com padrões de referência. Nas amostras em branco e nas amostras reais foram adicionadas quantidades conhecidas dos analitos, após a extração e quantificação destes, o valor obtido da concentração foi comparado com o valor real adicionado, segundo a equação 3.11.

3.5.2. *Precisão*

A precisão pode ser definida como a concordância de uma série de medidas de mesma grandeza. As medidas de precisão são freqüentemente, subdivididas em repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (LOUGH et al, 1995).

A repetibilidade é a precisão do método sob as mesmas condições de operação durante um pequeno período de tempo. A repetibilidade pode ser aplicada para medir a precisão de um sistema de HPLC, através de análises seqüenciais, repetindo injeções da mesma amostra, calculando a média da área ou altura dos picos, determinando o desvio padrão relativo (DPR).

A precisão intermediária é a concordância de medidas, quando um método é aplicado várias vezes pelo mesmo laboratório. Esta medida inclui análises em diferentes dias, instrumentos, ou analistas.

A reprodutibilidade examina a precisão entre laboratórios e é determinada através de trabalhos conjuntos ou transferência de experimentos.

Geralmente, a precisão, é estatisticamente expressa pelo desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR%) de uma série de medidas.

Em *HPLC*, a precisão do método depende de alguns fatores relacionados a: preparação da amostra; reprodutibilidade do instrumento, técnicas de injeção; razão sinal/ruído para o pico de interesse; formato do pico; manipulação dos resultados, incluindo integração dos picos e métodos de calibração ou quantificação [LOUGH et al, 1995].

3.5.3 Linearidade

Um método é linear quando a relação entre a resposta analítica “vs.” a concentração de um analito, aproxima-se de uma linha reta ao construir uma curva analítica, variando a concentração do analito obtendo um sinal proporcional do detector. Os dados obtidos são colocados em um gráfico, onde a abcissa representa a concentração do analito e a ordenada o sinal do detector. Aplicando uma regressão linear dos mínimos quadrados obtêm-se a equação linear da reta, dada:

$$y = mx + b, \quad (3.12)$$

onde y é igual ao sinal do detector, m a inclinação da reta, x a concentração do analito e b a interseção. Com o valores da inclinação, interseção e coeficiente de linearidade (r) obtidos, pode-se obter informações sobre a linearidade do método (SNYDER et al, 1997).

O valor numérico da inclinação e interseção da reta dependerá da reposta do detector. A inclinação da reta fornecerá informações sobre a sensibilidade de um analito a determinada detecção. A interseção da reta deve aproximar-se da origem ($b=0$), no entanto a maioria dos métodos de *HPLC* apresentam desvios em torno de 2%, o que é analiticamente aceitável. Com relação ao coeficiente linear, valores acima de 0,999 são aceitáveis para maioria dos métodos analíticos aplicados (SNYDER et al, 1997).

Um outro método para determinação da linearidade consiste em construir um gráfico do fator de resposta (ou sensibilidade) em função da concentração do analito. O fator de resposta (FR) é calculado pela razão da resposta do detector (área ou altura do pico) pela concentração do analito. Teoricamente, o fator de resposta deverá ser independente da concentração se o método for verdadeiramente linear, estendendo uma grande faixa de concentração, assumindo que a interseção da reta está próxima de zero.

3.5.4. *Limite de Detecção e Quantificação*

O limite de detecção (LD) é a quantidade mínima do analito que pode ser detectada com confiança em determinadas condições experimentais (BIDLINGMEYER, 1992; LOUGH et al, 1995; SNYDER et al, 1997). Geralmente, é difícil definir o que é exatamente detectado com confiança, sendo necessário à aplicação de testes estatísticos. O limite de detecção aplicado neste trabalho é a concentração do composto presente na solução, a qual fornece uma razão do sinal/ruído maior ou igual a um fator de 3. O sinal é a altura do pico e o ruído é a amplitude da pequena variação da linha de base.

O limite de quantificação (LQ) é a quantidade mínima do analito que pode ser quantificada em determinadas condições experimentais. O LQ aplicado neste trabalho é a concentração do analito presente em solução, a qual fornece uma razão sinal/ruído maior ou igual a um fator 10.

Os valores de LD e LQ determinados durante a validação de um método cromatográfico são afetados pelas condições de separação e principalmente pela instrumentação (detectores) e sistemas de coleta de dados empregados. De modo, geral os valores de LD e LQ obtidos para um determinado composto, indicam a seletividade e sensibilidade deste à determinado método de separação e detecção aplicado.

3.5.5. *Especificidade*

A especificidade de um método pode ser definida como a capacidade de medir com exatidão e precisão a concentração de um composto presente na amostra (SNYDER et al, 1997). A determinação da especificidade de um método de *HPLC* procede-se de duas maneiras. A primeira, consiste em separar os compostos de interesse, presentes na amostra, com boa resolução ($R_s > 1,5$) e a segunda em empregar detectores seletivos.

Para obtenção da especificidade em um método de *HPLC* alguns procedimentos são recomendados como:

- adição padrão na amostra contendo possíveis interferentes;
- estudo da degradação dos compostos na amostra;
- coleta dos picos para análise com outras técnicas;
- análise específica utilizando *HPLC*/espectrômetro de massas ou *HPLC*/detector *UV/vis* com varredura de comprimento de onda;
- utilização de outros métodos cromatográficos;
- mudanças nas condições de análise (colunas de diferente polaridade, solventes alternativos ou diferentes composições de fase móvel) (LOUGH et al, 1995).

3.5.6. Robustez

Um método analítico capaz de manter suas medições constantes ou inalteradas, fazendo pequenas alterações nos parâmetros experimentais, é dito como robusto. A robustez de um método de *HPLC* pode ser testada, utilizando colunas de diferentes “histórico”, ou seja, colunas de diferentes utilização ou fabricantes; entre outros parâmetros, como a aplicação da metodologia em diferente equipamento de *HPLC* e coluna, verificando possíveis mudanças nos fatores de separação (k , R_s) e quantificação (BIDLINGMEYER, 1992; LOUGH et al, 1995).

3.5.7. Estabilidade do Sistema

A estabilidade de um sistema de *HPLC* deve ser checada antes de analisar as amostras de interesse, assegurando, assim, a qualidade dos resultados apresentados. O teste é realizado injetando-se (no mínimo em duplicata) uma solução de concentração conhecida dos analitos, os resultados dos tempos de retenção dos compostos, resolução, eficiência e assimetria dos picos são comparados com valores pré - estabelecidos para o método desenvolvido. Geralmente, são realizadas injeções repetitivas de uma amostra padrão, obtendo-se uma média da altura ou da área dos picos. O desvio padrão relativo deve estar abaixo de 5%, tendo um erro absoluto menor que 10% para os valores das concentrações dos compostos obtidos através da curva analítica. O teste da estabilidade do sistema permite uma avaliação rápida e confiável da exatidão, precisão, especificidade e linearidade do método estabelecido (SNYDER et al, 1997).

CAPÍTULO 4

4. PARTE EXPERIMENTAL

Os estudos experimentais foram divididos nas seguintes etapas:

- 1) otimização da separação dos compostos por *HPLC* em fase reversa;
- 2) estudo da linearidade e sensibilidade do método proposto;
- 3) estudo da repetibilidade e estabilidade do sistema;
- 4) limites de detecção e quantificação da técnica;
- 5) desenvolvimento de um sistema para *SPE* em colunas;
- 6) comparação da eficiência de extração dos compostos em água, entre dois materiais bastante empregados na *SPE*, C_{18} e copolímero de estirenodivinilbenzeno;
- 7) estudos da exatidão (recuperação) e precisão da *SPE*, em amostras de água ultrapura de baixa resistividade e amostras de água superficial, contendo concentrações conhecidas dos compostos;
- 8) aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de águas superficial de rios;
- 9) aplicação do método de separação e detecção em diferente sistema de *HPLC* localizado em outro laboratório (robustez);
- 10) injeção das amostras extraídas por *SPE* em sistema de *GC-MS* para fins de comparação e confirmação dos resultados.

4.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Cromatografo líquido alta eficiência modelo LC-10Ai, *Shimadzu*, equipado com duas bombas peristálticas de fluxo constante, programador de gradiente para dois solventes, um injetor *Rheodyne 9725*, com *loop* de 20 μL . Um detector *UV/vis SPD 10Ai* da *Shimadzu* e um microprocessador de dados equipado com o programa *CLASS-LC10/M10*, *Shimadzu*;
- Software *Validation (Shimadzu)* versão 1.02;
- Coluna de fase reversa *Shim-Pack CCL-ODS C₁₈* (150 x 4,6 mm diâmetro interno 5 μm) *Shimadzu*;
- Pré-coluna *G-ODS C₁₈* (10 x 4,0 mm diâmetro interno 5 μm) *Shimadzu*;
- Sistema purificador de água, *Easypure RF Barnsted*;
- Colunas de *SPE*, *Supelclean*, *ENVI-18*, 500 mg, 3 mL (polipropileno), *Supelco*;
- Colunas de *SPE*, *Supelclean*, *ENVI Chrom-P* com 250 mg do copolímero de estirenodivinilbenzeno, 3 mL (polipropileno), *Supelco*;
- Sistema de extração para colunas *SPE*, à vácuo, desenvolvido no laboratório (Figura 11, 12, 13) constituído por: torneira de polipropileno, adaptador de vidro para vácuo, tampa de PVC e cânula adaptadora de *teflon*;
- Sistema de filtração à vácuo com membranas, *Sartorius*;
- Bomba de vácuo, *Speeddivac-2*, *Edwards*;
- Balança analítica, *Mettler*;
- Estufa, *Fanem*;
- Dessecador;
- Papel indicador de pH (faixa de 1 a 14);
- Membrana filtrante 47 mm, 0,45 μm porosidade, *Sartorius*;
- Seringa de volume 50 μL , *Hamilton*;
- Micro pipeta automática com volume variável de 100 a 1000 μL , *Costar*;
- Balão volumétrico, volumes: 10, 100, 250 mL;
- Balão de fundo chato de volume 50 mL;
- Erlenmeyer de volume 1 L;
- Frascos de vidro âmbar de 1 L para coleta e preservação da amostra;

- Conjunto de vidrarias e material básico de laboratório: béquers, erlenmeyers, balões volumétricos, pipetas, provetas, etc.

As vidrarias utilizadas foram lavadas da seguinte forma: enxaguadas com extran, lavadas com solução sulfocrômica, enxaguadas com água destilada e depois com acetona e secadas em estufa.

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções e eluentes foram preparadas com reagentes de grau analítico cromatográfico ou compatível de procedência, EM *Merck*, *Mallinckold Nanograde* ou *Merck*.

- Água ultrapura de baixa condutância ($<1,0 \mu\text{Scm}^{-1}$);
- Acetonitrila (ACN);
- Metanol (MeOH);
- Acetato de etila (AcEt);
- Acetona para limpeza das vidrarias e materiais em geral;
- Solução 50% (v/v) acetonitrila e água;
- Solução ácido monocloroacético 2,5 M (118 g do ácido em 500 mL de água);
- Solução de acetato de potássio 2,5 M (122,5 g do sal em 500 mL de água);
- Solução tampão de ácido monocloroacético/acetato de potássio pH 3 (312 mL/ 200 mL v/v);
- Tiosulfato de sódio P.A.;
- Solução padrão de referência de aldicarb com certificado de pureza, *AccuStandard Inc.*, 1 mL, concentração 1000mgL^{-1} ;
- Solução padrão de referência de carbofuran com certificado de pureza, *AccuStandard Inc.*, 1 mL, concentração 1000mgL^{-1} ;
- Padrão analítico de carbaryl 99,8%, com certificado de pureza, *Institut of Organic Industrial Chemistry*;
- Padrão analítico de atrazina 99,8%, com certificado de pureza, *Institut of Organic Industrial Chemistry*;
- Padrão analítico de simazina 99,8%. *Ciba – Geigy*;

- Padrão analítico de trifluralin 99,5%, com certificado de pureza, *Institut of Organic Industrial Chemistry*.

4.3. SOLUÇÕES - PADRÃO

Todas as soluções - padrão foram preparadas com solventes grau resíduo pesticida e/ou água ultrapura de baixa condutância ($<1,0 \mu\text{Scm}^{-1}$). As soluções padrão estoque foram preparadas a partir de padrões certificados, pesados e/ou diluídos com acetonitrila nas concentrações desejadas. As soluções padrão intermediária e de trabalho, contendo todos os compostos foram preparadas diluindo as soluções padrão estoque com a solução 50% (v/v) acetonitrila e água, também em concentrações desejadas.

- Solução padrão estoque do composto aldicarb, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão estoque do composto carbofuran, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão estoque do composto carbaryl, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão estoque do composto atrazina, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão estoque do composto simazina, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão estoque do composto trifluralin, preparado a partir do padrão certificado, concentração de 10 mgL^{-1} em 100 mL de acetonitrila;
- Solução padrão intermediária contendo todos os compostos, concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ em 50 mL em acetonitrila.
- Soluções padrão de trabalho as concentrações de: 0,02; 0,05; 0,08; 0,2 e 0,5 mgL^{-1} em 10 mL de ACN/H₂O 50 % (v/v).
- Solução padrão de trabalho mista, para otimização do método, contendo 0,2 mgL^{-1} de aldicarb, carbofuran, carbaryl, atrazina e triflutarlin e 2,0 mgL^{-1} de simazina em 10 mL de ACN/H₂O 50 % (v/v).

- Soluções padrão de trabalho (individual) para cada pesticida a $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ em 10 mL de ACN/H₂O 50 % (v/v) para identificação, através dos tempos de retenção, em condições ótimas de separação.

Observações e cuidados especiais: todas as soluções - padrão preparadas devem ser mantidas no congelador e na ausência de luz. Estas soluções, armazenadas adequadamente, são estáveis por 1 ano (BARCELÓ, 1993b; DEAN, 1996).

4.4. COLETA E PREVERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras água foram coletadas na superfície dos rios, em vidro âmbar de 1 L contendo 30 mL de solução tampão pH 3 e uma espátula (aproximadamente 80 mg) de tiosulfato de sódio (STANDARD METHODS, 1997). Após a coleta os fracos foram tampados com papel alumínio e vedados com a tampa. As amostras, devidamente identificadas, com nome, local, data e hora, foram mantidas em isopor com gelo para o transporte. Ao chegar no laboratório os frascos foram transferidos para refrigeradores e estes mantidos a temperatura aproximada de 4°C. As amostras foram analisadas em menos de 28 dias. A Figura 11, apresenta, a título de ilustração, dois pontos de coleta das amostras, dos 13 locais amostrados.



Figura 11. Rio Jaguari Mirim e Córrego Fartura

4.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de água superficial foram filtradas em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, para eliminar partículas em suspensão. O pH das amostras foi medido e mantido em 3. Um volume de 250 mL da amostra foi transferido para um balão volumétrico. Em seguida as amostra foram submetidas à *SPE*, a temperatura ambiente.

Para os estudos de recuperação dos compostos na *SPE* foram preparadas amostras de água ultrapura e água superficial contendo todos os compostos na concentração de $1,0\ \mu\text{gL}^{-1}$. As amostras de água ultrapura foram previamente tamponadas com 7,5 mL de solução tampão pH 3 e 250 μL de solução padrão intermediária de concentração $1,0\ \text{mgL}^{-1}$ em 250 mL. Nas amostras de água superficial adicionou-se apenas a solução padrão.

4.6. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-SÓLIDO DOS PESTICIDAS EM ÁGUAS SUPERFICIAL

Visando uma extração eficiente dos compostos pesticidas (aldicarb, carbaryl, carbofuran, atrazina, simazina e trifluralin) em águas superficiais, duas colunas de *SPE*, disponíveis no mercado, foram avaliadas: *ENVI-18* (preenchida com 500 mg da fase C_{18}) e *ENVI Chrom-P* (preenchida com 250 mL da resina de copolímero estirenodivinilbenzeno), ambas de mesmo volume, 3 mL e fabricante, *Supelco*. Os melhores resultados de extração foram relacionados, principalmente, com fatores de exatidão, precisão e eliminação de interferentes, para tanto foram extraídas amostras de água ultrapura branco e fortificadas com $1,0 \mu\text{L}^{-1}$ de cada composto (adição padrão). Na etapa de eluição dos compostos da coluna de *SPE*, diferentes solventes foram testados: acetonitrila, metanol e acetato de etila. As amostras extraídas foram analisadas no sistema de cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica, previamente otimizada. Mais detalhe sobre o estudo em questão estão descritos no capítulo 5, item 5.5.

As Figuras, 13, 14 e 15 apresentam todos os materiais, vidrarias e aparatos utilizados para extração das amostras por *SPE*. A Figura 15, apresenta o sistema de *SPE* desenvolvido e montado em nosso laboratório. Cabe salientar que, esse equipamento tem a capacidade extrair simultaneamente de 1 a 5 amostras, sob vácuo, permitindo um fluxo de aproximadamente $5,0$ a $6,0 \text{ mLmin}^{-1}$, realizando as extrações em menos de 50 min.

Entre as duas colunas estudadas, a mais indicada para extração dos compostos foi a *ENVI-18*, 500 mg, 3 mL (polipropileno) *Supelco* procedendo-se da seguinte forma: as colunas foram condicionadas com 3 mL acetonitrila e 3 mL de água, para ativação dos sítios e eliminação de impurezas. Em seguida, 250 mL da amostra tamponada a pH 3 foi extraída a um fluxo de $5,0$ a $6,0 \text{ mLmin}^{-1}$. Antes da etapa de secura da coluna, sob vácuo, 3 mL de água foi adicionado para eliminação de interferentes. Os compostos foram eluídos da coluna adicionado-se 2 volumes de 3 mL do solvente acetonitrila. Para análise no cromatógrafo líquido, o solvente foi evaporado até a secura em fluxo de nitrogênio, em seguida o resíduo foi diluído com 2 mL da solução 50% (v/v) acetonitrila e água e injetado no cromatógrafo líquido ($20 \mu\text{L}$).

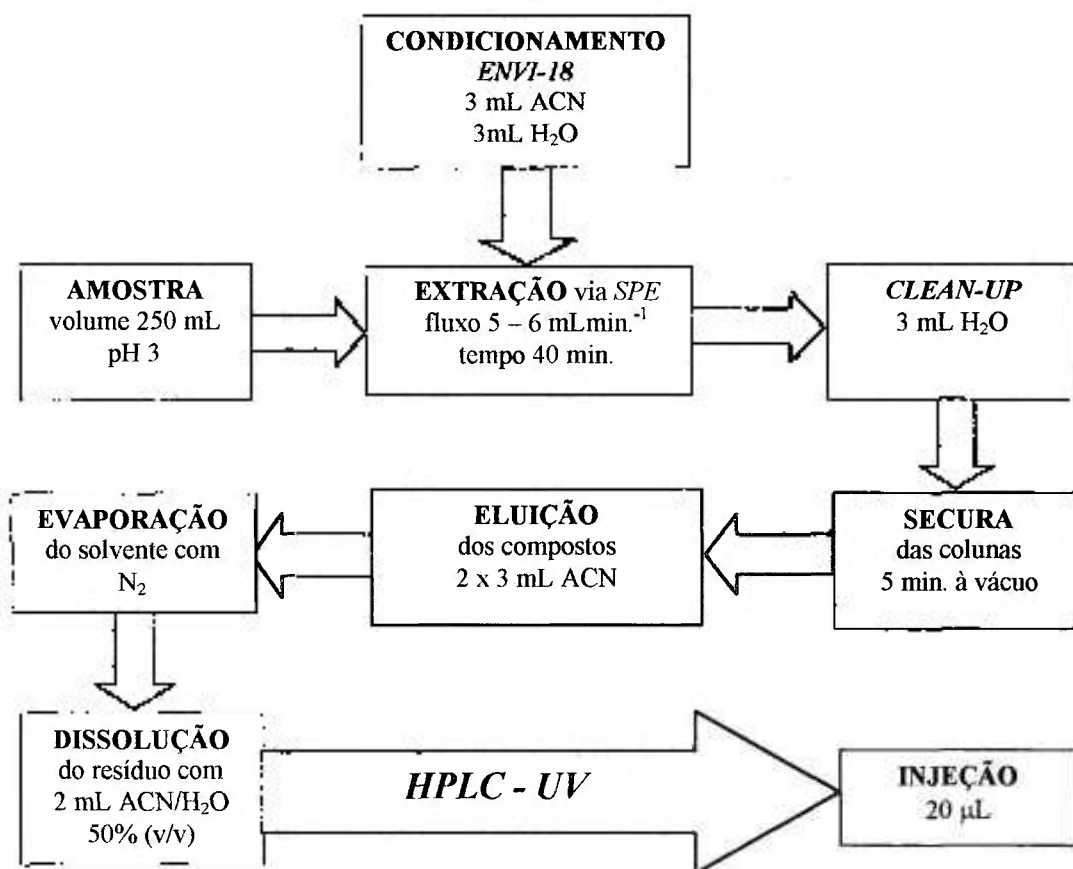


Figura 12. Esquema do procedimento de extração líquido-sólido.

Observações: Não deixar a coluna secar nas etapas de condicionamento, percolação da amostra e *clean-up*. Quando adicionar um volume de solvente ou água nas etapas de extração, deixar em contato por no mínimo 2 minutos.

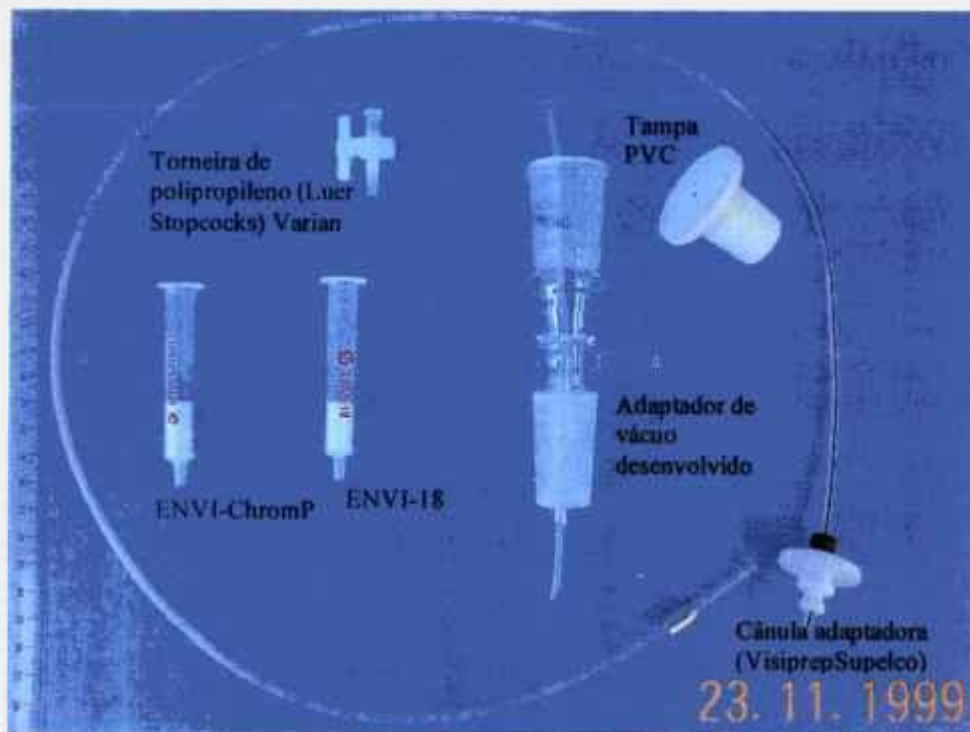


Figura 13 . Aparatos de *SPE*.

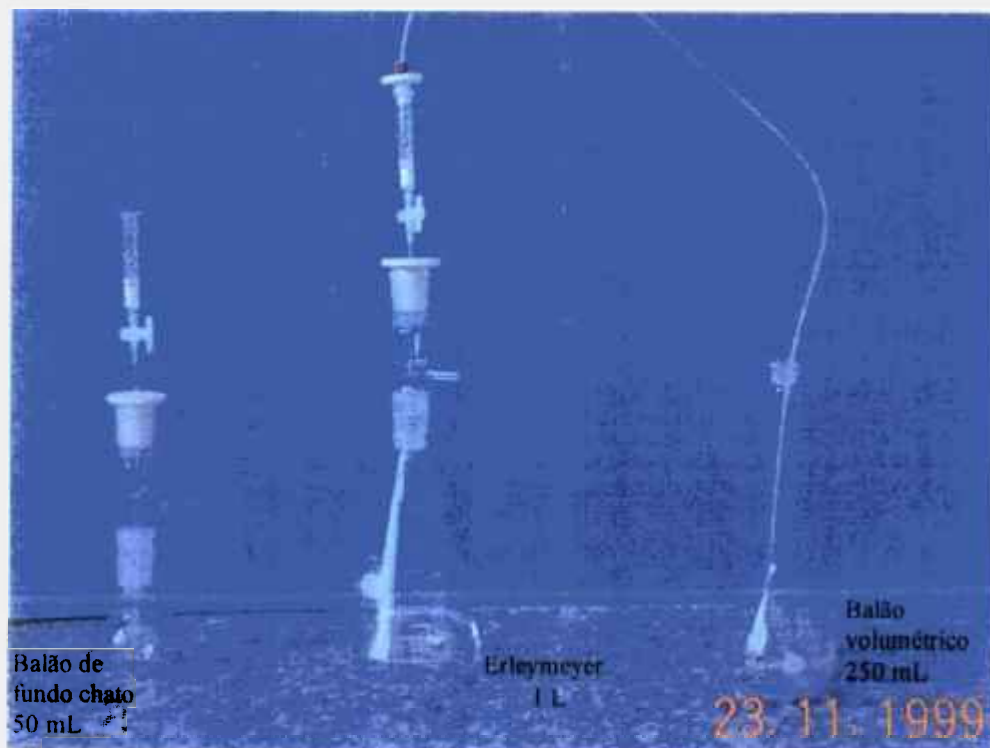


Figura 14. Vidrarias utilizadas na *SPE*.

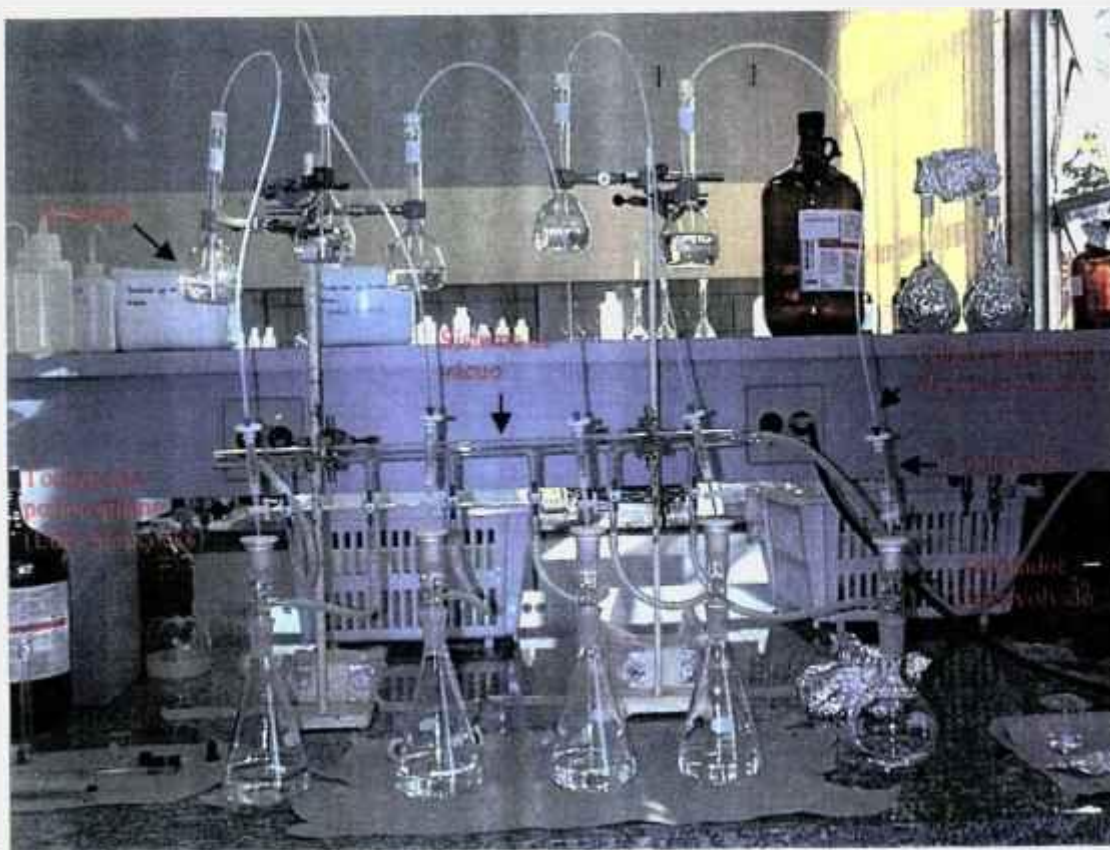


Figura 15. Aparelhagem de *SPE* desenvolvida no laboratório.

4.7. CONDIÇÕES DE ANÁLISE DOS PESTICIDAS NO SISTEMA DE HPLC UV/vis

Uma coluna de fase reversa C₁₈, *Shim-Pack CCL-ODS* (150 x 4,6 mm diâmetro interno 5 µm) *Shimadzu* e uma pré-coluna *G-ODS C₁₈* (10 x 4,0 mm diâmetro interno 5 µm), *Shimadzu*, foram utilizadas para separação dos compostos. Após alguns testes, variando a composição da fase móvel (acetonitrila e água) chegou-se a uma separação adequada para todos os compostos, através de um gradiente de eluição, aumentando a composição do solvente orgânico em função do tempo de análise. Detalhes sobre a otimização da separação dos compostos são descritos no capítulo 5, item 5.1 A Tabela 4, descreve detalhadamente, as condições analítica - instrumental. As Figuras 16 e 17, apresentam, respectivamente, um esquema do gradiente de eluição e o sistema de cromatografia líquida utilizados.

Tabela 4. Programação do gradiente de eluição utilizando coluna C₁₈ (150mm x 4,6 mm ID 5µm) e a fase móvel água (A) e acetonitrila (B).

Tempo (min.)	%A	%B	Curva
0	52	48	-----
4,5	52	48	-----
20,0	20	80	Convexa*
21,0	20	80	-----

*Curva de gradiente não linear, convexa inclinação de -8

Condições:

Fluxo da Fase Móvel: 1,0 mLmin.⁻¹;

Pressão: 96 Kgfc⁻²;

Volume de Injeção: 20 µL;

Deteccção no ultravioleta: 220 nm.

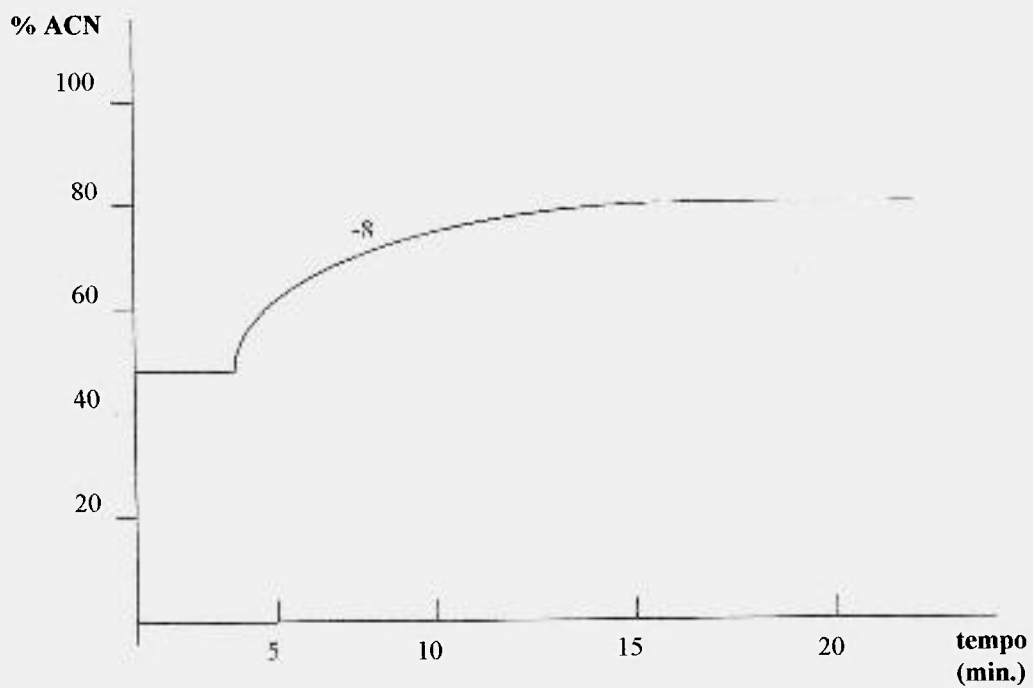


Figura 16. Esquema do gradiente de eluição.

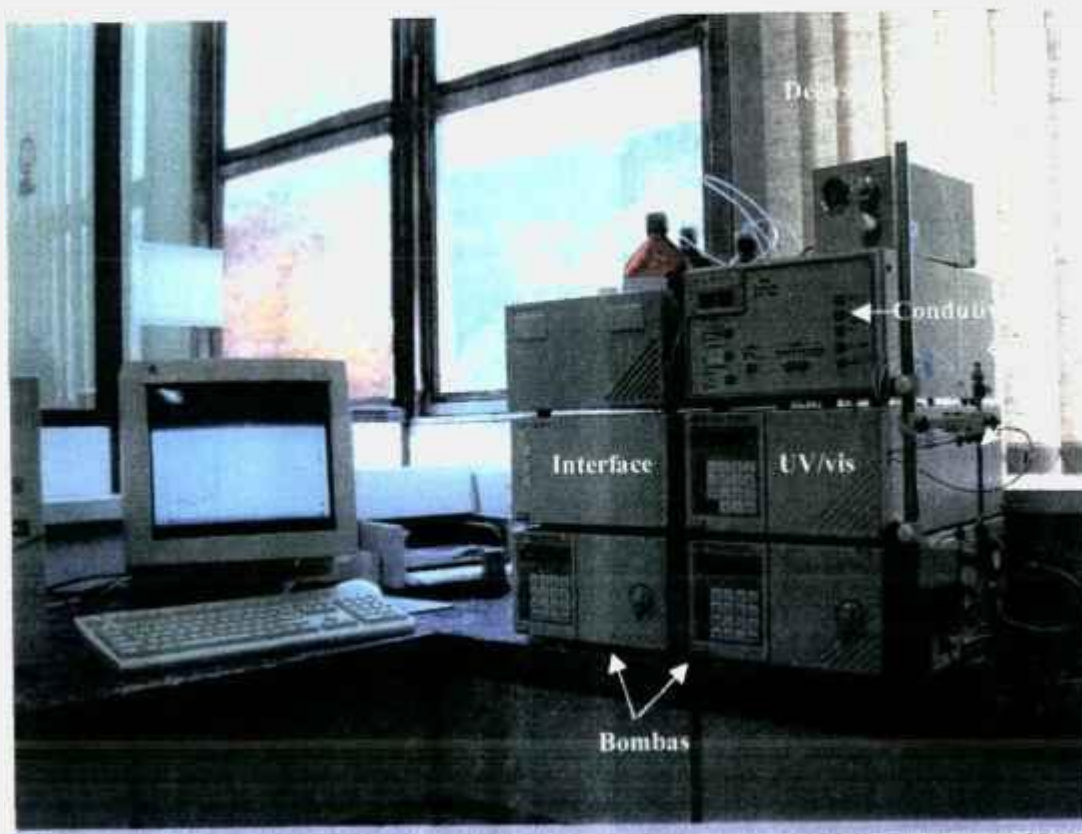


Figura 17. Sistema de HPLC.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para validação de todo e qualquer método analítico instrumental alguns testes analíticos e estatísticos foram realizados. Estes testes garantem a confiabilidade e exatidão dos resultados obtidos pela metodologia utilizada. Para tanto foram seguidas as Boas Práticas de Laboratório (BPL) recomendada por COFINO (1993), para assegurar a qualidade dos resultados fornecidos.

5.1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS PESTICIDAS POR HPLC

O primeiro passo para análise em HPLC é separar, com boa resolução, todos os compostos de interesse presente em uma solução padrão. Este estudo consiste em pesquisar qual a melhor fase móvel e sua composição, para obtenção de picos resolvidos.

Para os testes de separação dos pesticidas foi preparada uma amostra padrão contendo todos os compostos aldicarb, carbofuran, carbaryl, atrazina e trifluralin a concentração de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ (exceto para o composto simazina a concentração de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$). Estabelecida a coluna C_{18} (150 mm x 4,6 mm ID 5 μm) para separação dos compostos e o comprimento de onda para suas detecções, no caso 220 nm (SCHELTT, 1991; PARRILLA et al, 1994; SHCÜLEIN et al, 1995), o segundo passo foi definir a fase móvel, optou-se pelo solvente acetonitrila e água, recomendado por muitos autores (LOUGH et al, 1995; SNYDER et al, 1997), como a melhor mistura para começar um teste de separação. Também, foi levado em consideração as referências bibliográficas estudadas, onde colunas de fase reversa foram utilizadas para as separações dos pesticidas.

Mantendo-se um fluxo de $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ a composição da fase móvel, ou seja, a razão em porcentagem acetonitrila – água, foi variada de modo isocrático, a fim de avaliar a melhor condição de separação dos composto, verificando o tempo de retenção (t), o fator

de separação (k), a seletividade (α) e principalmente a resolução (R_s), para cada composição aplicada. Iniciou-se o estudo nas seguintes condições: 60% acetonitrila/ 40% H_2O , variando a composição até 40% acetonitrila/ 60% H_2O . Os cromatogramas obtidos referente a este estudo são mostrados na Figura 18.

Avaliando-se os cromatogramas da Figura 18 pode-se observar a ausência do composto trifluralin. Nas diversas condições aplicadas, o composto, de alto peso molecular e propriedades características, apresentou alto tempo de retenção na coluna. Aplicando uma composição 70% acetonitrila/ 30% H_2O , o composto apresentou um tempo de retenção na coluna de 12 min., conforme mostra o cromatograma da Figura 19, porém os outros compostos não são separados, devido a elevada força da fase móvel. Este problema foi solucionado e será discutido mais adiante.

Também pode-se observar na Figura 18, que a melhor separação dos compostos ocorre entre 48 e 50% de acetonitrila. O par crítico, ou seja, os dois compostos de difícil separação são carbaryl e atrazina.

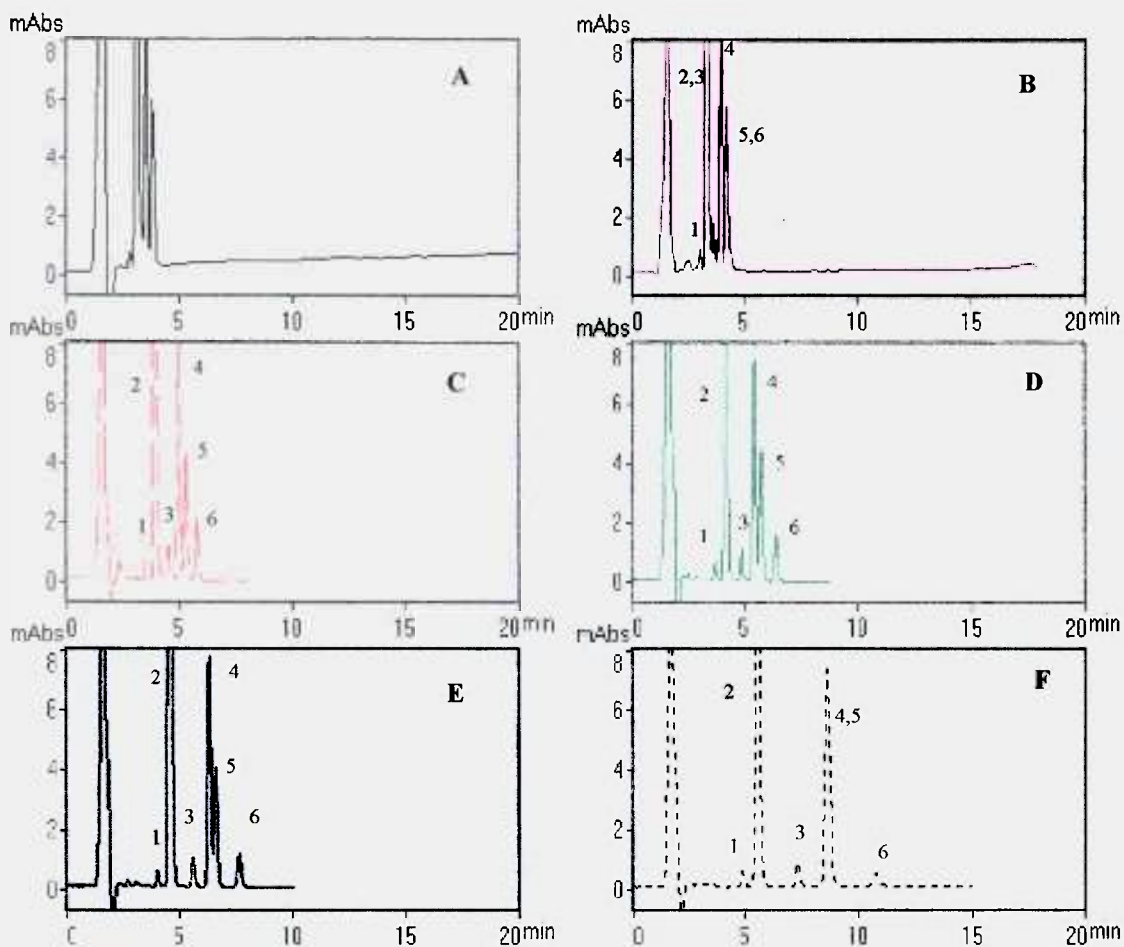


Figura 18. Separação dos compostos em diferentes composições da fase móvel. 1-aldicarb, 2-simazina, 3-carbofuran, 4-carbaryl, 5-atrazina, 6-impureza.

Condições:

A: 60% ACN/ 40% H₂O

D: 48% ACN/ 52% H₂O

B: 56% ACN/ 44% H₂O

E: 45% ACN/ 55% H₂O

C: 50% ACN/ 50% H₂O

F: 40% ACN/ 60% H₂O

Fluxo da Fase Móvel: 1,0 mLmin.⁻¹

Volume de Injeção: 20 µL

Massa dos compostos injetada: 4,0 ng e 40 ng (simazina)

Comprimento de Onda: 220 nm

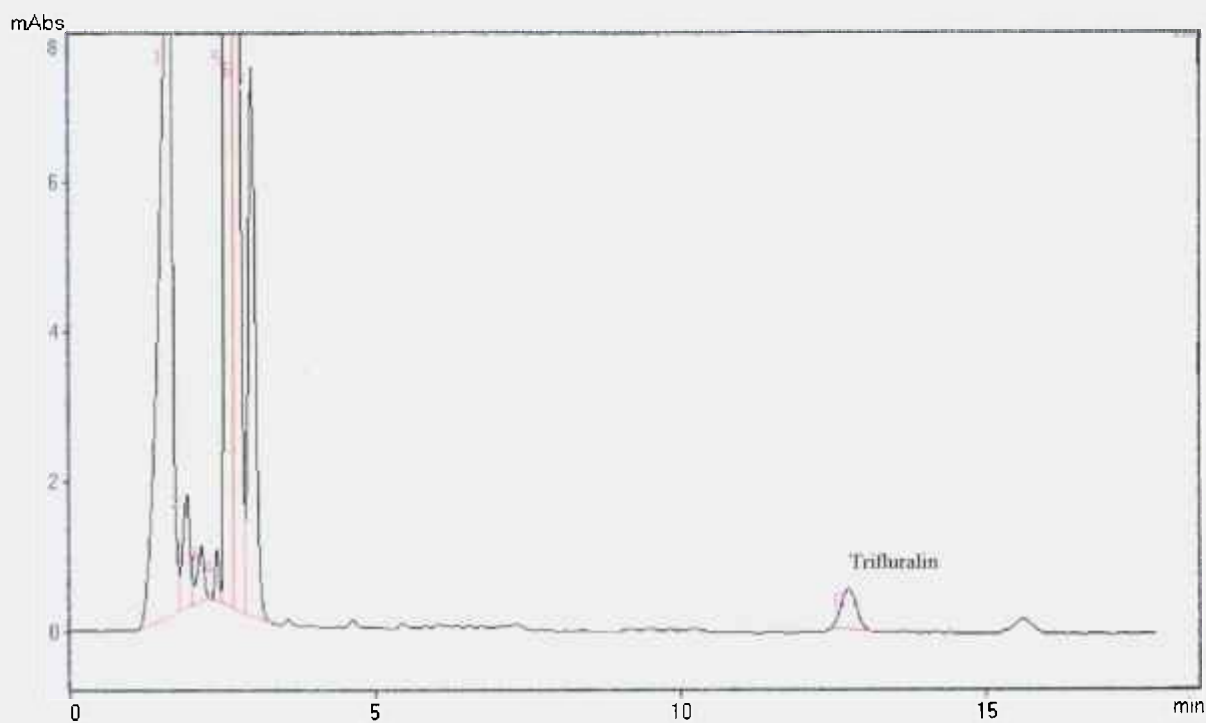


Figura 19. Separação da mistura dos compostos pesticidas em programação isocrática 70 % ACN/ 30% H₂O.

Condições:

Conc. da mistura: 0,2 mgL⁻¹ (simazina 2,0 mgL⁻¹)

Fluxo da fase móvel: 1,0 mLmin.⁻¹

Volume de injeção 20 µL

Comprimento de onda: 220 nm.

Para um estudo otimizado da influência da separação dos compostos em função das composições da fase móvel e para a escolha da melhor condição de separação, um gráfico de $\log k$ vs. % de acetonitrila foi construído com os valores obtidos experimentalmente.

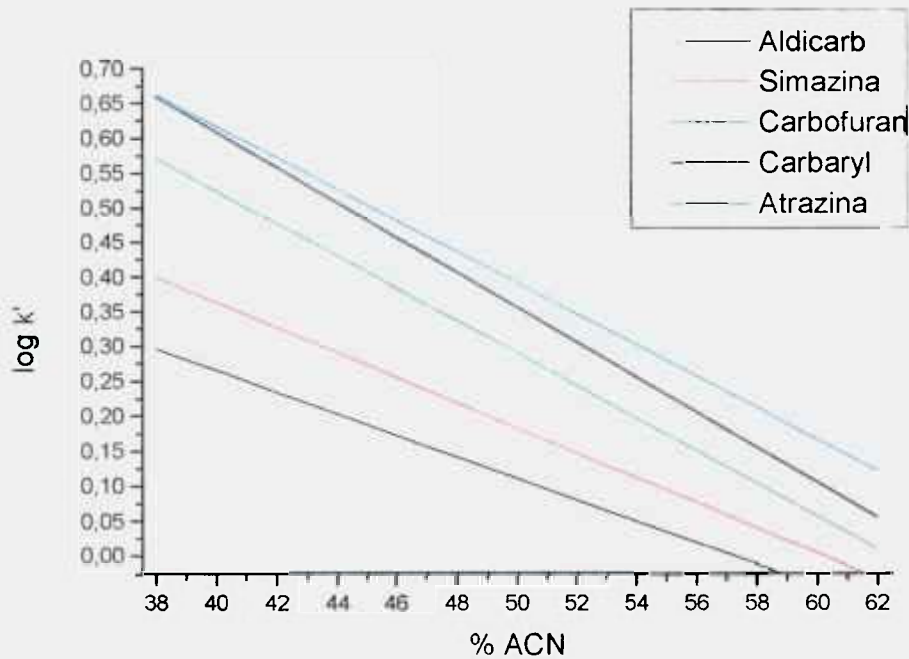


Figura 20. Influência da separação dos compostos em função da composição da fase móvel.

No gráfico da Figura 20 pode-se observar que a melhor condição de separação é obtida utilizando-se 48% de acetonitrila, conforme dito anteriormente, visto que os valores de k são bem distintos e α maior que 1. Os compostos carbaryl e atrazina possuem os mesmos valores de k , portanto não são separados com 40% de acetonitrila, como observado no gráfico através da sobreposição dos pontos (ou retas). A aproximação dos pontos (extremidades) nas curvas indica uma separação ruim ou pobre, devido aos valores próximos de k .

Com uma composição do eluente de 48% de acetonitrila e 52% de H_2O foi possível separar os cinco compostos com valores de k entre 1 e 11, com uma resolução para o par crítico de 1,5, o que é perfeitamente aceitável.

Estabelecido as condições de separação para os composto aldicarb, simazina, carbofuran, carbaryl e atrazina, não foi difícil otimizar as condições, para obter os valores de k aceitáveis (menor ou igual a 10), para o composto trifluralin. Para isso foi utilizado

uma programação de gradiente de eluição, a fim de diminuir o tempo de retenção do composto trifluralin na coluna cromatográfica, aumentado a porcentagem de solvente orgânico de forma não linear, durante a corrida. Após alguns ensaios chegou-se a uma programação ideal do gradiente de eluição, conforme Tabela 4, descrita anteriormente. O cromatograma da Figura 21, mostra a separação de todos os compostos em tempo de análise menor que 16 min. A Tabela 5 apresenta os parâmetros de separação obtidos.

Tabela 5. Resultados da separação dos compostos aplicando o gradiente de eluição.

Composto	t (min)	k	α	Rs	N
Aldicarb	3,57	1,87	----	----	8302
Simazina	4,02	2,24	1,20	2,80	8843
Carbofuran	4,75	2,82	1,26	4,02	9933
Carbaryl	5,29	3,26	1,15	2,70	10364
Atrazina	5,61	3,52	1,08	1,52	10116
Trifluralin	15,1	11,2	2,78	35,3	58206

Comparando os valores de k e R_s obtidos com os valores exigidos pela literatura, k entre 2 e 10 e R_s maior o igual a 1,5 (SNYDER et al, 1997), adotou-se estas condições para a separação dos compostos. Isto significa que, nestas condições os compostos analisados estão resolvidos, ou seja, otimamente separados. Na presença de interferentes, analisando amostras reais, estes fatores devem continuar constantes. Outros fatores como pH e força iônica da fase móvel não foram estudados, pois o método proposto apresentou-se eficiente. Verificou-se também, que fatores como estes são menos utilizados para separação destes compostos, segundo a bibliografia (BARCELÓ et al, 1992; VITALI et al, 1994; JIMÉNEZ et al, 1997).

Outra mistura, metanol e água, também, foi utilizada como fase móvel, porém com menor eficiência. Com 50% metanol e 50% H₂O, utilizando um fluxo de 1,0 mLmin⁻¹, o tempo de análise estendeu-se muito, acima de 15 min., não separando os compostos simazina e carbofuran (par crítico), aumentando a pressão na coluna para 152 kgfcm⁻² (não recomendada pelo fabricante). A Figura 22, apresenta um cromatograma correspondente a esta separação, utilizando os eluentes metanol e água.

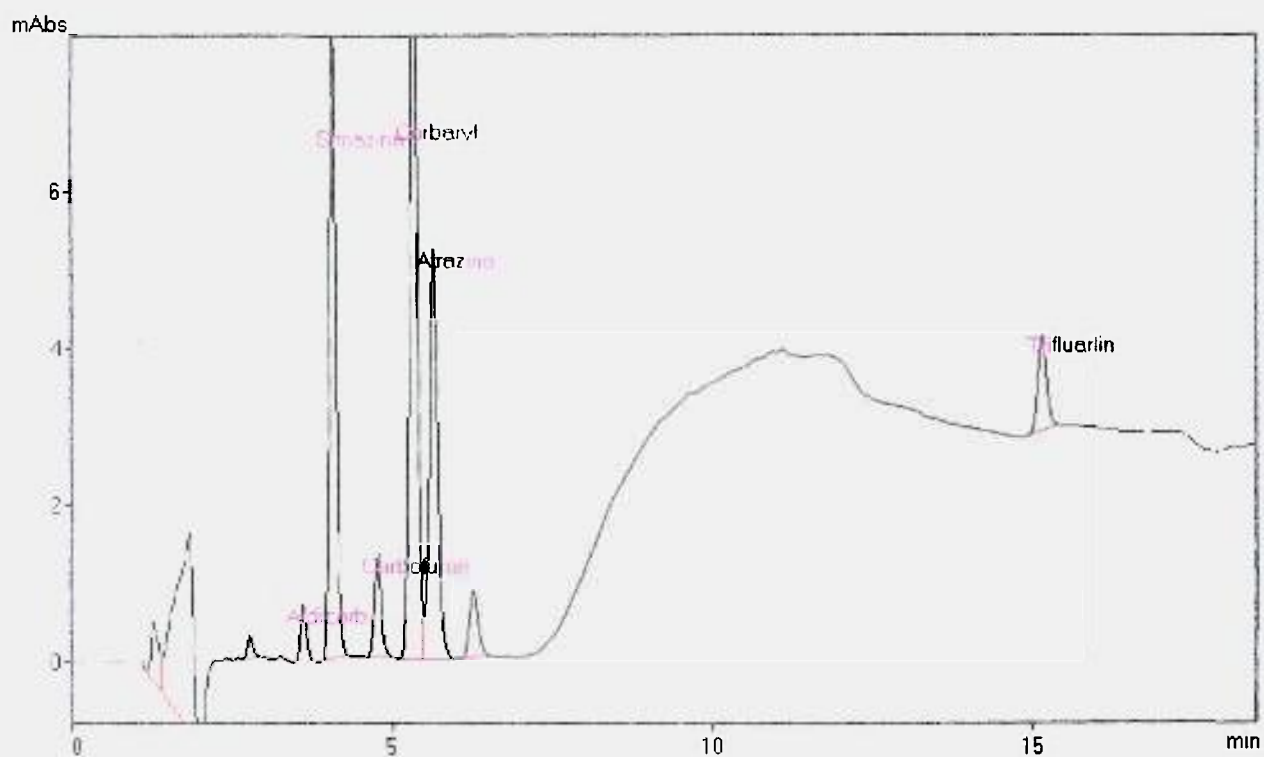


Figura 21. Cromatograma da separação ótima da mistura dos compostos pesticidas. Concentração. da Mistura $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ ($2,0 \text{ mgL}^{-1}$ simazina).

Condições de separação:

Gradiente de eluição: 48% ACN/ 52% H_2O de 0 a 4,5 min. GE convexo para 80% ACN/ 20% H_2O em 20 min.

Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$

Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$

Comprimento de onda: 220 nm

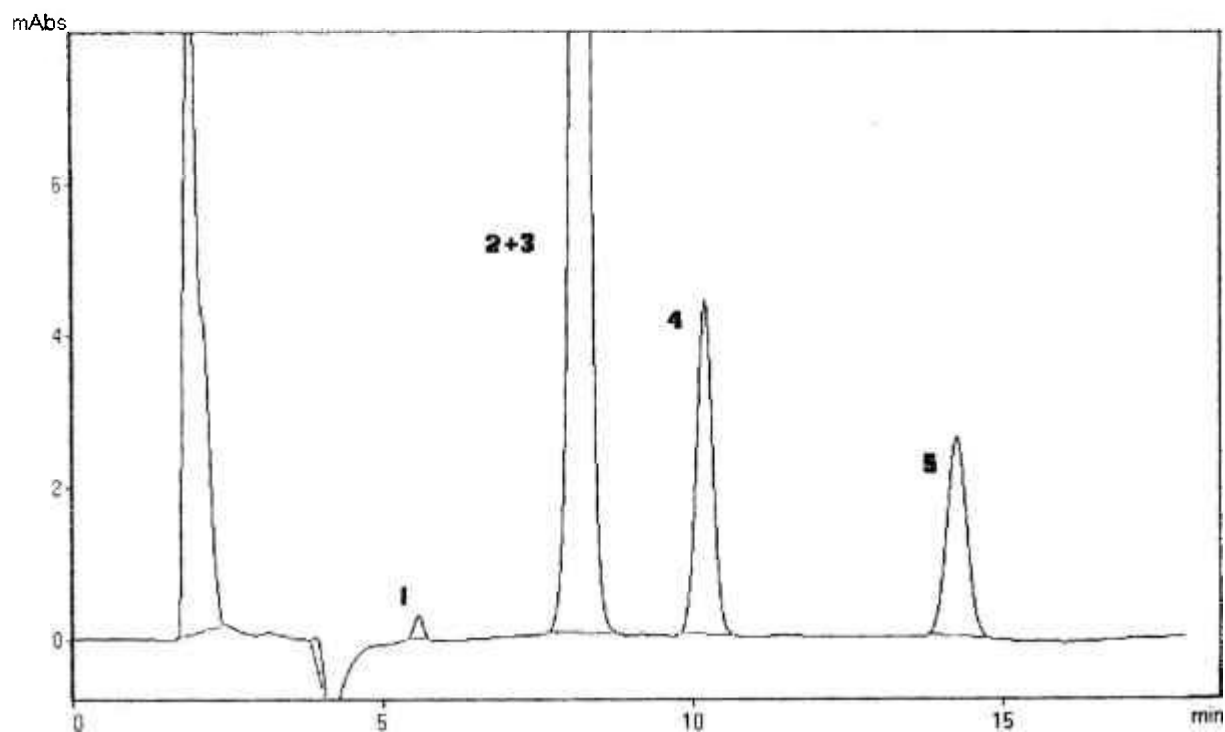


Figura 22. Cromatograma da separação da mistura dos compostos pesticidas em programação isocrática 50% MeOH/ 50% H₂O. 1- aldicarb, 2- simazina, 3- carbofuran, 4- carbaryl, 5- atrazina.

Concentração. da mistura: 0,2 mgL⁻¹ (simazina 2,0 mgL⁻¹)

Fluxo da fase móvel: 1,0 mLmin.⁻¹

Volume de injeção 20 µL

Comprimento de onda: 220 nm

Pode-se observar, em todos os cromatogramas obtidos, a presença de um pico com tempo de retenção de 6,3 min., este composto é uma impureza presente no solução padrão de carbaryl, identificada, quando injetada uma solução padrão do composto, com o intuito de determinar o tempo de retenção. Para todos os compostos foi realizado este teste, a fim de determinar o tempo de retenção e a ordem de eluição dos compostos nas condições de separação pré-estabelecidas. Os compostos também foram detectados a 254 nm sendo menos sensíveis a este comprimento de onda. As Figuras 23 e 24 apresentam os resultados desta comparação.

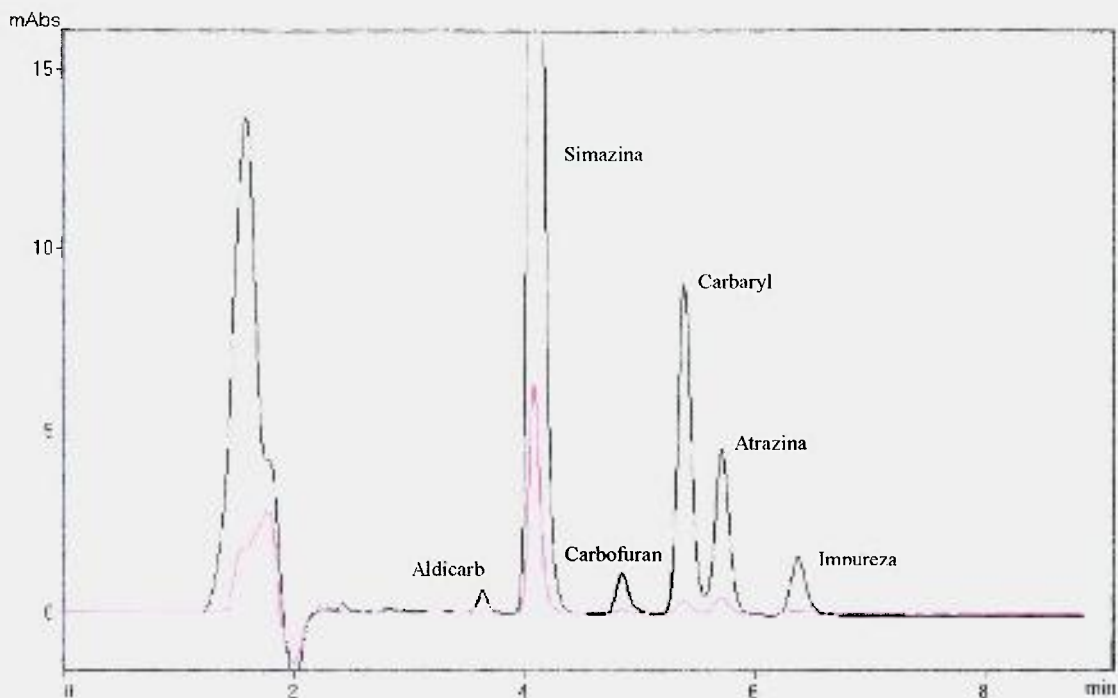


Figura 23. Comparação da absorvância dos compostos em dois comprimentos de onda distintos: 220 e 254 nm. Condições de análise: Isocrática 48% ACN/ 52% H₂O. Fluxo: 1,0 mLmin.⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Conc. dos compostos: 0,2 mgL⁻¹ e 2,0 mgL⁻¹ (simazina).

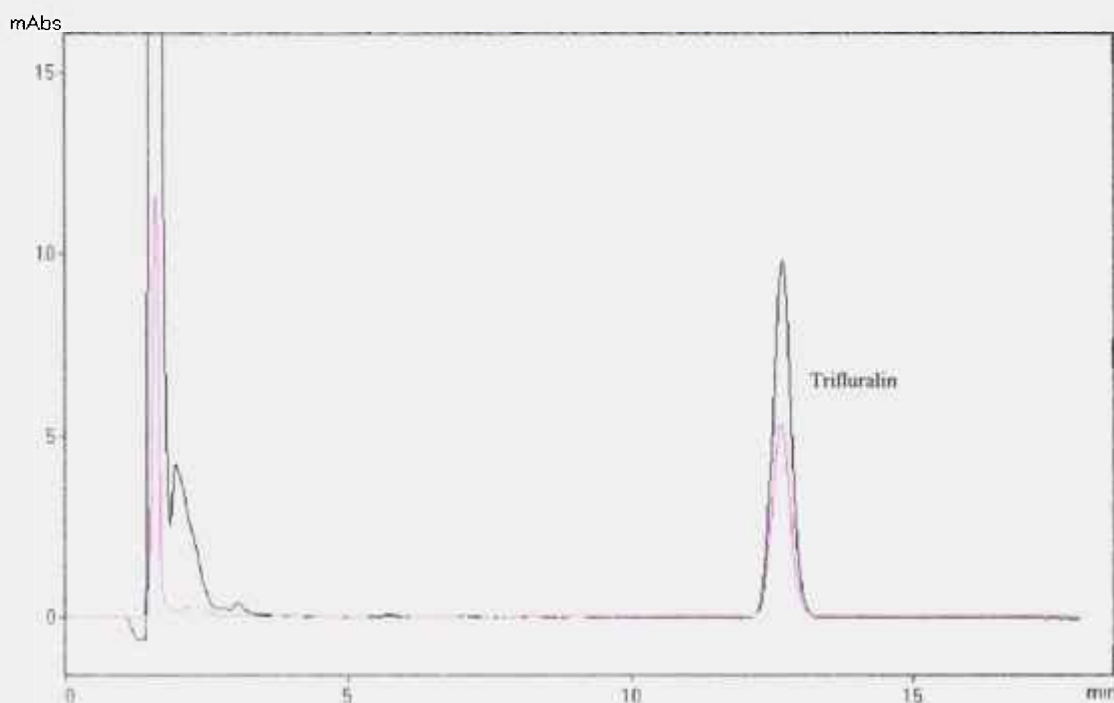


Figura 24 . Comparação da absorvância do composto trifluralin em dois comprimentos de onda distintos: 220 e 254 nm. Condições de análise: Isocrática 70% ACN/ 30% H₂O. Fluxo: 1,0 mLmin.⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Conc. do composto: 4,0 mgL⁻¹.

5.2. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

Estabelecidas as condições de separação dos compostos, foram construídas curvas analíticas para verificação da linearidade e sensibilidade do método. Para isso, foram analisadas soluções padrão de diferentes concentrações 0,02; 0,05; 0,08; 0,2 e 0,5 mgL^{-1} contendo todos os pesticidas em 50% ACN/ 50% H_2O (v/v). As curvas analíticas foram construídas pelo método de calibração externa, onde a altura dos picos obtidos são proporcionais ao sinal do detector a determinada concentração.

As curvas analíticas, mostradas na Figura 25, foram utilizadas para quantificação dos compostos, tanto nas amostra - teste para estudo da recuperação (ou exatidão), como em amostras reais de águas superficiais.

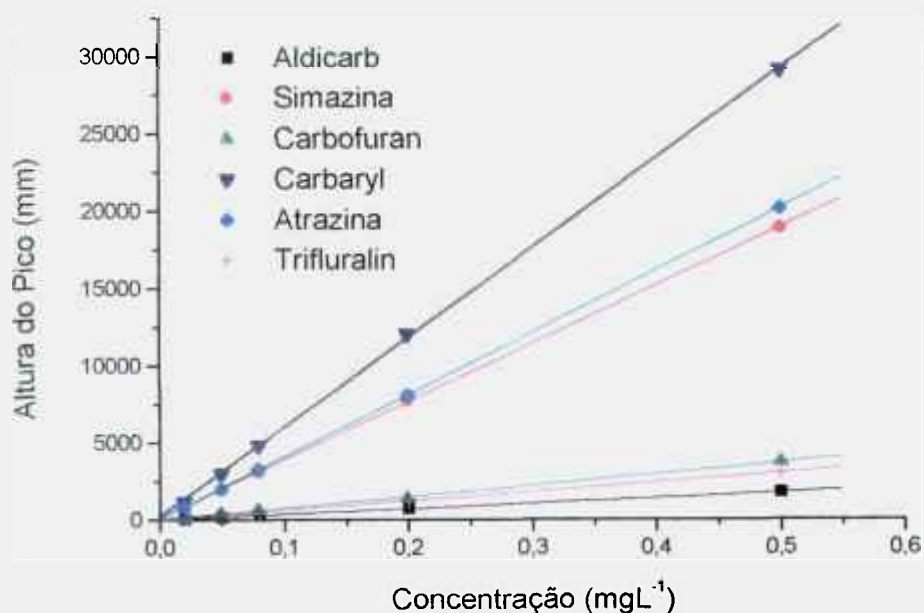


Figura 25 . Curvas analíticas.

Aplicada a regressão linear dos mínimos quadrados nas curvas analíticas, foi possível obter a equação da reta para cada analito. A Tabela 6 apresenta os valores, de “r”, que indicam o coeficiente de correlação, “m” a sensibilidade e “b” a interseção da reta.

Tabela 6. Valores obtidos de “m”, “b” e “r” através da regressão linear da curva analítica

Composto	m	b	r
Aldicarb	3.536	1,44	0,999
Simazina	37.640	115	0,999
Carbofuran	7.431	2,02	0,999
Carbaryl	58.029	170	0,999
Atrazina	40.261	72,0	0,999
Trifluralin	6.068	-17,3	0,999

As Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31 mostram os cromatogramas das soluções padrão contendo todos os pesticidas estudados nas concentrações; branco; 0,02; 0,05; 0,08; 0,2 e 0,5 mgL⁻¹, respectivamente.

Algumas considerações podem ser feitas com os resultados apresentados na Tabela 6: 1) quanto a linearidade, valores de “r” iguais ou próximo a 0,999 foram obtidos para todos os compostos, o que significa um fator de resposta do método de quantificação constante, visto que os pontos se correlacionam 99,9% com o modelo $y = mx + b$ da reta ou da curva analítica 2) o composto mais sensível, nas condições de detecção, escolhido o comprimento de onda 220 nm, é o carbaryl, pois o valor da inclinação da reta (m) é o maior obtido. A sensibilidade pode ser observada na curva analítica, onde a uma determinada concentração, 0,08 mgL⁻¹, por exemplo, a altura do pico obtida pelo composto carbaryl é maior do que a dos outros compostos, considerando que a resposta do detector é proporcional a altura do pico; 3) os valores de “b” aproximam-se da origem, ou seja, próximos de 0, com pequenos desvios, obtidos nas curvas dos compostos carbaryl, atrazina e simazina, pois a sensibilidade destes compostos são alta, proporcionando sinais altos, verificado nos baixos limites de detecção. Valores próximos de 0, onde a reta passa pela origem, significa que o método não sofre influência de erros não aleatórios ou indeterminados.

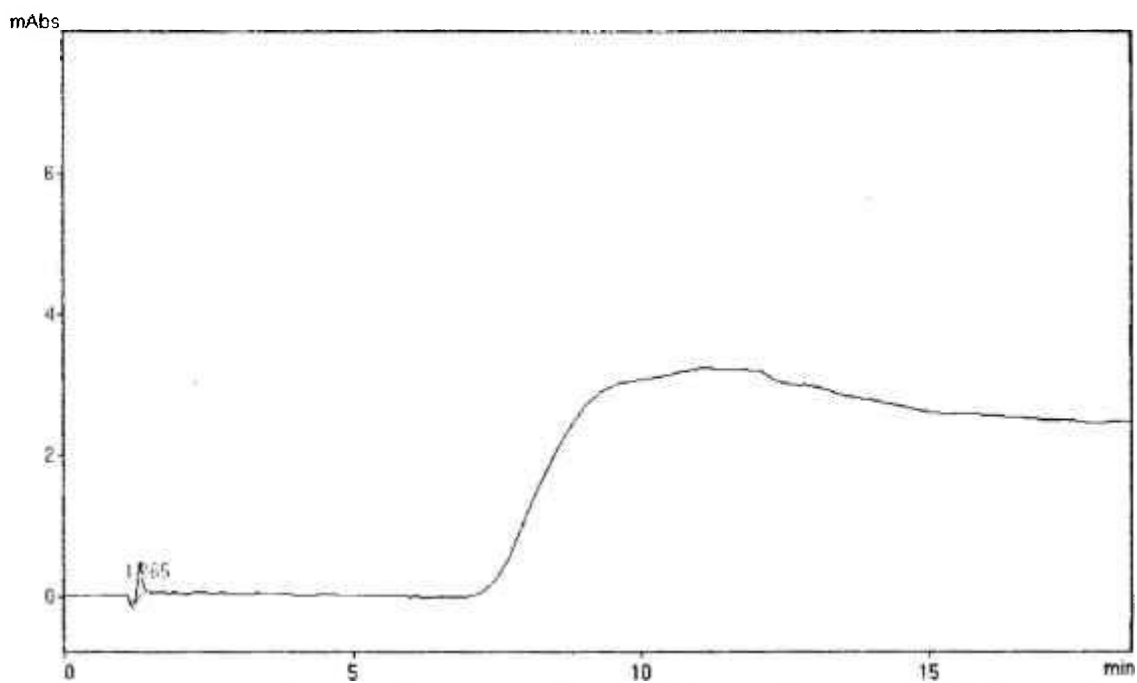


Figura 26. Cromatograma da amostra - branco 5 0% ACN/ 50% H₂O (v/v). $t_0 = 1.265$

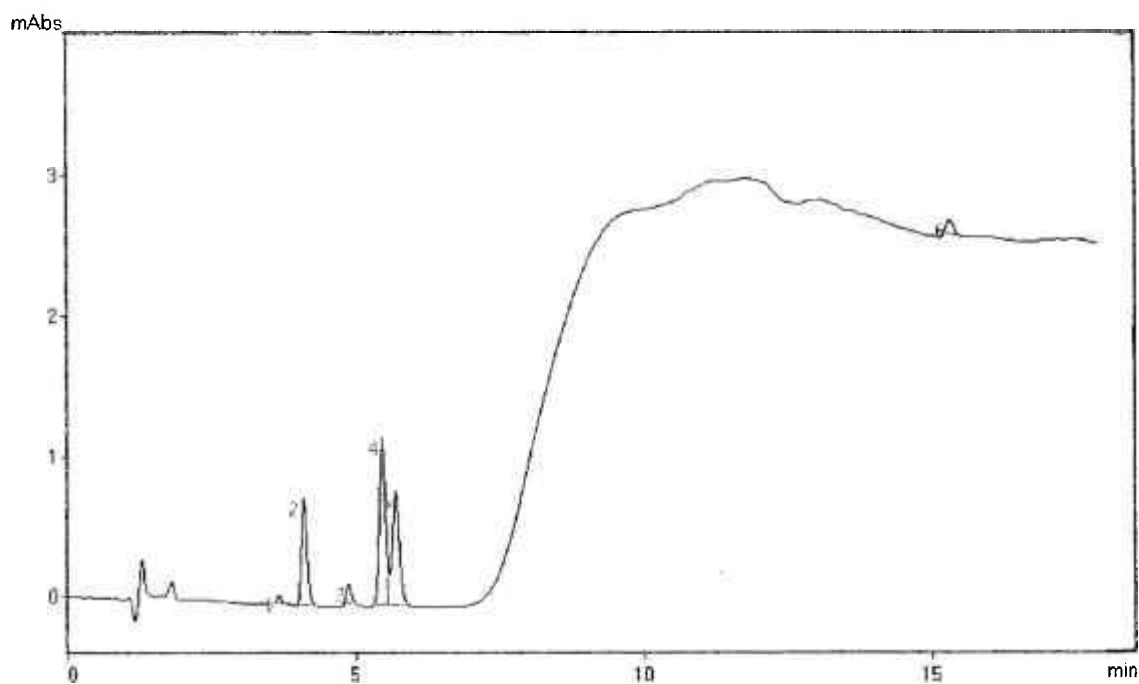


Figura 27. Cromatograma da amostra padrão, concentração 0,02 mgL⁻¹ (massa injetada = 0,4 ng) 1-aldicarb, 2- simazina, 3-carbofuran, 4- carbaryl, 5- atrazina, 6- trifluralin.

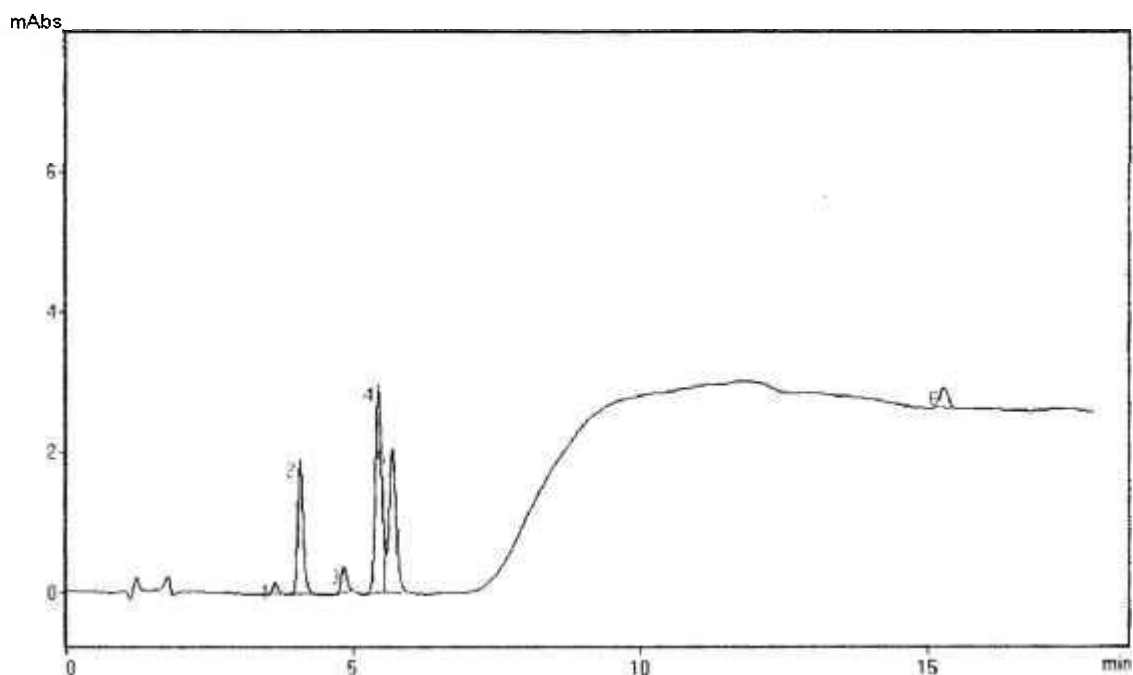


Figura 28. Cromatograma da amostra padrão, concentração $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ (massa injetada = $1,0 \text{ ng}$) 1-aldicarb, 2- simazina, 3-carbofuran, 4- carbarvl. 5- atrazina. 6- trifluralin.

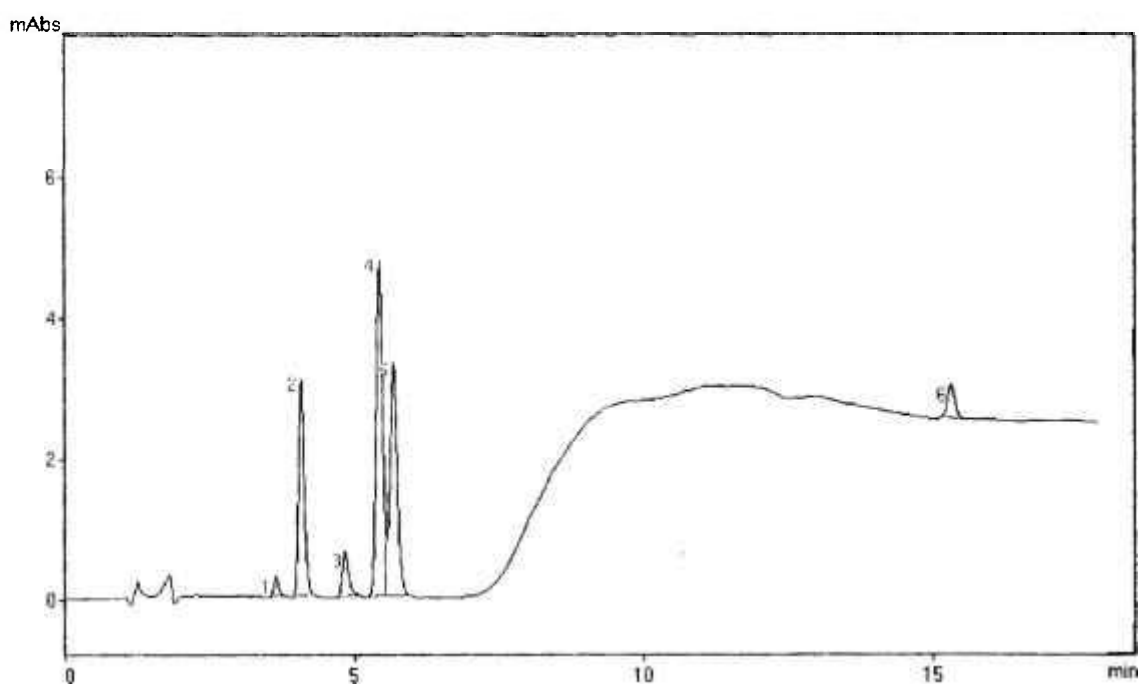


Figura 29. Cromatograma da amostra padrão, concentração $0,08 \text{ mgL}^{-1}$ (massa injetada = $1,6 \text{ ng}$) 1-aldicarb, 2- simazina, 3-carbofuran, 4- carbaryl, 5- atrazina, 6- trifluralin.

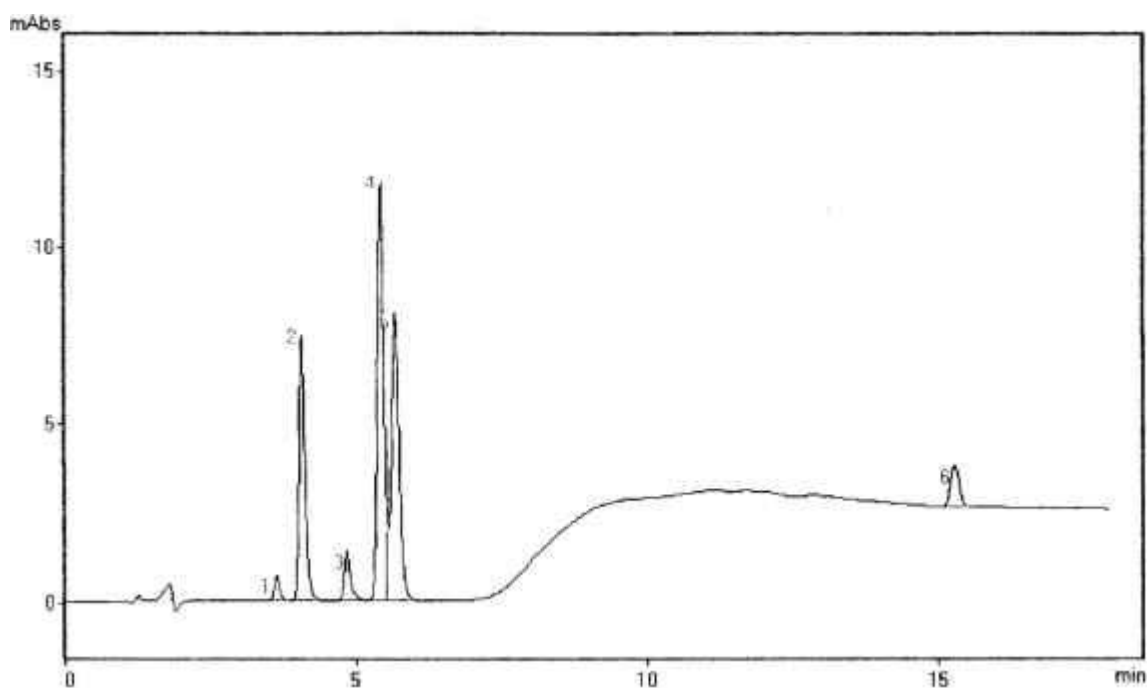


Figura 30. Cromatograma da amostra padrão, concentração 0,2 mgL⁻¹ (massa injetada = 4,0 η g) 1-aldicarb, 2- simazina, 3-carbofuran, 4- carbaryl, 5- atrazina, 6- trifluralin.

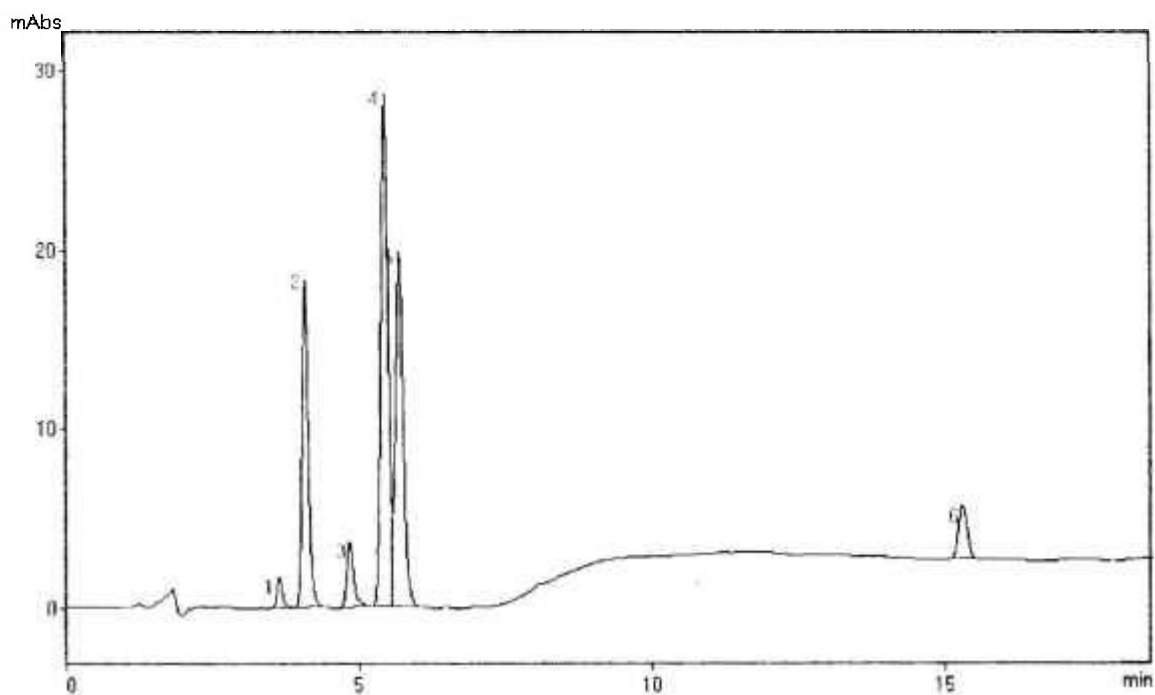


Figura 31. Cromatograma da amostra padrão, concentração 0,5 mgL⁻¹ (massa injetada = 10 η g) 1-aldicarb, 2- simazina, 3-carbofuran, 4- Carbaryl, 5- atrazina, 6- trifluralin.

Outra forma de verificar a linearidade é construir um gráfico, fator de resposta (ou sensibilidade) vs concentração do analito, apresentado na Figura 32. Os valores do fator de resposta (altura do pico/concentração do analito) foram calculados, a partir dos resultados obtidos das alturas dos picos nas soluções padrão utilizadas anteriormente. Cabe ressaltar, que o fator de resposta deverá ser independente da concentração se o método for verdadeiramente linear.

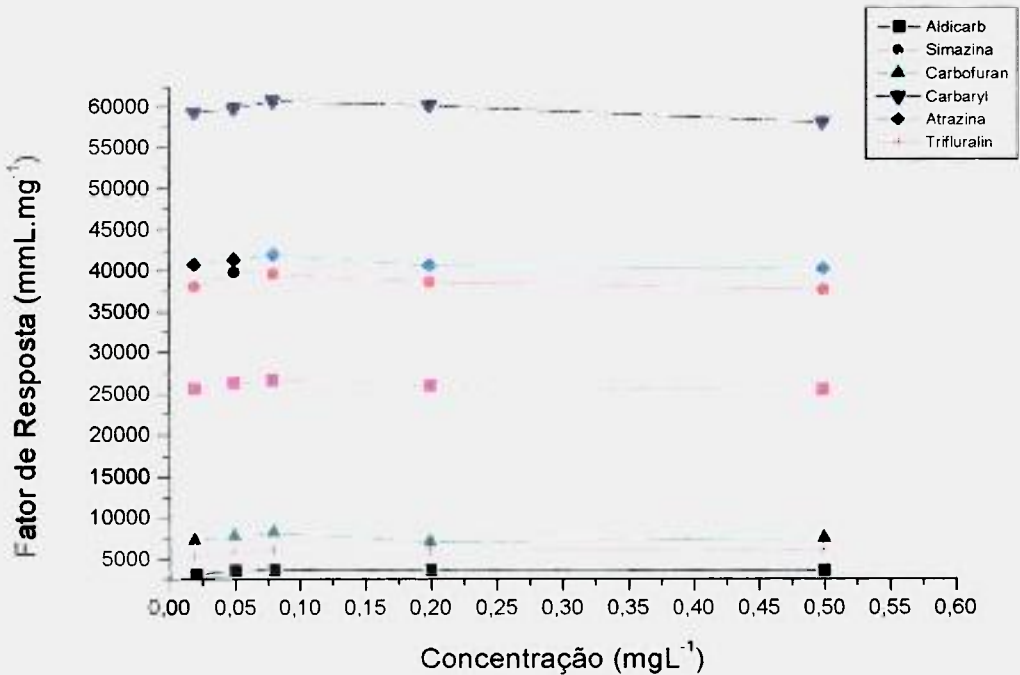


Figura 32. Fator de resposta x concentração dos analitos em mgL⁻¹.

No gráfico da Figura 32 podemos verificar, mais uma vez, a linearidade do método de quantificação para faixa de concentração escolhida. Calculou-se os desvios padrão relativo entre os pontos, obtendo valores abaixo de 6,0%. Isto significa que o detector está reproduzindo os sinais com boa precisão para esta faixa de concentração, levando em consideração erros na preparação da amostra (erros de diluição), volume de injeção, integração dos picos e método de calibração.

5.3. REPETIBILIDADE E ESTABILIDADE DO SISTEMA

Três curvas analíticas foram construídas em dias diferentes, para o estudo da precisão intermediária e estabilidade do sistema. Todas as soluções padrão foram injetadas em triplicata para o estudo da repetibilidade da técnica. Para cada dia de análise foram injetadas 16 amostras, da seguinte forma: 1 amostra em branco (solvente 50% (v/v) acetonitrila e água) e as amostras padrão injetadas em triplicata. Para cada concentração foram obtidos nove pontos. Durante os três dias, foram injetadas 45 amostras padrão.

A avaliação da repetibilidade e estabilidade do sistema foram estudadas, através de um ponto mediano da curva analítica, ou seja, analisando os resultados das medidas das alturas dos picos nas injeções da solução padrão de concentração $0,08 \text{ mgL}^{-1}$, em triplicata e em três dias de estudo. A Tabela 7, apresenta os resultados deste estudo.

Os cromatogramas da Figura 33, apresentam uma comparação de três injeções da solução padrão de concentração $0,08 \text{ mgL}^{-1}$, analisadas em dias distintos.

Os resultados deste experimento forneceram informações importantes, quanto a precisão na separação dos compostos e nas medidas do detector. Entre injeções repetitivas e entre dias diferentes de análise, as medidas apresentaram desvios menores que 1%, indicando baixas variações relacionadas: ao volume de injeção, condições de separação, integração dos picos, manipulação da solução e degradação dos compostos. Quanto a estabilidade do sistema, o gradiente de eluição aplicado é adequado, pois nestas condições, a composição da fase móvel varia com o tempo de análise, de 48% de acetonitrila a 80%, proporcionando um sinal estável e reprodutível durante toda a corrida cromatográfica.

OBS: Seguindo as Boas Práticas de Laboratório, uma solução de concentração $0,08 \text{ mgL}^{-1}$ (ponto da curva analítica) foi injetada antes de iniciar a análise das amostras - testes ou de águas superficiais, a fim de verificar a curva analítica e a estabilidade do sistema. Após a injeção da solução, os compostos são quantificados comparando a altura dos picos com a curva analítica, os valores das concentrações dos compostos calculados devem apresentar um DRP abaixo de 10 % (SNYDER et al, 1997), caso contrário nova curva analítica deve ser feita.

Tabela 7. Estudo da repetibilidade e precisão intermediária

Composto	Dias	Altura dos picos (mAbsorbância)			Repetibilidade		Precisão Intermediária (entre dias)	
		Injeções			Média \pm DP	DPR%	Média \pm DP	DPR%
		1°	2°	3°				
Aldicarb	1°	300	299	305	301 \pm 3	1,0		
	2°	298	301	301	300 \pm 2	0,7	302 \pm 3	1,0
	3°	306	305	303	305 \pm 2	0,7		
Simazina	1°	3180	3174	3180	3177 \pm 4	0,1		
	2°	3158	3160	3159	3159 \pm 1	0,03	3170 \pm 10	0,3
	3°	3158	3167	3197	3174 \pm 20	0,6		
Carbofuran	1°	564	556	565	565 \pm 1	0,2		
	2°	558	556	559	558 \pm 2	0,4	564 \pm 6	1,1
	3°	566	564	576	569 \pm 6	1,1		
Carbaryl	1°	4209	4199	4191	4200 \pm 9	0,2		
	2°	4176	4186	4189	4184 \pm 7	0,2	4212 \pm 35	0,8
	3°	4213	4244	4296	4251 \pm 42	1,0		
Atrazina	1°	2245	2233	2239	2239 \pm 6	0,3		
	2°	2226	2234	2236	2232 \pm 5	0,2	2245 \pm 16	0,7
	3°	2246	2261	2282	2263 \pm 18	0,8		
Trifluralin	1°	471	468	472	470 \pm 2	0,4		
	2°	467	467	469	468 \pm 1	0,2	471 \pm 4	0,8
	3°	477	475	477	476 \pm 1	0,2		

Atten:3

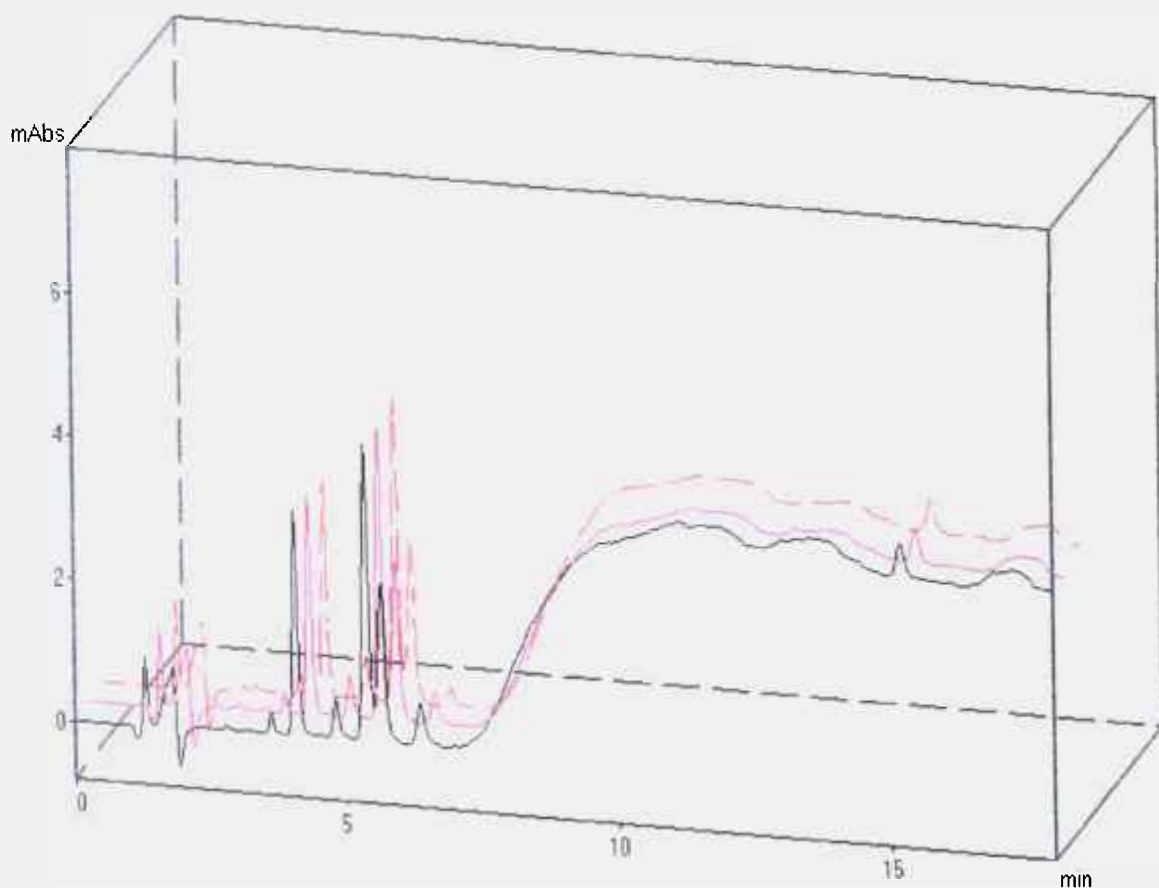


Figura 33. Comparação dos cromatogramas referentes às análises da amostra padrão de concentração $0,08 \text{ mgL}^{-1}$ em três dias diferentes para estudo da estabilidade do sistema.

5.4. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Com o software *Validation* da *Shimadzu* versão 1.02 foi possível medir o ruído (μAbs) e o sinal (μAbs) proporcionado pelo detector ao passar um analito. O ruído foi obtido através de uma amostra em branco, enquanto o sinal através de uma solução padrão contendo todos os compostos numa concentração de $0,05 \text{ mgL}^{-1}$. Estas amostras foram injetadas em triplicada no sistema cromatográfico, nas condições estabelecidas, obtendo uma média dos ruídos e dos sinais, relativo a concentração dos analitos. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados da seguinte forma:

$$LD = C \times \frac{3}{\frac{\bar{S}_m}{R_m}} \quad LQ = C \times \frac{10}{\frac{\bar{S}_m}{R_m}} \quad \text{onde, (5.1)}$$

C = concentração do composto ($0,05 \text{ mgL}^{-1}$ ou $50 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$)

\bar{S}_m = média dos sinais obtidos (μAbs) ($n = 3$)

R_m = média do ruído (μAbs) ($n = 3$)

3 = a razão S/R mínima para um pico ser detectado com segurança

10 = a razão S/R mínima para um pico ser quantificado com segurança (SNYDER, 1997)

A Tabela 8 apresenta os valores estimados de LD e LQ da técnica para os compostos analisados nas condições de separação e quantificação estabelecidas. Os valores de LD e LQ estão de acordo com a sensibilidade de cada composto como pôde ser observado, através das curvas analíticas.

Tabela 8. Limites de Detecção e de Quantificação.

Composto	$\frac{\bar{S}_m}{R_m}$	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Aldicarb	14,35	11	35
Simazina	155,7	0,96	3,2
Carbofuran	32,60	4,6	15
Carbaryl	235,7	0,64	2,1
Atrazina	170,9	0,88	2,9
Trifluralin	14,42	10	35

5.5. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO AS COLUNAS DE *SPE*: C_{18} E COPOLÍMERO DE ESTIRENODIVINILBENZENO

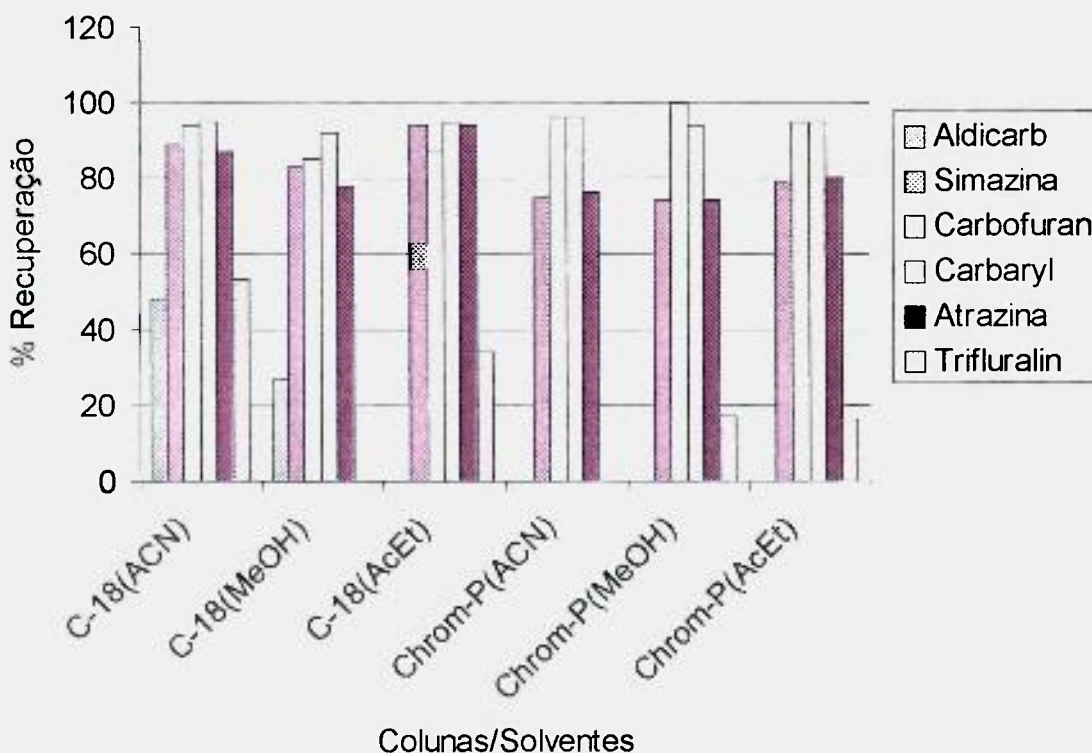
Da mesma forma que a cromatografia líquida, a escolha da coluna de *SPE* é um fator de grande importância para a extração dos compostos em amostras de água. O material que preenche a coluna de *SPE* escolhido deve, como característica, reter os analitos de interesse, enquanto que o solvente escolhido deve eluir os compostos da coluna livres de interferentes. Tendo como base a literatura estudada, selecionou-se duas diferentes colunas de *SPE*, que são frequentemente utilizadas na extração de pesticidas em amostras de águas e estão disponíveis no comércio, são estas:

- ⇒ *Supelclean ENVI-18 Supelco* 500 mg (sílica ligada octadecil) (17% de Carbono *endcapped*) volume 3 mL, área superficial $479 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, porosidade 67 Angstrom, tamanho da partícula 53 μm .
- ⇒ *Sulpeclean ENVI-ChromP Supelco* 250 mg (copolímero de estirenodivinilbenzeno) volume 3 mL, área superficial $1000\text{-}1500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, porosidade 200 Angstrom, tamanho da partícula 80-160 μm .

Para a realização dos testes de eficiência de extração e pré-concentração, aplicando os diferentes materiais, utilizaram-se amostras de água ultrapura de baixa condutância, um volume de 250 mL, previamente tamponada com a solução de ácido monocloroacético/acetato de potássio), a qual foi adicionado 1 μg de cada composto pesticida (0,25 mL de solução estoque $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ em ACN). Os mesmos procedimentos de extração foram seguidos, conforme parte experimental descrita (item 4.6), no entanto para estudos de desorção dos compostos utilizou-se um volume de 3 mL de três solventes diferentes: acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila (AcEt). Amostras - branco, ou seja, amostras de água ultrapura, também, foram extraídas, funcionando como amostra controle para detectar possíveis interferentes no processo de extração.

A eficiência da *SPE* foi avaliada em nível de recuperação, expressa em porcentagem, calculada pela razão: concentração do composto encontrada sobre a concentração adicionada ou conhecida. Os resultados deste estudo são apresentados na

Figura 34, que relaciona as porcentagens de recuperação dos compostos com a coluna e solvente utilizado. Como parâmetro de comparação, a *EPA* estabelece que uma boa recuperação dos compostos, aplicando os métodos de extração, deve apresentar valores acima de 70% (BARCELÓ, 1993).



ACN (acetonitrila), MeOH (metanol) e AcEt (acetato de etila)

Figura 34. Estudo da eficiência de extração utilizando diferentes colunas de *SPE* e diferentes solventes.

Constatou-se através dos estudos de recuperação, que a melhor opção para extração dos compostos foi obtida em coluna *ENVI-18*, utilizando como solvente acetonitrila. Outro fator a considerar foi a avaliação das amostras - branco analisadas. Os cromatogramas das Figuras 35 e 36, comparam as análises obtidas na extração com as colunas *ENVI-18* e *ENVI-ChromP*, nas melhores condições testadas. Nota-se a presença de interferêntes com tempos de retenção na região do composto aldicarb, quando o material de estirenodivinilbenzeno é utilizado, juntamente com as condições de separação definidas. Estes interferêntes ocorrem em todos os solventes aplicados na coluna de *ENVI-ChromP*.

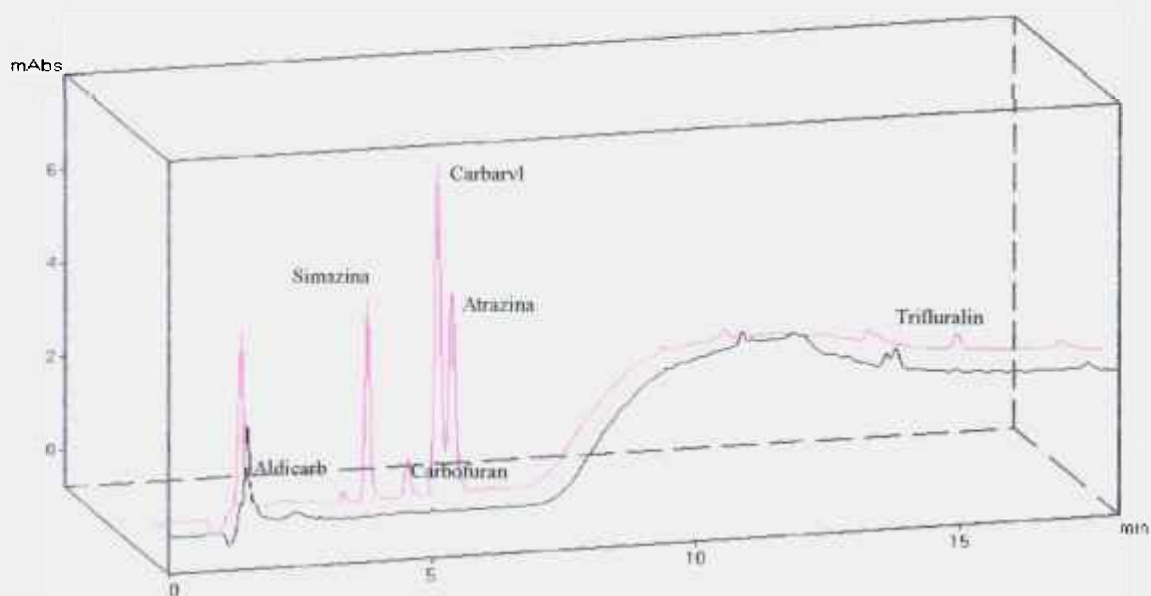


Figura 35. Comparação entre os cromatogramas de uma amostra - branco de água ultrapura (**preto**) e uma amostra - branco com adição padrão dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ (**rosa**), utilizando coluna *SPE ENVI-18* e extração com 6 mL de ACN.

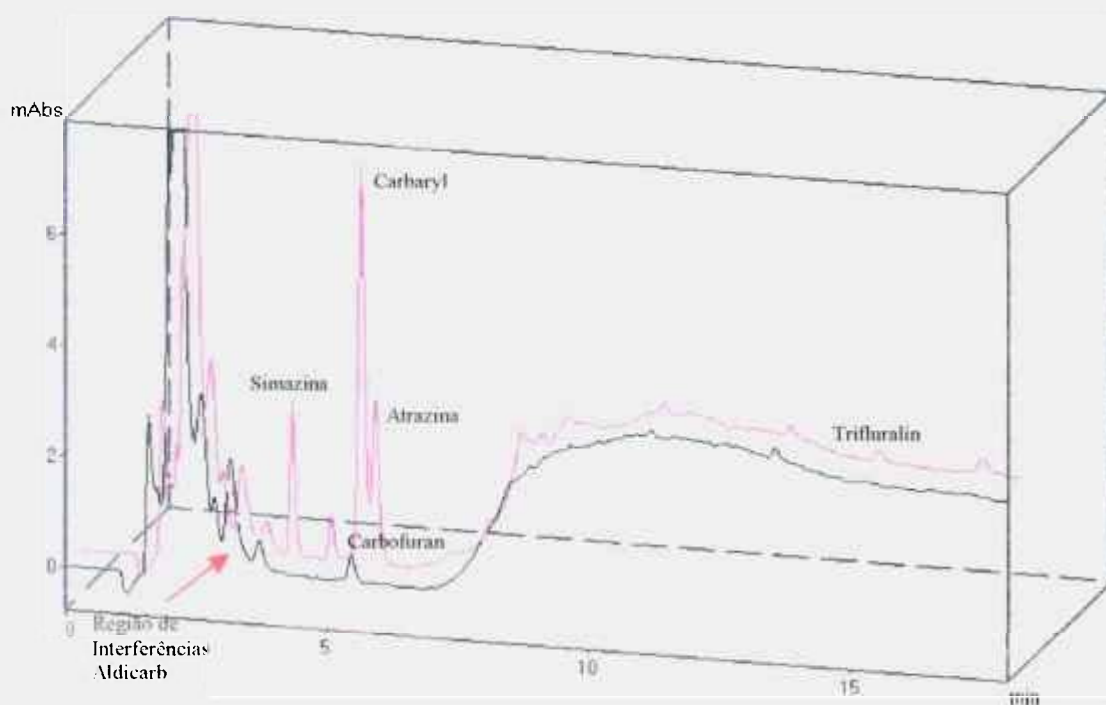


Figura 36. Comparação entre os cromatogramas de uma amostra - branco de água ultrapura (**preto**) e uma amostra - branco com adição padrão dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ (**rosa**), utilizando coluna *SPE ENVI Chrom-P* e extração com 3 mL de MeOH.

Isto foi levado em consideração na escolha do melhor material para extração dos compostos.

Definida a coluna de *SPE* e o melhor solvente para eluição dos compostos, o próximo passo foi definir o volume ideal de acetonitrila para extração dos compostos. Quatro amostras de água ultrapura (pH 3) contendo 1,0 μg de cada composto foram submetidas a *SPE* nas colunas *ENVI-18*, conforme procedimento estabelecido. Os compostos foram eluidos das colunas utilizando volumes diferentes de acetonitrila: 1, 3, 6 e 9 mL. Os resultados foram expressos em recuperação dos compostos por volume de solvente utilizado e são apresentados na Figura 37.

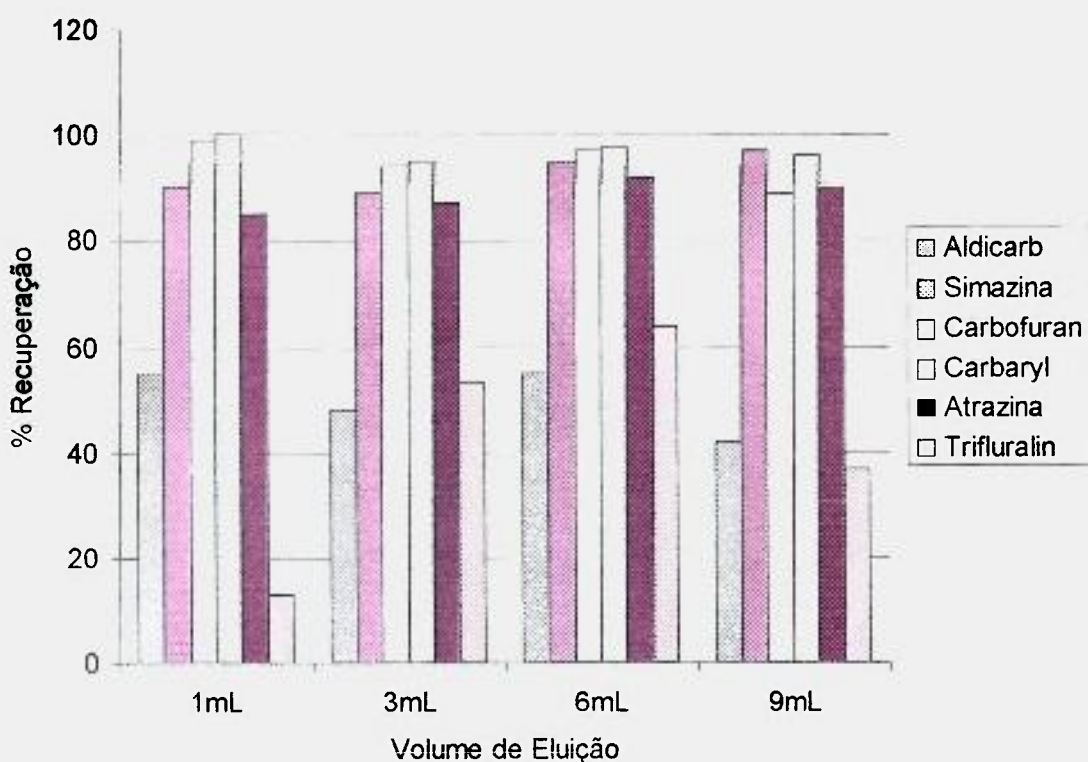


Figura 37. Estudo do volume de eluição em coluna de *SPE ENVI-18* utilizando acetonitrila.

Observou-se que utilizando um volume de apenas 1 mL de solvente, todos os compostos são eluidos com boa recuperação, com exceção dos compostos aldicarb e triflurarín. Uma recuperação ótima e constante, utilizando de 1 a 9 mL de solvente pode ser observada para os compostos triazínicos, carbaryl e carbofuran. A partir desses resultados,

determinou-se que 6 mL de acetonitrila é um volume adequado para a eluição dos compostos pesticidas da coluna.

EISERT et al. (1995), compararam os materiais C₁₈ e copolímero de estirenodivinilbenzeno. Para os compostos pesticidas em questão, extraídos por *SPE* na mesma faixa de concentração, os autores verificaram, também, que as colunas de *SPE* C₁₈ apresentaram melhores resultados, ou seja, melhor eficiência de extração.

5.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO (EXATIDÃO) E PRECISÃO DO MÉTODO DE SPE

Segundo TAYLOR (1983), uma das maneiras de determinar a exatidão de um método analítico é aplicar a metodologia em amostras contendo quantidades conhecidas dos compostos de interesse (reforço ou *spiked*, neste trabalho foi utilizada adição padrão). Extraído e analisando amostras em replicata verifica-se a precisão da metodologia desenvolvida. Com a adição padrão em amostras de águas superficiais pode-se observar, também, a especificidade do método proposto (LOUGH, 1995; SNYDER, 1997).

Para a realização dos testes de recuperação, a metodologia desenvolvida foi aplicada em 3 amostras de água ultrapura e 4 amostras de água superficial do Rio Jaguari Mirim, contendo em todas 1,0 µg de cada composto pesticida adicionados. A Tabela 9, apresenta os resultados de recuperação e precisão. Os cromatogramas das Figuras 38 e 39 e as Tabelas 10 e 11, mostram as análises de uma amostra - branco, uma amostra - branco mais adição padrão, uma amostra de água do rio Jaguari Mirim e uma amostra de água do rio Jaguari Mirim mais adição padrão, respectivamente.

Tabela 9. Estudo de recuperação dos compostos pesticidas em água ultrapura e em amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim, contendo ambas 1,0 µg de cada composto adicionados.

Composto	Água ultrapura		Água Superficial	
	Rec.(%)	DPR	Rec.(%)	DPR
Aldicarb	22	2,7	88	1,9
Simazina	94	0,6	94	2,3
Carbofuran	91	1,7	95	4,5
Carbaryl	100	1,5	100	1,3
Atrazina	92	1,1	93	2,4
Trifluralin	54	9,8	59	6,6

OBS: Os valores de Recuperação (Rec.) ou Exatidão são medidas de 3 extrações (branco) e 4 extrações (água superficial) DPR (desvio relativo padrão).

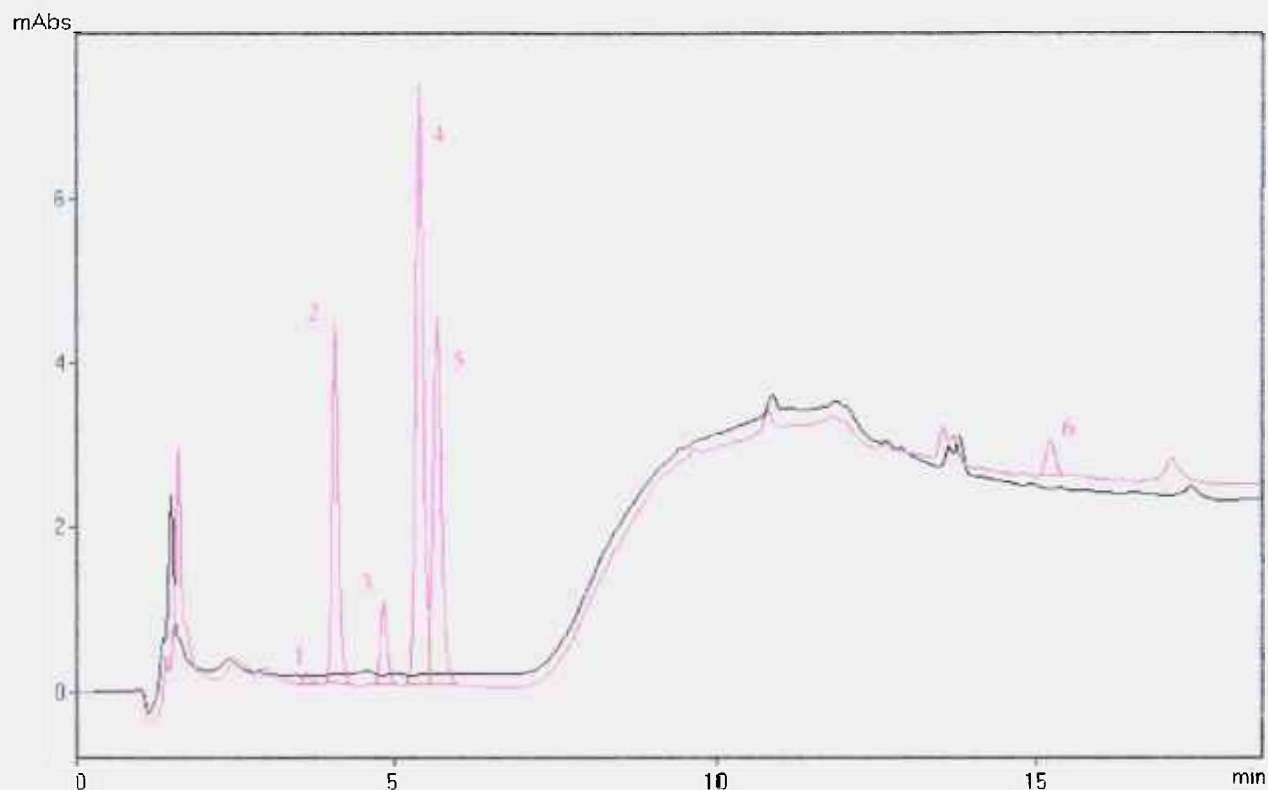


Figura 38. Cromatograma da amostra - branco (preto) e amostra - branco com adição padrão na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto (rosa). Concentração final do extrato dissolvido $0,125 \text{mgL}^{-1}$ (esperada).

Tabela 10. Resultado da análise de uma amostra - branco com adição padrão na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.

Pico	Composto	Altura dos picos (mV)	Conc. obtida (mgL^{-1})	Conc. final (μgL^{-1})
1	Aldicarb	104	0,029	0,23
2	Simazina	4.540	0,118	0,94
3	Carbofuran	846	0,113	0,90
4	Carbaryl	7.404	0,124	0,99
5	Atrazina	4.750	0,116	0,93
6	Trifluralin	376	0,065	0,52

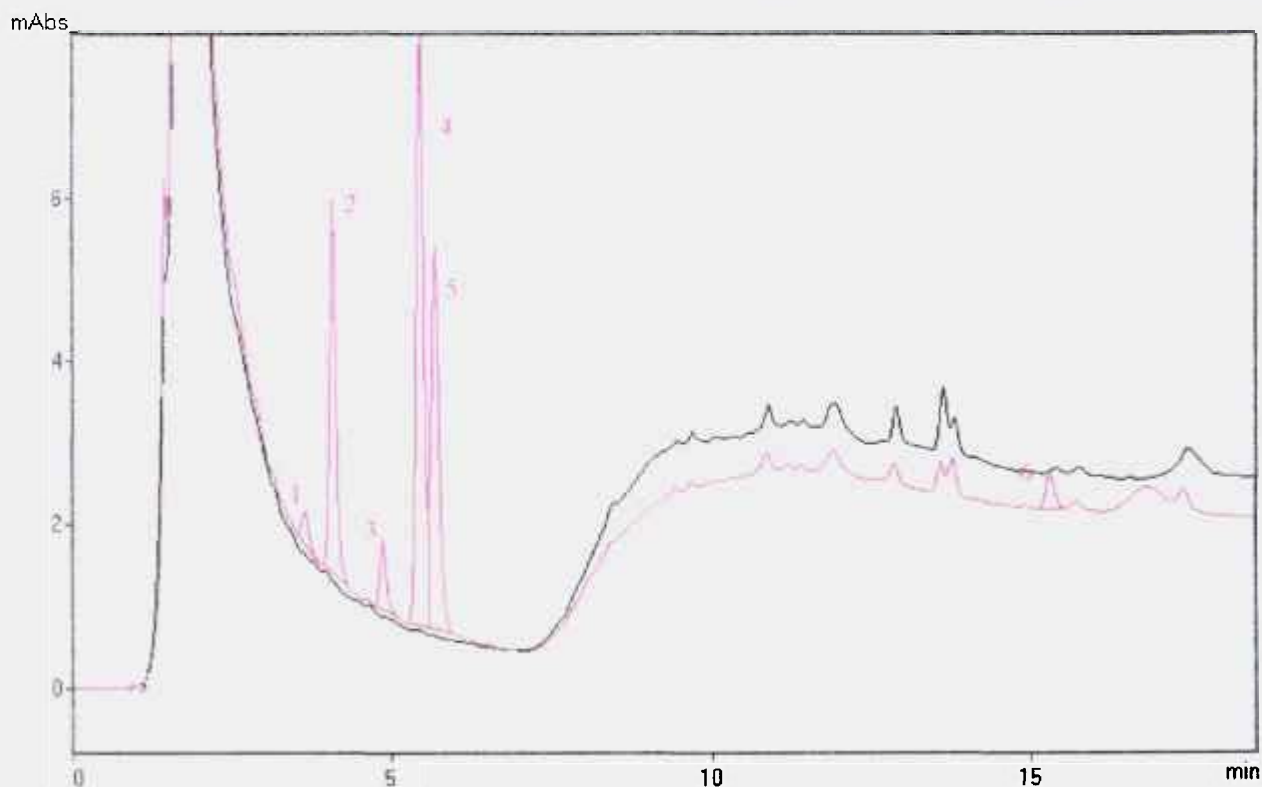


Figura 39. Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguarí Mirim (São João da Boa Vista) (**preto**) e amostra água superficial do rio Jaguarí Mirim com adição padrão, na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto (**rosa**). Concentração final do extrato dissolvido $0,125 \text{mgL}^{-1}$ (esperada).

Tabela 11. Resultado da análise da amostra de água superficial do rio Jaguarí Mirim com adição padrão na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.

Pico	Composto	Altura dos picos (mV)	Conc. obtida (mgL^{-1})	Conc. final (μgL^{-1})
1	Aldicarb	401	0,113	0,90
2	Simazina	4.579	0,119	0,95
3	Carbofuran	857	0,115	0,92
4	Carbaryl	7.407	0,125	1,00
5	Atrazina	4.758	0,116	0,93
6	Trifluralin	417	0,072	0,58

Comparando os valores de recuperação dos compostos pesticidas com valores sugeridos pela *EPA*, que estabelece um mínimo aceitável de 70%, pode-se verificar que a metodologia empregada é perfeitamente adequada para quantificação dos pesticidas em questão, fornecendo resultados confiáveis, ou exatos. Isto considerando, que foram utilizadas substâncias padrão com certificado.

Em geral, foram obtidos desvios padrão relativo abaixo de 5%, o que significa ótima precisão do método de *SPE*, estabilidade do sistema de *HPLC* e reprodutibilidade do método de quantificação. Considerando que cada etapa do método proposto está sujeita, a erros sistemáticos, como por exemplo, variação do fluxo de extração, diluição da amostra, volume de injeção, contaminações externas, estabilidade do equipamento, integração dos picos, erros do analista, os valores de *DPR* obtidos são considerados excelentes. Cabe lembrar, que a *EPA* considera valores de *DPR* abaixo de 30% (BARCELÓ, 1993).

O método aplicado possui alta especificidade, pois tem capacidade de medir com exatidão e precisão a concentração dos compostos presentes nas amostras (SNYDER et al, 1997). Além disso, pode-se observar nos cromatogramas das Figuras 38 e 39 que: na amostra branco não há interferentes; na amostra de água superficial escolhida para realização dos testes verifica-se que não há contaminação por pesticidas, comprovando mais uma vez a especificidade do método. Na amostra de água superficial, os compostos adicionados foram separados com a mesma resolução (*R_s*) e detectados livres de interferentes.

A baixa recuperação do composto trifluralin, de alto peso molecular pode ser explicada pela forte afinidade deste ao material extrator. Comportamento semelhante pode ser observado em todos os cromatogramas, onde o composto é o último a ser eluído da coluna cromatográfica (*C₁₈*). Valores de recuperação na mesma ordem de grandeza foram observados em outros trabalhos (PATSIAS et al, 1996; SCHÜLEIN et al, 1995; VITALI et al, 1994). Para este composto pode ser feita somente uma análise qualitativa e uma estimativa de sua quantidade presente em uma amostra real.

Nos procedimentos utilizando *SPE*, os principais interferentes são os materiais orgânicos dissolvidos, em especial o ácido húmico. A presença deste ácido pode causar: 1)

saturação dos sítios ativos do material C₁₈; 2) associação do pesticida com o ácido húmico sendo fortemente retido pelo material C₁₈ não desorvido por solventes na etapa de extração; 3) baixa afinidade dos pesticidas à coluna, quando associados com ácido húmico em solução. A presença de ácido húmico nas amostras de águas superficiais foi verificada, primeiramente pela coloração amarelada das amostras e em seguida pela adsorção do ácido húmico na coluna de *SPE*. Durante o processo de percolação da amostra, o material C₁₈ que inicialmente é branco, adquire uma cor castanho. O eluente ou extrato de cor levemente âmbar indicou que parte do ácido húmico foi extraído da coluna (JOHNSON, 1991).

O ácido húmico não interferiu substancialmente na extração e análise dos compostos pesticidas, como visto nos resultados de recuperação e nos cromatogramas mostrados. Mesmo mantendo as amostras em pH 3, este composto apresenta solubilidade em água. No entanto, é interessante notar que a recuperação do composto aldicarb é maior em águas superficiais do que em água ultrapura. É possível que o aldicarb, composto de baixo peso molecular e solubilidade em água 4,93 gL⁻¹ (Tabela 1), associado ao ácido húmico, tenha sua solubilidade diminuída, aumentando sua carga e afinidade com o material extrator. Como os resultados de recuperação nas amostras de água superficial foram altos e reprodutíveis é possível quantificar com confiança este composto.

Para minimizar os efeitos de interferência do ácido húmico, FERRER et al. (1999) propuseram um método simultâneo de *clean-up* e enriquecimento de traços de pesticidas em amostras de água e solo. Para isso, foram utilizado *SPE off-line* em discos ou membranas dispostos em série, o primeiro disco contendo *SAX* (material trocador de ânions) é eficiente na remoção de compostos orgânicos contendo grupos carboxílicos (ácido húmico) e o segundo disco contendo C₁₈. Os compostos foram analisados por HPLC (fase reversa) e detecção *UV*.

Outra observação a considerar é a capacidade da técnica de *SPE* em concentrar os compostos em solução. Um fator de 125 vezes foi aplicado para concentração das amostras, ou seja, partindo de um volume inicial de 250 mL de amostra para um volume final do extrato de 2 mL. Com o ajuste do volume final de diluição do extrato é possível adequar a concentração dos compostos para uma faixa ideal de detecção. A concentração de 1 µgL⁻¹ do composto, resulta em uma concentração final do extrato diluído de 0,125

mgL^{-1} , valor que esta dentro da curva analítica construída. Testes de recuperação em níveis mais baixos e mais altos de concentração foram estudados, sendo os resultados apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Recuperação dos compostos em água ultrapura em diferentes concentrações.

Compostos	0,4 μgL^{-1}	4,0 μgL^{-1}
	Rec (%)	Rec (%)
Aldicarb	nd	57
Simazina	86	100
Carbofuran	88	93
Carbaryl	94	103
Atrazina	86	100
Trifluralin	62	46

As Figuras 40 e 41 (resultados Tabelas 13 e 14), representam os cromatogramas das amostras de água ultrapura com concentrações de 0,4 e 4,0 μgL^{-1} , respectivamente, extraídas e analisadas em condições padrão estabelecidas.

É importante notar que as faixas de concentração estudadas são consideradas baixas, atendo os limites recomendados e os objetivos deste trabalho.

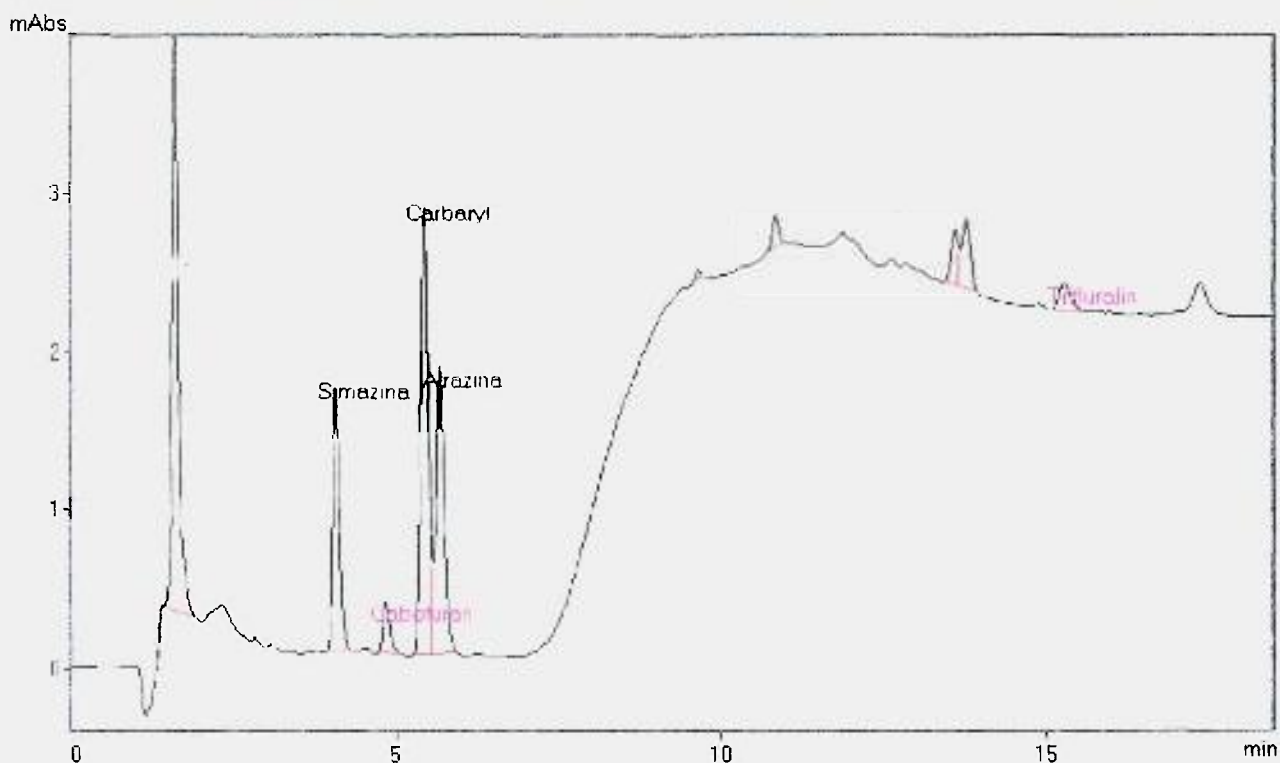


Figura 40. Cromatograma da amostra - branco com adição padrão na concentração de $0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto. Concentração final do extrato dissolvido $0,05 \text{mgL}^{-1}$ (esperada).

Tabela 13. Resultado da análise da amostra branco com adição padrão na concentração de $0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.

Pico	Composto	Altura dos picos (mV)	Conc. obtida (mgL^{-1})	Conc. final (μgL^{-1})
1	Aldicarb	-----	-----	-----
2	Simazina	1.726	0,043	0,34
3	Carbofuran	331	0,044	0,35
4	Carbaryl	2.872	0,047	0,38
5	Atrazina	1.817	0,043	0,34
6	Trifluralin	173	0,031	0,25

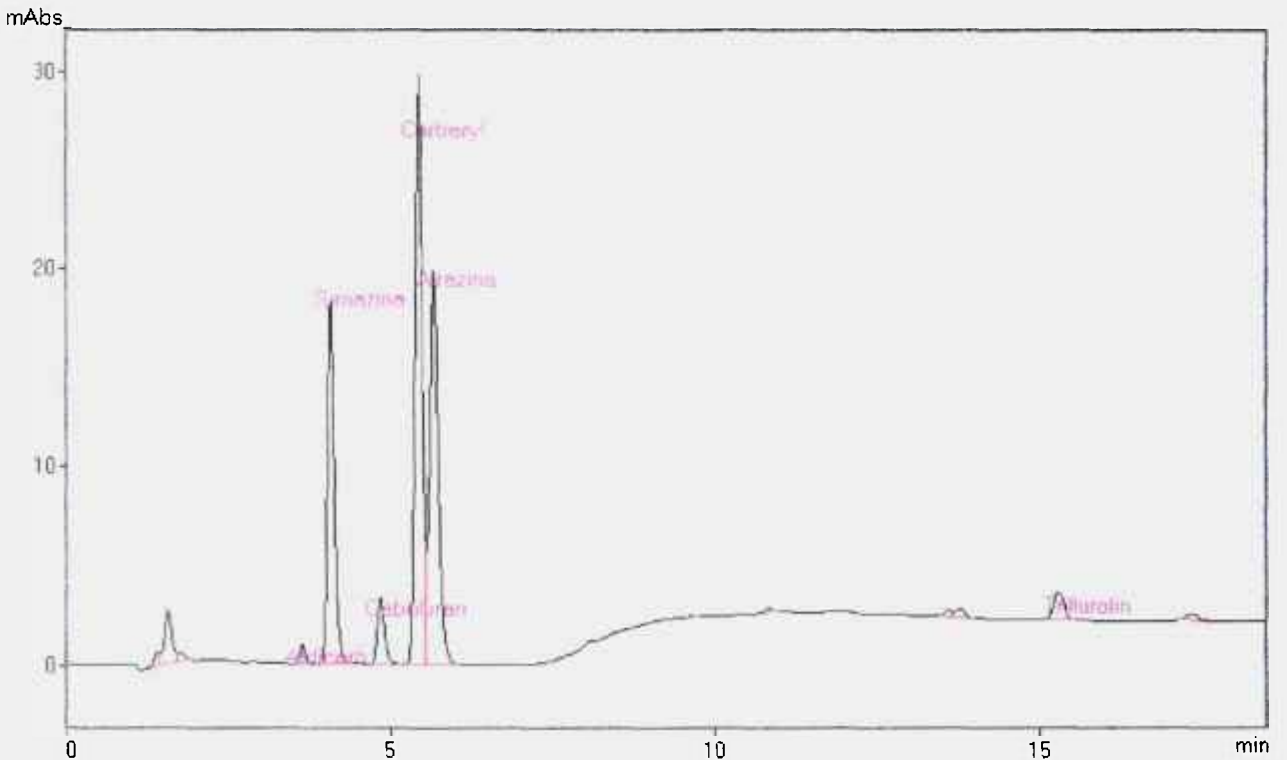


Figura 41. Cromatograma da amostra - branco com adição padrão na concentração de $4,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto. Concentração final do extrato dissolvido $0,5 \text{mgL}^{-1}$ (esperada).

Tabela 14. Resultado da análise da amostra-branco com adição padrão na concentração de $4,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada composto.

Pico	Composto	Altura dos picos (mV)	Conc. obtida (mgL^{-1})	Conc. final (μgL^{-1})
1	Aldicarb	1.004	0,283	2,26
2	Simazina	19.018	0,502	4,02
3	Carbofuran	3.456	0,464	3,71
4	Carbaryl	30.050	0,515	4,12
5	Atrazina	20.118	0,498	3,98
6	Trifluralin	1.378	0,230	1,84

5.7. TESTES DE REUTILIZAÇÃO DAS COLUNAS DE SPE

Com o intuito de verificar se as colunas de *SPE* poderiam ser utilizadas para mais de uma extração, minimizando o custo da análise, foram realizados alguns testes preliminares. Para tanto, duas amostras foram extraídas em duas colunas *ENVI-18* já utilizadas: uma amostra branco (250 mL) para verificar interferentes e uma amostra branco com adição padrão a concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cada pesticida. Para reciclagem da coluna (limpeza) percolou-se 9 mL de ACN e 9 mL de água ultrapura, em seguida procedeu-se conforme método estabelecido.

Os cromatogramas das Figuras 42 e 43 apresentam as análises das amostras - branco e branco com adição padrão. Na Figura 42 o detector registou um pico com tempo de retenção de 3,706 min., próximo do aldicarb (3,58 min.). Esta contaminação não é constante, pois no cromatograma da Figura 43, não ocorre, como também não há recuperação do composto aldicarb. Como observado na Figura 43, os compostos simazina, carbofuran, carbaryl, atrazina e trifluralin são detectados. A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação destes compostos.

Tabela 15. Recuperação dos compostos em uma amostra branco com adição padrão concentração $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ reutilizando a coluna de *SPE ENVI-18*.

Composto	% Recuperação
Aldicarb	nd
Simazina	84
Carbofuran	78
Carbaryl	89
Atrazina	82
Trifluralin	40

Com os valores de recuperação obtidos (acima de 70%) pode-se afirmar que a coluna de *SPE ENVI-18* pode ser reutilizada, no entanto teriam que ser realizado mais testes de recuperação; precisão; aplicação em amostras de águas superficiais reais, envolvendo mais tempo, este não disponível. Abre-se a oportunidade para estudos futuros.

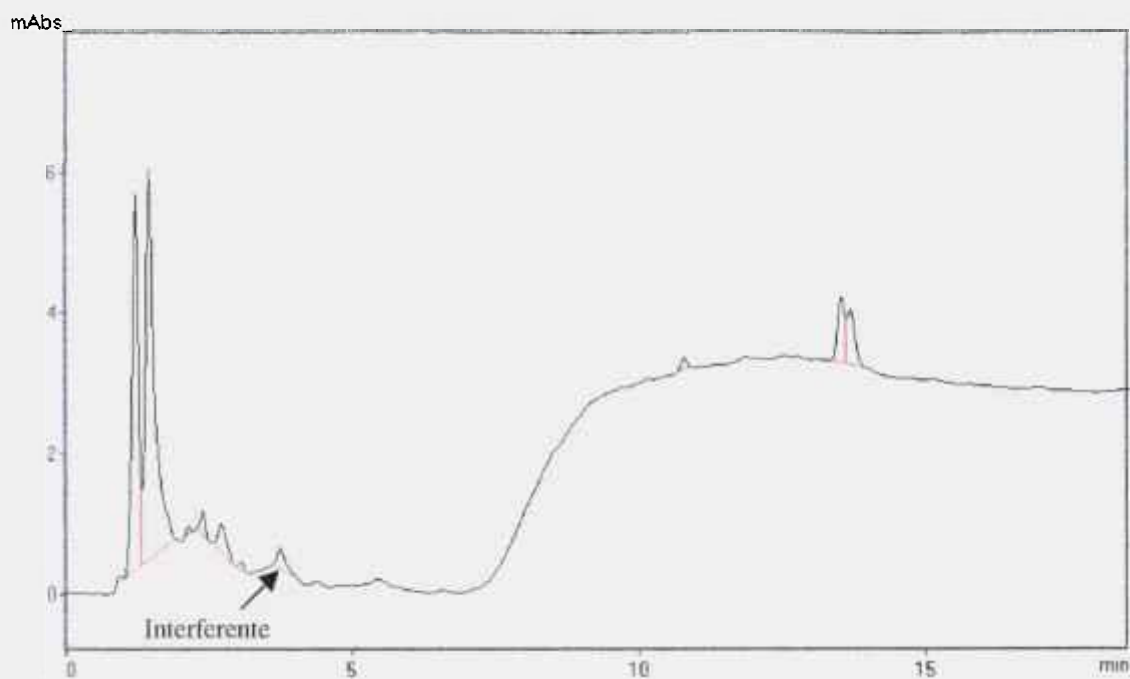


Figura 42. Cromatograma da amostra - branco. Coluna de *SPE ENVI-18* reutilizada.

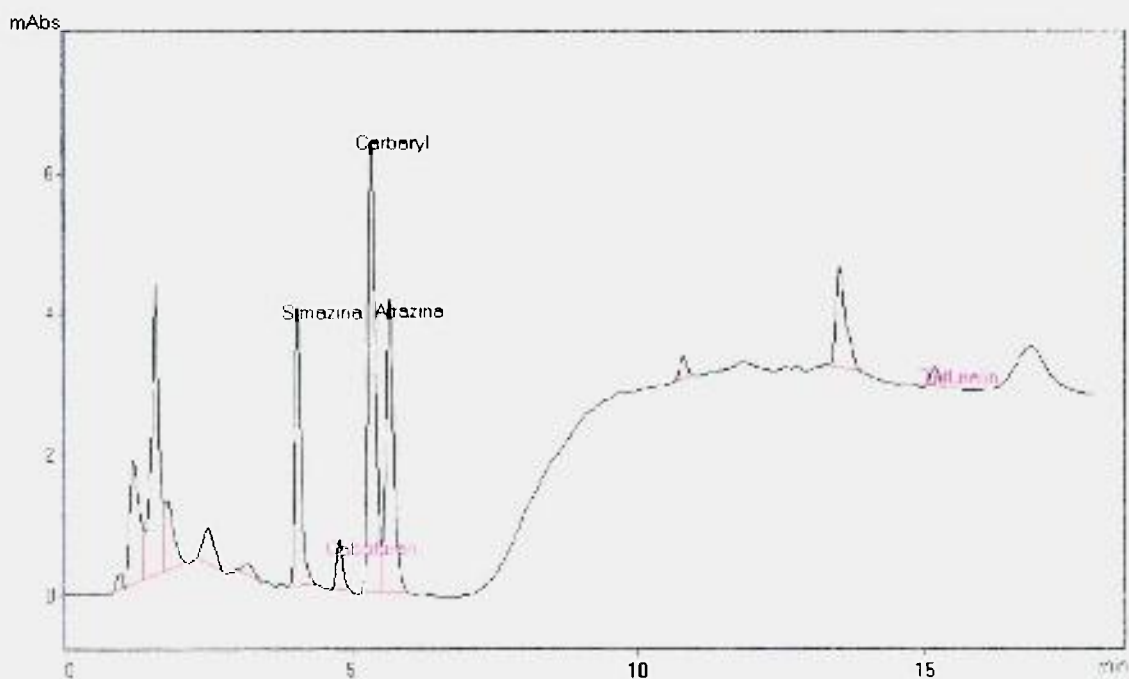


Figura 43. Cromatograma da amostra - branco com adição padrão dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$. Coluna de *SPE ENVI-18* reutilizada.

5.8. ROBUSTEZ

A robustez do método de separação cromatográfica foi avaliada em um outro equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, localizado na Divisão de Supervisão de Radioensaios do *IPEN*:

⇒ *HPLC LC-10 AD vp Shimadzu* com capacidade de programação da fase móvel para 4 solventes. Detector *SPD-10AV vp UV-Vis Shimadzu*. System Controller *SCL-10A vp Shimadzu*. Software *CLASS-VP Chromatography Data System* versão 4.2. Injetor *Reodyne 7725i* com loop de 300 μL . Pré-coluna *C₁₈ ISCO* (10 x 4,6 mm ID 5 μm). *Shim-Pack CCL-ODS C₁₈* (150 x 4,6 mm ID 5 μm) *Shimadzu*. Seringa 50 μL . Para este estudo foi utilizada um amostra padrão contendo os compostos pesticidas na concentração de 0,2 mgL^{-1} .

Como o tempo e disponibilidade do equipamento foi de apenas 1 dia não foi possível realizar um estudo mais minucioso, contudo foi possível observar a robustez do método de separação cromatográfica.

Nas mesmas condições de separação e detecção definidas, uma amostra padrão foi analisada no equipamento em questão, conforme apresenta o cromatograma da Figura 44. Pode-se observar que nestas condições (gradiente 48% ACN – 80% ACN) os compostos não são separados com boa resolução. Com base nos estudos de otimização de separação dos compostos (item 5.1.) realizados neste trabalho, uma pequena alteração nas condições de separação (42% ACN – 80% ACN) permitiu a separação dos compostos com boa resolução, conforme observado no cromatograma da Figura 45, verificando, assim, a robustez do método proposto.

Através deste teste, observa-se que um laboratório ao aplicar o método proposto para a separação para dos compostos aldicarb, simazina, carbofuram, carbaryl, atrazina e trifluralin conseguirá bons resultados, considerando os desvios e ajustes necessários.

Comparando a escala de absorvância dos cromatogramas obtidos neste estudo com o cromatograma da Figura 30, referente a amostra padrão de concentração $0,2 \text{ mgL}^{-1}$, percebe-se diferenças entre as respostas dos detectores. Comentários quanto estas diferenças são limitados, pois envolveria um estudo mais detalhado e interlaboratorial.

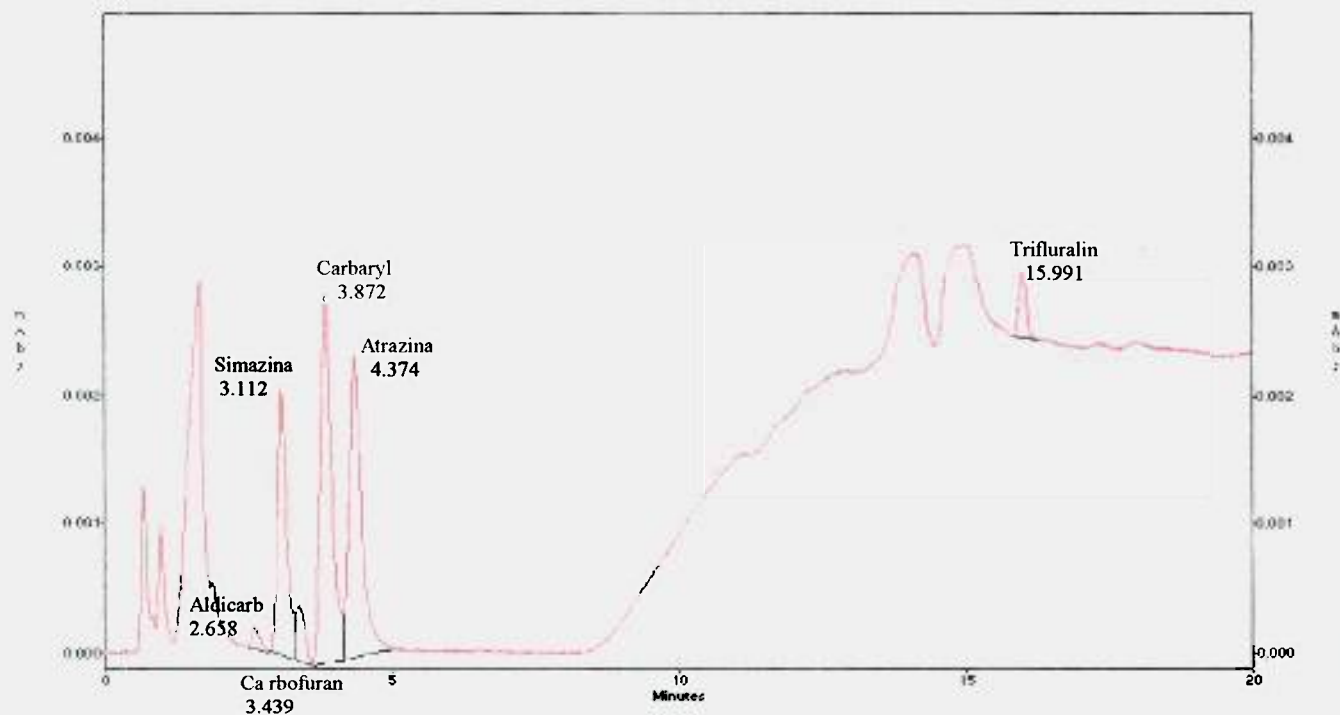


Figura 44. Cromatograma de uma amostra padrão de concentração $0,2 \text{ mgL}^{-1}$, analisada no equipamento de *HPLC LC-10 vp (Shimadzu)*.

Condições:

Gradiente de eluição: 48% ACN/ 52% H_2O de 0 a 4,5 min. GE convexo (-8) para 80% ACN/ 20% H_2O em 20 min.

Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$

Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$

Comprimento de onda: 220 nm

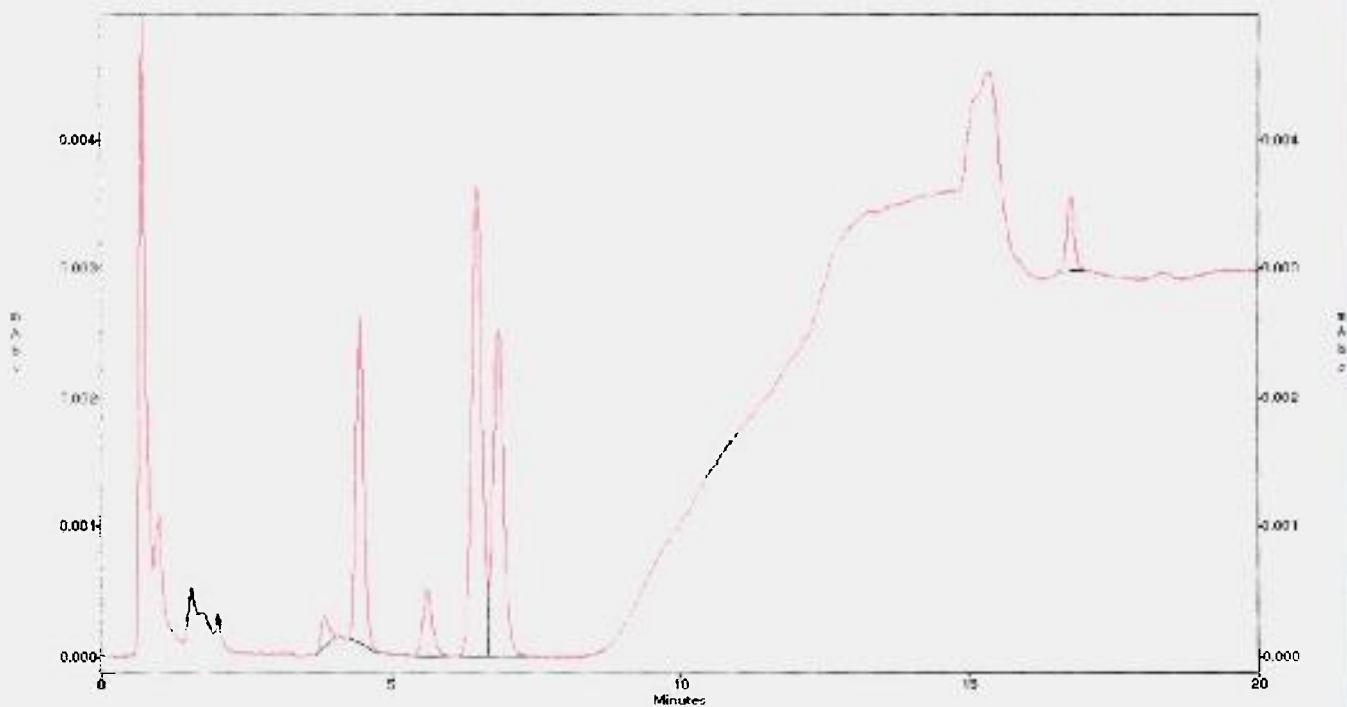


Figura 45. Cromatograma de uma amostra padrão de concentração $0,2 \text{ mgL}^{-1}$, analisada no equipamento de *HPLC LC-10 vp (Shimadzu)*.

Condições:

Gradiente de eluição: 42% ACN/ 58% H_2O de 0 a 4,5 min. GE convexo (-8) para 80% ACN/ 20% H_2O em 20 min.

Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mLmin.}^{-1}$

Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$

Comprimento de onda: 220 nm

CAPÍTULO 6

6.1. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DAS BACIAS DOS RIOS DO MOGI-GUAÇÚ E PARDO

A metodologia desenvolvida foi aplicada às amostras de águas superficiais de captação, responsáveis pelo abastecimento de 13 municípios, pertencentes a região nordeste do estado de São Paulo. As amostras de águas superficiais e amostras de água potável (pós - tratamento convencional), estão sendo coletadas e analisadas de dois em dois meses, durante um ciclo hidrológico completo. A Tabela 16, apresenta informações detalhadas sobre os pontos de coleta das amostras.

As amostras de águas superficiais, coletadas no período de junho e julho de 1999 foram analisadas. Os cromatogramas referentes as amostras analisadas são apresentados nas Figuras 46, 47 e 48. Não foram detectados os compostos pesticidas em questão, com exceção da amostra do rio Verde (município de Vargem Grande do Sul), que apresentou traços do composto trifluralin. A concentração estimada deste composto foi de $0,47 \mu\text{gL}^{-1}$.

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas antes de 28 dias, prazo recomendado (STANDARD METHODS, 1997).

Com relação aos resultados das análises obtidas, pode-se afirmar, na totalidade, que não ocorre a contaminação deste compostos nas águas superficiais, no entanto este foi o primeiro mês de monitoria. As conclusões, quanto a contaminação ambiental, somente, poderão ser feitas no final do período determinado da pesquisa. Se houver contaminação das amostras analisadas, a SABESP será informada e tomará as providencias necessárias para não colocar em risco a saúde dos consumidores.

Tabela 16. Localização dos pontos de coleta das amostras de água superficial.

Cidade	Nome do Rio	Data da Coleta	Localização utilizando GPS*
São João da Boa Vista	Rio Jaguari Mirim	30/06/1999	S 22° 00' 11,1" O 046° 47' 33,1"
Mococa	Rio Canoas	29/06/1999	S 21° 25' 45,1" O 047° 00' 50,6"
Espírito Santo do Pinhal	Ribeirão da Capelinha	28/07/1999	S 22° 12' 56,6" O 046° 43' 13,2"
Águas da Prata	Ribeirão da Prata	28/06/1999	S 21° 56' 53,2" O 046° 42' 22,0"
São Roque da Fartura	Córrego Fartura	28/06/1999	S 21° 50' 35,5" O 046° 44' 07,6"
Cascata	Córrego Cascais	28/06/1999	S 21° 51' 38,1" O 046° 40' 38,8"
Vila Nossa Senhora Aparecida	Mina da Encosta	28/06/1999	S 21° 50' 47,0" O 046° 41' 23,8"
Divinolândia	Córrego Santo Ambrosio	27/07/1999	S 21° 41' 06,4" O 046° 42' 03,1"
Campestrinho	Rio do Peixe	27/07/1999	S 21° 43' 03,0" O 046° 38' 36,5"
Itobi	Ribeirão Doce	20/06/1999	S 21° 44' 39,2" O 046° 58' 08,9"
Santo Antônio do Jardim	Córrego do Jardim	28/07/1999	S 22° 07' 24,8" O 046° 40' 59,2"
São Sebatião da Grama	Córrego Anhuma	27/07/1999	S 21° 42' 50,3" O 046° 48' 23,1"
Vargem Grande do Sul	Rio Verde	28/06/1999	S 21° 49' 24,4" O 046° 53' 02,8"

* GPS - Global Posicion System (Latitude S- Sul e Longitude O- Oeste)

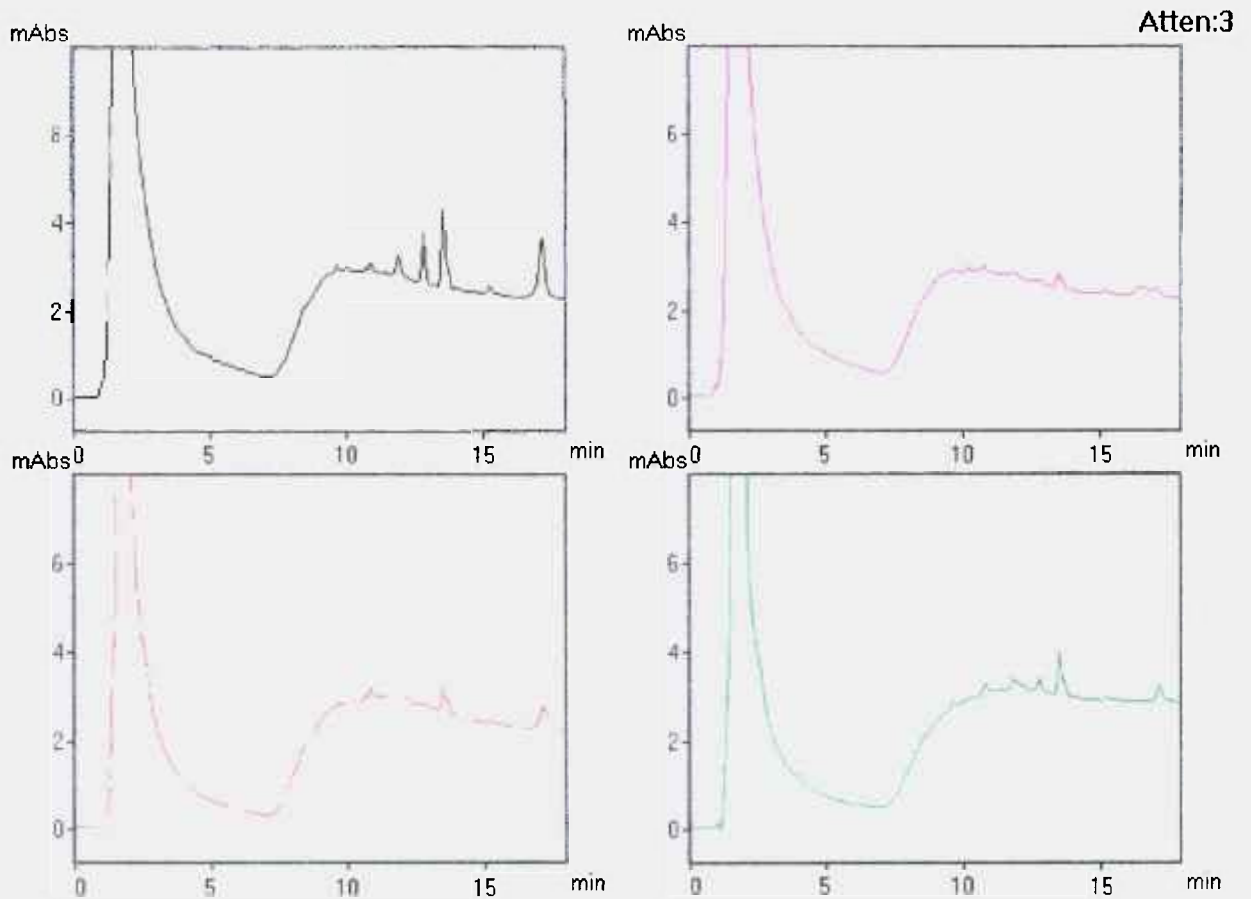


Figura 46. Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas.

- A- Córrego Fartura (São Roque da Fartura)
- B- Rio Canoas (Mococa)
- C- Córrego Santo Ambrósio (Divinolândia)
- D- Rio Ribeira da Capelinha (Espírito Santo do Pinhal)

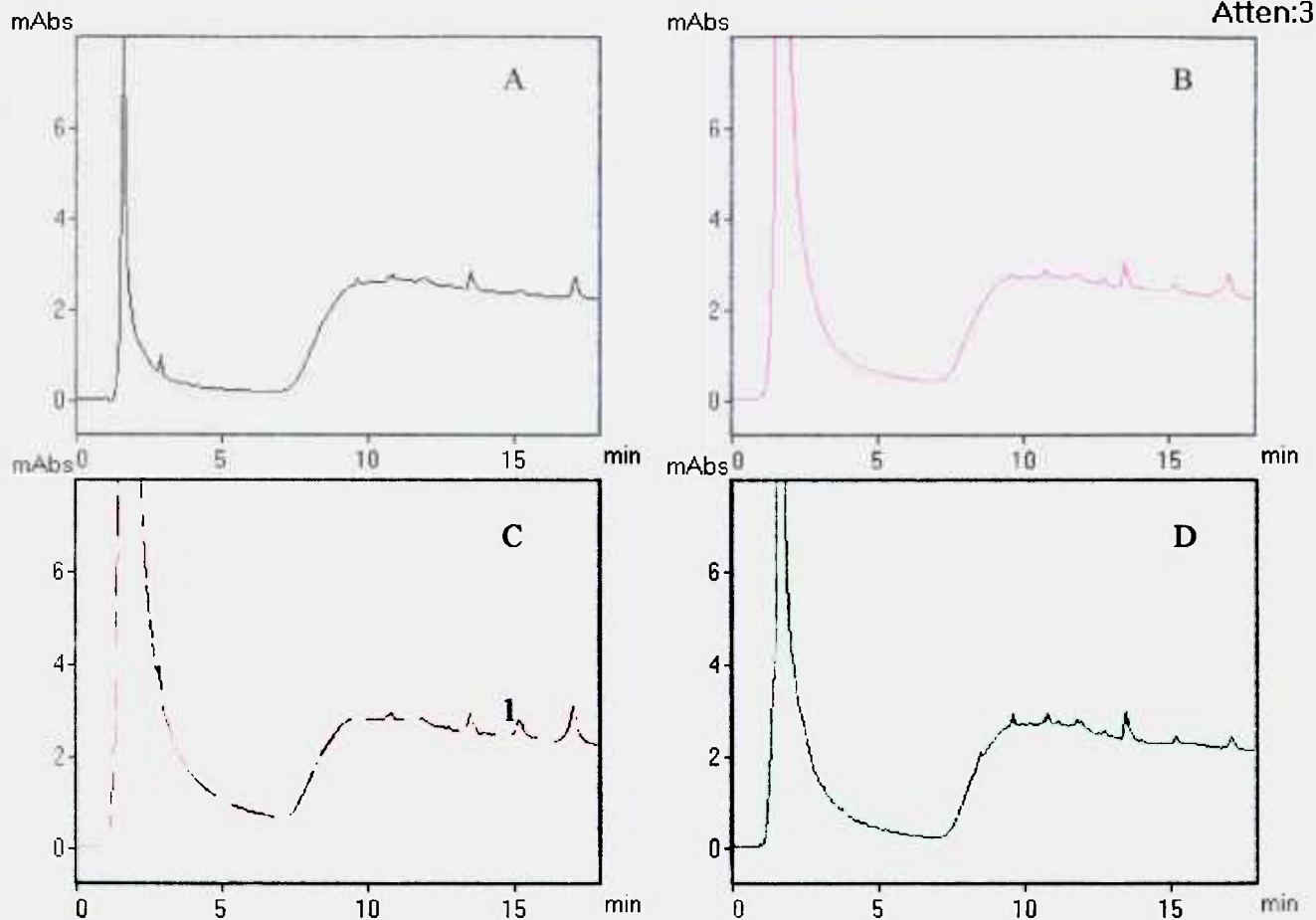


Figura 47. Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas.

A- Córrego Cacaís (Cascata)

B- Ribeirão da Prata (Águas da Prata)

C- Rio Verde (Vargem Grande do Sul) 1- trifluralin,
 Altura do pico = 339 mm, concentração calculada $0,059 \text{ mgL}^{-1}$,
 concentração encontrada $0,47 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$

D- Mina da Encosta (Vila Nossa Senhora Aparecida)

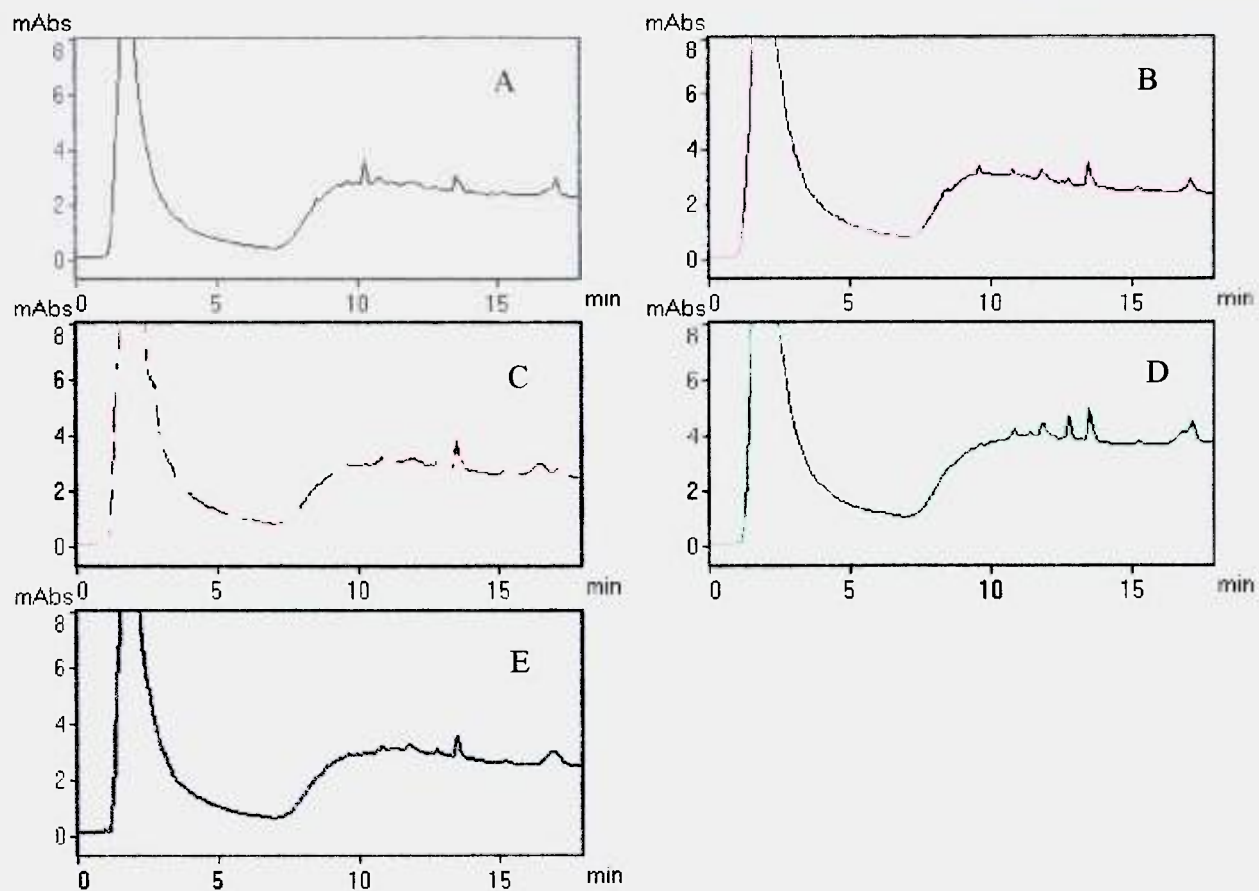


Figura 48. Cromatogramas referentes as amostras de águas superficiais analisadas.

- A- Ribeirão Doce (Itobi)
- B- Rio Jaguari Mirim (São João da Boa Vista)
- C- Rio do Peixe (Campestrinho)
- D- Córrego Anhuma (São Sebatião da Grama)
- E- Córrego do Jardim (Santo Antônio do Jardim)

6.2. ESPECIFICIDADE

Este teste tem o intuito de comparar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica *UV/vis* com a técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas. Outra finalidade deste experimento é aplicar a metodologia de extração líquido - sólido, realizando posterior análise em *GC/MS*, para confirmação dos compostos pesticidas analisados, visto que, o detector de espectrometria de massas tem a vantagem de identificar os compostos presentes em uma amostra, através de espectros de massas fornecidos.

O cromatografo à gás com detecção espectrométrica de massas esta sendo utilizado para determinar os compostos organoclorados nas amostras de águas superficiais, fazendo parte integrante do projeto do IPEN em parceria com a SABESP e estudado minuciosamente em uma tese de doutorado, em andamento no laboratório.

O cromatografo à gás utilizado foi um um modelo *GC 17A* da *Shimadzu* equipado com uma coluna capilar *HP-5MS (Hewlett Packard)* de dimensões 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) e 0,25 μ m de espessura do filme preenchida com 5 % de fenilmetilsiloxano. Este cromatógrafo esta acoplado a um espectrômetro de massas modelo *GC-QP 5000, Shimadzu*. Os dados são registrados em um microcomputador pentium, com o programa *CLASS-5000* da *Shimadzu*.

Na cromatografia à gás os compostos orgânicos, diluídos em um solvente orgânico, são introduzidos no injetor do cromatógrafo a alta temperatura (acima de 100⁰C), os compostos no estado gasoso são arrastados pela fase móvel, conhecida com gás de arraste (He, H₂, ou ar sintético), através da coluna cromatografica (fase estacionária) que retêm seletivamente os compostos. A retenção dos compostos pela fase estacionária é governada por processos de adsorção fisico-químicos e pela volatilidade do composto, ou seja, sua pressão de vapor. Compostos com maior capacidade de adsorção permanecem na coluna por um período de tempo maior e os composto com mesma capacidade podem ser separados, se apresentarem pressões de vapor diferentes, por isso a temperatura da coluna deve ser ajustada corretamente para obtenção de picos resolvidos.

O detector de espectrometria de massas acoplado ao *GC* é constituído de uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector de íons. O espectrômetro utilizado é um

“quadropolo” (*mass spectrometer – quadrupole mass filter*), existindo também o detector de “armadilhamento” de íons (*mass spectrometer – ion trap detector*).

Em síntese, o princípio do detector de espectrometria de massas consiste em bombardear as moléculas orgânicas separadas, que estão em estado gasoso, com um feixe de elétrons de alta energia, sob baixa pressão, fragmentando-as formando íons moleculares. Os elétrons são emanados por um filamento eletricamente aquecido que possuem, usualmente, uma energia de 70 eV. Os íons moleculares formados são separados em um analisador do tipo quadropolo, que é constituído por quatro barras paralelas submetidas a um campo magnético sob baixa pressão (vácuo). O quadropolo utiliza correntes elétricas contínuas juntamente com radio frequência para formar campos magnéticos bem definidos, onde os íons moleculares serão selecionados sob ação de um determinado campo. A interação dos fragmentos iônicos com o campo magnético faz com que apenas íons de determinada relação massa/carga (m/z) passem intactos sem colidirem com as barras do quadropolo. Dessa forma, quando se aumenta o campo magnético, obtém-se sequencialmente uma varredura de campos em função do tempo, que é diretamente proporcional às razões m/z , portanto obtém-se o espectro dos íons moleculares discriminados pela razão m/z . Variando-se o campo magnético é possível efetuar uma varredura ampla das faixa de espectro de massas de interesse. Interpretando os íons moleculares detectados e suas intensidade relativas, determina-se a estrutura da molécula que foi fragmentada (SOLOMNS, 1992). O programa *CLASS-5000* possui um banco de dados com centenas de compostos catalogados, auxiliando na identificação.

Para o ensaio experimental foram utilizados duas amostras padrão de concentração 10 mgL^{-1} e 60 mgL^{-1} em acetonitrila, contendo os compostos aldicarb, carbofuran, carbaryl, simazina, atrazina e trifluralin, preparadas a partir de uma amostra padrão de concentração 1.000 mgL^{-1} .

As condições de análise no cromatógrafo à gás, como temperatura do injetor programação do gradiente de temperatura para separação dos compostos, temperatura da interface do detector, fluxo do gás de arraste, entre outros parâmetros, foram ajustados tomando-se com referência o trabalho dos autores PATSIAS et al (1996). Neste trabalho foram determinaram 60 compostos pesticidas, dentre estes, atrazina, simazina, carbofuran, carbaryl e trifluralin, em águas superficiais e águas subterrâneas, utilizando *SPE off-line*



em coluna C₁₈ e posterior análise em cromatografia gasosa com detecção espectrométrica de massas (*ion trap*).

A seguintes condições de análise foram programadas:

- **cromatógrafo à gás:** o injetor split-splitless foi operado no modo splitless a temperatura de 230⁰C. O volume injetado foi de 1 µL. A coluna utilizada foi uma HP-5 MS (30 m x 0,25 mm de DI e 0,25 µm), conforme descrita anteriormente. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma, 30⁰C (mantendo durante 3 minutos) para 200⁰C a 6⁰C/min. mantendo a esta temperatura por 3 minutos, aumentando para 260⁰C, também a 6⁰C/min., mantendo a esta temperatura por 10 minutos. O tempo total de corrida foi de 54,33 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a pressão de 50,3 kPa e fluxo total de 41,5 mL.min⁻¹.
- **detector de espectrometria de massas:** o sistema quadropolo foi operado no modo elétron impacto a 70 eV (voltage do filamento 1600 V). A temperatura da interface foi mantida a 250⁰C. Os composto foram monitorados no modo SCAN na faixa de 50 a 450 unidade de massas..

Primeiramente foi injetada uma solução padrão contendo todos pesticidas na concentração de 10 mgL⁻¹ (massa injetada de 10 ng), porém não foi possível detectar os compostos, verificando a baixa sensibilidade do detector, operando nestas condições.

O cromatograma da Figura 49, apresenta uma análise da amostra padrão, na concentração de 60 mgL⁻¹ de cada composto pesticida (massa injetada de 60 ng). Os tempos de retenção de cada composto presente e seus fragmentos são apresentados na Tabela 17. Verifica-se, no cromatograma obtido, que os compostos carbamatos, aldicarb, cabofuran e carbaryl são termoinstáveis formando produtos de decomposição devido a alta temperatura do injetor, como descrito anteriormente. Na temperatura do injetor fixada em 230⁰C, o composto aldicarb degrada-se totalmente formando o produto *2H-Thiopyran-3(6H)-one*, o carbofuran e o carbaryl degradam-se, parcialmente, nos compostos *bezofuranol* e *naphthalenol*, respectivamente. PATSIAS et al, (1996) estudaram a

ocorrência dos produtos de decomposição dos compostos carbofuran e carbaryl, em condições similares e constataram que estes compostos se decompõem na razão aproximada de 30%.

Nas condições de separação programada, os compostos carbofuran e simazina têm tempos de retenção muito próximos, afetando diretamente na resolução dos dois picos, no entanto foi possível identificá-los. Os espectros de massas de cada composto detectado são apresentados na Figura 50.

Foram realizados alguns testes variando a temperatura do injetor e verificou-se que quanto maior sua temperatura, maior é a formação dos produtos de decomposição. Isto pode ser observado através da intensidade dos picos referentes aos compostos carbamatos, apresentados nos cromatogramas da Figura 51, analisados em diferentes temperaturas do injetor a 140^oC, 290^oC e 330^oC. Também pode-se observar que em temperaturas mais elevadas do injetor, ocorre uma diminuição na sensibilidade de detecção.

Com os ensaios realizados pode-se constatar que a técnica de *HPLC* com detecção *UV/vis* é a escolha mais adequada para a determinação dos compostos carbamatos, pois apresenta maior especificidade e sensibilidade, quando comparada a *GC/MS*. No caso dos compostos atrazina, simazina e trifluralin ambas as técnicas podem ser utilizadas, no entanto a *HPLC* com detecção *UV/vis* apresenta, também, maior sensibilidade.

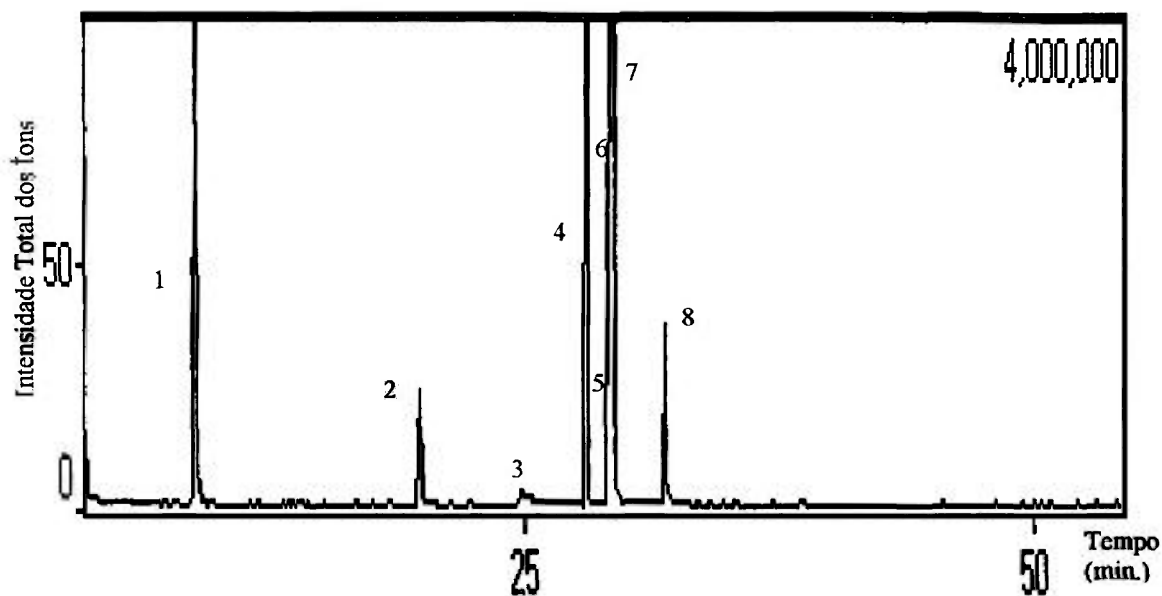


Figura 49. Cromatograma da amostra padrão de concentração 60 mgL^{-1} de cada composto pesticida, analisados por *GC/MS*. Massa injetada 60 ng . Temperatura do injetor 230°C .

Tabela 17. Compostos detectados por *GC/MS*.

Pico	Composto	F.M.	M.M.	t_r (min.)	Fragmentos (m/z)
1	<i>2H-Thiopyran-3[6H]-one</i>	$\text{C}_5\text{H}_6\text{OS}$	114	8,958	116, 114 , 85, 68, 46, 39, 27
2	<i>7-Benzofuranol, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl</i>	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	164	20,008	164, 149 , 131, 121, 103, 91, 77, 65, 71
3	<i>1-Naphthalenol</i>	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$	144	24,850	144, 115 , 89, 72, 63, 39
4	Trifluralin	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$	335	28,108	306 , 290, 264, 248, 206, 160, 145, 105
5	Simazina	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClN}_5$	201	29,233	201 , 186, 173 158, 138, , 96, 68, 55, 44
6	Carbofuran	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$	221	29,233	164 , 149, 131, 122, 91, 51, 28
7	Atrazina	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	215	29,367	215, 200 , 173, 132, 104, 96, 58
8	Carbaryl	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	201	31,858	144 , 127, 115, 89, 75, 63, 39

F.M.= Formula Molecular, M.M= Massa Molecular, t_r = tempo de retenção.

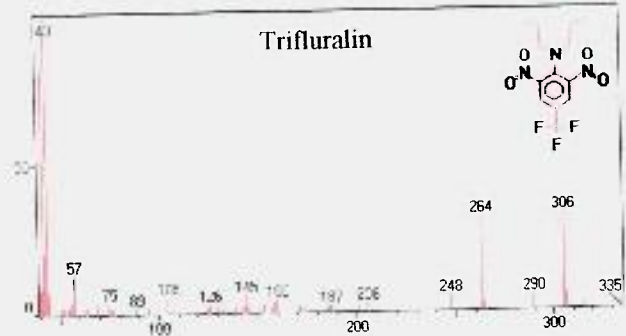
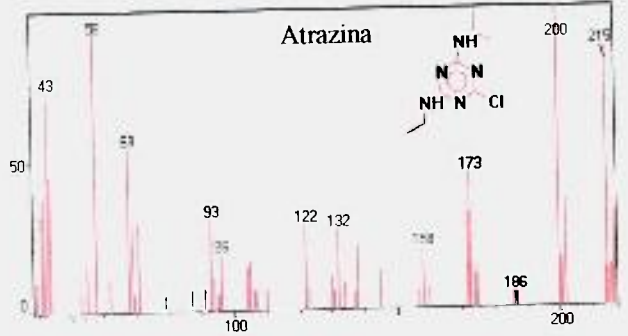
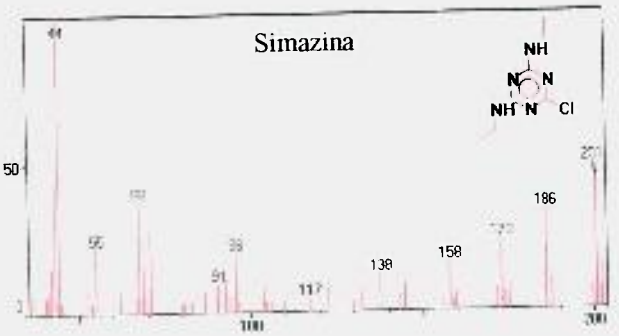
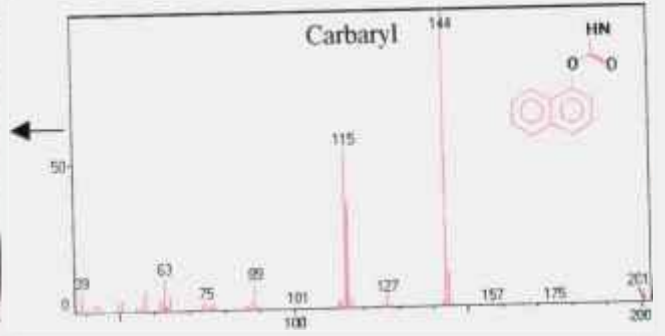
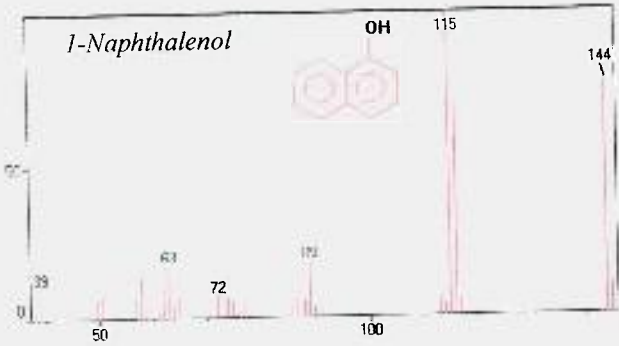
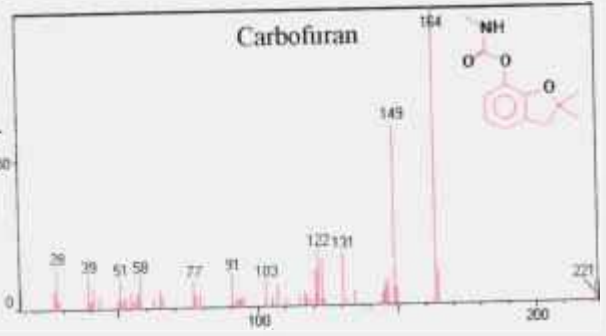
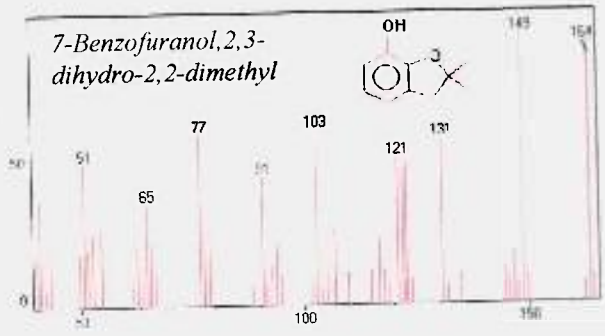
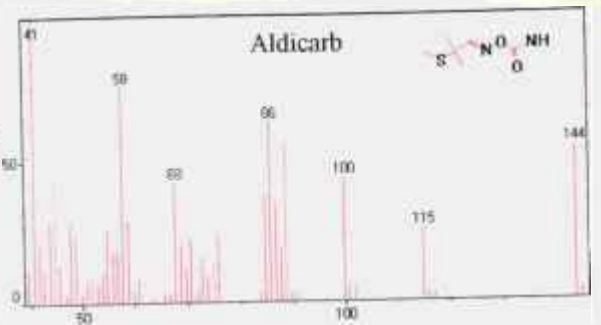
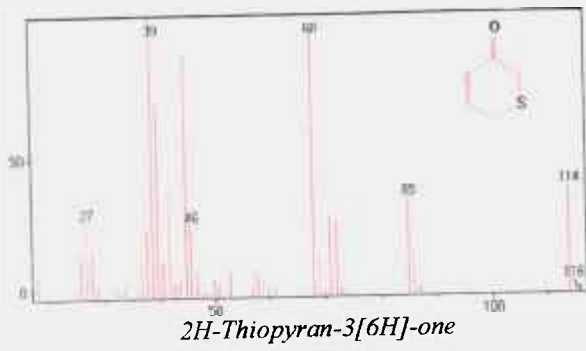


Figura 50. Espectro de massas dos compostos pesticidas analisados. Eixo *x* – *m/z*. Eixo *y* – abundância relativa dos íons.

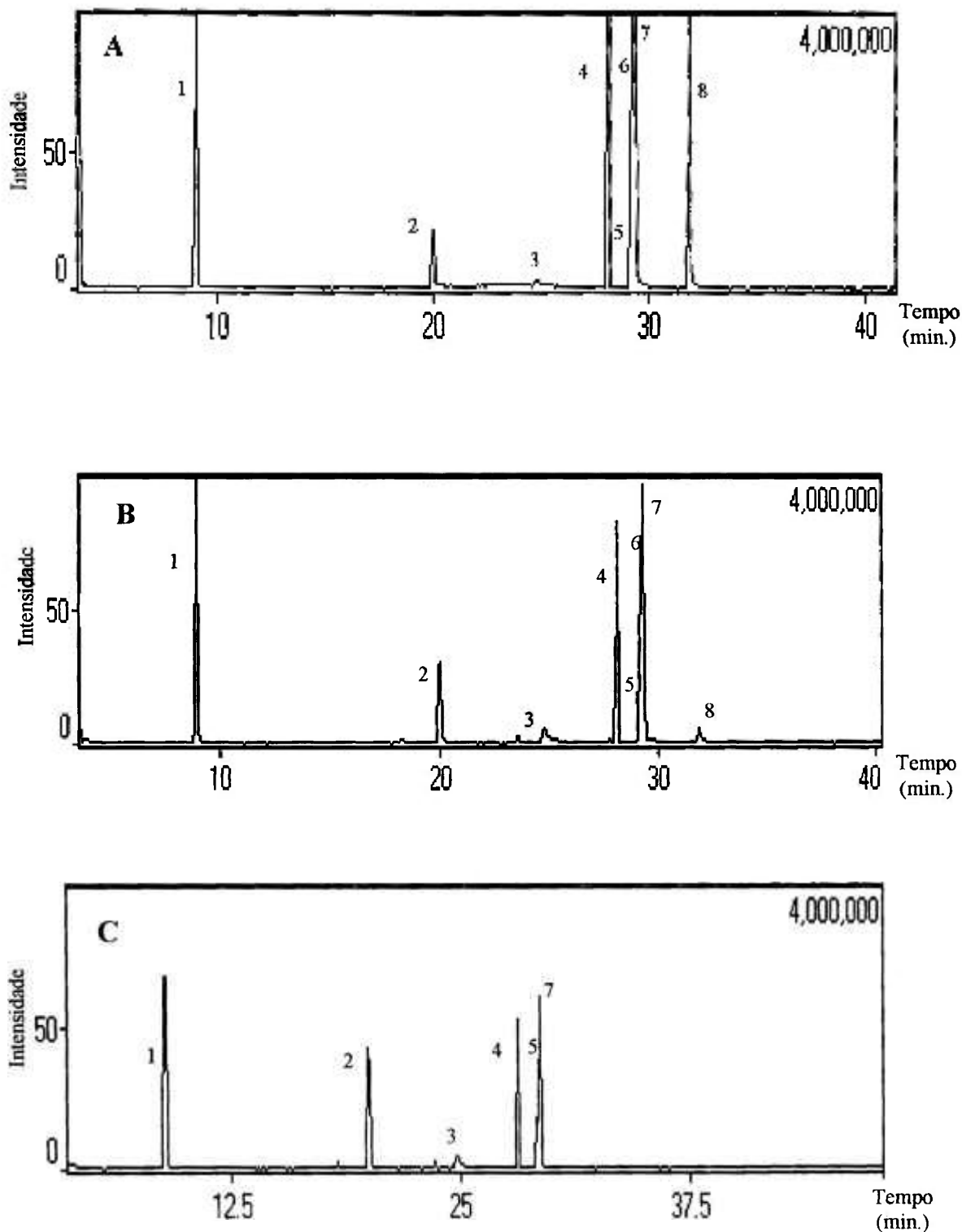


Figura 51. Cromatogramas da amostra padrão de concentração 60 mgL^{-1} , analisadas em diferentes temperaturas do injetor.

A - Temperatura do injetor 140°C .

B - Temperatura do injetor 290°C .

C - Temperatura do injetor 330°C .

Compostos: 1- *2H-Thiopyran-3[6H]-one*, 2- *7-Benzofuranol,2,3-dihydro-2,2-dimethyl*, 3- *1-Naphthalenol*, 4- Trifluralin, 5- Simazina, 6- Carbofuran, 7- Atrazina, 8- Carbaryl.

Concluindo a parte experimental deste trabalho e aproveitando a propriedade da técnica de detecção por espectrometria de massas, analisaram-se amostras de água ultrapura e água superficial, extraídas pelo método de *SPE*. Este experimento, qualitativo, foi realizado com o intuito de caracterizar as amostra e confirmar a presença dos compostos pesticidas estudados.

Um total de quatro amostras foram extraídas: uma amostra branco (cromatograma Figura 52), uma amostra branco mais adição padrão dos compostos na concentração de 5,0 mgL⁻¹ (cromatograma Figura 53), uma amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim (cromatograma Figura 54) e a mesma amostra com adição padrão dos compostos na concentração de 5,0 mgL⁻¹ (cromatograma Figura 55). Após a extração dos compostos por *SPE ENVI-18*, o solvente (ACN) foi evaporado em fluxo de nitrogênio, conforme procedimento descrito na parte experimental, e em seguida o extrato foi dissolvido com 100 µL de ACN, fornecendo um fator de concentração de 2.500 vezes.

Em todas as amostras foi detectado um pico com tempo de retenção de 30,008 minutos, referente ao composto heptadecano. Este composto está presente no óleo da bomba de vácuo utilizado na extração, contaminando as colunas de *SPE* com os vapores formados pelo aquecimento do óleo.

Na amostra de água superficial do rio Jaguari Mirim não foi detectado nenhum composto pesticida, visto que este método tem a capacidade de detectar uma variedade de compostos pesticidas (PATSIAS, 1996), no entanto verificou-se a presença do ácido fosfórico tributil ester.

Nas amostras de água ultrapura e superficial com adição padrão dos compostos pesticidas foi possível a detecção, confirmando de forma qualitativa os resultados obtidos nas análises por *HPLC-UV/vis*, verificando a eficiência e a versatilidade do método de extração líquido-sólido na pré-concentração e extração dos compostos pesticidas nas águas.

Outros compostos orgânicos foram detectados na amostra de água superficial, no entanto, também, foram encontrados nas amostras-branco, retirando a possibilidade de

contaminação da água. A maioria dos compostos detectados são alcanos provenientes dos vapores do óleo da bomba de vácuo; os ftalatos compostos presentes em materiais de plástico e polipropileno, utilizados na preparação das amostras e o ácido monocloroacético utilizado como preservativo, na etapa de coleta e armazenamento das amostras.

Estes testes comprovaram que a técnica de *GC/MS*, também pode ser utilizada em conjunto com a *SPE* para determinação dos compostos pesticidas em águas, porém com algumas ressalvas. O detector de espectrometria de massas pode ser utilizado em conjunto com a *HPLC*, onde as frações dos compostos serão coletadas e injetadas no sistema de *GC/MS* para confirmação dos resultados obtidos - sugestão dada para trabalhos futuros.

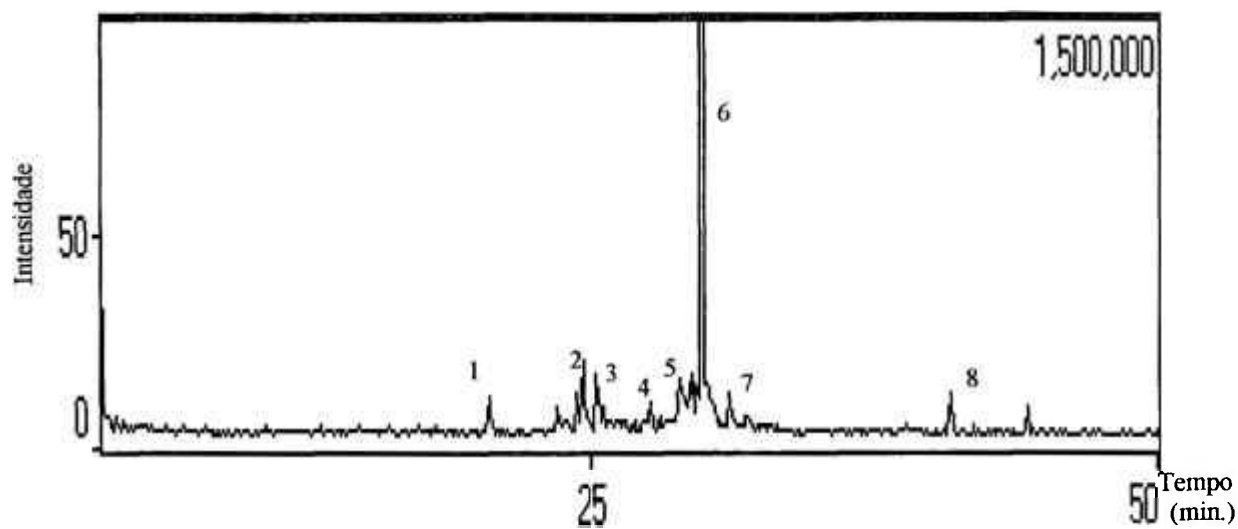


Figura 52. Cromatograma de uma amostra - branco extraída por *SPE* e analisada por *GC/MS*.

Compostos identificados:

1. 3-pentanol,3-metil-
2. fenol,3,5-bis[dimetiletil]
3. heptadecano,2,6,10,15-tetrametil
4. ácido benzóico,2,4,-bis[trimetilsilil]oxi-,trimetilsilil ester
5. dodecano,2,6,11,trimetil
6. heptadecano
7. ftalato
8. butano-2-bromo

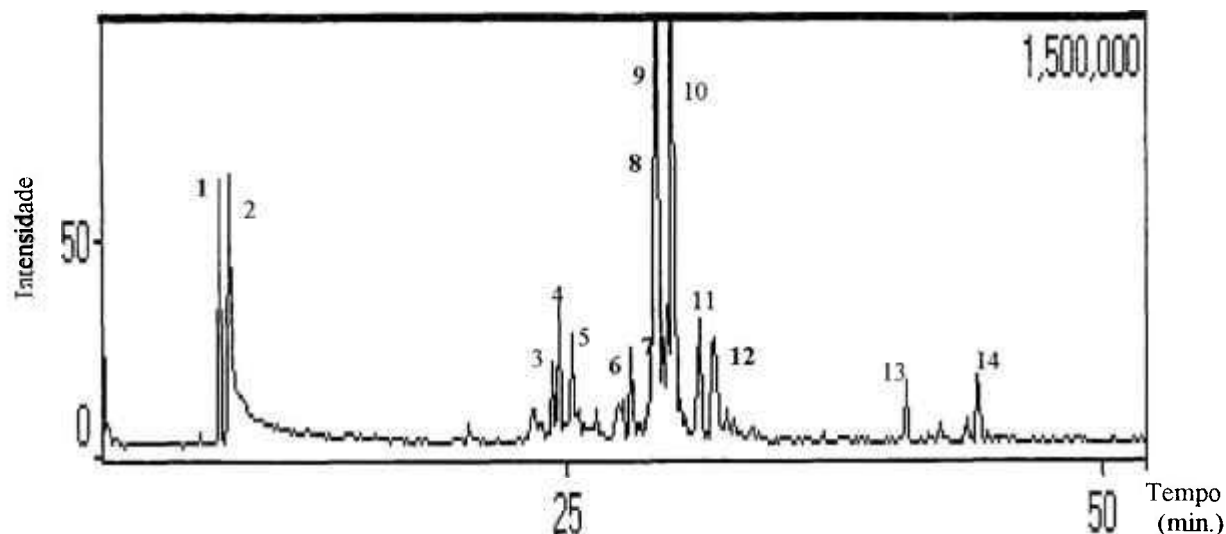


Figura 53. Cromatograma da amostra - branco com adição padrão dos compostos pesticidas na concentração de $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$ extraída por *SPE* e analisada por *GCMS*.

Compostos identificados:

1. **2H-thiopyran-3[6H]-one**
2. ácido cloroacético
3. heptadecano,2,6,10,14-tetrametil
4. fenol,3,5,-bis[1,1-dimetiletil]
5. decano,5-etil-5metil
6. **trifluralin**
7. **simazina**
8. **carbofuran**
9. **atrazina**
10. heptadecano
11. 1,2-ácido benzenodicarboxílico,bis[2-metilpropil]ester
12. **carbaryl**
13. butano-2-bromo
14. benzeno,1-[1,1-dimetiletil]-3,3,dimetilbutil

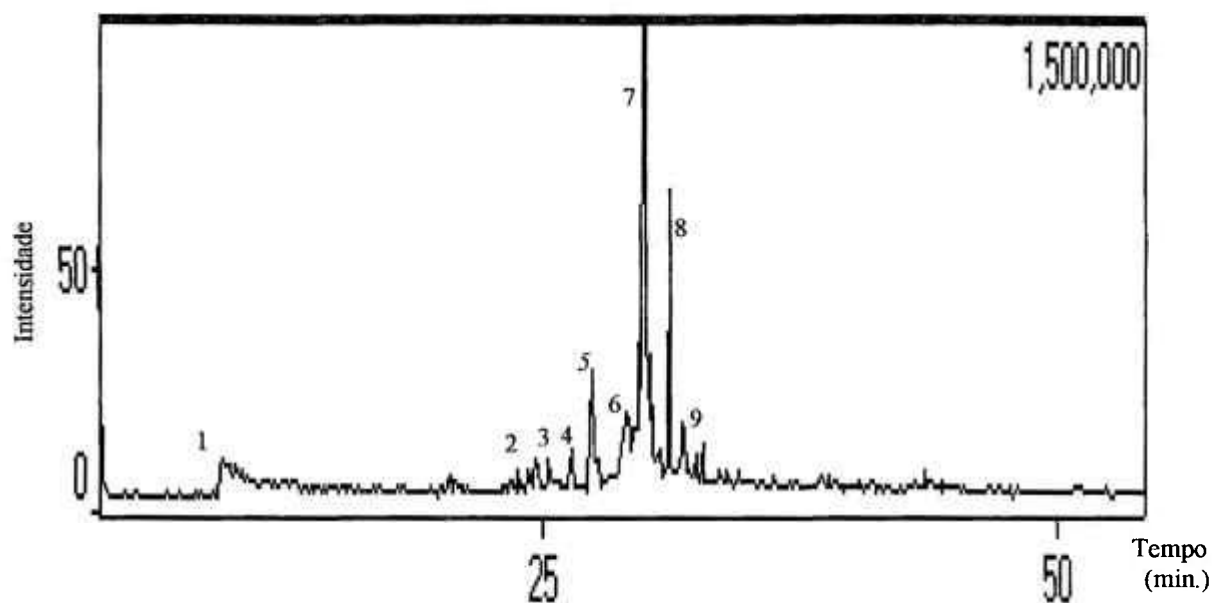


Figura 54. Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguarí Mirim, extraída por *SPE* e analisada por *GC/MS*.

Compostos identificados:

1. ácido cloroacético
2. heptadecano,2,6,10,15-tetrametil
3. fenol,3,5,-bis[1,1-dimetiletil]-
4. ácido propanóico,2-metil-2,2-dimetil-1-1[2-hidroxi-1-metiletil]propil ester
5. *ácido fosfórico tributil ester*
6. 1-decanal-2-etil
7. heptadecano
8. 1,2-ácido benzenodicarboxílico,bis[2-metilpropil]ester
9. 1-dodecanol,3,7,11-trimetil

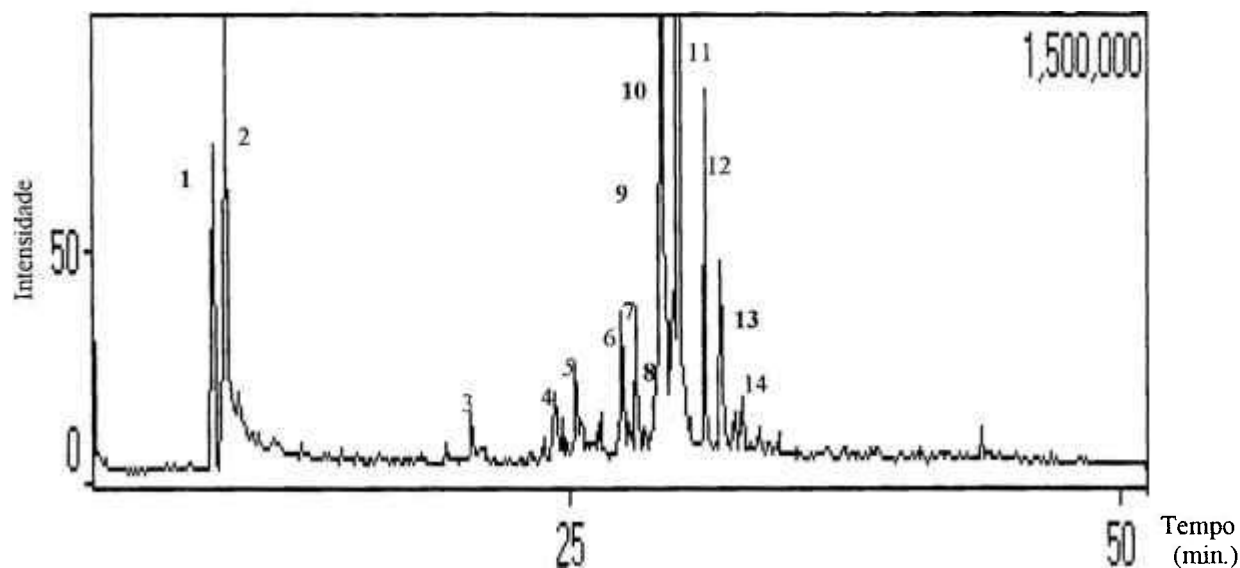


Figura 55. Cromatograma da amostra de água superficial do rio Jaguarí Mirim com adição padrão dos compostos pesticidas na concentração de $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$ extraída por *SPE* e analisada por *GC/MS*.

Compostos identificados:

1. **2H-thiopyran-3[6H]-one**
2. ácido cloroacético
3. dodecano,3,6,11,-trimetil
4. heptadecano,2,6,10,14-tetrametil
5. heptadecano,2,6,10,15-tetrametil
6. *ácido fosfórico tributil ester*
7. **trifluralin**
8. **simazina**
9. **carbofuran**
10. **atrazina**
11. heptadecano
12. 1,2-ácido benzenodicarboxílico,bis[2-metilpropil]ester
13. **carbaryl**
14. ftalato

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS

Os objetivos deste trabalho foram atingidos, mostrando que a metodologia analítica desenvolvida é eficiente para determinação de baixas concentrações dos compostos carbamatos (aldicarb, carbofuran, carbaryl), triazinas (atrazina e simazina) e nitroanilina (trifluralin) em amostras de águas superficiais. Como visto, vários testes analíticos foram realizados: precisão, exatidão, estabilidade, robustez, especificidade, entre outros, com a finalidade de validar a metodologia utilizada, ou melhor, de verificar sua eficiência na determinação destes compostos.

A aplicação da técnica de *SPE* em coluna, utilizando o material de preenchimento C_{18} , para pré - concentração e extração dos compostos pesticidas nas amostras de águas superficiais mostrou-se: exato, recuperações dos compostos acima de 80%; preciso, desvio padrão relativo abaixo de 5 % (média); versátil, pode ser utilizada em conjunto com *HPLC* e *GC* e sensível, onde concentrações abaixo de $0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ podem ser extraídas. Esses resultados estão de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*EPA*), que recomenda valores de recuperação dos compostos, aplicando um método de extração, acima de 70% com no máximo 30% de desvio padrão relativo (COFINO, 1993).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*) utilizando coluna de fase reversa, aplicando um gradiente de eluição adequado, separou todos os compostos com boa resolução ($R_s > 1,5$), reprodutibilidade e livres de interferentes (mesmo nas amostras de água superficial). Para os compostos carbamatos (termoestáveis), a técnica de *HPLC* mostrou-se extremamente específica, pois verificou-se experimentalmente, que estes compostos analisados por cromatografia gasosa (*GC*) se decompõem a alta temperatura do injetor, formando produtos de degradação.

O detector espectrofotométrico *UV/vis* acoplado ao *HPLC*, programado com o comprimento de onda fixo de 220 nm, apresentou alta sensibilidade, precisão e linearidade, verificados através dos baixos limites de detecção (faixa de concentração de 0,5 a 10 μgL^{-1}) e quantificação (faixa de concentração de 2 a 43 μgL^{-1}), repetibilidade das medidas ($\text{DPR} < 1,0$) e curvas analítica construídas ($r = 0,999$).

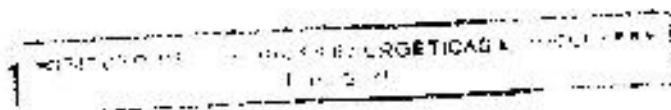
Com as análises das amostras realizadas por *GC/MS* foi possível a caracterização da amostra e confirmar os compostos pesticidas presentes. Este estudo comprovou a versatilidade da técnica de *SPE off-line*, propondo um método em conjunto com a cromatografia gasosa, sendo outra alternativa para determinação de compostos pesticidas. Também foi verificado, como dito anteriormente, que a técnica de cromatografia gasosa não é específica para compostos carbamatos, sendo a melhor escolha a *HPLC*. Apesar da técnica de detecção de espectrometria de massas ter como vantagem a identificação simultânea dos compostos, foi observado que o detector espectrofotométrico *UV/vis* possui maior sensibilidade para os compostos pesticidas analisados.

Contribuição Tecnológica do Projeto

Desenvolveu-se uma metodologia analítica eficiente para determinação de seis compostos pesticidas (aldicarb, carbofuran, carbaryl, atrazina, simazina e trifluralin) em águas superficiais. Esta ferramenta analítica está fornecendo resultados importantes para o projeto intitulado: *Modelagem diagnóstico e prognóstico da qualidade da água em áreas de captação*, com parceria da SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) e financiamento FINEP/PADCT (n^o 03-PCRS-01/98); RHAE/CNPq (n^o 610039/38-9/1998). Amostras de água superficial e amostras de água pós tratamento convencional, (região nordeste do estado de São Paulo) estão sendo analisadas de dois em dois meses, durante um ciclo hidrológico completo, com o intuito de rastrear possíveis contaminações dos compostos, controlando assim, a qualidade das águas destinada a população dos municípios próximos.

A metodologia desenvolvida aliou a simplicidade, rapidez, sensibilidade, reprodução e exatidão, aplicando uma tecnologia adequada, conseguindo resultados semelhantes ou superiores aos da literatura. Os limites de determinação obtidos, atingem o nível máximo dos compostos aconselhado a saúde para águas superficiais (NMAS), estabelecidos pelas agências internacionais de proteção ambiental (*EPA, EEA, FAO*). É importante salientar que, os compostos analisados neste trabalho são bastante utilizados na agricultura nacional e na região estudada, no entanto não constam na **Portaria 36**, dos valores máximos dos compostos permissíveis nas águas para abastecimento público, fornecidos pelo Ministério da Saúde (Brasil).

Outra contribuição importante do trabalho foi a implementação da técnica de Extração Líquido - Sólido (*SPE*) no Laboratório de Análises Ambiental no Departamento de Engenharia Química e Ambiental do IPEN. Esta técnica possui algumas vantagens na extração de compostos orgânicos (principalmente compostos pesticidas) em amostras aquosas como: rapidez, alta capacidade de concentrar os compostos, fácil eliminação de interferentes (seletividade), evita a formação de emulsões, fácil automação, baixo manuseio da amostra e utiliza baixas quantidades de solventes orgânicos. Este último item, abaixa o custo da análise e é ecologicamente mais correto, pois evita um maior contato do analista com solventes orgânicos, minimizando, também os riscos de contaminação do meio ambiente.



A *SPE* em coluna ou membrana possui uma variedade de materiais de preenchimento, (C_{18} , C_8 , SDVB, Fenil, Carbono-grafite, resinas de troca aniônica e catiônica, sílica) que podem ser estudados e aplicados na extração de inúmeros compostos orgânicos em amostras ambientais.

Os fundamentos das técnicas de *SPE* e *HPLC*, estudados e mostrados neste trabalho, contribuem muito como a comunidade científica e com a preservação da qualidade da água dos rios, pois servem como referência para aplicar esta metodologia ou desenvolver outras para a determinação de compostos: pesticidas; PHA's (hidrocarbonetos poliaromáticos); PCB's (bifenilascloradas); surfactantes; óleos e graxas; fenóis; dioxinas; entre outros, indicativos de poluição ambiental.

Sugestões para Atividades Futuras

- ⇒ Aplicar e estudar a metodologia desenvolvida para analisar os compostos pesticidas em amostras de alimentos, sedimentos e solos.
- ⇒ Avaliar o impacto ambiental desses compostos pesticidas, aplicando um programa de monitoramento, utilizando programas específicos de análise de risco para a avaliação da qualidade das águas superficiais e subterrâneas de uma determinada região.
- ⇒ Aplicar a técnica de *SPE* em conjunto com a *HPLC* com detecção *UV/vis* para analisar outros grupos ou compostos pesticidas em amostras de água superficial e águas subterrâneas.
- ⇒ Comparar as técnicas de *LLE*, *SPE* e *SPME* quanto à eficiência de extração dos compostos pesticidas em amostras de água.
- ⇒ Comparar as técnicas de detecção *UV/vis*, fluorescência e espectrometria de massas acoplada a *HPLC*.
- ⇒ Comparar a técnica de *HPLC* e *GC* com seus respectivos detectores, específicos para determinação dos compostos pesticidas.
- ⇒ Adaptar a metodologia desenvolvida neste trabalho para análise de outros compostos orgânicos, indicativos de poluição das águas ou do meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR, C.; BORRULL, F., MARCÉ, R. M. Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and mass spectrometry detection. **J. of Chromatogr. A.** v. 771, p. 221-231, 1997.
2. ALBANIS, T. A. HELA, D. G., SAKELLARIDES, T. M., KONSTANTINOY, I. K. Monitoring of pesticides residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. **J. of Chromatogr. A.** v. 823, p. 59-71, 1998.
3. BALINOVA, A. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. **J. of Chromatogr.**, v. 643, p. 203-207, 1993.
4. BARCELÓ, D.; VERONIQUE, B. e DURAND, G. Determination of trace levels of herbicides in estuarine waters by gas and liquid chromatographic techniques. **J. of Chromatogr.**, v. 607, p. 319-327, 1992.
5. BARCELÓ, D. Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. **J. of Chromatogr.**, v. 643, p. 117-143, 1993.
6. BARCELÓ, D. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. v. 13: **Environmental analysis techniques, applications and quality assurance**, 1. ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1993a.
7. BARCELÓ, D.; VERONIQUE, B., DURAND, G e NLELEN, M. Use of extraction disks for trace enrichment of various pesticides from river water and simulated seawater samples followed by liquid chromatography-rapid-scanning UV-Visible and Thermospray-Mass Spectrometry detection. **Environ. Sci. Technol.**, v. 27, p. 271-277, 1993b.
8. BIDLINGMEYER, B. A. **Practical HPLC Methodology and Applications**. 1. ed. Nova York, NY: Wiley Interscience Publication, 1992.
9. BISIUK, M., PRZYJAZNY, A.; CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **J. of Chromatogr.**, v. 754, p. 103-123, 1996.
10. BLAB, W. Determination of methyl carbamate residues using on-line coupling of HPLC with a post column fluorimetric labeling technique. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 339, p. 340-343, 1991.
11. BÖRNER, H. **Pesticides in Ground and Surface Water - Chemistry of Plant Protection**. v. 9, ed. Springer-Verlag, 1994.

12. BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). "Resolução do nº 20", de 18/06/86, D.O.U., DE 30/07/86, Brasília.
13. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 36 de 19/01/90, D.O.U., de 23/01/90, Brasília.
14. BROOKS, M.W.; TESSIER D.; SODERSTROM D.; JEKINS J. e MARSHALL C. J. A rapid method for simultaneous analysis of chlorpyrifos, isofenphos, carbaryl, iprodione and tradimefon. **J. of Chromatogr. Sci.** v. 28, p. 487-489, set. 1990.
15. BRANCO, S.M. **Natureza e Agroquímicos**. 10. ed. São Paulo, SP.:Moderna, 1995.
16. BRUN, G. L. e MACDONALD, R. M. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 24, p. 886, 1980.
17. BUSER, H-R. Atrazine and other s-triazines in lakes and in rain in Switzerland. **Environ. Sci. Technol.**, v. 24, p. 1049-1058, 1990.
18. BUSHWAY, R. J. High-performance liquid chromatographic determination of carbaryl and 1-naphthol at residues levels in various water source by direct injection and trace enrichment. **J. of Chromatogr.** v. 211, p.135, 1981.
19. CARTAS DO BRASIL, Escala 1:50.000. Folhas: SF-23-Y-A-III-1, SF-23-Y-A-III-2, SF-23-V-C-VI-1, SF-23-V-C-VI-2, SF-23-V-C-VI-3, SF-23-V-C-VI-4, IBGE 1972.
20. CARVALHO, F.P. e HANCE, R.S. Pesticides in tropical marine environments: assessing their fate. **IAEA Bullentin.**, n. 2, 1993.
21. CHIRON, S. e BARCELÓ, D. Determination of pesticides in drinking water by on-line solid-phase disk extraction followed by various liquid chromatographic systems. **J. of Chromatogr.**, v. 645, p. 125-134, 1993.
22. CHIRON, S., BARCELÓ, D. e ALBA, A. F. Comparison of on-line solid-phase disk extraction to liquid-liquid extraction for monitoring selected pesticides in environmental waters. **Environ. Sci. Technol.**, v. 27, p. 2352-2359, 1993a.
23. COFINO, W. P. Quality assurance in environmental analysis. In: BARCELÓ, D. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. v. 13: **Environmental analysis techniques, applications and quality assurance**, 1. ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1993.
24. COLEMAN, W. E.; MELTON, R.G.; KOPFLER, C. F.; KAREN, A. B.; AURAND, T. A.; JELLISON, M. G. Identification of organic compounds in mutagenic extract of a surface drinking water by a computerized gas chromatography/mass spectrometry system (GC/MS/COM). **Environ. Sci. Technol.**, v 14, p. 576, 1980.

51. MUCH, D. J.; GRAVES, R. L.; MAXEY, R. A.; ENGEL, T. M. Methods development and implementation for the National Pesticide Survey. **Environ. Sci. Technol.** - v. 24, n. 10, p. 1446-1451, 1990.
52. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guias para la calidad del agua potable**, 2^o ed, v. 1- recomendações. Genebra, 1995.
53. PARRILLA, P.; VIDAL, J. L. M.; GALERA, M. M., FRNICH, A. G. Simple and rapid screening procedure for pesticide in water using SPE and HPLC/DAD detection. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 350, p. 633 – 637, 1994.
54. PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU-MOTUKIDOU, E. Rapid method for analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground water by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **J. of Chromatogr. A.**, v. 740, p. 83-98, 1996.
55. PAWALISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.** v. 62, p. 2145, 1990.
56. PAWALISZYN, J. e CHEN, J. Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Anal. Chem.** v. 67, p. 2530-2533, 1995.
57. SCHLETT, C. Multi-residue-analysis of pesticides by HPLC after solid phase extraction. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 339, p. 344–347, 1991.
58. SCHÜLEIN, J.; MARTENS, D.; SPITZAUER, P.; KETTRUP, A. Comparison of different solid phase techniques by application of multiresidue methods for the determination of pesticides in water by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 352, p. 565-571, 1995.
59. SENNERT, S.; VOLMER, D.; LEVESEN, K., WÜNSCH, G. Multiresidue analysis of polar pesticides in surface and drinking water by on-line enrichment and thermospray LC-MS. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 351, p. 642-649, 1995.
60. SOLOMONS, T.W.G. **Organic Chemistry**. 5 ed. Nova York, NY.: J. Wiley & Sons, 1992.
61. SPARCINO, C. M. e HINES, J. W. High-performance liquid chromatography of carbamate pesticides. **J. of Chromatogr. Sci.** v. 14, p. 549-556, 1976.
62. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. Nova York, NY.: Wiley-Interscience, 1997.
63. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 19. ed. Nova York, NY.; 1997. **Carbamate pesticide (6610)/HPLC Method**. p. 6-109 a 6-114.
64. TANABE, A.; MITOBE, H.; KAWATA, K.; SAKAI, M. Monitoring of herbicides in river water by gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction. **J. of Chromatogr. A.** v. 754, p. 159-168, 1996.

65. TAYLOR, J. K. Validation of Analytical Methods . **Anal. Chem.** v. 55A, p. 600A., 1983.
66. TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual.** 11. ed. London, UK.: Brithish Crop Protection Council, 1997.
67. VASSILAKIS, I.; TSIPI, D.; SCULLOS, M. Determination of variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, and high performance liquid chromatography with post column derivatisation and fluorescence detection. **J. of Chromatogr.** v. 823, p. 49-58, 1998.
68. VITALI, P., VENTURINI, E., BONORA, C., CALORI, R, e RAFFAELLI, R. Determination of triazines and dinitroanilines in waters by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. **J. of Chromatogr. A.**, v. 660, p. 219-222, 1994.