

**UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB**

**ELIZABETH APARECIDA KOLTZ WATTHIER**

**MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS  
ORGANOCLORADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

**BLUMENAU – SC**

**2006**

**ELIZABETH APARECIDA KOLTZ WATTHIER**

**MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS  
ORGANOCORADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Dissertação de Mestrado em Química  
Para a obtenção do Título de Mestre em  
Química  
Universidade Regional de Blumenau  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Orientador: Doutor Marcos Rivail da Silva

BLUMENAU – SC

2006

**MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS  
ORGANOCORADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

**Por**

**ELIZABETH APARECIDA KOLTZ WATTHIER**

Dissertação apresentada para obtenção  
do Título de Mestre em Química, pela  
banca examinadora formada por:

---

Presidente: Prof. Dr. Marcos Rivail da Silva – Orientador – FURB

---

Membro: Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues - UTFPR

---

Membro: Prof. Dr. Clodoaldo Machado - FURB

Blumenau, 08 de junho de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho para meu marido Roque Roberto, aos meus filhos, Marina e Leonardo, e aos meus pais, pois o término só foi possível devido à compreensão e apoio da minha família.

## AGRADECIMENTO

Tudo e todas as pessoas são importantes. A muitas devemos agradecer, a outras devemos amar eternamente. Porém, algumas agradecemos de forma especial.

A Deus, o autor da vida e princípios de todas as coisas, pela oportunidade de ser o que sou.

Especialmente ao meu marido Roque e aos meus filhos Marina e Leonardo, que sempre estiveram ao meu lado com seu apoio, compreensão e incentivo, principalmente nos momentos críticos desta jornada. “Vocês são a essência da magia, que é a razão da minha energia, persistência e luta”.

Aos meus pais, pelo amor, ensinamentos e preces que ajudaram a nutrir as forças e vencer todos os obstáculos que surgiram nesta missão.

Ao meu orientador professor Doutor Marcos Rivail da Silva pela paciência, ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento da dissertação.

Ao Alberto Wisniewski Júnior que, pacientemente, colaborou com muitas informações essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo professor Marcio Barreto Rodrigues pela contribuição de conhecimentos e essencial ajuda na organização e planejamento deste trabalho, além do apoio e amizade.

A minha amiga “família” Mariza Miola pelo incentivo desde o início do mestrado e pela confiança depositada em mim.

A Cleuza pela atenção aos meus filhos nos momentos de minha ausência.

Ao Leônidas da SANEPAR, pelo auxílio nas informações e coletas.

Aos meus colegas de mestrado que nos momentos difíceis estavam junto para não deixar o desânimo vencer.

E finalmente, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e elaboração deste trabalho: Roberta, Cleci, Vanessa, Rodrigo, Dirceu, professores do LPC (Laboratório de Pesquisa em Combustíveis), professores das disciplinas do mestrado e colegas da UTFPR.

*“O mais importante é não parar de questionar.  
A curiosidade tem a sua própria razão de ser.  
Não podemos fazer nada senão contemplar  
extasiados os mistérios da eternidade, da vida, da  
maravilhosa estrutura da realidade.  
É mais que suficiente tentarmos simplesmente  
compreender um pouco deste mistério a cada dia.  
Nunca perca a sagrada curiosidade”.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Muitos resíduos de agroquímicos estão presentes em mananciais de águas em nível de traço. Desta forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas analíticas para o preparo de amostras têm sido de grande interesse para alcançar baixas concentrações e adequar os volumes da amostra aos sistemas de detecção. Para o desenvolvimento deste estudo foi empregada a técnica de microextração líquido-líquido, na investigação dos agroquímicos organoclorados, Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro, utilizando o frasco de Murray modificado. A eficiência da extração depende de uma série de parâmetros experimentais como o tipo do solvente orgânico extrator, tempo de repouso e tempo de agitação da amostra. De acordo com os experimentos foi estabelecido como melhor solvente orgânico o hexano, tempo de repouso e de agitação da amostra de 10 minutos. Foram estudadas as variações dos fatores: pH, concentração salina e tempo de agitação da amostra, enriquecida pelos agroquímicos, baseando-se em um planejamento fatorial  $2^3$  como ferramenta para encontrar as melhores condições de extração dos analitos. A condição otimizada de extração de acordo com o planejamento fatorial para os agroquímicos foi: pH 7,0, concentração salina ( $\mu$ ) de 5g de NaCl e tempo de agitação da amostra de 10 minutos. As curvas de calibração foram construídas através pelo método de calibração externa, sob as condições de pH 5,0, concentração salina de 117g ( $2,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) e tempo de agitação de 10 minutos. As recuperações dos agroquímicos, Aldrin  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro ficaram entre 0,4 e  $4,8 \mu\text{g.dm}^{-3}$ , com valores do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), 0,9892, 0,9986 e 0,9962, respectivamente. A metodologia proposta foi aplicada em amostras de águas da Bacia Rio Pato Branco e seus afluentes, Rio Divisa, Pinheiro, Captação do Rio Pato Branco, Lambedor, Mangueirinha e Panela no Estado do Paraná, utilizando as condições demonstradas como as melhores pelo planejamento fatorial. Através da técnica de microextração líquido-líquido foi detectada no Rio Pinheiro a presença dos três agroquímicos estudados com concentrações entre 0,3 e  $0,5 \mu\text{g.dm}^{-3}$ . Desta forma foi comprovada a eficiência do método analítico para a detecção de concentrações em nível de traço.

Palavras-chave:

Águas - agroquímicos - microextração líquido-líquido.

## ABSTRACT

There are many agrochemicals residues in water sources in trace level. This way, the development and improvement of the analytical techniques to prepare the samples has been of great interest to reach low concentrations and to adapt the volumes of the samples to the detection systems. For the development of this study the liquid-liquid microextraction technique was used, in the investigation of the organochlorine agrochemical, Aldrin  $\gamma$ -BCH (Lindane) and Heptachlor, using the Murray flask modified. The efficiency of the extraction depends on some experimental parameters such as the type of the extractor solvent, time of rest and shaking time of the sample. According to the experiments it established that the hexane was the best solvent, rest and shaking time of 10 minutes. Where studied the variation of the factors, pH, saline concentration and shaking time of the enriched sample water based on a factorial experimental  $2^3$  as tool to find the best conditions of the analytes extraction. The optimized condition of the extraction, according to the factorial experimental for the agrochemicals was: pH 7,0, saline concentration 5g NaCl and shaking time of the sample 10 minutes. The analytical curves were built through the calibration by the method, in the conditions of the pH 5,0, saline concentration 117g ( $2.0 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) and shaking time of 10 minutes. The recoveries of the agrochemicals Aldrin,  $\gamma$ -BHC(lindane) and Heptachlor were between 0,4 and  $4,8 \mu\text{g.dm}^{-3}$ , with values of correlation coefficient ( $r^2$ ), 0,9892, 0,9986 e 0,9962, respectively. The proposed methodology was applied in water samples from the Pato Branco River and its effluents, Rivers Divisa, Pinheiro, drinking water collection of Pato Branco River, Lambedor, Mangueirinha and Panela river in the state of Paraná, using the demonstrated conditions as the best by the factorial experiment. Through the liquid-liquid microextraction technique were detected on Pinheiro River the presence of three agrochemicals studied with concentrations between 0,3 and  $0,5 \mu\text{g.dm}^{-3}$ . In this way, the efficiency of the analytical method for detection in concentrations in trace level was proved.

Key-words:

waters - agrochemicals - liquid-liquid microextraction.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do agroquímico Aldrin .....	23
Figura 2: Fórmula estrutural do agroquímico $\gamma$ -BHC(Lindane) .....	24
Figura 3: Fórmula estrutural do agroquímico Heptacloro.....	25
Figura 4: Frasco de microextração líquido-líquido. ....	31
Figura 5: Frasco de microextração líquido-líquido modificado.....	32
Figura 6: Frasco de microextração utilizado por Zapf, Heyer e Stan.....	32
Figura 7: Frasco de microextração líquido-líquido modificado a partir do trabalho de Murray, utilizado no estudo dos agroquímicos organoclorados. ....	40
Figura 8: Representação esquemática do estudo e otimização das condições de extração dos agroquímicos utilizando o frasco de Murray.....	42
Figura 9: Mapa da Bacia do Rio Pato Branco - pontos de coleta .....	50
Figura 10: Cromatograma de estudos preliminares da amostragem sem adição de sal e sem correção de pH .....	55
Figura 11: Estudo da recuperação dos diferentes tipos de solvente orgânicos, sem adição de sal na amostra e ausência dos agroquímicos.....	57
Figura 12: Efeito do solvente orgânico extrator com adição de sal (KCl) na amostragem sobre a recuperação dos agroquímicos .....	58
Figura 13: Formação de bolhas no braço lateral do frasco na recuperação do solvente orgânico durante o processo de extração, utilizando o frasco de Murray modificado .....	59
Figura 14: Recuperação do solvente orgânico hexano de acordo como a variação nos tempo 10, 30, 60 e 90 minutos de repouso. ....	62
Figura 15: Cromatograma dos ensaios em triplicata realizados para o estudo do melhor tempo de repouso.....	63
Figura 16: Estudo do tempo repouso na extração dos agroquímicos em água, sob agitação constante (900rpm) e temperatura ambiente (25°C).....	64
Figura 17: Recuperação dos agroquímicos sem adição de sal, 5g de sal na amostra (nível -) e 112g de sal (nível +) do planejamento fatorial .....	71
Figura 18: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina ( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o Aldrin, no planejamento fatorial $2^2$ .....	73
Figura 19: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o $\gamma$ -BHC(Lindane), no planejamento fatorial $2^2$ .....	74
Figura 20: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina ( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o Heptacloro, no planejamento fatorial $2^2$ .....	74
Figura 21: Cromatograma da solução padrão 20mg/mL.....	76
Figura 22: Curva de calibração para o agroquímico Aldrin .....	77
Figura 23: Curva de calibração para o agroquímico $\gamma$ -BHC(Lindane) .....	78
Figura 24: Curva de calibração para odo Heptacloro.....	79
Figura 25: Cromatograma de amostra de águas naturais do ponto 02 - Rio Pinheiro, na presença dos agroquímicos Aldrin, $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis experimentais e respectivos níveis de estudo do planejamento fatorial.....	46
Tabela 2 - Matriz de planejamento fatorial, demonstrando as combinações das variáveis experimentais em estudo.....	46
Tabela 3 - Recuperação do Aldrin, $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro sem ajuste de pH e sem adição de sal na preparação da amostra.....	55
Tabela 4 - Estudo da recuperação dos diferentes solventes extratores na ausência dos contaminantes, com e sem adição de sal (KCl) na amostragem.....	56
Tabela 5 - Influência da variação no tempo de repouso da amostra na recuperação do solvente orgânico extrator.....	61
Tabela 6 - Recuperação dos agroquímicos organoclorados de acordo com o tempo de repouso da amostra no frasco de microextração.....	62
Tabela 7 - Matriz de planejamento contendo os efeitos principais, secundários e tri-fatorial de interações e respostas em concentração para os agroquímicos estudados.....	65
Tabela 8 - Recuperação do agroquímicos de acordo com o ponto central conforme planejamento fatorial, desvio padrão e coeficiente de variação.....	66
Tabela 9 - Efeitos principais e de interações calculados para as combinações do planejamento fatorial $2^3$ a partir dos dados obtidos da Tabela 7.....	67
Tabela 10 - Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do Aldrin.....	77
Tabela 11 - Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do $\gamma$ -BHC(Lindane).....	78
Tabela 12 - Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do Heptacloro.....	79
Tabela 13 – Fator de recuperação dos analitos de acordo com a fortificação da amostra.....	81
Tabela 14 - Limite de detecção e de quantificação dos agroquímicos organoclorados para a metodologia proposta.....	81
Tabela 15 - Descrição dos pontos de amostragem na Bacia do Rio Pato Branco, pH, temperatura do ar, temperatura da água e profundidade da coleta.....	83
Tabela 16 - Concentração de organoclorados nas amostras de águas naturais da Bacia do Rio Pato Branco.....	84

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ai	Unidades do analito introduzidas
ANA	Agência Nacional de Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	Unidades do analito recuperadas
BHC	Hexaclorocicloexano
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DDTP	Dietilditiofosfato de amônio
DISAD	Divisão Nacional de Vigilância de Produtos Saneantes Domissanitários
EC	Comunidade Européia
ECD	Deteccção e captura de elétrons
EPA - U.S	Environmental Protection Agency (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos)
EU	União Européia
C.S	Concentração salina
FAO	Organização das Nações Unidas para e Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
GC/ECD	Cromatografia gasosa com deteccção e captura de elétrons
GPS	Global Positioning System
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
HRGC-MS	Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada espectrometria de massa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPTB	Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de deteccção
LOQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama
mg.mL <sup>-1</sup>	Miligramas por mililitro
MLLE	Microextração líquido-líquido
NaCl	Cloreto de Sódio
ng.dm <sup>-3</sup>	Nanograma por litro
OCPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
OPPs	Organofosforados
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
r <sup>2</sup>	Coeficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto
S	Desvio Padrão
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
S <sub>w</sub>	Solubilidade em água
T.A	Tempo de agitação
U.S.A	Estados Unidos da América
UTM	Universal Transverse Mercator
WHO	Organização Mundial de Saúde
µg.dm <sup>-3</sup>	Micrograma por decímetro
µL	Microlitros

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 OBJETIVOS .....	15
1.1 OBJETIVO GERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 AGROQUÍMICOS .....	16
2.2 AGROQUÍMICOS ORGANOCLORADOS NO BRASIL/PARANÁ E REGIÃO SUDOESTE .....	19
2.3 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL .....	21
2.4 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS ORGANOCLORADOS EM ESTUDO .....	22
2.4.1 Aldrin - Grupo C .....	22
2.4.2 BHC - 1, 2, 3, 4, 5, 6 - Hexaclorocicloexano - Grupo B.....	23
2.4.3 Heptacloro - Grupo C.....	24
2.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	25
2.5.1 Extração Líquido-Líquido (LLE).....	26
2.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE) .....	27
2.5.3 Microextração em Fase Sólida (SPME) .....	29
2.5.4 Microextração Líquido-Líquido (MLLE).....	30
2.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE AGROQUÍMICOS.....	34
2.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO .....	35
2.7.1 Exatidão .....	35
2.7.2 Precisão .....	36
2.7.3 Linearidade e Faixa Linear .....	36
2.7.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) .....	36
2.7.5 Recuperação .....	37
2.7.6 Robustez.....	37
2.8 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	37
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1.1 Materiais Utilizados .....	39
3.1.2 Reagentes Utilizados .....	39
3.1.3 Solventes de Extração.....	39
3.1.4 Padrões de Agroquímicos.....	40
3.1.5 Amostra de Água Bruta .....	40
3.1.6 Frasco de Murray Modificado - Características .....	40
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	41
3.2.1 Preparo da Solução Padrão dos Agroquímicos.....	41
3.2.2 Procedimento de Microextração utilizando o Frasco de Murray Modificado .....	41
3.2.3 Escolha do Solvente Extrator .....	43

3.2.4 Contaminação da Amostra pelos Agroquímicos Organoclorados e Estudo do Tempo de Repouso antes da Pré-concentração no Frasco de Murray Modificado .....	44
3.2.5 Determinação do Tempo de Repouso para Separação de Fases dentro do Frasco de Murray Modificado .....	45
3.3 METODOLOGIA DE ESTUDO DOS EFEITOS EXPERIMENTAIS, pH, CONCENTRAÇÃO SALINA E TEMPO DE AGITAÇÃO SOBRE A RECUPERAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS .....	45
3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS) .....	47
3.5 CURVAS DE CALIBRAÇÃO EXTERNA PELO MÉTODO .....	47
3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO E DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS EM ÁGUAS .....	48
3.6.1 Curva Analítica .....	48
3.6.2 Linearidade e Faixa de Aplicação .....	48
3.6.3 Recuperação .....	49
3.7 AMOSTRAGEM REAL - CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ÁREA EM ESTUDO “BACIA DO RIO PATO BRANCO” .....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	52
4.1 ESTUDOS PRELIMINARES DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO .....	54
4.2 ESCOLHA DO SOLVENTE ORGÂNICO .....	56
4.3 ESTUDO DO TEMPO DE REPOUSO .....	60
4.4 ESTUDO DO EFEITO PRINCIPAL E INTERAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS NA AMOSTRAGEM, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL .....	64
4.5 EFEITOS PRINCIPAIS .....	68
4.5.1 Efeito do pH .....	68
4.5.2 Efeito da Concentração Salina ( $\mu$ ) .....	69
4.5.3 Efeito do Tempo de Agitação .....	71
4.6 INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS .....	72
4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS ORGANOCLORADOS EM AMOSTRAS AQUOSAS .....	75
4.7.1 Curva Analítica .....	75
4.7.2 Recuperação .....	80
4.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	81
4.8 AVALIAÇÃO DO IMPACTO EM MATRIZES REAIS USANDO AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (ÓTIMAS) .....	82
CONCLUSÃO .....	86
REFERÊNCIAS .....	89

## INTRODUÇÃO

O aumento da população gera maior consumo de alimentos e, conseqüentemente, aumento do uso de agroquímicos para o controle de ervas daninhas, doenças e pragas que atacam a produção agrícola. O Brasil dispõe de uma das maiores áreas agricultáveis do mundo, sendo um dos primeiros no “ranking” de vendas de agroquímicos. O intensivo de produtos agrícolas, muitas vezes sem receituário agrônômico adequado, leva a produção de grandes quantidades de resíduos que afetam os diversos ecossistemas existentes.

Desde o início da década de 1980 algumas classes de agroquímicos fazem parte das listas vermelhas e/ou negras desenvolvidas pelos órgãos de proteção ambiental como a Agência de Proteção Ambiental (EPA) ou a Comunidade Européia (EC). Nesta relação, agroquímicos como os organoclorados que são de grande periculosidade, estão incluídos. Sabe-se, no entanto, que resíduos destas espécies químicas têm sido encontrados no meio ambiente.

Apesar do rigor e da severidade da legislação ainda existe uma grande preocupação com relação a entrada ilegal de produtos agroquímicos no Brasil. inclusive agroquímicos falsificados sem ação alguma no controle das pragas ou com ação danosa aos seres vivos, colocando em risco o próprio cultivo agrícola.

Muitos agroquímicos apresentam efeito nocivo ao meio ambiente e devem ser recomendados de maneira criteriosa a fim de reduzir o impacto ambiental. A necessidade de reduzir o impacto ambiental tem despertado o interesse científico em pesquisas que visam contribuir para a identificação, análise e monitoramento dos compostos encontrados nos diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar).

Dentre todas as preocupações, a água por ser um dos elementos de maior importância para todas as formas de vida na terra, é o compartimento ambiental que mais sofre contaminação química por agroquímicos.

Através da água, todas as espécies químicas não degradadas podem chegar até os organismos vivos e, dependendo da concentração e da bioacumulação ao longo da cadeia trófica, podem causar danos à saúde, como também tornarem-se cancerígenos. Os organoclorados, por exemplo, quando presentes no metabolismo dos seres vivos são solúveis em gorduras e se bioacumulam em níveis tóxicos por grande período de tempo.

Em função desta problemática, muitas técnicas de digestão e/ou extração têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas, visando a pré-concentração de agroquímicos em águas para posterior quantificação. A análise quantitativa exige métodos analíticos eficientes que consigam detectar e quantificar níveis cada vez mais baixos em matrizes ambientais.

Este trabalho propõe o estudo de um método de pré-concentração de agroquímicos organoclorados em matrizes aquosas através do processo de microextração líquido-líquido utilizando o frasco de Murray modificado, levando em consideração a influência de fatores como: pH, concentração salina, tempo de agitação da amostra, bem como o solvente extrator a ser usado. Espera-se que este trabalho possa contribuir para melhorias na recuperação de analitos, utilizando pequenas quantidades de solvente orgânico para o preparo da amostra, economizando custo e tempo.

Com o objetivo de diminuir o número de ensaios laboratoriais, durante a avaliação dos efeitos dos fatores experimentais propostos, utilizou-se uma estratégia multivariada fundamentada em planejamento fatorial de experimentos.

Diante destes aspectos, com base na literatura, foi otimizada a metodologia de microextração líquido-líquido, em amostras fortificadas com os agroquímicos organoclorados, Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro e, posteriormente, testou-se com amostras reais coletadas na Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco e seus afluentes, responsáveis pelo abastecimento de água da cidade de Pato Branco - PR.

O método instrumental empregado para a análise após preparação das amostras de água (sintéticas e reais) foi a cromatografia gasosa, com o emprego de um detector de espectrometria de massa (GC/MS). Este método instrumental tem sido indicado em literatura como um dos mais eficientes devido a sua grande confiabilidade e sensibilidade.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GERAL**

Esse trabalho tem como objetivo geral o estudo e otimização de um método simples e eficiente para determinação dos agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro em águas, empregando a técnica de microextração líquido-líquido, utilizando o Frasco de Murray modificado para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o uso de diferentes solventes orgânicos para pré-concentrar e extrair agroquímicos organoclorados das amostras de águas;
- Verificar a influência dos fatores como, concentração salina, pH, tempo de agitação e tempo de repouso na preparação da amostra;
- Otimizar a metodologia, para extrações em nível traço de compostos organoclorados em matrizes aquosas;
- Validar a metodologia levando em consideração os efeitos de variação dos fatores e suas respostas obtidas através de um planejamento experimental;
- Avaliar a presença de moléculas de organoclorados, proibidos por lei, em águas utilizadas para o consumo humano na Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco.



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 AGROQUÍMICOS

A agricultura vem fazendo um grande esforço para além de aumentar o setor produtivo de alimentos promover colheitas com maior qualidade. A produção agrícola contribui de forma efetiva para a contaminação das águas, tanto em níveis superficiais ou subterrâneos, seja por meio de despejos de substâncias eutrofizantes como os fertilizantes à base de fósforo e nitrogênio, seja pelos detritos de animais, que pela ação das chuvas são carregados para os recursos hídricos ou, ainda, pelo uso inadequado dos agroquímicos (DORES, 2001; MAGOSSI *apud* MACÊDO, 2002; SANTOS NETO, 2005).

Segundo a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89 o termo agroquímico é definido da seguinte forma:

Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

Conforme cita Bortoluzzi (2005), os agroquímicos compõem-se de uma grande variedade de princípios ativos e concentrações. Após a aplicação, uma parte alcança o alvo sanitário, cumprindo a sua finalidade, porém outra é liberada no ambiente interagindo com o solo, a água e a atmosfera (DONG, 2005). A transferência de moléculas de agroquímicos no ambiente é regida por uma série de fenômenos, como: evaporação, lixiviação e adsorção. O solo tem o papel de receptor e de agente tamponante para certas moléculas, reduzindo assim a possibilidade de contaminação das águas. No entanto, o uso e o manejo impróprio do solo, restringem sua capacidade de retenção de água (menor taxa de infiltração), elevando a possibilidade de contaminação dos mananciais. Esta problemática é particularmente importante para as micro-bacias hidrográficas destinadas ao abastecimento público, pois, segundo a legislação em vigência, a água nessas condições precisa ser de excelente qualidade.

Segundo as considerações de Rissato (2004) o problema de intoxicações por agroquímicos preocupa principalmente pelo fato de que essas acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos. O uso de muitos destes compostos foi proibido devido à constatação dos efeitos cumulativos e prejudiciais, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (GONÇALVES, 2002).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental, (EPA – Environmental Protection Agency), o uso difundido de organoclorados persistentes (OCPs) em épocas passadas criou preocupação ambiental significativa devido a grande persistência. A natureza perigosa dos OCPs é um resultado da sua toxicidade e lipossolubilidade (FIDALGO, 2003).

Autores como Galassi (1996) e Lanças (1996) *apud* RISSATO (2004), afirmam que os agroquímicos organoclorados são relativamente inertes quando comparados a outras classes de agroquímicos, pois possuem alta estabilidade devido às ligações carbono-cloro apresentadas em sua estrutura química. Entretanto, conforme Grande (2003), são conhecidos por sofrerem desidrocloração, oxidação, descloração, rearranjos, hidrólise e reações fotoquímicas. Estes compostos são muito estudados, devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e biossolubilidade em tecido lipídico (BASHEER, 2005).

O emprego de agroquímicos organoclorados nas últimas décadas conforme afirma Guzzella (2004), tem produzido acumulação de resíduos tóxicos em vários ecossistemas de todo o mundo e, de acordo com informações citada por Amato (2002), podendo ser transportados por grandes distâncias, retidos no organismo de animais migrantes marinhos (ROUTTI, 2004).

Para Oliveira (1995), a concentração destes compostos tem alcançado níveis tóxicos em vários organismos terrestres, como pássaros e mamíferos, assim como em organismos aquáticos. Zhou (2001) *apud* AMATO (2002), reportou contaminações de organoclorados em algumas amostras de água, partículas em suspensão e sedimentos, na Baía de Daya, China. Segundo este autor, os perfis de distribuição destes poluentes sugerem que existem várias fontes contribuindo para a contaminação da baía, incluindo lixiviação de solos, descargas de águas contaminadas por lixo, esgoto e detrito de indústria naval. Os resíduos de agroquímicos organoclorados têm se tornado parte intrínseca dos ciclos biológicos, geológicos e químicos da Terra e têm sido detectados no ar, água, solo, plantas,

invertebrados marinhos e mesmo em locais onde eles não são empregados.

Para Campanilli (2004), os níveis de organoclorados na água dos oceanos têm causado sérios problemas ecológicos como, por exemplo, o fracasso da reprodução da truta-do-mar, na Laguna Madre, no Texas, e da águia-marinha, no Báltico (FLORES, 2004-b). Além disso, tem-se encontrado golfinhos contaminados com DDT, desde o litoral paulista até regiões da Antártida.

Para Dórea (2004), a eliminação das pragas que atacam a agricultura, através dos agroquímicos proporciona benefício inquestionável na produção dos alimentos. Porém, os resíduos de pesticidas permanecem nos alimentos, no solo, nas águas subterrâneas e nas águas de descarte após a aplicação desses componentes químicos. Lopes (2003), em outro estudo cita que esses compostos são altamente nocivos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora, ser cancerígeno, entre outros males. Em água potável podem aumentar os riscos de ocorrência de câncer, bem como causar danos ao sistema: nervoso, cardíaco, endócrino e reprodutivo (BAIRD, 2002; GRANDE, 2003).

Na década de 1960 conforme Roberts (1999), verificou-se uma grande contaminação ambiental em vários países do mundo, como principal contaminante encontrou-se o Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), seguido por outros que também são responsáveis pela contaminação, entre eles estão o endrin, o lindano, o aldrin, o dieldrin, o heptacloro, o clorodano e o endossulfano: família dos compostos organoclorados com potencial tóxico. Segundo Konradsen (2004), na Europa, os agroquímicos, organoclorados em especial o DDT, foram considerados produtos milagrosos a tal ponto que, para prevenir uma epidemia de tifo (doença transmitida por piolhos) que ocorria em Nápoles (1943-1944), as tropas americanas e a população local foram pulverizadas com este produto, contribuindo para a diminuição da doença. O efeito do DDT foi tão prolongado, que uma vez aplicado às paredes internas de uma casa, matava qualquer inseto que ali pousasse, mantendo essa ação por vários meses.

De acordo com Mozaz (2004), além da diversificação destes compostos, a sua utilização na agricultura disseminou-se por todo o planeta. Para agravar as condições ambientais, cita Queiroz (2001), que em 1967 já haviam sido aplicadas em lavouras de todo o planeta aproximadamente 1.700.000 toneladas de agroquímicos, comprometendo a sanidade dos recursos naturais, bem como, a

fauna, a flora e a saúde humana.

Amato (2002) reportou que a elevação da temperatura e a influência do pH nos compostos organoclorados em corpos d'água afetam tanto a sua solubilidade quanto a volatilidade destes compostos.

Em corpos aquáticos, como rios e lagos, os organoclorados têm maior probabilidade de estarem ligados à superfície do material particulado orgânico em suspensão e aos sedimentos nas regiões mais profundas do que estar dissolvidos na própria água. Devido a esse fenômeno, a concentração de organoclorados freqüentemente tem atingido níveis perigosos em muitas espécies (BAIRD, 2002).

Quanto ao transporte dos organoclorados, conforme Fatoki (2003), pelo fato de possuir baixa solubilidade em água, o DDT e demais organoclorados, quando carregados para corpos d'água (lagos, rios etc) tendem a se acumular na superfície. Agroquímicos de baixa solubilidade em água tendem a escapar da fase aquosa e aderir a substâncias lipofílicas que ocorrem no sistema, ou se suas pressões de vapores forem altas o suficiente, volatilizam gradualmente para a atmosfera (GRANDE, 2003).

A exemplo do que acontece com outros agroquímicos organoclorados, o transporte atmosférico é a principal via de disseminação do ambiente aquático. Sua baixa pressão também não impede que os organoclorados existentes na superfície do solo se volatilizem, diluindo para o ambiente atmosférico e, assim, pode ocorrer que as moléculas dos pesticidas sejam carregadas por meio da ação eólica ficando em suspensão no ambiente atmosférico (MACÊDO, 2002).

## **2.2 AGROQUÍMICOS ORGANOCORADOS NO BRASIL/PARANÁ E REGIÃO SUDOESTE**

Queiroz (2001) observa algumas tendências na ciência dos agroquímicos como resultado da mudança no uso de pesticidas e no desenvolvimento de novos produtos. Segundo a autora, observa-se o decréscimo no uso de inseticidas persistentes (de longo tempo), tais como organoclorados, substituídos por agroquímicos mais polares e mais rapidamente degradados (tempo de meia-vida curto), como exemplo cita-se os N-metilcarbamatos. Também se pode substituir o uso de herbicidas tradicionais, tais como, triazinas, ácidos clorofenoxi e feniluréias

pelos sulfoniluréias e imidazolinonas, que apresentam uma baixa dose de aplicação e alto grau de biodegradação.

No Brasil, conforme um relatório apresentado em 2001 pela Agência Nacional de Águas (ANA), cerca de 70% dos rios que fazem parte das bacias hidrográficas que vão do Sergipe ao Rio Grande do Sul apresentaram altos índices de contaminação, principalmente por efluentes urbanos, substâncias lixiviadas de grandes lixões e agroquímicos.

Quanto ao Estado do Paraná, segundo pesquisas realizadas pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG, 2005), é um dos estados, juntamente com o Mato Grosso do Sul, que recebe grandes quantidades de produtos ilegais, entre eles inclusive agroquímicos falsificados, sem ação alguma no controle de pragas, pois o alto valor do produto nacional faz com que o estado fique suscetível ao recebimento de produtos ilegais.

De acordo com artigo publicado por Silva (2004), alguns resíduos de agroquímicos organoclorados foram monitorados em sedimentos de superfície dos rios como: Chopim e seus afluentes, Caldeiras, Bandeira e Lontras, localizado no município de Palmas - PR. Segundo os autores, os agroquímicos organoclorados em estudo nas amostras de água foram extraídos através de extração em fase sólida (SPE). Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa, entre eles estão: BHC (hexaclorocicloexano), aldrin e o heptacloro-epóxido em amostras de águas. No Rio Caldeira, que é o principal responsável pelo abastecimento de água pública do município de Palmas, foi encontrado o aldrin em quantidade três vezes superior ao permitido conforme legislação do Ministério da Saúde Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. O BHC também foi encontrado, mas com concentrações abaixo dos valores máximos preconizados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Também nesta mesma linha, Andreoli (2004) fez um levantamento e monitoramento dos níveis de agroquímicos entre 1994 e 1998 nas águas *in natura* e tratada nos municípios de Curitiba e de Londrina. Os agroquímicos pesquisados foram: Andrin, BHC, Clordano, HCB, Heptacloro, Lindano, Parathion, entre outros. No município de Curitiba, em 100% das análises realizadas, não foram encontrados quaisquer níveis de agroquímicos. No laboratório de Londrina foram encontrados resíduos em 0,966% de amostras na água tratada e 2,012% amostras de água *in natura*.

Portanto, pode-se dizer que apesar dos baixos percentuais apresentados, evidenciam a absoluta inadequação da norma em relação à realidade agrícola do Paraná, pois não garantem que a água não apresenta problemas, sendo que muitos dos produtos pesquisados, já estão proibidos pela Portaria 329/2002 de 02 de setembro de 1985 e não são monitorados (ANDREOLI, 2004).

### 2.3 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL

De acordo com Tiburtius (2004), nas últimas décadas, o aumento populacional e o conseqüente aumento das atividades industriais vêm contribuindo para o agravamento dos problemas ambientais, principalmente com respeito à preservação das águas superficiais e subterrâneas.

A União Européia (EU) preconiza que a concentração de agroquímicos individuais em água potável não deve exceder  $0,1\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , para agroquímicos individuais e  $0,5\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  para o total de agroquímicos encontrados. A quantificação a este nível requer limites de detecção de  $0,01\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (LUTHJE, 2004).

O Brasil apresenta uma legislação que também regulamenta os níveis máximos de agroquímicos em água potável, baseados em sua periculosidade, similarmente a EPA. A portaria número 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, estabelece padrões de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos a saúde, entre elas estão os organoclorados em estudo: Aldrin  $0,03\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma$ -BHC(Lindane)  $2\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  e Heptacloro  $0,03\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tanto a EC como o EPA colocam o Aldrin, o  $\gamma$ -BHC (Lindane) e o Heptacloro (agroquímicos estudados neste trabalho) nas listas vermelhas e/ou negras, tendo estes maiores periculosidades de acordo com a toxicidade, persistência e uso (AMATO, 2002).

Deve-se lembrar que a portaria 329 de 02 de setembro de 1985 do Ministério da Saúde proíbe em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos organoclorados destinados à agropecuária. Sendo que a Portaria 11 do Ministério da Saúde – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, em de 8 de janeiro de 1998 proibiu completamente (Aldrin, DDT, Endrin, Heptacloro e outros), para todos os setores da agricultura e produtos domissanitários.

## **2.4 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS ORGANOCLORADOS EM ESTUDO**

Todas as espécies de agroquímicos podem ser classificadas de acordo com sua toxicologia que indica o risco oferecido pelo uso de uma substância ou produto químico à saúde dos seres vivos, em especial aos seres humanos.

Segundo o Ministério da Saúde essa classificação foi estabelecida pela portaria número 04 da Divisão Nacional de Vigilância de Produtos Saneantes Domissanitários (DISAD) de 30 de abril de 1980, que especifica a classificação toxicológica em:

Classe I – Aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados “Altamente Tóxicos” para o ser humano.

Classe II – Aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados “Mediamente Tóxicos” para o ser humano.

Classe III – Aquela onde se encontram as substâncias consideradas “Pouco Tóxicas” para os seres humanos.

Classe IV – Aquela onde se encontram substâncias ou compostos químicos considerados “Praticamente não Tóxicos” para o ser humano.

Os agroquímicos organoclorados podem ser divididos em grupos (A, B, C e D) de acordo com a semelhança (fórmulas estruturais, ação sobre os insetos etc).

Os agroquímicos organoclorados, objeto deste estudo, foram descritos a seguir segundo aspectos gerais relacionados à toxicidade, suas propriedades físico-químicas, seus impactos sobre os ecossistemas e outras características de relevância ambiental.

### **2.4.1 Aldrin - Grupo C**

O Aldrin foi descoberto em 1948, nos Estados Unidos, por Julius Hyman sendo fabricado comercialmente em 1950 (GRANDE, 2003). Sua ação se dá através da ingestão, contato ou fumigação. Usado na pulverização e tratamento sendo que o calor diminui seu poder residual, pois a volatilidade aumenta com a elevação da temperatura, mesmo assim pode-se dizer que o Aldrin possui um bom poder residual. Segundo Baird (2002), o Aldrin é solúvel em quase todos os compostos orgânicos e insolúvel na água. O Aldrin apresenta-se no estado sólido, é cristalino,

pouco volátil, quase sem odor e de cor levemente pardacenta, é bastante tóxico ao homem quando ingerido, apresenta tempo de meia vida de 760 dias à temperatura de 25°C e pH 7, com solubilidade em água  $S_w = 17 - 180 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a 25°C (MONTGOMERY, 1997).

O Aldrin foi utilizado no Brasil no tratamento do solo para pré-plantio, no controle de pulgas, moscas, piolhos, ácaros, cupins e formigas. Este agroquímico provoca bioacumulação nos tecidos gordurosos, efeitos sobre o meio ambiente, resíduos prolongados, riscos toxicológicos indevidos. Entrou no mercado para complementar o DDT (BAIRD, 2002).

Segundo Solomons (1996), o Aldrin pode ser obtido por uma reação de Diels-Alder entre o hexaclorociclopentadieno e norbornadieno.

Sua fórmula química molecular é  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6$  e sua fórmula estrutural é apresentada na figura 1.

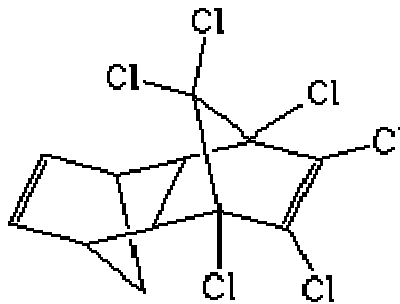


Figura 1: Fórmula estrutural do agroquímico Aldrin  
Fonte: Compendium of Pesticide Common Names, 2006

#### 2.4.2 BHC - 1, 2, 3, 4, 5, 6 - Hexaclorocicloexano - Grupo B

O BHC foi sintetizado por Michael Faraday, em 1825 e a existência de estereoisômeros foi demonstrada em 1912, por Van der Linden. É um dos inseticidas mais conhecidos, foi utilizado no controle de gafanhotos e várias outras pragas do solo, principalmente à broca do café.

Para Grande (2003), o BHC consiste de uma mistura de uma série de isômeros em diferentes percentagens. Segundo Oliveira (1995), a composição centesimal desta mistura é de 65 - 70% para o isômero  $\alpha$ , 7-10% para o isômero  $\beta$ , 14-15% para o isômero  $\gamma$ , 7% para o isômero  $\delta$  e 1 - 2% para impurezas e subprodutos. Dentre esses compostos, somente o isômero  $\gamma$ -(Lindano) possui propriedades inseticidas.



De acordo com Grande (2003), este agroquímico é insolúvel em água e solúvel em benzeno, clorofórmio, éter dietílico e hexano. Aparentemente não sofre reações fotoquímicas na atmosfera e nem hidrólise (BAKAN, 2004).

No Brasil o consumo deste agroquímico foi utilizado em maior escala no Estado de São Paulo devido a enorme quantidade de culturas cafeeiras.

No homem esses compostos podem ser identificados no sangue, no plasma, no soro, no tecido adiposo e no leite. Em épocas passadas foi este o ingrediente ativo de várias preparações médicas comerciais usadas para liberar crianças de piolhos e sarna e também no tratamento de sementes e mudas (BAIRD, 2002).

O BHC pode ser obtido através da cloração do benzeno em presença de luz ultravioleta. De acordo com Queiroz (2005), este produto pode ser aplicado por contato, ingestão ou fumigação, apresenta cheiro desagradável, se encontra na forma de pó amorfo, é volátil, acinzentado ou ligeiramente pardo, é insolúvel em água dissolvendo apenas 0,0062mg de BHC em um litro de água.

Sua fórmula química molecular é  $C_6H_6Cl_6$  e sua fórmula estrutural é apresentada na figura 2.

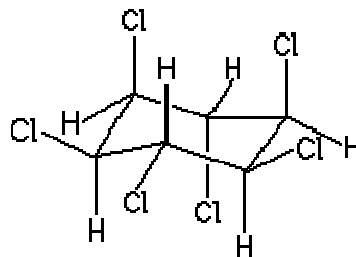


Figura 2: Fórmula estrutural do agroquímico  $\gamma$ -BHC(Lindane)  
Fonte: Compendium of Pesticide Common Names, 2006

### 2.4.3 Heptacloro - Grupo C

Segundo Baird (2002), o Heptacloro em estado puro é sólido, de cor branca, cristalina, com leve odor de cedro. Apresenta solubilidade em água  $S_w = 180 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $25^\circ\text{C}$  (MONTGOMERY, 1997). É solúvel em cetonas, benzeno, tetracloreto de carbono, hexano, xileno etc. apresenta poder residual curto por ser bastante volátil, é estável ao calor, luz, umidade e ar. Nos animais e nos seres humanos é tido como de toxicidade aguda oral. O Heptacloro mata insetos por ingestão, contato e fumigação.

No Brasil foi usado no cultivo de arroz, milho, cana, banana, essências florestais e em aplicações localizadas no controle de cupins, besouro cinzento-preto, besouro da banana e formigas (GRANDE, 2003).

Sua fórmula química molecular é  $C_{10}H_5Cl_7$  e sua fórmula estrutural é apresentado na figura 3:

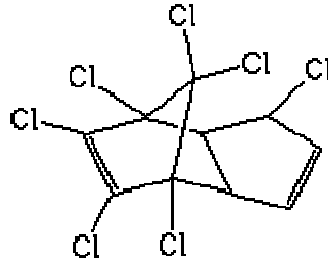


Figura 3: Fórmula estrutural do agroquímico Heptacloro  
Fonte: Compendium of Pesticide Common Names, 2006

## 2.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Existem várias publicações como de Barrionuevo (2002), Carasek (2002), Doong (1999), Dórea (2004), Facchin (1997), Flores (2004-a), Rissato (2004), Santos Neto (2005), que descrevem os processos de preparação de amostras para análise de agroquímicos individuais ou classes de compostos. Neste trabalho serão apresentados os métodos de extração e pré-concentração mais utilizados com agroquímicos, para posterior quantificação.

Segundo Queiroz (2001), as técnicas de extração e pré-concentração têm como objetivo obter uma subfração da amostra original enriquecida com o substrato de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise.

De acordo com Dórea (2004), quando se deseja a detecção em níveis de traços, a instrumentação existente tem que possibilitar sensibilidade analítica suficiente para sua detecção. Além disso, comumente não se analisam amostras em sua forma aquosa ou sólida, pois elas podem conter espécies interferentes e serem incompatíveis com os equipamentos analíticos (CARASEK, 2002). Segundo os autores, uma opção para essa problemática é empregar procedimentos de preparo da amostra, os quais envolvem várias etapas: coleta, armazenagem, solubilização,

extração, pré-concentração, isolamento dos compostos de interesse e análise qualitativa e quantitativa.

Para Oliveira (2004), a amostragem é o passo inicial e uma das etapas mais críticas. Tanto as agências de regulamentação quanto os órgãos de pesquisa levam em consideração a representatividade da amostra. Quantidade suficiente de amostra deve ser coletada de forma a representar a variabilidade total do sistema, com garantia da integridade da amostra até o momento da análise. Quando se trata de agroquímicos, em muitos casos, as meias-vidas dos pesticidas e as baixas concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) são dependentes das condições de estocagem (pH, exposição à luz e temperatura). De acordo com Dores (2001), deve-se ressaltar que a concentração das substâncias químicas em meio aquoso apresenta-se baixa, pelo fato de muitas vezes serem pouco solúveis ou devido ao efeito da diluição. Citando Carasek (2002), as perdas podem ser devido à adsorção dos agroquímicos nos frascos, hidrólise, biodegradação, fotólise e evaporação. Cada um destes mecanismos irá depender das propriedades físico-químicas dos agroquímicos e da matriz.

Em se tratando de agroquímicos como os organoclorados, ressalta-se a dificuldade de interpretar o tempo de sua presença no ambiente, pois tanto pode indicar que foi despejado recentemente no local, ou transportado por longas distâncias pela atmosfera, ou ainda é um resíduo remanescente de seu uso em uma época passada (AMATO, 2002),.

Komatsu (2004), cita que as técnicas de extração mais usadas para amostras líquidas dividem-se em: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), estando em ascensão à microextração em fase sólida (SPME). Além dos procedimentos de extração citados, outra técnica que vem sendo estudada e desenvolvida é a microextração líquido-líquido (MLLE).

Neste estudo, será visto detalhadamente cada uma destas técnicas, em especial o método de microextração líquido-líquido.

### **2.5.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)**

A extração líquido-líquido é uma das técnicas mais simples de extração, onde ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis, a orgânica e a aquosa (BRONDI, 2005). Segundo Queiroz (2001), a eficiência da extração depende

da afinidade do soluto pelo solvente orgânico de extração, da razão das fases e do número de extrações.

Essa forma de extração é considerada uma técnica clássica de preparo de amostras e tem sido utilizada na análise de diversos tipos de substâncias (LÓPEZ-BLANCO, 2003). A LLE apresenta vantagens de ser limpa e possuir um número grande de solventes extratores puros disponíveis comercialmente, que fornecem amplas faixas de solubilidade e seletividade (TAHBOUB, 2005). Entretanto, também possui uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perdas do analito; impurezas do solvente extrator são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que implica em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solvente extratores são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; o processo é suscetível a erros e, relativamente, de fácil automação (CARASEK, 2002; DINIZ, 2004). Essas desvantagens estão abrindo amplo espaço para a técnica de microextração líquido-líquido, que está sendo considerada alternativa viável para pré-concentração de compostos em água (QUEIROZ, 2001).

Ferracini (2005), realizou um trabalho usando o método extração líquido-líquido seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação simultânea de hexazinone e tebutiuron em amostras de água. A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão. Segundo os autores, a resolução na linha de base dos herbicidas foi obtida após um estudo das condições cromatográficas. Os resultados obtidos mostraram por meio dos parâmetros de validação, ser eficiente e confiável para a determinação dos herbicidas tebutiuron e hexazinone em amostras de água subterrânea.

### **2.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE)**

Para Santos Neto (2005), a extração em fase sólida é muito empregada para a extração e/ou pré-concentração do analito presente em matrizes complexas, permitindo que concentrações em níveis muito baixas sejam detectadas pelos instrumentos. Conforme Perez-Trujillo (2002), a SPE, quando comparada com a LLE

possui avanços importantes, pois permite uma grande redução na quantidade de solventes extratores e amostras para cada extração. Além disso, muitos analitos polares, tais como, produtos de degradação de micropoluentes, não podem ser extraídos com boas recuperações, quaisquer que sejam os solventes orgânicos imiscíveis em água. Uma consequência disso é que a SPE tem sido utilizada cada vez mais, inclusive em métodos oficiais, como os recomendados pela Agência EPA (LUTHJE, 2004; QUEIROZ, 2001).

De acordo com Queiroz (2001), a SPE é uma técnica de separação líquido-sólido que tem mecanismos de retenção como cromatografia líquida de baixa pressão, que emprega uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, nas formas de barril ou seringa, a qual contém a fase sólida (LYYTIKAINEN, 2003).

Tradicionalmente como citado acima, é usada na forma de cartuchos, porém, com a passagem de grandes volumes de água estes podem ser obstruídos, tornando o processo lento. Santos Neto (2005), cita que discos extratores em fase sólida, de introdução mais recente, admitem fluxos mais altos, diminuindo o tempo de extração permitindo a passagem de maior volume de líquido e desta forma, obtendo uma maior concentração de analitos.

Dórea (2004), aponta que alguns resultados têm mostrado que as vantagens do método SPE a tornam superior à LLE e tem desempenho (em termos de recuperação, precisão, tempo e número de etapas) similar à extração com fluido supercrítico quando utilizada na análise de agroquímicos em frutas.

O procedimento de extração em fase sólida envolve 5 etapas:

- I) ativação dos adsorventes para deixar os sítios ativos disponíveis;
- II) condicionamento do adsorvente com o solvente extrator adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
- III) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito às vezes de alguns interferentes;
- IV) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
- V) eluição e coleta do analito.

Alguns resultados obtidos mostram a eficiência deste método, como exemplo pode-se citar o trabalho de Rissato (2004), que fez a coleta de amostras de águas e solo dos rios Batalha e Bauru - SP, utilizando extração por SPE. Depois de

obtidos os extratos, os mesmos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD), e os resultados indicaram valores de recuperação que variaram entre 80 e 99%, com desvio padrão relativo de 3 a 6% (n=5) para os seis pesticidas estudados (BHC, Dieldrin, Endosulfan, Aldrin, Heptachlor e DDT), pertencentes à classe dos organoclorados. Os resultados obtidos detectaram a presença desses compostos nos corpos d'água, porém, foram inferiores ao admitidos pela legislação brasileira.

As extrações em fase sólida podem ser divididas em dois modos: “*off-line*” e “*on-line*”. Segundo Queiroz (2001), no modo “*off-line*”, a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico, e no modo “*on-line*”, a etapa é realizada no próprio sistema cromatográfico.

### **2.5.3 Microextração em Fase Sólida (SPME)**

Esta técnica de extração e pré-concentração, microextração em fase sólida (SPME - Solid Phase Microextraction) foi desenvolvida pelo grupo Pawliszyn a partir de 1989 (SILVA, 1999) e consiste em duas etapas básicas: a adsorção e a desorção dos compostos em uma fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico. A etapa de adsorção é realizada expondo a fibra diretamente na amostra ou em sua fase gasosa e a desorção ocorre no próprio injetor do cromatógrafo a gás ou no injetor de um CLAE (KOMATSU, 2004). A base deste método está na fase imobilizada (polidimetilsiloxano, policrilatos), que atua como fase estacionária, para extrair diretamente traços de compostos orgânicos da água, onde a fibra é imersa (KRUTZ, 2003).

A SPME difere das outras técnicas de extração para amostras aquosas pela não utilização de solventes extratores pela exposição ocupacional e pelo menor tempo de análise. É uma técnica simples, rápida, de fácil manuseio que utiliza pequena quantidade de amostra. Atualmente, a minimização de descartes como solventes orgânicos vem se tornando cada vez mais necessária, tendo em vista as leis de proteção ambiental (FACCHIN, 1997; PEREZ-TRUJILLO, 2002).

Em programas de monitoramento rotineiro de águas na África do Sul, conforme Dalvie (2005), a técnica SPME tem sido recomendada por oferecer sensibilidade, confiança e apresentar baixo custo.

A técnica SPME é um procedimento de preparação de amostra que permite concentrar vários grupos de agroquímicos eficazmente, usando detectores como espectrômetro de massa ou técnicas combinadas à cromatografia gasosa como detecção e captura de elétrons (ECD), entre outras. Gonçalves (2002), utilizou a técnica SPME para a extração simultânea de 34 combinações, incluindo organoclorados (OCPs), organofosforados (OPPs), piretróides e grupos de triazinas. Gonçalves (2002), Komatsu (2004), citam que as condições de extração como, modo de extração (headspace” ou imersão direta na amostra líquida), tipo de fibra, pH, velocidade de agitação, concentração iônica e temperatura, devem ser otimizadas para cada tipo de amostra.

Segundo ressalta Bagheri (2005), por ser uma técnica de adsorção a SPME pode estar sujeita aos chamados “efeitos de memória” ou “carryover”, caracterizados pela desorção incompleta dos analitos adsorvidos na fibra, podendo ser mais acentuada para compostos com alta afinidade, pelo recobrimento da fibra (BASHEER, 2005). Para eliminar o efeito “carryover” os estudos demonstram que é necessário deixar a fibra inserida no injetor durante toda a corrida cromatográfica para a remoção total dos analitos absorvidos (KOMATSU, 2004).

#### **2.5.4 Microextração Líquido-Líquido (MLLE)**

Para preparação de amostras de acordo com o volume requerido pelas técnicas cromatográficas, o método de microextração líquido-líquido mostra-se eficiente. Oferece vantagens como: economia de solventes extratores facilidade de extração e rapidez na análise (BALINOVA, 1996; CARASEK, 1997).

Comparada com a extração convencional, a microextração se caracteriza por piores recuperações do analito, mas a concentração na fase orgânica é aumentada. Adicionalmente, o volume de solvente orgânico usado é reduzido e somente uma etapa de manipulação é necessária, diminuindo assim os problemas de contaminação e perdas do analito (CARASEK, 2002).

Segundo Attygalle (1986), foi desenvolvido um micro reator/extrator de Keele com objetivo de encontrar concentrações em níveis de traços, permitindo também a realização de reações, derivatizações e extrações, utilizando volumes de amostra e de solventes, na ordem de microlitros. O micro reator/extrator de Keele pode ser usado em temperatura abaixo ou acima da ambiente, pressões moderadas e na

ausência de água. O solvente usado na extração pode ter densidade maior ou menor que da amostra.

Conforme estudos realizados, foi desenvolvido por Grob outro microextrator de operação rápida e simples. Este microextrator pode ser usado com volumes de 1,0L de solução e 0,5 a 1mL de solvente extrator, com imediata análise cromatográfica, permitindo determinações em níveis de até parte por trilhão (GROB, 1975).

Posteriormente, um frasco de microextração rápida, similar ao de Grob, foi desenvolvido a partir do trabalho de Murray (Figura 4), que permite extrações com volumes de 980mL de amostra de água contaminada e 200 $\mu$ L de solvente extrator para a extração. O processo operacional para a extração do analito consiste na agitação da amostra, separação das fases por decantação e adição de água através do braço lateral, permitindo que o solvente extrator chegue até o tubo capilar e seja coletado por uma seringa, para análise cromatográfica. No trabalho de Murray, conforme Carasek (1997) é citada a possibilidade da realização de três extrações sucessivas que permite maior quantidade de recuperação do solvente extrator e melhor recuperação do analito.

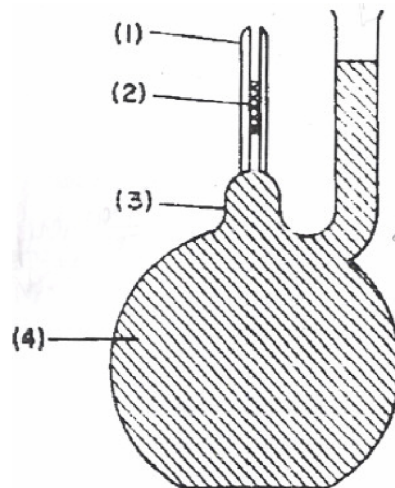


Figura 4: Frasco de microextração líquido-líquido  
 (1) Tubo capilar, (2) camada de solvente, (3) frasco volumétrico, (4) amostra de água  
 Fonte: Carazek, 1997

Posterior ao trabalho de Murray, foi reproduzido por Carasek (1997), um novo microextrator líquido-líquido (Figura 5), com modificações no braço lateral para que as condições de extrações sucessivas fossem aperfeiçoadas.



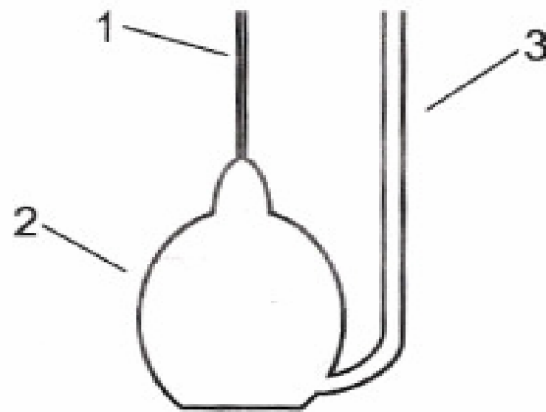


Figura 5: Frasco de microextração líquido-líquido modificado  
 (1) Tubo capilar, (2) frasco de 1L modificado e (3) braço lateral  
 Fonte: Carazek, 2002

Conforme Zapf (1995), foi desenvolvido um outro microextrator (Figura 6) que utilizava 400mL de amostra aquosa, saturada com cloreto de sódio (NaCl) e 500 $\mu$ L de solvente tolueno para a extração.



Figura 6: Frasco de microextração utilizado por Zapf, Heyer e Stan  
 (a) Funil de separação com solução saturada de NaCl, (b) camada de solvente tolueno e (c) amostra  
 Fonte: Zapf, Heyer e Stan, 1995

Após 20 minutos de agitação mecânica, uma nova solução de NaCl saturada era adicionada do balão A para o frasco que continha a amostra, desta forma, deslocando o extrato para o topo do frasco de coleta. Em seguida o extrato era

analisado diretamente por CG. Os níveis de recuperação de agroquímicos testados variaram na concentração entre 50 e 500 ng.dm<sup>-3</sup>.

#### 2.5.4.1 Frasco de Murray Modificado

Conforme Carasek (1997), o modo de operação do frasco de Murray modificado (Figura 5) era semelhante ao original (Figura 4). Consistia em adicionar no frasco 980mL de amostra contaminada por agroquímicos e em seguida o solvente extrator através do tubo capilar. Depois se realizava a agitação do sistema, seguido de tempo de repouso até a separação completa das fases orgânica e aquosa. A parte orgânica era coletada em uma única etapa ou através de sucessivas extrações e encaminhada para análise cromatográfica.

Foram realizados estudos utilizando o frasco de Murray modificado para amostras sintéticas dos agroquímicos organoclorados, Aldrin<sup>TM</sup>, Dieldrin<sup>TM</sup>, Lindano<sup>TM</sup>, Endrin<sup>TM</sup>, Hexaclorobenzeno (HCB) e Mirex<sup>TM</sup>, que após extração foram diretamente analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (ECD). As recuperações dos agroquímicos chegaram acerca de 90% com extrações sucessivas, indicando a eficiência do método para a determinação de quantidades traços dos agroquímicos em águas (CARAZEK, 1997).

No trabalho desenvolvido por Carasek (2002), foi demonstrada a viabilidade do uso do frasco de Murray modificado para pré-concentração de ouro em água do mar após complexação com dietilditiofosfato de amônio (DDTP), com limite de detecção para o ouro na ordem de ng.dm<sup>-3</sup>.

Com o mesmo frasco de Murray modificado, Carasek (2002), otimizou um procedimento analítico rápido e de baixo custo para a pré-concentração em nível de traço de chumbo e cádmio em águas naturais, e posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. Conforme o trabalho desenvolvido foram comparados os resultados da microextração, com uma metodologia alternativa de preparo de amostras e ficou comprovada a eficiência do frasco de Murray modificado para pré-concentração dos baixos níveis de cádmio e chumbo em amostras de água.

## 2.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE AGROQUÍMICOS

Cromatografia é um termo geral aplicado a uma variedade de técnicas, nas quais uma amostra contendo dois ou mais componentes é separada como resultado de um equilíbrio entre duas fases, uma móvel e a outra estacionária. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes são retidos de acordo com a sua distribuição relativa nas duas fases, resultado de processos físicos, químicos e mecânicos (COLLINS, 1990; HARRIS, 2003).

A cromatografia gasosa baseia-se na distribuição de substâncias entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa), sendo aplicada a gases ou substâncias volatilizáveis. É, muito provavelmente, a mais valiosa técnica hoje para análise orgânica (LANÇAS, 2004).

A análise de agroquímicos organoclorados em águas é constantemente realizada por Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida (SHERMA, 2005). Conforme Mühlen (2004), a GC/ECD é um método de análise muito eficiente, porque, aliando-se a capacidade de resolução cromatográfica da CGAR, com a seletividade e sensibilidade do DCE para organoclorados, é possível processar amostras complexas e viabilizar as monitorações destes compostos em níveis tão baixos como  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , que é a máxima permitida para cada pesticida (CARAZEK, 1998).

Grosser (1993), estudando métodos de análise nos Estados Unidos da América (USA), concluiu que o controle de qualidade adotado pela EPA caracteriza as técnicas como cromatografia líquida (HPLC-MS) e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (HRGC-MS), precisas rápidas, bem como confiáveis para análises ambientais. As técnicas cromatográficas são utilizadas em grande escala para a determinação de agroquímicos em solos e consideradas eficientes para a identificação e quantificação, conforme Andreu (2004). Atualmente, as técnicas cromatográficas se tornaram uma poderosa ferramenta analítica para determinação de resíduos de agroquímicos em muitas matrizes como alimentos, águas, solos, sedimentos entre outros (CAJKA, 2004).

Conforme Mühlen (2004), uma das melhores escolhas de detector para a cromatografia é a espectrometria de massa, sendo considerada uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial de fornecer

informações estruturais do analito e dos pontos de degradação desde a fragmentação das moléculas (HARRIS, 2004).

## **2.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO**

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - 2003), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

A análise cromatográfica de uma amostra envolve etapas de preparo dessa amostra, cromatografia e identificação dos compostos separados. Para garantir a certeza e qualidade dos resultados analíticos, os métodos que empregam técnicas cromatográficas devem ser validados de acordo com procedimentos muito bem definidos (LANÇAS, 2004).

Conforme Ribani (2004), todo sistema apresenta limitações, a validação se faz necessária para conhecer essas limitações e assegurar que o sistema analítico apresente o desempenho esperado, dentro dos limites determinados no processo de validação. Com estas informações pode-se garantir que o novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre as amostras. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento.

### **2.7.1 Exatidão**

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro.

Na prática, a exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método a validar comparado aos obtidos por intermédio de um método estabelecido como referência (US-EPA, FDA), ou órgão similares (VIEIRA, 2004).

### 2.7.2 Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra.

A precisão pode ser determinada em condições de repetibilidade ou condições de reprodutibilidade. Condições de repetibilidade são aquelas em que resultados são obtidos a partir do mesmo método, para a mesma amostra, mesmo laboratório, pelo mesmo operador, com mesmo equipamento e em curto intervalo de tempo. As condições de reprodutibilidade são obtidas usando o mesmo método, para a mesma amostra, em diferentes laboratórios, por diferentes operadores, com diferentes equipamentos. Normalmente, a precisão é medida por meio do desvio-padrão ou do coeficiente de variação (LANÇAS, 2004).

### 2.7.3 Linearidade e Faixa Linear

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.

Pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica* (RIBANI, 2004). Através de tratamento estatístico, a partir dos dados experimentais, podem-se estimar os coeficientes de uma curva de calibração (BARROS NETO, 2002). O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação acima de 0,99 e o INMETRO -Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial um valor acima de 0,90.

### 2.7.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Um procedimento comum é aceitar como limite de detecção a concentração ou massa do analito que geram um sinal três (3) vez maior do que o ruído do sistema (RIBANI, 2004).

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. Para calcular o LOQ podem ser adotados: o método visual, o método relação sinal-ruído (normalmente 10 vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Este último é considerado, estatisticamente, o mais confiável (LANÇAS, 2004).

### **2.7.5 Recuperação**

A recuperação é a medida de eficiência no processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. É importante avaliar a recuperação em várias concentrações, uma vez que esta pode variar bastante em concentrações muito baixas (LANÇAS, 2004).

### **2.7.6 Robustez**

A robustez é a medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência a pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.

A robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. A influência dos fatores na resposta pode ser verificada individual (método univariado) ou simultaneamente (método multivariado).

No caso em que se deseja avaliar a influência de vários parâmetros, simultaneamente, um método multivariado, como um planejamento fatorial, é sugerido. Os fatores determinados como relevantes no planejamento fatorial são, então, submetidos a um estudo do tipo superfície de resposta para obter uma descrição mais completa dos fatores (LANÇAS, 2004).

## **2.8 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS**

O planejamento de experimentos está baseado em princípios estatísticos que por sua vez, conforme Buchmann (2002), é ferramenta indispensável nos procedimentos de medição, e em geral, é a maneira mais eficiente para estimar os

efeitos de diversas variáveis simultaneamente. De acordo com Teófilo (2006), esta ferramenta dá suporte aos pesquisadores para extrair o máximo de informações úteis do sistema em estudo com um número mínimo de ensaios laboratoriais, oferecendo vantagens como economia de tempo, gastos com reagentes e qualidade no processo (BRUNS, 1996).

O uso das ferramentas estatísticas potencializa o conhecimento estatístico do pesquisador que, por sua vez, conforme Neuman (1993), deve:

1. Selecionar as variáveis independentes a serem avaliadas;
2. Selecionar os níveis máximo e mínimo para cada variável que possibilitem a obtenção de amostras cuja variação dos resultados seja significativo e mensurável sobre a resposta que se deseja otimizar;
3. Projetar o planejamento de experimento de forma que ele possa fornecer exatamente o tipo de informação desejada.

No tópico 3 (parte experimental), serão apresentados os detalhes sobre as variáveis e as respostas estudadas de acordo com o planejamento fatorial proposto para o desenvolvimento deste trabalho.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo foram apresentados os materiais e os métodos utilizados no procedimento experimental de microextração líquido-líquido, na detecção de agroquímicos organoclorados.

##### **3.1.1 Materiais Utilizados**

Os materiais utilizados para o procedimento analítico foram: frasco de Murray modificado Bomex – 1000mL (Figura 7); Micro seringa Microliter 702 de 25 $\mu$ L marca Hamilton CO. Reno Nevada; Vial de poliestireno; Bomba a vácuo TE-058 TECNAL; Cronômetro STOP WATCH; Agulha PERICAN – Tuohy-Kaniile G18 – 1,3 x 150mm; agitador magnético mecânico micro Química MQAMA-301; barra magnética de 2cm de comprimento; balança analítica AG-200 GEHAKA; frasco âmbar de volumes 1L, 2L e 4L; papel filtro QUANTY TP42 – faixa azul cinza 0,00005 permeabilidade ao ar: 31/s m<sup>2</sup> – maioria dos poros 8 $\mu$ m; pH-metro B474 Micronal; pipetas de microprecisão 2 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L; termômetro.

##### **3.1.2 Reagentes Utilizados**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, água utilizada na preparação de todas as soluções e fortificação das amostras de trabalho foi do tipo 1 (água ultrapura), do Sistema de Purificação de água Master System - GEHAKA. Cloreto de sódio (NaCl) e Cloreto de potássio (KCl) P. A. - Reagentes Analíticos CRQ. Soluções de HCl e NaOH de 0,1M e 2M - P.A - VETEC (37%).

##### **3.1.3 Solventes de Extração**

Os solventes orgânicos acetato de etila, tolueno, hexano e acetona, utilizados neste trabalho apresentaram alto grau de pureza (HPLC) e foram adquiridos junto a J.T. Baker Corporation.



### 3.1.4 Padrões de Agroquímicos

Soluções estoque individuais de  $200\text{mg.mL}^{-1}$  dos padrões de pesticidas Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro foram obtidos da Aldrich. A partir da solução estoque foi preparada a solução padrão na concentração de  $20\text{mg.mL}^{-1}$  utilizada para fortificar as amostras experimentais.

### 3.1.5 Amostra de Água Bruta

A amostra de água bruta foi coletada no Município de Pato Branco e no Município de Mariópolis, no Estado do Paraná, junto a Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco e seus afluentes, conforme descrição no item 3.7.

### 3.1.6 Frasco de Murray Modificado - Características

O frasco de Murray modificado, demonstrado na Figura 7, foi reproduzido a partir do trabalho de Carasek (1997). O mesmo é um frasco de vidro volumétrico, composto por: (1) tubo capilar, diâmetro interno de 3mm e altura de 10cm, (2) frasco de 1L modificado e (3) braço lateral - diâmetro interno de 20mm e altura de 30 cm.

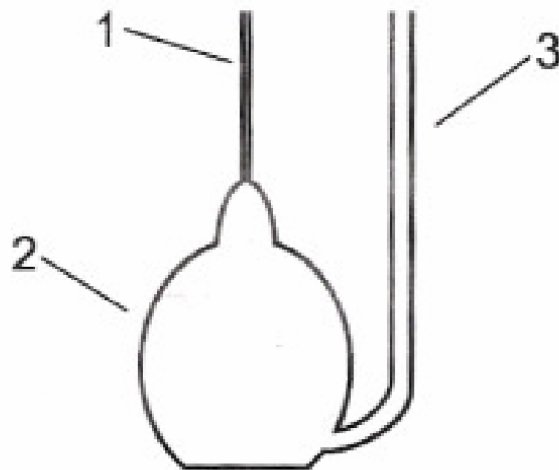


Figura 7: Frasco de microextração líquido-líquido modificado a partir do trabalho de Murray, utilizado no estudo dos agroquímicos organoclorados

Fonte: CARASEK, 2002

## **3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Preparo da Solução Padrão dos Agroquímicos**

Em um balão volumétrico de 5mL, foi adicionado com auxílio de uma micropipeta 0,5mL de cada um dos agroquímicos (Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro). Em seguida foram diluídos para 5mL com uma mistura de hexano e acetona na proporção 90/10 (v/v). Após aferição a mistura foi transferida para um frasco âmbar hermeticamente fechado e armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Essa solução foi utilizada para determinar a linearidade do detector, fortificações das amostras e obtenção das curvas analíticas.

### **3.2.2 Procedimento de Microextração utilizando o Frasco de Murray Modificado**

O procedimento de utilização do frasco de Murray modificado seguiu as etapas descritas na Figura 8. Após preparação da amostra foi escolhido o solvente orgânico e para a contaminação da amostra. Selecionado o tempo de repouso mais conveniente para a extração. A seguir foi selecionada a condição experimental para melhor recuperação, levando-se em consideração os fatores, pH, concentração salina ( $\mu$ ) e tempo de agitação. Finalmente, foi efetuada a análise cromatográfica das amostras.

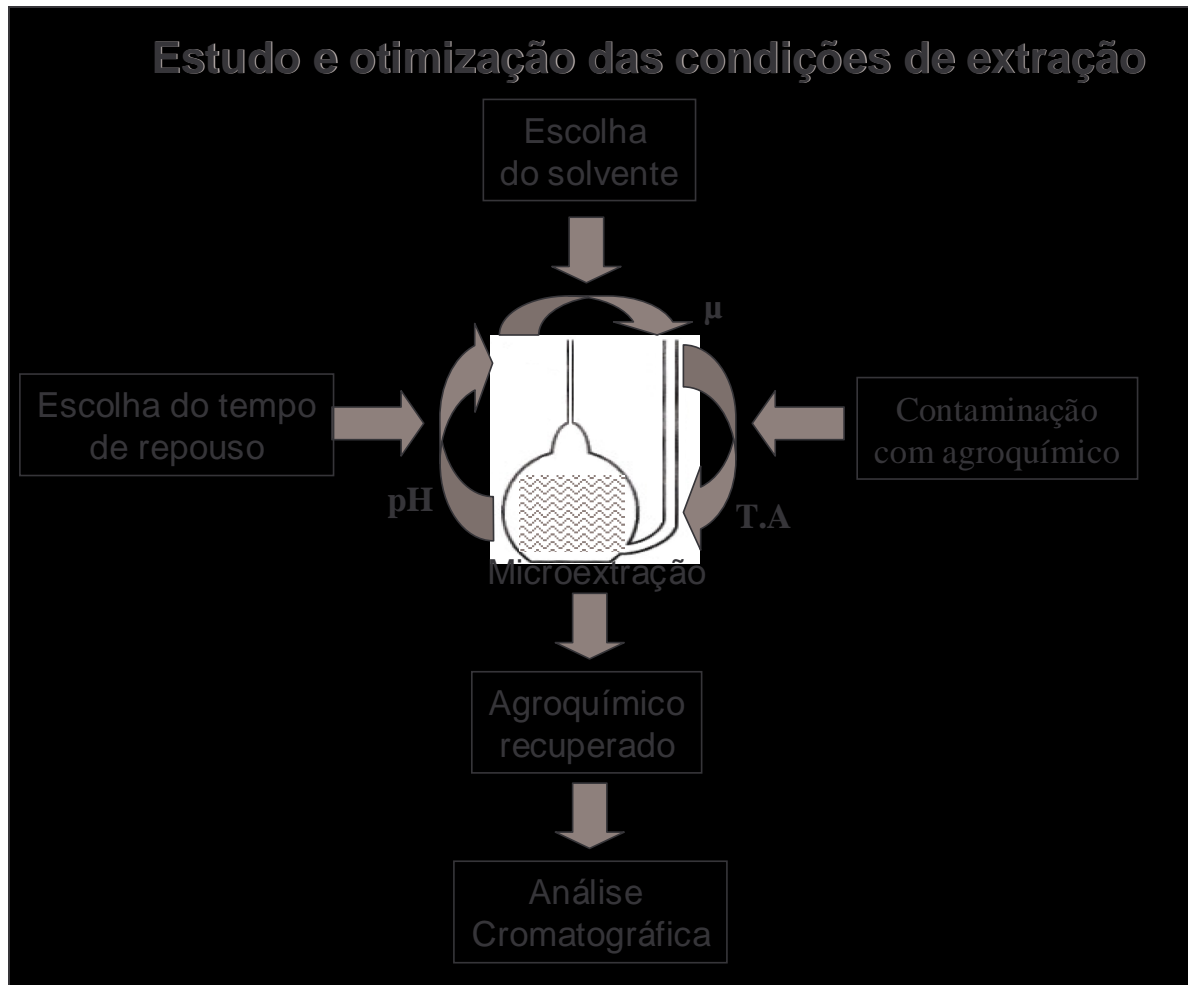


Figura 8: Representação esquemática do estudo e otimização das condições de extração dos agroquímicos utilizando o frasco de Murray. (T.A) tempo de agitação, ( $\mu$ ) concentração salina

O frasco de Murray modificado para cada experimento realizado passou por um procedimento de lavagem rigoroso, diversas vezes com água e detergente, solução alcoólica de KOH, seguido de enxágüe com água destilada e finalmente foi rinsado com solvente orgânico, como o hexano ou tolueno, para ter a certeza que não havia traços de qualquer contaminação antes de cada procedimento de extração. Todo material de apoio também passou pelo mesmo procedimento de limpeza.

Para cada ensaio, com o auxílio de uma proveta, transferiu-se o volume de 1 litro de água ultrapura para um frasco âmbar com capacidade 1L. Quando realizada amostragem em replicata, esta foi preparada em única etapa, utilizando o frasco âmbar de capacidade 2L ou 4L. No frasco âmbar foi medido o pH da água ultrapura que sempre ficou na faixa de 5,8 a 6,5. Foi então, adicionado o sal cloreto de sódio (NaCl), ajustado o pH da solução com ácido clorídrico (HCl - 0,1 e 2M) nas

condições otimizadas para cada experimento, de acordo com a matriz de planejamento fatorial (Tabelas 1 e 2), ficando assim a solução pronta para ser contaminada com quantidades da mistura dos agroquímicos organoclorados Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro estabelecida. Depois da contaminação a solução permaneceu em repouso por um tempo também otimizado, como será tratado no item 3.2.4.

Após o procedimento de preparação, a solução foi transferida com auxílio de um funil, através do braço lateral do microextrator, para o frasco de Murray modificado. Com a micropipeta (1000 $\mu$ L) conectada a uma agulha PERICAN 1,3 x 150mm, 1mL de solvente hexano, foi introduzido através do tubo capilar, de forma que fosse totalmente lançado na amostra de água sem contato com as paredes superiores do frasco.

A mistura foi levada para o agitador magnético para que ocorresse o contato da amostra com a alíquota de solvente orgânico, seguindo o tempo determinado pelo planejamento de acordo com a Tabela 1 e 2, para realização do planejamento ou pelo tempo estabelecido para cada ensaio preliminar.

Após o tempo de agitação, o frasco permaneceu em repouso para a separação de fases (otimizado e descrito no item 3.2.4).

A camada de fase orgânica imiscível foi deslocada para o tubo capilar através da adição de água pelo braço lateral do Frasco de Murray modificado até chegar ao tubo capilar, onde foi possível, com o auxílio de uma microseringa retirar e quantificar o solvente extrator acompanhado ou não do analito. O conteúdo extraído foi transferido para um vial e encaminhado para análise cromatográfica.

### **3.2.3 Escolha do Solvente Extrator**

Para este estudo, foram levadas em consideração as informações das práticas experimentais e operacionais realizadas por Carasek (1997), descrita na literatura, observando o coeficiente de solubilidade, a densidade, o tempo de agitação, e a influência da concentração salina no rendimento na separação de fases. Os solventes orgânicos utilizados para os testes foram: acetato de etila, tolueno e hexano.

O experimento para a escolha do solvente extrator consistiu em adicionar 1000mL de água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação Master System –

GEHAKA, no frasco de Murray modificado com 1mL de hexano que foi inserido pelo tubo capilar. Essa mistura não fortificada por agroquímicos permaneceu no agitador magnético pelo tempo de 10 minutos, com rotação de 90rpm. Logo após o período de agitação, o frasco permaneceu em repouso por mais 10 minutos, tempo satisfatório, através da observação visual, para ocorrer separação de fases. Em seguida, foi adicionada no frasco, pelo braço lateral, quantidade suficiente de água para elevar a fase orgânica até o tubo capilar, possibilitando a recuperação e quantificação do hexano.

Foram realizados testes com os solventes orgânicos puros e também com mistura entre eles em diversas proporções.

Após observações, a mesma metodologia foi utilizada na recuperação do solvente nas amostras com a adição de sal. O sal KCl  $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (7,45g) foi pesado em balança analítica, e transferido para o frasco âmbar onde estava a amostra e foi para a agitação magnética até a total diluição. O pH do sistema permaneceu entre 5,8 e 6,2.

### **3.2.4 Contaminação da Amostra com Agroquímicos Organoclorados e Estudo do Tempo de Repouso antes da Pré-concentração no Frasco de Murray Modificado**

Na metodologia utilizada para a construção das curvas analíticas, as amostras de água ultrapura foram fortificadas com 60 $\mu\text{L}$ , 120 $\mu\text{L}$ , 240 $\mu\text{L}$ , 480 $\mu\text{L}$  e 720 $\mu\text{L}$ , da solução padrão ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dos agroquímicos (Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro) e deixadas em repouso por um período de 2 horas antes de serem transferidas para o frasco extrator. Os ensaios para a construção das curvas analíticas, em todas as concentrações foram habilitados em triplicata.

Para a execução dos oito ensaios e o ponto central determinado pelo planejamento fatorial (Tabela 2), o tempo de repouso foi estabelecido em 10 minutos e a amostra foi fortificada com 80 $\mu\text{L}$  da solução padrão ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) antes da transferência da amostra para o frasco de Murray modificado.

### **3.2.5 Determinação do Tempo de Repouso para Separação de Fases dentro do Frasco de Murray Modificado**

Na determinação do tempo necessário ou mais adequado para ocorrer separação das fases, orgânica e aquosa, foram estabelecidas algumas constantes para o preparo da amostra, entre elas o tempo de agitação de 10 minutos. No frasco âmbar contendo 4L de água ultrapura, sem fortificação dos agroquímicos, foram adicionados 234g de NaCl (cloreto de sódio) de forma que a solução ficasse com concentração salina ( $\mu$ ) de  $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , o pH foi ajustado para 5,0 com solução de HCl (0,1M). Cada volume de 1L da solução foi transferido para o frasco de Murray modificado, onde foi adicionado 1mL de solvente hexano a cada experimento, e levado para agitação em agitador magnético – 90rpm por 10 minutos. O tempo de repouso, otimizado para cada replicata do experimento foi de 10, 30, 60 e 90 minutos. A avaliação foi feita através da quantificação da fase orgânica recuperada.

Em seguida foram executadas as mesmas etapas do procedimento experimental descrito acima, com 3 amostras de águas fortificadas por  $80\mu\text{L}$  para cada litro, da solução padrão de organoclorados ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Foram feitos três ensaios com tempos de repouso de 10, 30 e 60 minutos e posterior comparação dos resultados de quantificação do solvente e recuperação dos analitos.

### **3.3 METODOLOGIA DE ESTUDO DOS EFEITOS EXPERIMENTAIS: pH, CONCENTRAÇÃO SALINA E TEMPO DE AGITAÇÃO SOBRE A RECUPERAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS**

A metodologia consistiu em adequar fatores experimentais de relevância a uma estratégia multivariada fundamentada no planejamento fatorial de experimentos  $2^3$  com ponto central em duplicata. Os fatores experimentais selecionados a partir de antecedentes bibliográficos (CARASEK, 2002; KOMATSU, 2004) foram: pH, concentração salina ( $\mu$ ) e tempo de agitação da amostra, buscando atingir maior sensibilidade possível do método. Os fatores experimentais e seus respectivos níveis foram demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1

Variáveis experimentais e respectivos níveis de estudo do planejamento fatorial

Variáveis	Nível (-)	Ponto Central	Nível (+)
pH	3,0	5,0	7,0
$\mu$ (g. dm <sup>-3</sup> )	5	58,5	112
T.A (min)	10	20	30

( $\mu$ ) Concentração salina, (T.A) tempo de agitação

A combinação dos fatores experimentais (Tabela 1) gerou uma matriz contendo 8 ensaios e um ponto central, o qual foi realizado em duplicata, para atestar o erro experimental do sistema (Tabela 2).

A Tabela 2 mostra os ensaios de acordo com a variação e a combinação dos fatores para cada experimento executado.

Tabela 2

Matriz de planejamento fatorial, demonstrando as combinações das variáveis experimentais em estudo

exp., y	pH	$\mu$	T.A	pH	$\mu$ (g; dm <sup>-3</sup> )	T.A (min)
1	-	-	-	3,0	5,0	10
2	+	-	-	7,0	5,0	10
3	-	+	-	3,0	112,0	10
4	+	+	-	7,0	112,0	10
5	-	-	+	3,0	5,0	30
6	+	-	+	7,0	5,0	30
7	-	+	+	3,0	112,0	30
8	+	+	+	7,0	112,0	30
9	0	0	0	5,0	58,5	20
10	0	0	0	5,0	58,5	20

( $\mu$ ) Concentração salina, (T.A) tempo de agitação

Para a avaliação dos efeitos isolados e combinados dos fatores experimentais, foi considerada como resposta à eficiência de recuperação do analito (avaliada através da concentração residual), utilizando a microextração líquido-líquido através de análise cromatográfica, acoplada a espectrometria de massa.

### **3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS)**

A composição química dos extratos de agroquímicos em amostras de águas obtidos através da microextração líquido-líquido, foi determinada por um GC-MS (Cromatógrafo Gasoso Varian® CP-3800 acoplado ao Espectrômetro de Massas Saturn® 2000 - Autosample CP-8410) equipado com uma coluna capilar CP-Sil 8 CB low Bleed/MS (30m x 0,25mm – filme 0,25µm). O gás de arraste foi o Hélio (Fluxo Constante de 1mL/min). As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB) - FURB (SC). A coluna foi aquecida a 80°C por 3 minutos, programada a 10°C/min – 11 min até 250°C. Volume de injeção: 2µL – Splitless. MSTemp. Íon Trap: 220°C, Temp. Manifold: 80°C, Temp. Transferline: 240°C. O software de gerenciamento foi Saturn® GC/MS Workstation 5.51.

A identificação das substâncias foi realizada através de comparação com o tempo de retenção do padrão e confirmados pelo espectro de massa das substâncias analisadas, com banco de dados do sistema GC-MS (Standard Reference Data Series do National Institute of Standard and Technology - NIST 98 MS Library /Database in Saturn and NIST Format).

### **3.5 CURVAS DE CALIBRAÇÃO EXTERNA PELO MÉTODO**

A resposta considerada para avaliação dos estudos de extração dos agroquímicos organoclorados nas amostras de água foi obtida por Cromatografia Gasosa utilizando um cromatógrafo a gás, equipado com detector e espectrometria de massa (GC-MS). O método cromatográfico empregado foi o de calibração externa associada ao método de microextração, desta forma, para cada amostra fortificada, foram inicialmente construídas curvas de calibração para cada padrão, utilizando no mínimo quatro concentrações diferentes.



## 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO E DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS EM ÁGUAS

### 3.6.1 Curva Analítica

Obtiveram-se curvas analíticas dos agroquímicos em estudo empregando a microextração líquido-líquido com faixas de concentração entre  $0,4\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (ppb) à  $4,8\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (ppb), injetando-se  $2\mu\text{L}$  de cada extrato no cromatógrafo gasoso, em triplicata e, finalmente, fazendo o gráfico da área versus concentração dos agroquímicos, através do programa Microsoft Excel que forneceu os coeficientes de correlação das retas obtidas, coeficientes angulares e lineares, estimativas de desvio padrão e coeficiente de variação.

As condições de amostragem para a construção da curva analítica de cada um dos agroquímicos foram:  $\text{pH} = 5,0$ ,  $\mu = 2\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  de  $\text{NaCl}$  ( $117\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), tempo de agitação de 10 minutos, tempo de repouso 10 minutos.

As amostras foram fortificadas com volumes de 20, 40, 80, 160 e  $240\mu\text{L}$  da solução padrão ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para cada litro de água. A partir dos resultados obtiveram-se os valores da equação da reta para cada contaminante.

### 3.6.2 Linearidade e Faixa de Aplicação

Para a determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do instrumento, foram construídas as curvas analíticas a partir das triplicatas obtidas sob condições descritas no item 3.6.1. O LOD e o LOQ foram calculados através da expressão 1.0 e 2.0, pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.

$$\text{LOD} = 3,3 \times a/b \quad (1.0)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times a/b \quad (2.0)$$

Onde:  $a$  = coeficiente linear da equação

$b$  = coeficiente angular da curva analítica

### 3.6.3 Recuperação

Os valores referentes às recuperações dos agroquímicos de cada experimento realizado em triplicata, das amostras de água tipo 1 (ultrapura) fortificadas com a solução padrão, após procedimento de extração foram calculados através da expressão 3.0:

$$R = \frac{A_r \times 100}{A_i} \quad (3.0)$$

onde:  $A_r$  = unidades do analito recuperadas

$A_i$  = unidades do analito introduzidas

## 3.7 AMOSTRAGEM REAL - CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ÁREA EM ESTUDO: “BACIA DO RIO PATO BRANCO”

As amostras de água dos rios foram coletadas na primeira quinzena do mês de agosto de 2005, com um tempo ensolarado, sem chuvas há 3 semanas, em 6 pontos de amostragem na Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco e seus principais contribuintes, responsáveis pelo abastecimento de água da cidade de Pato Branco/PR. Os pontos de amostragem foram selecionados com ajuda de funcionários da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), utilizando pontos estratégicos, marcados com aparelho GPS (Global Positioning System) ao longo da bacia, em locais onde haveria maior probabilidade de contaminação por agroquímicos.

**Ponto 01** - Rio Divisa - Altitude 700m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0341428, y: 7091826.

**Ponto 02** - Rio Pinheiro - Altitude 711m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0339987, y: 7090551.

**Ponto 03** - Rio Pato Branco (captação) - Altitude 698m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0341433, y: 7091869.

**Ponto 04** - Rio Lambedor - Altitude 739m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0339913, y: 7086122.

**Ponto 05** - Rio Mangueirinha - Altitude 786m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0341331, y: 7084649.

**Ponto 06** - Rio Panela - Altitude 780m

Coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) x: 0341300, y: 7084530.

A água foi coletada de acordo com a metodologia Standard Methods (1998), e armazenada em frascos de polietileno, com capacidade para 2 litros, previamente limpos com detergente, água, solução alcoólica, rinsados com hexano e finalmente com a própria amostra. No momento da coleta foram determinadas as condições de pH, temperatura da água, bem como temperatura do ar e mantidas sob refrigeração  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , até o momento dos procedimentos experimentais, que foi aproximadamente dois dias após a coleta. Sendo de 7 dias o tempo máximo indicado para armazenamento das mesmas.

A Figura 9 mostra os pontos de coleta dentro da Bacia do Rio Pato Branco.

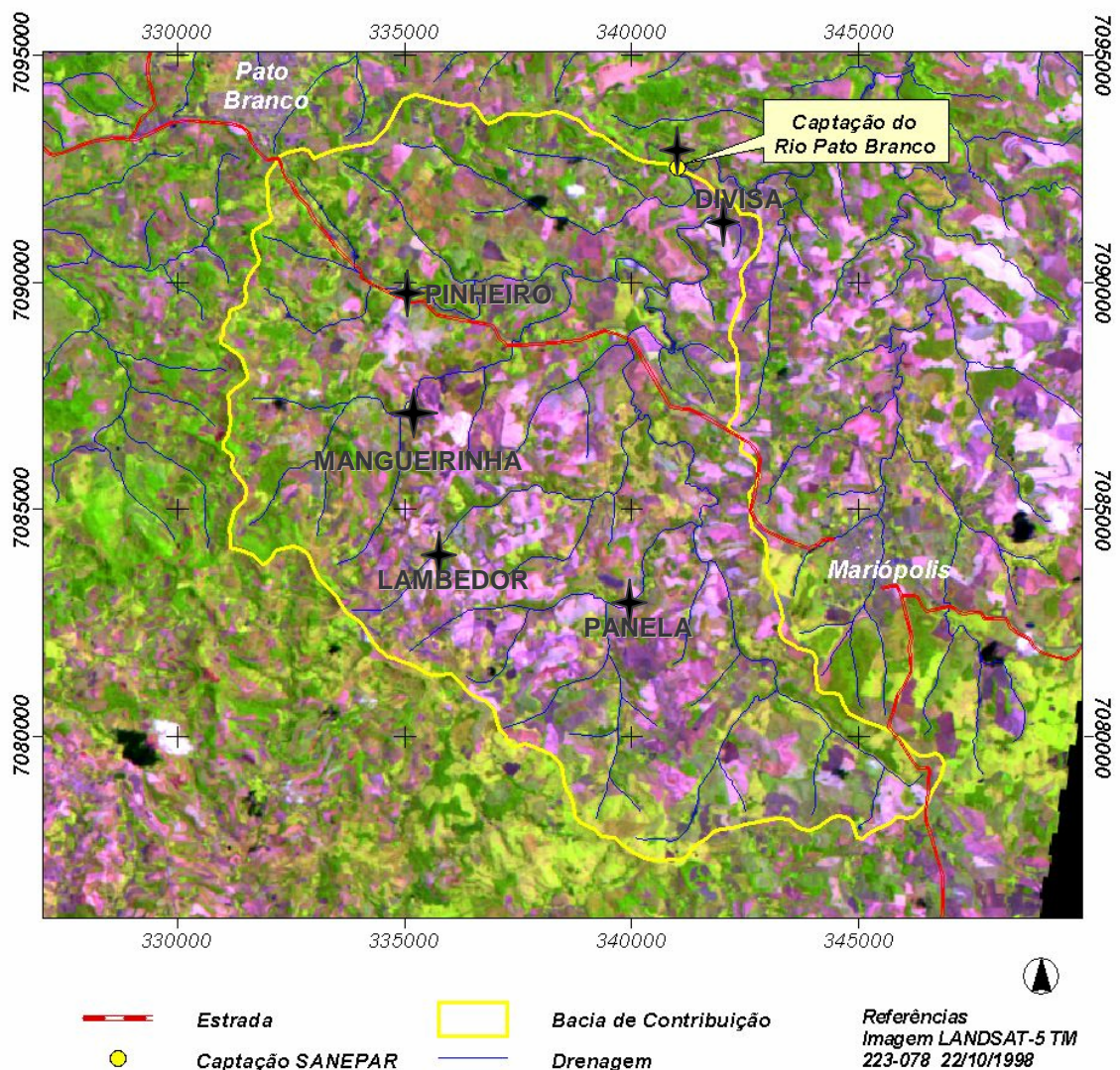


Figura 9: Mapa da Bacia do Rio Pato Branco - pontos de coleta

Todas as amostras foram coletadas a uma profundidade de 0,5m e longe das margens dos rios, com o objetivo de evitar possíveis interferências de matérias em deslocamento pelo rio.

No laboratório, as amostras de águas foram filtradas com filtro de poro 0,45 $\mu$ m utilizando sistema a vácuo, a fim de eliminar o material particulado e colóides presentes. Em seguida, foi realizado o processo de pré-concentração e extração, utilizando o frasco de Murray modificado e análise cromatográfica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este trabalho descreve um método analítico utilizado na determinação dos agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC (Lindane) e Heptacloro, em amostras de águas fortificadas e amostras reais provenientes da Bacia do Rio Pato Branco.

O método utilizado e estudado é baseado em microextração líquido-líquido (MLLE), que oferece vantagens como baixo custo, utilização de pequenas quantidades de solvente orgânico na pré-concentração do analito e ainda permite deixar a amostra compatível com o volume requerido pelas técnicas cromatográficas (CARASEK, 1997).

A etapa inicial da pesquisa consistiu em realizar testes com o objetivo de detectar os agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro, variando aleatoriamente o pH, concentração salina e tempo de agitação. As primeiras detecções através da cromatografia gasosa ocorreram quando foi utilizado como solvente extrator o hexano, pH na faixa de 5,0,  $\mu$  de 2mol. dm<sup>-3</sup> (117g de NaCl) e tempo de agitação de 10 minutos. Este ensaio foi levado em consideração para quantificar nessas condições a recuperação dos agroquímicos e a partir destes dados, construir as curvas de calibração.

Após a construção das curvas analíticas sob as condições já citadas, foi traçado um planejamento para verificar a detecção e a recuperação dos agroquímicos estudados em condições variadas de pH, concentração salina e tempo de agitação, executando combinações entre esses fatores e observando as respostas obtidas em níveis de concentração. Este estudo teve por objetivo entender o comportamento do sistema, a influência isolada e combinada dos fatores experimentais e alcançar condições ótimas de recuperação.

Apesar da microextração líquido-líquido ser uma técnica simples, verifica-se que há necessidade da otimização dos parâmetros de extração para que seja obtido o melhor rendimento possível a cada tipo de matriz analisada. Com o objetivo de minimizar o número de ensaios necessários para as demais otimizações do processo de pré-concentração e extração, utilizou-se uma estratégia multivariada, que consiste em um sistema de planejamento fatorial de experimentos para definir a influência e o efeito das variáveis, pH, concentração salina e tempo de agitação, em um sistema de dois níveis (+) e (-). A estrutura do planejamento correspondeu a um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, com duplicata no ponto central. Os resultados foram

processados na forma de recuperação dos agroquímicos, determinados por cromatografia gasosa CG-MS. Com as respostas obtidas foi possível calcular os coeficientes de influência para cada parâmetro estudado e obter a interpretação geométrica posteriormente apresentada.

Os dados relativos aos teores de agroquímicos recuperados foram tratados através de técnicas estatísticas, as quais são ferramentas indispensáveis no desenvolvimento e na validação do procedimento em estudo (BUCKMANN, 2002).

Outros parâmetros considerados importantes para o estudo, além dos citados no planejamento foram: o melhor tipo de solvente extrator o tempo de contato do contaminante com a amostra antes do procedimento de pré-concentração no frasco e o tempo de repouso para separação de fases (amostra e solvente extrator) dentro do frasco de Murray modificado. Após a otimização das condições de extração e interpretação dos dados obtidos a partir dos experimentos realizados com a matriz fortificada e amostra real, o método foi validado. A validação foi necessária para garantir a confiabilidade dos resultados.

A metodologia experimental seguiu a seqüência ilustrada pela Figura 8, descrita na parte experimental, para todos os experimentos. No frasco de Murray modificado, foram adicionados 1 litro de amostra contaminada com a solução padrão dos agroquímicos ( $20\text{mg.mL}^{-1}$ ) e 1mL do solvente extrator hexano, deixados sob agitação por um período de tempo definido na Tabela 1 e finalmente em repouso pelo tempo otimizado (item 3.2.4) até ocorrer à separação das fases. Em seguida, por meio da adição de água, através do braço lateral do frasco, a camada de solvente extrator foi deslocada para um tubo capilar, coletada com uma microseringa, transferida para um frasco vial e encaminhada para a análise cromatográfica.

As extrações utilizando o frasco de Murray modificado foram feitas em uma única etapa, pois quando se adicionava água pelo braço lateral para a fase orgânica chegar até o tubo capilar, o volume da amostra aumentava e só seriam possíveis mais etapas de extração, se parte da amostra fosse retirada, deixando-a, com o mesmo volume inicial para recomeçar o processo. No caso da retirada, poderia ocorrer além da diluição, a perda de parte do analito.

Carasek (1997), em seu trabalho, utilizou pressão de ar com uma seringa através do braço lateral do frasco para deslocar o hexano até o tubo capilar. Desta forma, o mesmo conseguiu fazer sucessivas etapas de extrações, sem diluir ou

retirar parte da amostra. Conforme o autor, etapas sucessivas de extrações melhoram significativamente o rendimento da recuperação dos agroquímicos.

Nos experimentos realizados neste estudo, não foi possível utilizar a pressão de ar para mais de uma etapa de extração, pois no momento em que se injetava ar com a seringa através do braço lateral, ocorria à formação de bolhas de ar dentro do frasco, não obtendo a força necessária para elevação da fase orgânica até o tubo capilar.

#### **4.1 ESTUDOS PRELIMINARES DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO**

A eficiência de extração da MLE depende de uma série de parâmetros experimentais, sendo assim, foi feito um estudo da otimização do processo envolvendo o comportamento da MLE com relação ao tipo e recuperação do solvente extrator, tempo de repouso da amostra e tempo de agitação do sistema, antes de estudar os efeitos da variação dos fatores, demonstrados no planejamento fatorial (Tabela 2 – parte experimental).

Como ensaio preliminar, com o objetivo de adequar condições de trabalho e de ensaios cromatográficos foi realizado um experimento onde a amostra passou pelo processo de extração, sem adição de sal e sem correção de pH.

A amostra de água permaneceu nas seguintes condições: com pH 6,01 (pH normal da água ultrapura), fortificação de 80 $\mu$ L da solução padrão (20mg.mL<sup>-1</sup>) em triplicata. No microextrator a amostra recebeu 1mL de hexano e passou por todo o procedimento de extração, com tempo de agitação de 10 minutos e tempo de repouso para separação de fases também de 10 minutos.

A quantidade de hexano recuperado em cada experimento foi aproximadamente 700 $\mu$ L, que imediatamente foi transferido para o vial e enviado para análise cromatográfica.

Como a adição do padrão foi de 80 $\mu$ L dos agroquímicos, esperava-se um valor para a recuperação para cada um dos agroquímicos de 1,6 $\mu$ g.dm<sup>-3</sup>. Observando-se os resultados, verifica-se que não ocorreu à recuperação de 100% de nenhum dos analitos conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3

Recuperação do Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro sem ajuste de pH e sem adição de sal na preparação da amostra

Agroquímicos	X( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ ) e S(%)	CV (%)	Recuperação(%)
Aldrin	1,303 $\pm$ 0,106	8,13	81,43
$\gamma$ -BHC(Lindane)	1,354 $\pm$ 0,113	8,36	84,62
Heptacloro	1,162 $\pm$ 0,162	14,01	72,62

(X) Média aritmética, (S) desvio padrão, (CV) coeficiente de variação

Os resultados obtidos estão demonstrados no cromatograma apresentado na Figura 10:

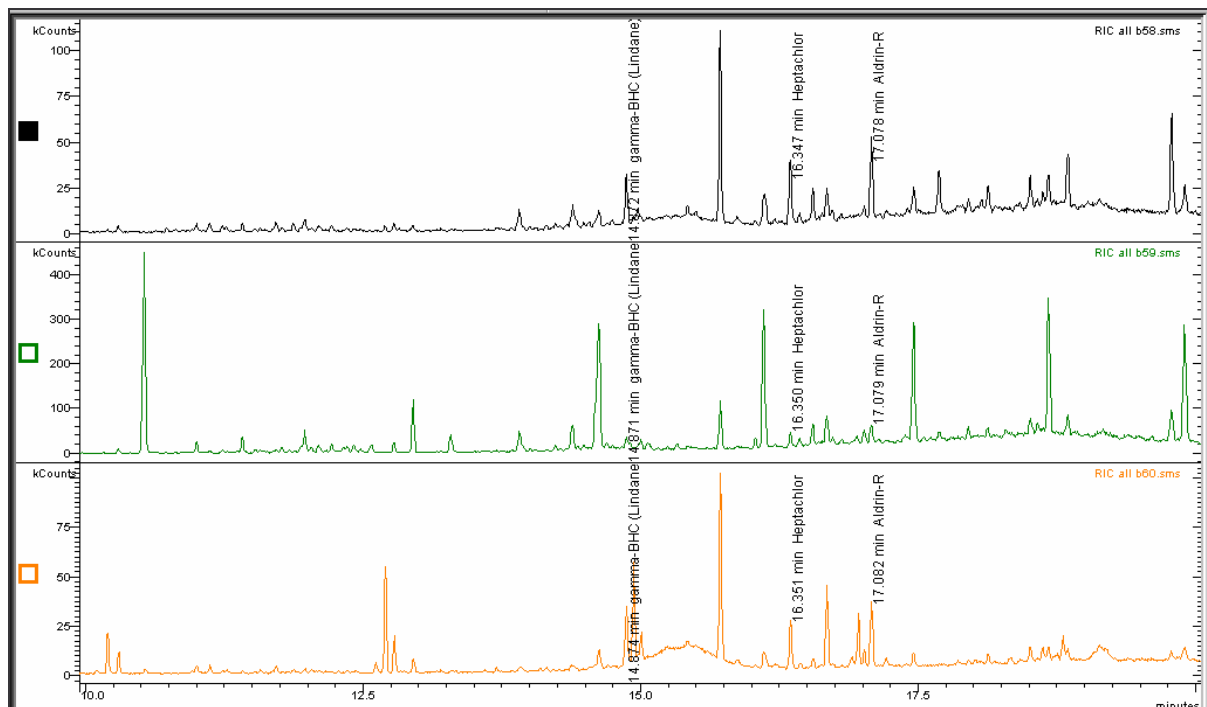


Figura 10: Cromatograma de estudos preliminares da amostragem sem adição de sal e sem correção de pH

É importante salientar a observação de ruídos e picos com intensidades significativas, proporcionais ou maior que os picos dos analitos identificados no cromatograma. Isso se deve, provavelmente, as impurezas presentes nos materiais utilizados.

Em etapas mais avançadas deste trabalho, os dados desses estudos preliminares serão comparados com os obtidos através da otimização considerando a importância dessas variáveis a sua influência na recuperação de cada agroquímico.



## 4.2 ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR

Foram selecionados três solventes orgânicos para os testes e realizados estudos comparativos, com o objetivo de selecionar o mais adequado para a pré-concentração do analito na amostra, levando-se em consideração a solubilidade em água de cada um deles e sua densidade, pois o frasco modificado de Murray foi adaptado para trabalhar com solventes menos densos do que a água. É importante lembrar ainda que a escolha dos solventes orgânicos se deu também pelo fato de serem os mais utilizados para a extração destes agroquímicos de acordo com o levantamento bibliográfico realizado nesta dissertação. A solubilidade é de extrema importância, pois a menor quantidade de solvente orgânico dissolvido na água pode carregar traços do material a ser extraído.

Para se determinar a reprodutibilidade da MLE no processo de extração foi calculado o desvio padrão (S), sendo este um parâmetro de indicação da repetibilidade do método.

Os experimentos foram realizados com o solvente acetato de etila, hexano e tolueno puro ou com combinações entre eles, em replicata. Ainda foram feitos testes com e sem adição de sal (KCl -  $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) na amostra, para verificar se a concentração salina gera influência na recuperação do solvente orgânico, conforme representado na Tabela 4:

Tabela 4

Estudo da recuperação dos diferentes solventes extratores na ausência dos contaminantes, com e sem adição de sal (KCl) na amostragem

Solvente	Proporção da mistura (%)	Recuperação sem sal (mL. $\text{dm}^{-3}$ )	Recuperação com sal (mL. $\text{dm}^{-3}$ )
Hexano	100	0,94 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,05
Hexano + acetato de etila	0,90 + 0,10	0,67 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,07
Hexano + acetato de etila	0,80 + 0,20	0,58 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,10
Hexano + acetato de etila	0,70 + 0,30	0,46 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,07
Hexano + acetato de etila	0,60 + 0,40	0,33 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04
Hexano + acetato de etila	0,50 + 0,50	0,30 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,05
Hexano + tolueno	0,90 + 0,10	0,70 $\pm$ 0	0,76 $\pm$ 0,05
Hexano + tolueno	0,80 + 0,20	0,78 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,04
Hexano + tolueno	0,70 + 0,30	0,78 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,07
Hexano + tolueno	0,60 + 0,40	0,84 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,10
Hexano + tolueno	0,50 + 0,50	0,66 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,04
Tolueno	100	0,80 $\pm$ 0	0,81 $\pm$ 0,08

A partir da Tabela 4, pode ser visualizada a melhor recuperação do solvente extrator através da apresentação gráfica das Figuras 11 e 12.

O acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ), pertence ao grupo éster, tem peso molecular igual a 88,11, densidade  $0,902g.mL^{-1}$  a  $20^\circ C$  (líquido), é portanto, um composto menos denso que a água, apresenta solubilidade de  $8,7g/100mL$  em água a  $20^\circ C$  (pouco solúvel em água), volátil (CETESB, 2006), porém, quando realizados os testes, nas combinações com o hexano e tolueno foi o solvente que teve a menor recuperação pois apresentou maior solubilidade que os demais, conforme Tabela 4 e Figura 11.

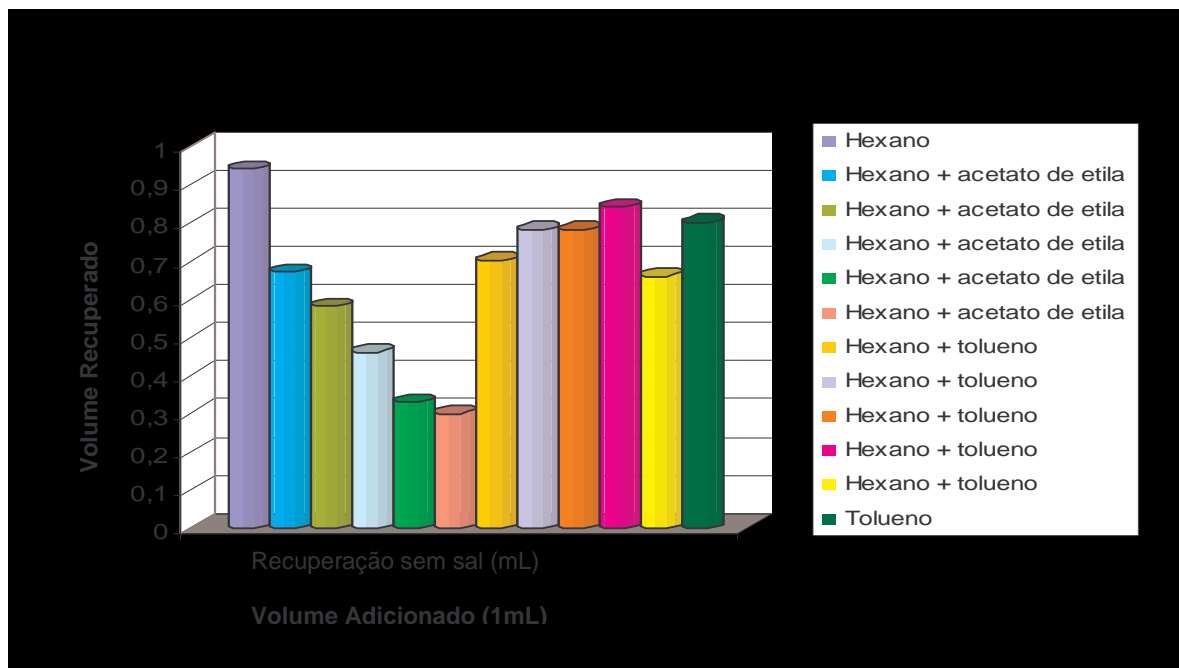


Figura 11: Estudo da recuperação dos diferentes tipos de solventes extratores, sem adição de sal na amostra e ausência dos agroquímicos

O tolueno ( $C_6H_5CH_3$ ) pertence ao grupo hidrocarboneto aromático, apresenta massa molecular de  $92,14dm^{-3}$  é um composto menos denso que a água, com densidade  $0,867g.mL^{-1}$  a  $20^\circ C$  (líquido), solubilidade de  $0,05g/100mL$  de água a  $20^\circ C$ , mas bastante volátil (CETESB, 2006). Este apresentou maior solubilidade que o hexano e teve menor recuperação conforme demonstrado nas Figuras 11 e 12.

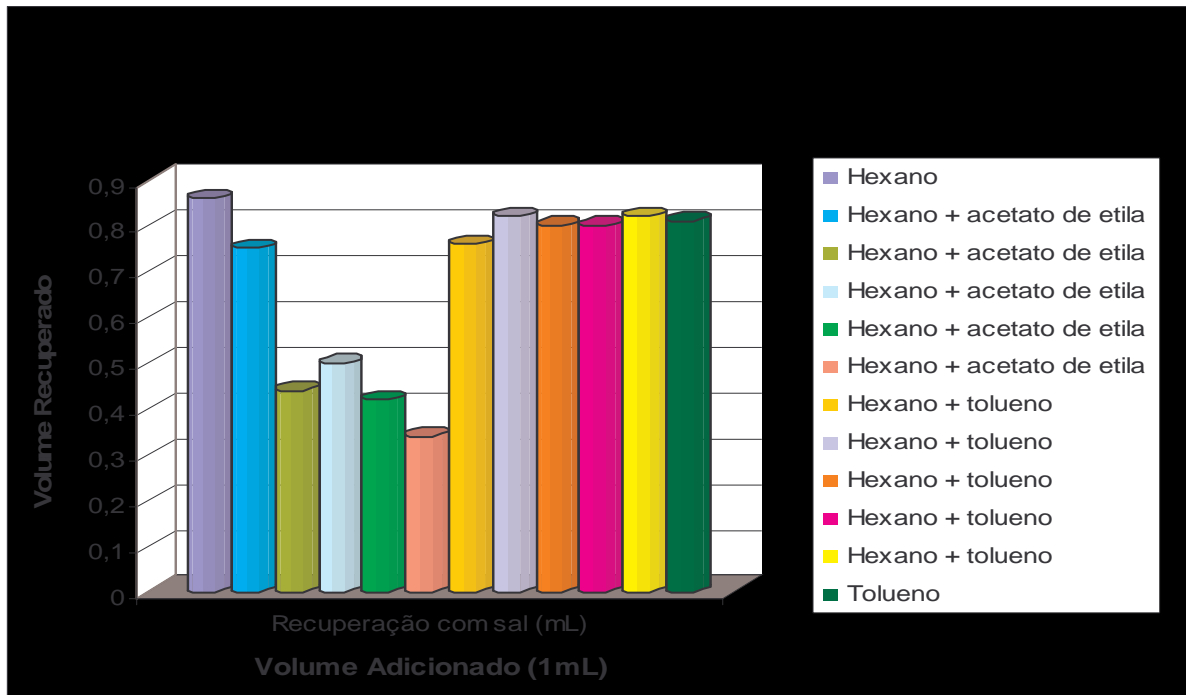


Figura 12: Efeito do solvente extrator com adição de sal (KCl) na amostragem sobre a recuperação dos agroquímicos

O hexano ( $C_6H_{14}$ ) possui massa molecular  $86,17g.dm^{-3}$  e é o solvente extrator que apresenta, entre os estudados, menor densidade,  $0,659g.mL^{-1}$  a  $20^\circ C$  (líquido) e solubilidade de  $0,01g/100mL$  sendo o menos solúvel em água, comparando aos demais utilizados (CETESB, 2006).

Alguns ensaios obtiveram desvio padrão de até 10% na recuperação do solvente orgânico isso pode ser explicado pelo fato que, além das propriedades específicas de cada solvente orgânico o sistema pode apresentar dificuldades em manter a forma de agitação idêntica da amostra oferecendo condições de parte do solvente orgânico/analito ficar retido nas paredes do frasco. É possível também a evaporação do solvente extrator de acordo com a variação na temperatura. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente sem controle deste parâmetro. Observou-se na junção do braço lateral do frasco a formação de bolhas de solvente orgânico que ficavam grudadas na parede de vidro como mostrado na Figura 13 contribuindo, portanto, para que não fosse possível a recuperação de todo o volume adicionado ao frasco. Esse mesmo fato foi observado no experimento realizado por Carasek (1997) quando utilizou o frasco de Murray modificado para a pré-concentração de organoclorados em águas.

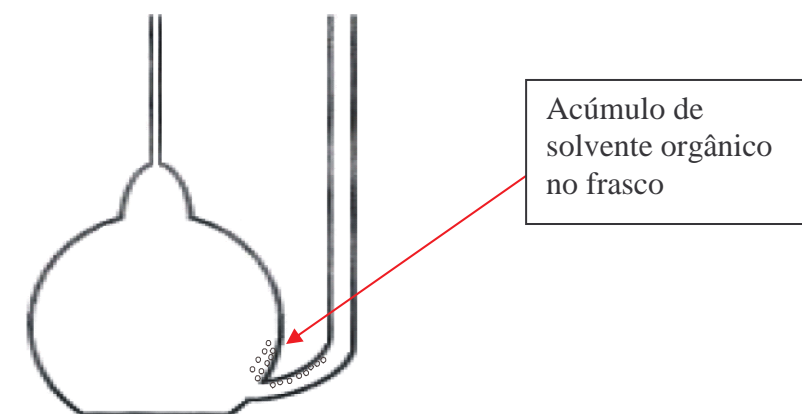


Figura 13: Formação de bolhas no braço lateral do frasco na recuperação do solvente durante o processo de extração, utilizando o frasco de Murray modificado

Com base nos resultados, o solvente orgânico que obteve a menor solubilidade e melhor recuperação no processo de separação de fases foi o hexano, sendo escolhido para ser o solvente extrator.

A Tabela 4 mostra que dos doze testes realizados, somente 3 obtiveram rendimento maior na recuperação sem a presença de sal. O hexano foi o solvente orgânico que obteve melhor recuperação sem adição e com adição de KCl, quando comparado com os demais experimentos.

De acordo com análise da totalidade dos experimentos, em geral, a adição de sal (KCl) na amostra nos permite confirmar o que a literatura informa (CARASEK,1997; KOMATSU, 2004). Sendo que o sal minimiza a solubilidade do solvente orgânico na água, pois na maioria dos testes foram observadas melhorias na recuperação e com o aumento de força iônica.

Com relação ao tempo de agitação, foi determinado o tempo de 10 minutos para a seleção do solvente extrator, considerando este como variável de nível menor (-) nos fatores experimentais propostos pelo planejamento fatorial (Tabelas 1 e 2). Para escolher esse tempo como sendo o mais adequado, foi observado o comportamento de cada um dos solventes orgânicos quanto à temperatura e volatilização, pois o experimento estava sendo realizado em sistema fechado somente com papel alumínio, sem vedação, e desta forma, sugerindo que quanto maior o tempo de agitação, maior é a possibilidade de evaporação do solvente orgânico. O tempo de repouso de 10 minutos foi suficiente para ocorrer à separação de fases, pois acima disso, já se percebia perdas consideráveis na recuperação do solvente orgânico.

### 4.3 ESTUDO DO TEMPO DE REPOUSO

A metodologia inicial consistiu em preparar a amostra e transferi-la para o frasco de Murray modificado, adicionar o contaminante pelo tubo capilar com uma seringa. Após misturar, adicionar o hexano. Levar a amostra para agitação, depois para repouso e coletar o solvente orgânico recuperado para análise cromatográfica. Quando procedido desta forma, em algumas análises não foi possível à detecção dos agroquímicos.

O procedimento foi então modificado e a amostra deixada por um tempo em contato com o analito antes da sua adição no frasco de Murray modificado. A partir desse procedimento, pode-se observar que o contato entre o contaminante e a amostra possivelmente favoreceu a detecção dos agroquímicos em estudo.

Na etapa de preparação da amostragem, as amostras fortificadas permaneceram por um tempo de repouso dentro do frasco âmbar para que desta forma ficassem com características mais semelhantes às amostras reais de águas naturais, pois estas, possivelmente já estavam em contato com o analito, quando presente, em tempo maior que as amostras preparadas para testes laboratoriais.

Na construção das curvas de calibração a amostra preparada e fortificada permaneceu pelo tempo de 2 horas em repouso dentro do frasco âmbar, antes de ser transferida para o frasco de Murray modificado.

As amostras de águas que foram utilizadas para a realização dos experimentos do planejamento fatorial foram fortificadas e deixadas por 10 minutos em repouso no frasco âmbar, seguidos de 5 minutos de agitação mecânica ainda dentro do âmbar para homogeneização. Em seguida passaram pelo processo de pré-concentração no frasco de Murray modificado.

Os resultados demonstraram que em todos os experimentos ocorreu a extração dos analitos, porém com variação na quantidade recuperada.

Através dos experimentos foi possível concluir que não há necessidade de deixar a amostra fortificada por tempo de repouso de 2 horas antes da adição no frasco de Murray modificado, mas o tempo de 10 minutos foi importante para o contato entre o analito e a amostra, favorecendo melhor recuperação dos agroquímicos. É necessário que, antes da amostragem ser transferida para o frasco de extração (Murray modificado), seja feita a homogeneização para que o analito

esteja em condições uniformes de distribuição por toda a amostra, principalmente quando há preparo de quantidades maiores de amostra em uma única etapa.

Definido o tempo de repouso para melhor contato entre analito e amostra antes da pré-concentração, foram realizados testes em duplicatas para a escolha do tempo de repouso mais adequado dentro do frasco de Murray, para a separação das fases orgânica e aquosa. Os tempos estabelecidos para os testes foram entre 10 a 90 minutos. As observações aconteceram a partir do preparo de 4L de amostra, com 234g de NaCl ( $1\text{Mol.dm}^{-3}$ ), o pH foi ajustado para 5,0 e agitação de 10 minutos (90rpm, primeiramente sem contaminação da amostra). Os experimentos com o objetivo de verificar o melhor tempo de repouso e a resposta (mL) da recuperação do solvente hexano estão demonstrados na Tabela 5 e na Figura 14.

Tabela 5

Influência da variação no tempo de repouso da amostra na recuperação do solvente orgânico extrator

<b>Tempo de repouso (min)</b>	<b>Solvente Extrator Recuperado (mL)</b>
10	0,78±0,03 (78%)
30	0,60±0,07 (60%)
60	0,50±0,08 (50%)
90	0,35±0,07 (35%)

O volume de solvente adicionado no frasco de extração para cada experimento foi de 1mL de hexano. O tempo de repouso de 10 minutos foi o que apresentou o melhor resultado com relação à recuperação do solvente sendo que o volume recuperado foi de 78% ( $0,78\pm 0,03\text{mL}$ ) do volume adicionado. Quando a amostra foi deixada sob repouso por 30 minutos no frasco, observou-se conforme a tabela 5, que diminuiu a quantidade do hexano recuperado para 60% ( $0,60\pm 0,07\text{mL}$ ) do volume adicionado.

Nos experimentos onde as amostras ficaram em repouso por 60 minutos a recuperação foi de 50% do volume inicial. Com 90 minutos de repouso conseguiu-se quantificar somente 35% do hexano adicionado.

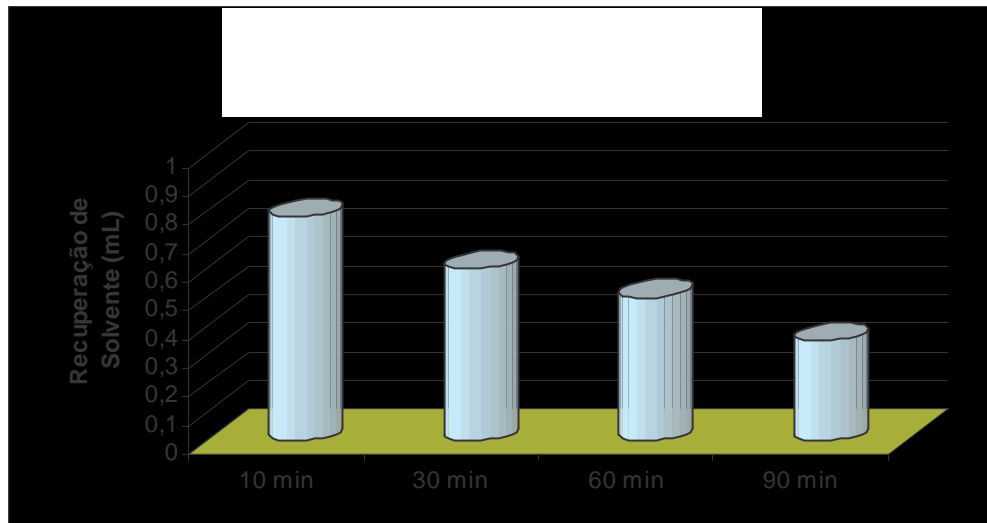


Figura 14: Recuperação do solvente hexano de acordo como a variação nos tempo 10, 30, 60 e 90 minutos de repouso. Condições:  $1\text{ mol. dm}^{-3}$  de NaCl, pH ajustado em 5,0 e agitação: 10 minutos (90rpm), sem contaminação da amostra

Analisando a Figura 14 e comparando os resultados verificou-se que o tempo de repouso ideal para maior recuperação de volume de solvente orgânico na separação de fases (orgânica e aquosa) utilizando o procedimento de operação com o frasco de Murray modificado foi de 10 minutos, visto que, quando deixado o hexano em contato com a amostra por maior tempo pode ocorrer, como já citado, à evaporação dos extratos para o ambiente externo.

Depois da observação do tempo de repouso da amostra sem contaminação dentro do frasco de Murray modificado, foram realizados experimentos com preparo da amostra em triplicata nas mesmas condições citadas acima, com a fortificação de  $80\mu\text{L}$  da solução padrão dos agroquímicos organoclorados. Foi desconsiderado o tempo de 90 minutos visto que, este apresentou menor recuperação de solvente no experimento realizado sem contaminação. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6 e no cromatograma apresentado na Figura 15.

Tabela 6

Recuperação dos agroquímicos organoclorados de acordo com o tempo de repouso da amostra no frasco de microextração

Tempo de Repouso	Recuperação Aldrin ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Recuperação do BHC ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Recuperação do Heptacloro ( $\text{mg dm}^{-3}$ )
10 min	1.956	1.620	1.985
30 min	1.822	1.595	1.817
60 min	1.966	1.831	2.386

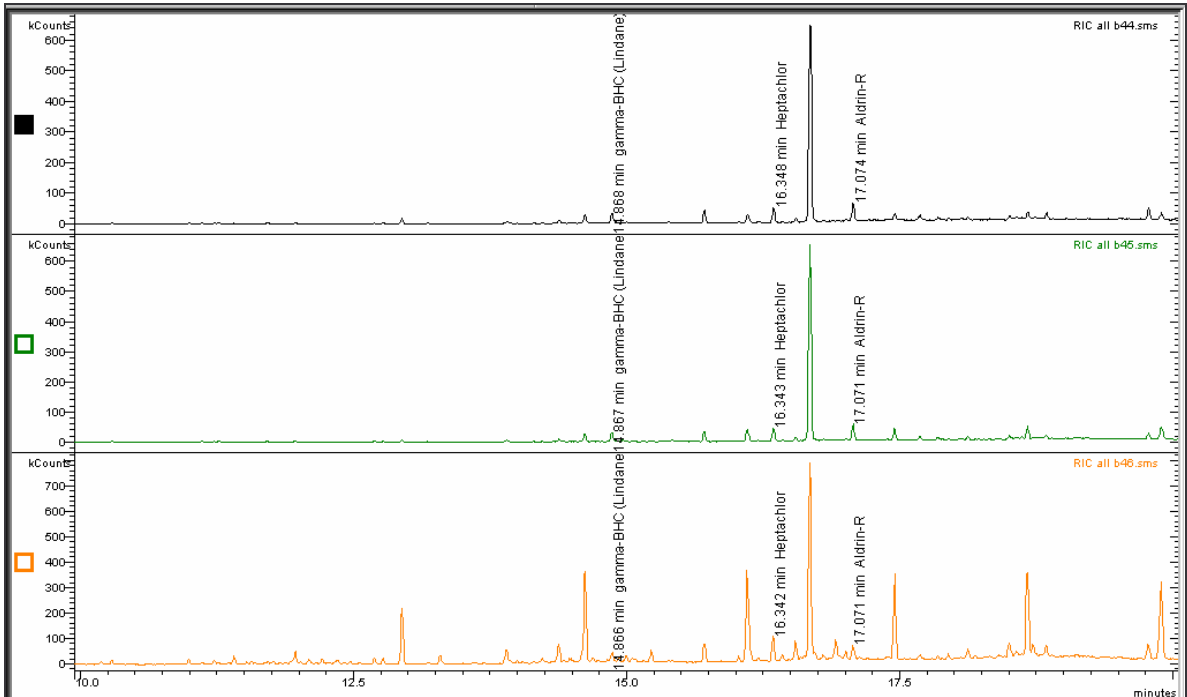


Figura 15: Cromatograma dos ensaios em triplicata realizados para o estudo do melhor tempo de repouso. Condições:  $1\text{ mol. dm}^{-3}$  de NaCl, pH ajustado em 5,0 e agitação: 10 minutos (90rpm), com a amostra contaminada por  $80\mu\text{L}$  dos agroquímicos

Conforme demonstrado na Figura 16, quanto maior o tempo de repouso da amostra, maior a possibilidade de concentração do analito em volume menor de solvente extrator, ultrapassando inclusive a concentração esperada ( $1.6\mu\text{g. dm}^{-3}$  do analito para  $1\text{ mL}$  de hexano), sugerindo a evaporação do solvente orgânico. A evaporação é um fenômeno de difícil controle, que provoca uma situação desfavorável, podendo implicar em alterações da concentração da amostra nas diversas etapas do processo analítico, como na amostragem, no transporte, na conservação e no acondicionamento. Nesse contexto, considera-se desejável uma amostragem tanto mais representativa quanto for possível, principalmente quando se trabalha com concentrações em nível de traços. Portanto para os estudos posteriores foi escolhido o tempo de 10 minutos, sendo este tempo o qual permite recuperação do solvente hexano ( $\pm 0,78\text{ mL}$ ) mais próximo da quantidade adicionada ( $1\text{ mL}$ ).



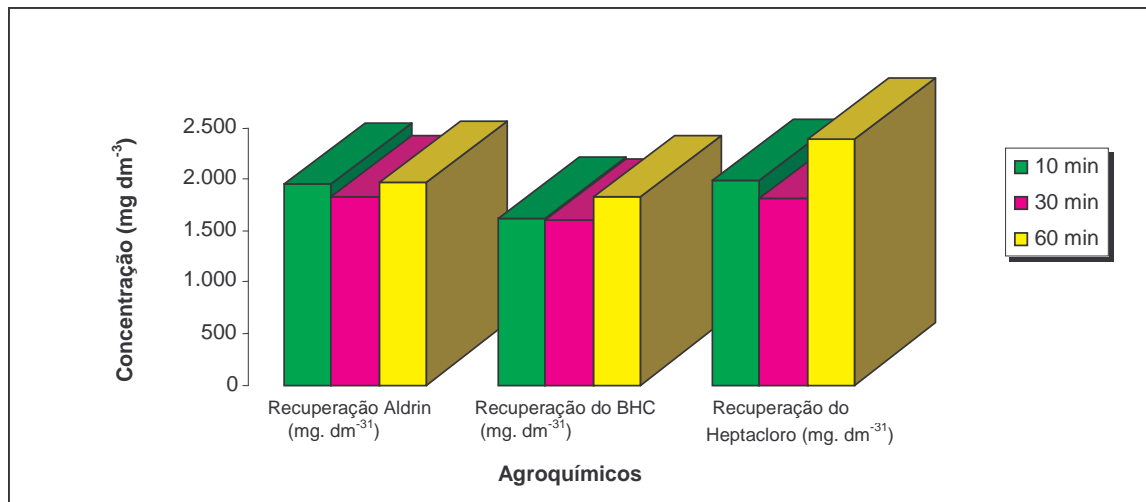


Figura 16: Estudo do tempo repouso na extração dos agroquímicos em água, sob agitação constante (90rpm) e temperatura ambiente (25°C)

A variação na temperatura pode influenciar na recuperação ou até na remoção do solvente orgânico, pelo fato do sistema ser aberto, maior será a evaporação ou degradação. Os agroquímicos estudados, especialmente o  $\gamma$ -BHC (Lindane), apresentam-se estáveis em temperatura ambiente, desta forma, pode ter ocorrido uma maior concentração dos analitos na extração, pelo fato de que a temperatura nessas condições tenha favorecido para a volatilização de parte do hexano para o ambiente externo e, os agroquímicos devido a esta estabilidade, tenham permanecido no frasco e se concentrado na alíquota de hexano que permaneceu dentro do frasco.

#### 4.4 ESTUDO DO EFEITO PRINCIPAL E INTERAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS NA AMOSTRAGEM, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL

Como já foi citado, o processo de MLLC necessita da otimização dos parâmetros de extração para cada tipo de matriz. Considerando essa necessidade, utilizando-se das condições experimentais previamente estudadas foram realizados estudos para definir a influência dos níveis de pH, concentração salina ( $\mu$ ) e tempo de agitação (T.A) da amostra, buscando atingir a maior sensibilidade possível do método na recuperação dos agroquímicos.

Amostras de água ultrapura foram contaminadas com 80 $\mu$ L da solução padrão dos agroquímicos para cada ensaio de 1 litro, seguida da realização das combinações entre as variáveis, previstas pelo planejamento de fatores que

consistiu em realizar 8 ensaios e registrar as respostas observadas em todas as combinações dos níveis escolhidos e um ponto central em duplicata, demonstradas na Tabela 7. A concentração prevista para ser recuperada foi de 1,6  $\mu\text{g. dm}^{-3}$  dos agroquímicos em 1L de água concentrados em 1mL de solvente hexano. A Tabela 7 demonstra a matriz do planejamento juntamente com as respostas obtidas por cromatografia na forma de concentração, para cada experimento.

Tabela 7

Matriz de planejamento contendo os efeitos principais, secundários e tri-fatorial de interações e respostas em concentração para os agroquímicos estudados

Variáveis		Nível baixo			Ponto Central			Nível alto			
pH		3,0 (-)			5,0			7,0 (+)			
$\mu$ ( $\text{g. dm}^{-3}$ )		5,0 (-)			58,5			112 (+)			
Tempo de Agito (min)		10 (-)			20			30 (+)			
		Efeitos principais				Interações			Respostas ( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ )		
exp. $\gamma$	X	pH 1	$\mu$ 2	TA 3	pH $\mu$ 12	pH TA 13	$\mu$ TA 23	pH $\mu$ TA 123	ALDRIN ( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ )	$\gamma$ -BHC ( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ )	HEPTA-CLORO ( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ )
1	+	-	-	-	+	+	+	-	1,840	1,796	1,812
2	+	+	-	-	-	-	+	+	2,258	1,804	2,197
3	+	-	+	-	-	+	-	+	1,677	1,848	1,457
4	+	+	+	-	+	-	-	-	1,879	1,790	1,963
5	+	-	-	+	+	-	-	+	1,789	1,476	1,738
6	+	+	-	+	-	+	-	-	2,517	1,921	2,378
7	+	-	+	+	-	-	+	-	1,637	1,753	1,597
8	+	+	+	+	+	+	+	+	1,778	1,974	1,852
9	0	0	0	0	0	0	0	0	X=2,518	X=2,011	X=2,207
10	0	0	0	0	0	0	0	0	X=2,518	X=2,011	X=2,207

(X) Média, ( $\mu$ ) concentração salina, (T.A) tempo de agitação

O planejamento fatorial teve como objetivo executar todas as possíveis combinações dos fatores em relação aos níveis escolhidos, possibilitando a extração do maior número de informações possíveis do sistema em estudo, com um número mínimo de ensaios.

### Estimativa do erro experimental:

A estimativa do erro experimental foi calculada através do ponto central com o respectivo coeficiente de variação (CV%) para cada um dos agroquímicos. A extensão desse erro é importante para avaliar a significância estatística dos fatores sobre a resposta. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20% (Ribani, 2004).

Tabela 8

Recuperação do agroquímicos de acordo com o ponto central conforme planejamento fatorial, desvio padrão e coeficiente de variação

Organoclorados	X( $\mu\text{g. dm}^{-3}$ )	S(%)	CV%
Aldrin	2,518	$\pm 0,179$	7,13
BHC	2,011	$\pm 0,062$	3,13
Heptacloro	2,207	$\pm 0,122$	5,54

(X) Média, (S) desvio padrão, (CV) coeficiente de variação

Para a construção dos resultados da Tabela 9, primeiramente foram somadas as respostas obtidas em termos de concentração através da CG para cada um dos agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro, relacionados aos ensaios 01 a 08 da Tabela 7. Em seguida, este valor foi dividido por 8 para encontrar a média global que demonstra o rendimento da recuperação.

Todas as colunas da tabela têm quatro sinais positivos e quatro sinais negativos, qualquer efeito, portanto, pode ser interpretado como a diferença entre as duas médias (BRUNS, 1996).

As expressões, 4.0, 5.0 e 6.0 podem ser reescritas nas expressões 4.1, 5.1 e 6.1, como a diferença entre a resposta média no nível superior e nível inferior para os três agroquímicos, as quais foram utilizadas para encontrar os valores dos efeitos principais (pH, U e T.A) demonstrados na Tabela 9.

Expressão para o cálculo de efeito do pH:

$$\text{pH} = \left(\frac{1}{4}\right)\{(y_2 + y_4 + y_6 + y_8) - \left(\frac{1}{4}\right)(y_1 + y_3 + y_5 + y_7)\} \quad (4.0)$$

$$\text{pH} = \check{y}_+ - \check{y}_- \quad (4.1)$$

Expressão para o cálculo do efeito da concentração salina ( $\mu$ ):

$$\mu = (1/4)\{(y_2 + y_4 + y_6 + y_8) - (1/4)(y_1 + y_3 + y_5 + y_7)\} \quad (5.0)$$

$$\mu = \check{y}_+ - \check{y}_- \quad (5.1)$$

Expressão para o cálculo de efeito do tempo de agitação (T.A):

$$TA = (1/4)\{(y_2 + y_4 + y_6 + y_8) - (1/4)(y_1 + y_3 + y_5 + y_7)\} \quad (6.0)$$

$$TA = \check{y}_+ - \check{y}_- \quad (6.1)$$

O efeito das interações entre dois fatores pode ser calculado pela expressão 7.0 e seus resultados estão demonstrados na Tabela 9:

$$pH \times CS = pHCS = 1/4 (\check{y}_+ - \check{y}_-) \quad (7.0)$$

O efeito de interações entre os três fatores foi calculado pela equação 8.0 e seus resultados estão demonstrados na Tabela 9:

$$pH \times CS \times TA = pHCSA = 1/4 (\check{y}_+ - \check{y}_-) \quad (8.0)$$

Tabela 9

Efeitos principais e de interações calculados para as combinações do planejamento fatorial  $2^3$  a partir dos dados obtidos da Tabela 7

	<b>Aldrin</b>	<b><math>\gamma</math>-BHC(Lindane)</b>	<b>Heptacloro</b>
<b>Média Global</b>	1,921( $\pm 0,179$ )	1,795( $\pm 0,062$ )	1,874( $\pm 0,122$ )
<b>Efeitos principais</b>			
(1) pH	+0,372( $\pm 0,179$ )	+0,15( $\pm 0,062$ )	+0,44( $\pm 0,122$ )
(2) $\mu$	-0,358( $\pm 0,179$ )	+0,09( $\pm 0,062$ )	-0,31( $\pm 0,122$ )
(3) T.A	+0,016( $\pm 0,179$ )	-0,02( $\pm 0,062$ )	+0,03( $\pm 0,122$ )
<b>Efeitos de interação (entre dois fatores)</b>			
(1) pH x (2) $\mu$	-0,201( $\pm 0,179$ )	-0,07( $\pm 0,062$ )	-0,06( $\pm 0,122$ )
(1) pH x (3) T.A	+0,062( $\pm 0,179$ )	+0,17( $\pm 0,062$ )	+0,001( $\pm 0,122$ )
(2) $\mu$ x (3) T.A	+0,087( $\pm 0,179$ )	-0,07( $\pm 0,062$ )	-0,01( $\pm 0,122$ )
<b>Efeitos de interação (entre três fatores)</b>			
(1) pH x (2) $\mu$ (3) TA	-0,093( $\pm 0,179$ )	-0,03( $\pm 0,062$ )	-0,12( $\pm 0,122$ )

Através dos dados apresentados na Tabela 9, pôde-se observar que os efeitos principais significativos entre os fatores para os agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro são, pH e  $\mu$ , podendo ser desconsiderado o tempo de agitação por estar abaixo do erro padrão calculado através do coeficiente de variação do ponto central.

Isso significa que o efeito principal tempo de agitação (T.A), pode ser interpretado isoladamente, porque o seu valor estando abaixo do coeficiente de variação, demonstra que não há interação, ou seja, influência desse fator nos demais resultados. Esse assunto será discutido detalhadamente no item 4.5.3, que se refere ao efeito principal tempo de agitação.

A Tabela 9 demonstra que quando existe a interação entre os dois fatores pH e  $\mu$ , há influência na recuperação do Aldrin. Para o  $\gamma$ -BHC(Lindane) observa-se que a interação entre dois fatores foi significativa em todas as combinações. O Heptacloro não demonstrou efeito de interações entre dois fatores nos experimentos. A interação entre três fatores se mostrou sem significância para os três agroquímicos em estudo por estar abaixo da estimativa de erro padrão calculado.

## 4.5 EFEITOS PRINCIPAIS

### 4.5.1 Efeito do pH

A análise da significância estatística para o efeito principal do pH na recuperação do Aldrin,  $\gamma$ -BHC (Lindane) e Heptacloro, foi determinada através das expressões 4.0 e 4.1.

Para o Aldrin,  $\gamma$ -BHC (Lindane) e Heptacloro, obtiveram-se as respostas +0,372 ( $\pm 0,179$ ), +0,15( $\pm 0,062$ ) e +0,44( $\pm 0,122$ ), respectivamente, demonstradas na Tabela 9 como efeitos significativos na recuperação de todos estes agroquímicos.

Quando transformados esses resultados em pontos percentuais para melhor interpretação, observa-se que a elevação do pH favorece para as extrações dos agroquímicos, pois observando os três resultados pode-se concluir que quando se avança de um nível inferior (-) onde o pH é 3, para um nível superior (+) onde o pH é 7, há tendência de ganhos na eficiência de extração em 23,3 pontos percentuais para o Aldrin, 9,4 pontos percentuais para o  $\gamma$ -BHC (Lindane) e 27,5 pontos percentuais para o Heptacloro, sendo este um fator altamente significativo na

recuperação dos compostos estudados, por estar acima do erro experimental da determinação.

De modo geral, conclui-se para os três agroquímicos estudados que o pH 7,0 é o ponto ótimo de acordo com as respostas das variações experimentais.

#### **4.5.2 Efeito da Concentração Salina ( $\mu$ )**

A sensibilidade do método pode em muitos casos ser aumentada na presença de sal, conforme cita Komatsu (2004), devido ao efeito salting out (condução dos analitos da solução para a fase orgânica). Quando se trata de micro-extração líquido-líquido utilizando o frasco de Murray modificado para os agroquímicos organoclorados em estudo, Carasek (1997) concluiu em seu estudo que o efeito salting-out favorece a passagem dos pesticidas para a fase orgânica e que não há necessidade de saturar a fase aquosa com sal. O mesmo cita que a adição de sal na amostra aquosa minimiza solubilidade do solvente orgânico na água. O trabalho desenvolvido por Zapf (1995) utilizando um frasco microextrator, também demonstra melhorias na recuperação quando adicionado NaCl na amostragem, afirmando que no momento da partição do solvente orgânico e a água, o sal favorece para a menor solubilidade.

Em estudo recente (FARIA, 2004), sobre extração de alguns agroquímicos em água, o autor cita que o aumento da concentração salina tem como objetivo diminuir as interações do analito com a água (solvente) e assim facilitar a retenção no solvente orgânico utilizado e, portanto, aumentar a recuperação dos analitos. Assim, a adição de sal na amostra deve ter maior influência para pesticidas polares. Não se pode dizer que só pela adição de sal à amostra as recuperações serão maiores.

Conforme experimentos, a influência da concentração salina foi determinada empregando-se soluções contaminadas e insaturadas com 5g em nível (-) e 112g em nível (+) de NaCl em 1 litro de amostra. Para o cálculo de efeito da tendência foram utilizadas a expressão 5.0 e 5.1 e os valores foram demonstrados na Tabela 9.

Os resultados obtidos para o Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro são, respectivamente,  $-0,358(\pm 0,179)$ ,  $+0,09(\pm 0,062)$  e  $-0,31(\pm 0,122)$ . Esses resultados demonstram na interpretação isolada deste fator que o efeito da adição do nível (+)

de sal na amostra favorece negativamente na recuperação dos agroquímicos Aldrin e Heptacloro. Isso significa dizer que, quando se avança ao longo do planejamento de um nível superior (+) 112g de NaCl onde é gerada maior força iônica para um nível inferior (-) 5g de NaCl, há tendência de ganhos em eficiência de 22,4 pontos percentuais na recuperação do Aldrin e 19,38 pontos percentuais na recuperação do Heptacloro, sendo altamente significativos esse valores por estarem acima do erro experimental da determinação. Os cálculos foram demonstrados em percentual para melhor comparação deste efeito.

Entre os compostos analisados, o  $\gamma$ -BHC(Lindane) foi o único que demonstrou ter melhor recuperação na extração com a presença do nível (+) de sal. Esse resultado demonstra que o efeito da adição de maior quantidade de sal gera força iônica suficiente para favorecer positivamente a recuperação do pesticida. Isso significa dizer que, quando se avança ao longo do planejamento de um nível inferior (-) de  $\mu$  para um nível superior (+), se ganha em eficiência 5,63 pontos percentuais na recuperação do agroquímico BHC, sendo significativo esse valor por estar acima do erro experimental da determinação, demonstrado através da duplicata do ponto central na Tabela 8.

Pode-se concluir, observando a Figura 17 e comparando com os resultados do experimento preliminar da amostra sem ajuste de pH (6,01) e sem adição de sal, demonstrado na Tabela 3 e no cromatograma da Figura 10, que a concentração salina é de grande importância para a extração dos agroquímicos, porém, não há necessidade de adicionar quantidade acima de 5g de NaCl na amostra, pois a partir dessa quantidade para os agroquímicos Aldrin e Heptacloro observou-se perda na eficiência de recuperação, concordando esse resultado com o estudo anterior realizado por Carasek (1997) utilizando o mesmo frasco como extrator. Observando o cálculo, verifica-se que a recuperação do  $\gamma$ -BHC(Lindane) melhora com a adição do nível (+) de sal, mas a diferença não se sobressai a  $\pm 6\%$ . Para melhores conclusões foi realizada a interpretação geométrica desse efeito interagindo com o pH que será discutido no item 4.6. É também interessante em trabalhos futuros detalhar outros níveis de concentração salina para o estudo, pois se esse percentual de recuperação não for tão significativo e representativo na recuperação implicaria na economia de  $\pm 100$ g de NaCl para cada ensaio realizado, utilizando-se de um nível menor de  $\mu$  na amostragem.

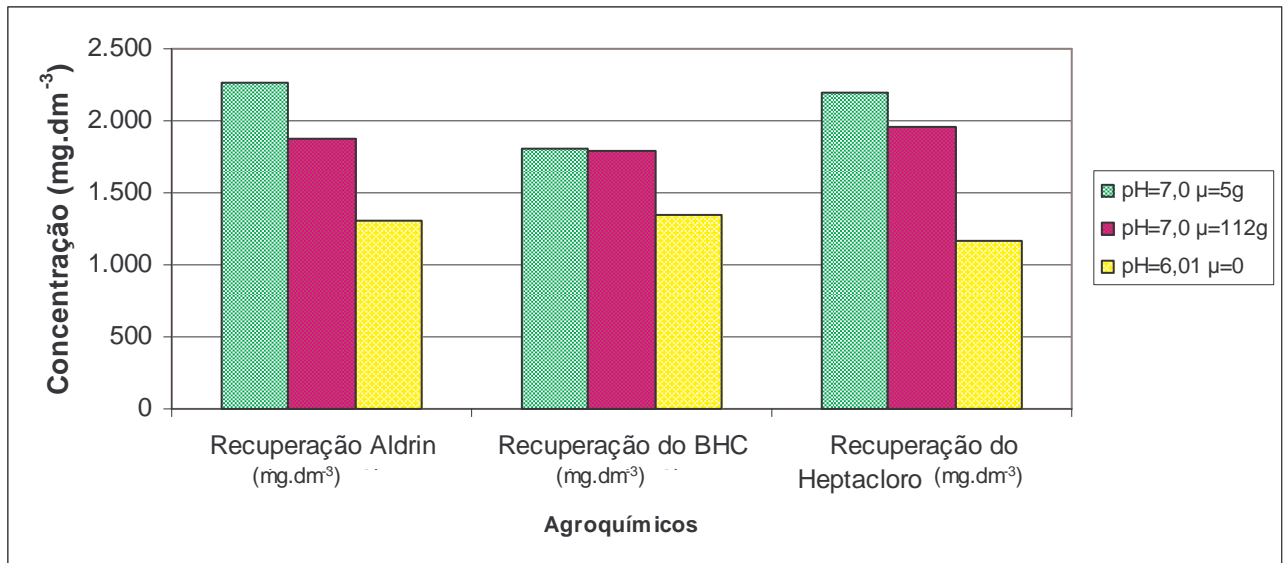


Figura 17: Recuperação dos agroquímicos sem adição de sal, 5g de sal na amostra (nível -) e 112g de sal (nível +) do planejamento fatorial

#### 4.5.3 Efeito do Tempo de Agitação

A quantidade de analito extraído depende da razão entre o contato e a transferência de massa da fase aquosa para o solvente orgânico (KOMATSU, 2004). Usualmente pode-se melhorar a transferência de massa através da agitação da amostra, pois é uma forma de transporte entre as fases. A influência do tempo de agitação (10, 20 e 30 minutos) nas combinações de variáveis estabelecidas pelo planejamento de fatores, pode ser demonstrada para cada um dos agroquímicos estudados, através da eficiência na extração de acordo com a quantidade de analito adicionado ( $1,6\mu\text{g. dm}^{-3}$ ) na amostra e a quantidade de analito recuperado.

Os valores demonstrados na Tabela 9 para a avaliação da influência do efeito principal tempo de agitação nos experimentos, foram obtidos pela expressão 6.0 e 6.1.

Através da observação dos efeitos calculados,  $+0,016(\pm 0,179)$  para o Aldrin,  $-0,02(\pm 0,062)$  para o  $\gamma$ -BHC(Lindane) e  $+0,03(\pm 0,122)$  para o Heptacloro, foi demonstrado que não há evidências da interação entre o tempo de agitação (T.A) com os outros dois fatores, pois os valores calculados para o T.A, são inferiores aos valores de estimativa do erro padrão, sendo a extensão desse erro considerada importante para a decisão da existência ou não de efeito significativo do fator sobre a resposta. Desta forma o T.A foi considerado um fator entre os três níveis sem



interferência significativa na recuperação dos agroquímicos, quando varia do nível menor para o nível maior entre os valores estabelecidos no planejamento.

Pode-se concluir que a eficiência na extração dos agroquímicos é considerada semelhante quando o experimento é realizado com tempo de 10, 20 ou 30 minutos de agitação. Neste caso, não foram observadas diferenças significativas entre as diversas condições experimentais utilizadas do nível (-) para o nível (+), por questão de simplificação e economia de tempo, optou-se por utilizar o tempo de agitação de 10 minutos como condição ótima para a validação do método.

A interação entre dois e três fatores somente se mostrou significativa para o  $\gamma$ -BHC(Lindane) por estar acima do erro experimental, mas observando a Tabela 9 verifica-se que quando há interação entre três fatores a resposta obtida está muito próxima do erro experimental, não oferecendo uma significância relevante.

#### 4.6 INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS

O planejamento fatorial também foi aplicado em um sistema geométrico para melhor compreensão dos resultados. As respostas em concentração estão demonstradas através das figuras 18, 19 e 20 que representam a interpretação geométrica dos resultados referentes à recuperação, mostrando o efeito principal para cada agroquímico (pH,  $\mu$  e T.A), bem como o efeito da interação entre eles. A representação geométrica foi dada através de um diagrama de planejamento fatorial  $2^2$  pois as interações foram observadas somente entre dois fatores (pH e  $\mu$ ).

Os resultados foram novamente demonstrados na forma de percentual de recuperação, para possibilitar a melhor interpretação da influência de cada parâmetro na representação geométrica, conforme as Figuras 18, 19 e 20. Os valores numéricos percentuais dentro dos círculos, representam a eficiência de recuperação medida por cromatografia gasosa e as setas apontam para as tendências de maior eficiência. O valor que está no centro é a média de recuperação obtida. Nesta representação foram considerados somente os efeitos significativos. Deve-se lembrar que esses percentuais foram obtidos pré-concentrando os analitos no volume de 1mL de hexano adicionado, mas dessa totalidade, somente foram recuperados aproximadamente 0,7mL do solvente orgânico adicionado.

Através da representação geométrica observa-se para o Aldrin (figura 18) que a elevação do pH do nível (-) para o nível (+), aumenta o rendimento da

extração, mas esse efeito é muito mais pronunciado quando a concentração salina ( $\mu$ ) está no nível menor, igual (5g) do que quando a concentração salina ( $\mu$ ) está igual a 112g (nível +), obtendo-se +36,3% de eficiência nesta condição, contra +10% no nível (+). A condição ótima de extração para o Aldrin foi considerada pH = 7,0 e  $\mu$ = 5g de NaCl.

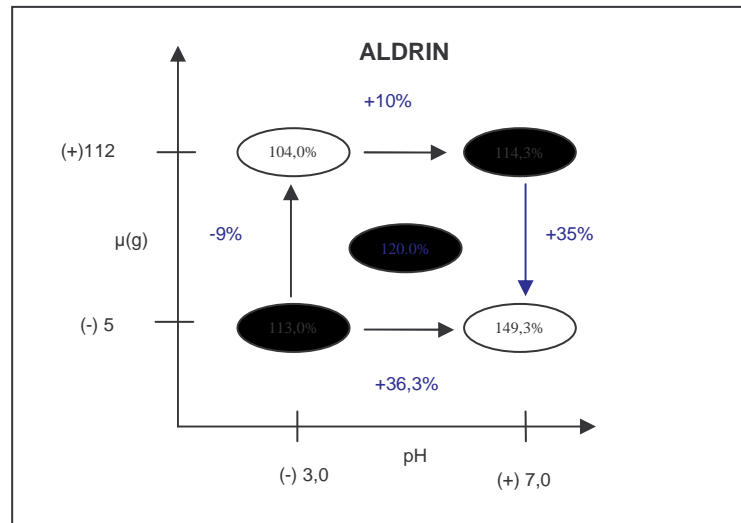


Figura 18: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina ( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o Aldrin, no planejamento fatorial  $2^2$

A representação geométrica dos resultados na Figura 19 demonstra o rendimento da extração do  $\gamma$ -BHC(Lindane).

Quando se tem menor concentração salina a variação de pH de 3,0 para 7,0 resulta em um aumento de eficiência de 14,4 pontos percentuais. Por outro lado, em nível (+) de concentração salina a elevação do pH implica em um ganho de eficiência de apenas 5,3 pontos percentuais.

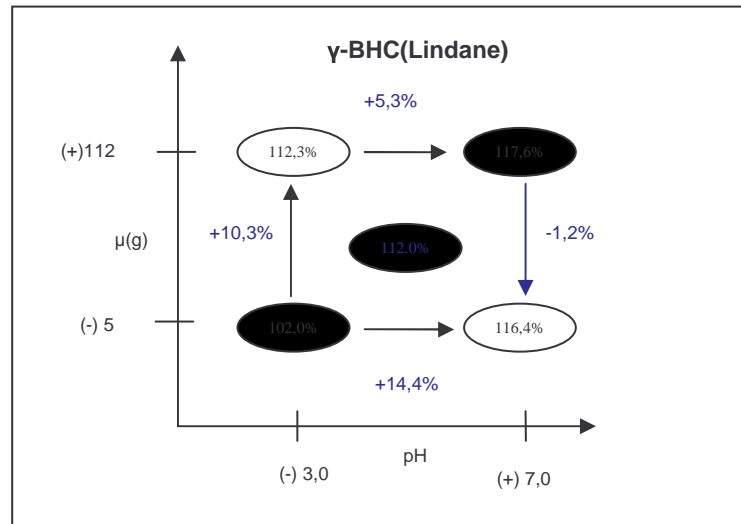


Figura 19: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina ( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o  $\gamma$ -BHC(Lindane), no planejamento fatorial  $2^2$

Observando a figura 19, verifica-se pelos cálculos que a melhor condição de extração, considerando a determinação do erro experimental é a de nível (+) para a concentração salina e nível (+) para pH, resultando em uma eficiência 1,2 % superior à segunda opção de melhor condição de extração. Apesar da maior eficiência indicada ser 117,6%, considerou-se a melhor condição a de nível (+) para o pH e nível (-) para a concentração salina que indica recuperações de 116,4% para o  $\gamma$ -BHC(Lindane), pois utilizar a condição de nível (+) para a concentração salina implicaria no uso de mais sal, para resultados muito semelhantes, essa informação está em conformidade com a literatura (CARASEK, 1997).

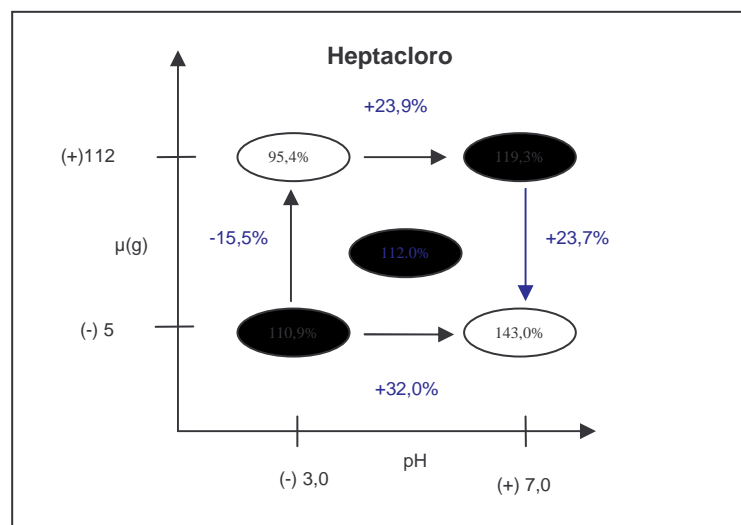


Figura 20: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração salina ( $\mu$ ) e do pH sob condições otimizadas para o Heptacloro, no planejamento fatorial  $2^2$

Da mesma forma que foi observada para o  $\gamma$ -BHC(Lindane), neste caso na extração do Heptacloro (figura 20) considerando a menor concentração salina a elevação do pH, implica em um aumento de eficiência de aproximadamente 32 pontos percentuais. Este comportamento também foi observado utilizando um nível maior de concentração salina, ocorrendo neste caso, um aumento de eficiência de 23,9 pontos percentuais. Observa-se claramente uma tendência evidenciada também no estudo para o  $\gamma$ -BHC(Lindane) de aumento de eficiência com o pH. Desta forma conclui-se que a condição ótima de extração para o Heptacloro é aquela que utiliza um nível menor de  $\mu$  (5g) e maior de pH (7,0).

## **4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS ORGANOCLORADOS EM AMOSTRAS AQUOSAS**

### **4.7.1 Curva Analítica**

A validação da metodologia é realizada para garantir a exatidão analítica, a especificidade e a reprodutibilidade. A interação entre o princípio ativo e a matriz dentro de uma técnica analítica resulta na quantificação desejada e correta.

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios como cita Vieira (2004) e Ribani (2004), como: linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez.

O trabalho iniciou pela determinação do método cromatográfico que foi de calibração externa pelo método. Para tal comparação e conformidade foi obtido primeiramente um cromatograma, através da adição da solução padrão dos agroquímicos, demonstrando a concentração de  $20\text{mg.mL}^{-1}$  conforme Figura 21.

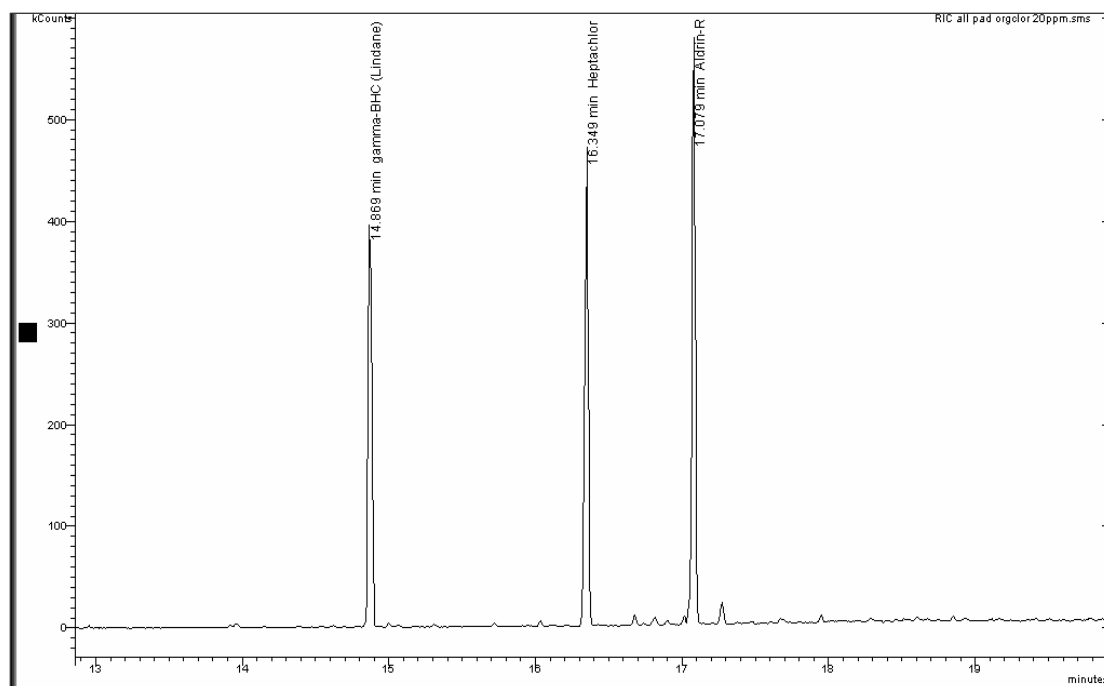


Figura 21: Cromatograma da solução padrão  $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Para verificar a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substância dentro de uma determinada variação, o primeiro e mais simples parâmetro a ser avaliado é a linearidade que foi obtida plotando os valores da área contaminada conforme o cromatograma *versus* a concentração da solução analítica adicionada, sendo este fator normalmente relacionado com a variação da inclinação da linha de regressão.

Desta forma, as curvas analíticas para cada um dos agroquímico, foram obtidas utilizando soluções padrões de referência ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nos volumes  $20\mu\text{L}$ ,  $40\mu\text{L}$ ,  $80\mu\text{L}$ ,  $160\mu\text{L}$ ,  $240\mu\text{L}$  na contaminação utilizada nos experimentos. As respostas de recuperação esperadas foram de  $0,40\mu\text{g}$ ,  $0,8\mu\text{g}$ ,  $1,6\mu\text{g}$ ,  $3,2\mu\text{g}$  e  $4,8\mu\text{g}$  a cada litro, respectivamente.

Realizou-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e verificou-se o coeficiente de determinação,  $r^2$ , adequado para cada um dos agroquímicos estudados (LEITE, 2002).

As curvas de calibração obtidas com as fortificações das amostras a partir dos padrões dos agroquímicos apresentaram um desvio padrão relativo variando de  $\pm 6\%$  a  $25\%$  para  $n=5$ . O  $r^2$  calculado para cada agroquímico é em média  $0,9900$  como mostrados nas Figuras 22, 23 e 24. Estes resultados indicam que as curvas de

calibração são representativas para comparação com os valores dos agroquímicos organoclorados encontrados nas amostras de águas naturais analisadas.

Tabela 10

Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do Aldrin.  
 Condições: solvente extrator = 1mL de hexano, pH = 5,0,  $\mu$  = 117g de NaCl, T.A = 10min e Tempo de repouso = 10min

**CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO ALDRIN**

EXP.	Conc. do ponto da curva	Área do CG	Conc. Corrigida	% desvio
1	0,0	0,0	-0,1374	0,0000
2	0,4	1401,5	0,5977	33,0718
3	0,8	1624,0	0,7143	-11,9908
4	1,6	3422,0	1,6573	3,4574
5	3,2	6302,7	3,1681	-1,0083

			MÉDIA DA ÁREA DO CROMATOGRAMA
0	0	0	0,0
0	1565	1612	1588,5
1579	0	1224	1401,5
1847	1423	1602	1624,0
3350	3340	3576	3422,0
8160	5331	5417	6302,7
13548	16058	13555	14387,0

<b>Coefficiente angular da reta</b>	1906,770938
<b>Coefficiente Linear da reta</b>	261,908275

<b>Média % desvio</b>	4,7060
<b>%RSD</b>	16,88014963

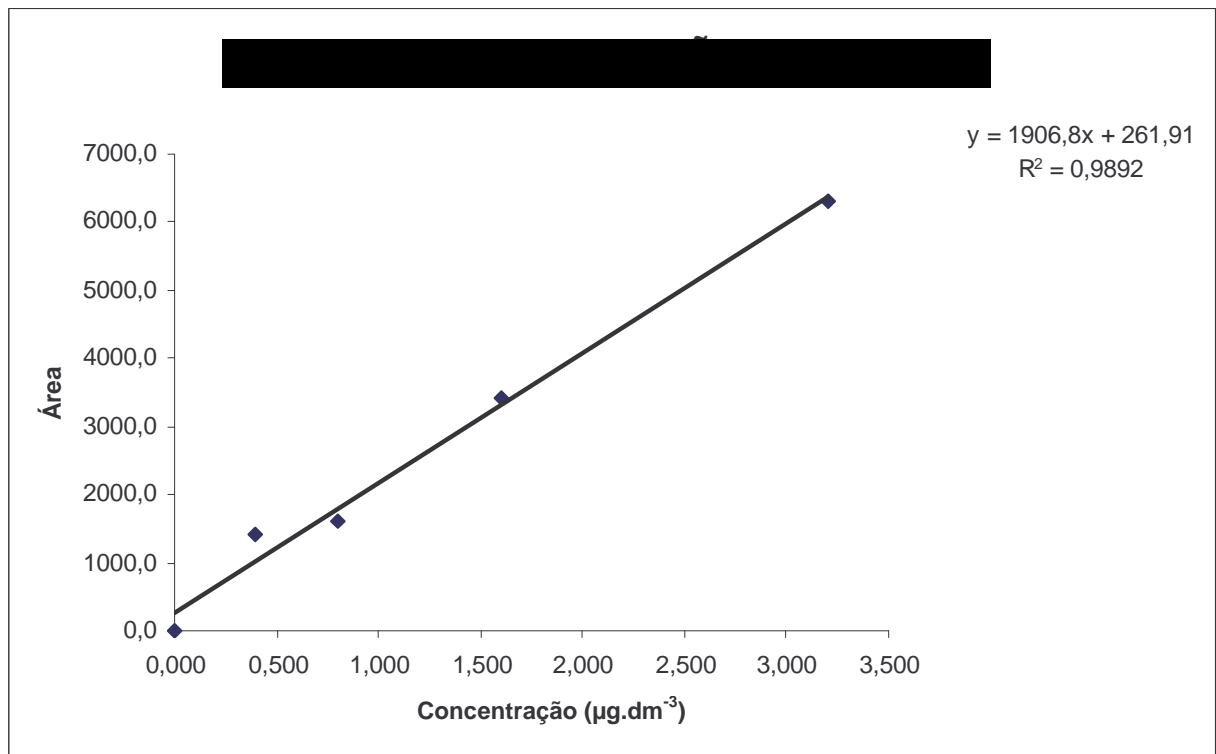


Figura 22: Curva de calibração para o agroquímico Aldrin

Tabela 11

Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do  $\gamma$ -BHC(Lindane). Condições: solvente extrator = 1mL de hexano, pH = 5,0,  $\mu$  = 117g de NaCl, T.A = 10min., Tempo de repouso = 10min

**CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO  $\gamma$ -BHC(LINDANE)**

EXP.	Conc. do ponto da curva	Área do CG	Conc. Corrigida	% desvio
1	0,0	0,0	0,0387	0,0000
2	0,4	2383,7	0,4196	4,6598
3	0,8	4707,3	0,7908	-1,1626
4	1,6	9159,7	1,5022	-6,5108
5	3,2	20091,0	3,2488	1,5008
6	4,8	31071,3	5,0031	4,0604

			MÉDIA DA ÁREA DO CROMATOGRAMA
0	0	0	0,0
2466	3812	3679	3319,0
1599	2746	2806	2383,7
4470	5084	4568	4707,3
8634	8838	10007	9159,7
23895	21853	14525	20091,0
31674	34341	27199	31071,3

<b>Coefficiente angular da reta</b>	6258,75
<b>Coefficiente Linear da reta</b>	-242,16

<b>Média % desvio</b>	-0,3026
<b>%RSD</b>	4,100336844

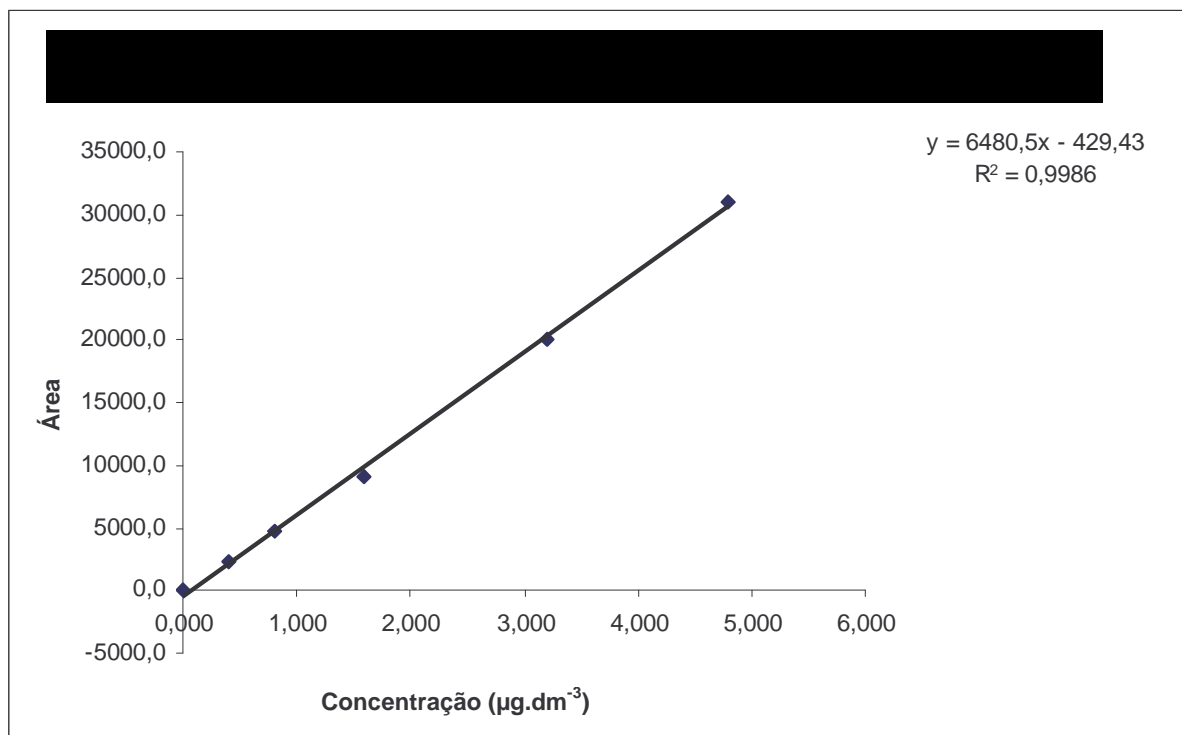


Figura 23: Curva de calibração para o agroquímico  $\gamma$ -BHC(Lindane)

Tabela 12

Dados obtidos através de ensaios experimentais para construção da curva de calibração do Heptacloro. Condições: solvente extrator = 1mL de hexano, pH = 5,0,  $\mu$  = 117g de NaCl, T.A = 10min e Tempo de repouso = 10min

**CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO HEPTACLORO**

EXP.	Conc. do ponto da curva	Área do CG	Conc. Corrigida	% desvio
1	0,0	0,0	-0,1128	0,0000
2	0,4	1231,7	0,4769	16,1209
3	0,4	1210,7	0,4668	14,3142
4	0,8	1826,7	0,7618	-5,0204
5	1,6	3643,3	1,6316	1,9343
6	3,2	6868,7	3,1758	-0,7614

			MÉDIA DA ÁREA DO CROMATOGRAMA
0	0	0	0,0
1034	1625	1036	1231,7
1428	1000	1204	1210,7
2026	1696	1758	1826,7
3490	3547	3893	3643,3
8347	6127	6132	6868,7
12968	15705	12860	13844,3

<b>Coefficiente angular da reta</b>	2088,596154
<b>Coefficiente Linear da reta</b>	235,6641026

<b>Média % desvio</b>	4,4313
<b>%RSD</b>	8,677416976

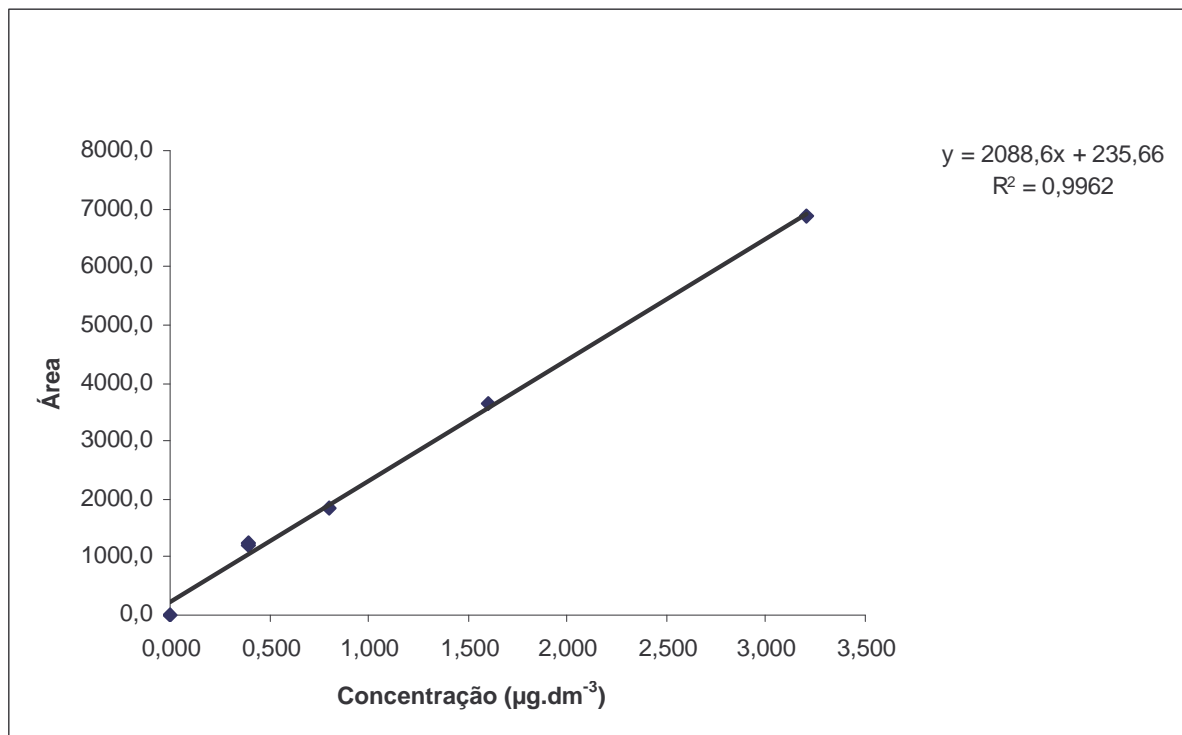


Figura 24: Curva de calibração para o agroquímico Heptacloro



As curvas analíticas obtidas para o Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro, indicam boa linearidade do método na faixa de concentração estudada. Analisando a equação das retas obtidas observa-se que a resposta do detector mostrou-se linear mesmo para faixas extensas de concentração, pois as curvas de calibração apresentaram valores de  $r^2$ , 0,9892, 0,9986, 0,9962, respectivamente.

Estes resultados permitiram indicar uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, é indicativo de menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,9. Deste modo nota-se a representatividade das curvas de calibração obtidas para os agroquímicos em estudo.

A precisão do método foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo, ou seja, pelo coeficiente de variação (CV)

Para a exatidão, pode-se expressar a relação do resultado obtido com o resultado esperado.

#### 4.7.2 Recuperação

Com o fator de recuperação, o resultado fica mais próximo da realidade analítica, ou seja, determina-se a eficiência do método (LEITE, 2002).

As recuperações foram determinadas a partir de uma única etapa de extração e as concentrações adicionadas nas amostras variaram entre 0,4 e 4,8  $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

A Tabela 13 demonstra a recuperação quantificada através da cromatografia gasosa e o fator de recuperação que se dá através da comparação das concentrações definidas dos analitos adicionadas e retiradas de acordo com a expressão, já demonstrada nos materiais e métodos.

$$\text{Fator}_{\text{rec}} = \frac{A_r \times 100}{A_i}$$

A tabela abaixo apresenta o resultado do fator de recuperação, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) dos agroquímicos estudados em amostras de águas fortificadas, utilizando o dispositivo de microextração líquido-líquido e a quantificação por CG:

Tabela 13

Fator de recuperação dos analitos de acordo com a fortificação da amostra

Agroquímicos	Fortificada (µL)	Esperada µg. dm <sup>-3</sup>	Recuperada µg.dm <sup>-3</sup>	S	CV (%)	Fator de Recuperação (%)
Aldrin	20	0,4	0,3	±0,07	17,70	98,75
Aldrin	40	0,8	0,4	±0,06	13,10	57,25
Aldrin	80	1,6	0,9	±0,03	3,10	60,31
Aldrin	160	3,2	1,7	±0,45	25,52	55,53
Aldrin	240	4,8	4,0	±0,408	10,06	84,50
γ-BHC(Lindane)	20	0,4	0,4	±0,66	15,50	106,50
γ-BHC(Lindane)	40	0,8	0,8	±0,059	5,94	105,25
γ-BHC(Lindane)	80	1,6	1,6	±0,13	7,93	102,44
γ-BHC(Lindane)	160	3,2	3,5	±0,088	24,52	112,38
γ-BHC(Lindane)	240	4,8	5,5	±0,645	11,61	115,88
Heptacloro	20	0,4	0,3	±0,66	17,50	94,00
Heptacloro	40	0,8	0,5	±0,05	8,80	70,88
Heptacloro	80	1,6	1,1	±0,06	5,30	70,69
Heptacloro	160	3,2	2,1	±0,397	18,64	66,66
Heptacloro	240	4,8	4,3	±0,50	11,62	89,58

(S) Desvio padrão, (CV) coeficiente de variação

#### 4.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Na Tabela 14 estão demonstrados os parâmetros e resultados obtidos através das curvas analíticas (inclinação e intersecção), faixa linear, coeficiente linear, coeficiente angular, correlação linear ( $r^2$ ) encontrados para os agroquímicos, empregando o método de microextração líquido-líquido e análise por CG.

Para o Aldrin foi observado que a concentração abaixo 0,4µg. dm<sup>-3</sup>, apresentou instabilidade na quantificação. A partir dos dados obtidos através das curvas de calibração foi possível calcular os limites de detecção e quantificação dos agroquímicos, demonstrado na tabela 14.

Tabela 14

Limite de detecção e quantificação dos agroquímicos organoclorados para a metodologia proposta

CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO						
	Coeficiente linear	Coeficiente angular	LOD	LOQ	Faixa de concentração µg. dm <sup>-3</sup>	R <sup>2</sup>
ALDRIN	261,9083	1906,7709	0,4533	1,3736	0,4 - 4,8	0,989
γ-BHC(LINDANE)	242,1600	6258,7500	0,1277	0,3869	0,4 - 4,8	0,999
HEPTACLORO	235,6641	2088,5962	0,3724	1,1283	0,4- 4,8	0,996

Os limites de detecção para os três agroquímicos estudados foram calculados considerando os resultados da linearidade oferecidos pelas curvas analíticas em relação as suas concentrações. Os valores de limite de detecção são da ordem de  $\mu\text{g. dm}^{-3}$ , indicando a viabilidade deste método para a determinação de quantidades traços de agroquímicos em águas. Os valores, referentes ao método, do LOD foram 0,1 e 0,5  $\mu\text{g. dm}^{-3}$  e LOQ 0,3 e 1,4  $\mu\text{g dm}^{-3}$ . Estes resultados indicam que o método é sensível para detectar a presença de agroquímicos em níveis baixos de concentração nas matrizes aquosas.

#### **4.8 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EM MATRIZES REAIS UTILIZANDO AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FATORIAL**

A Bacia do Rio Pato Branco ocupa uma área de 270Km<sup>2</sup> e está situada na região Sudoeste do Estado do Paraná, entre os municípios de Pato Branco e Mariópolis, a 26°14'42" de latitude Sul e 52°33'03" de longitude Oeste, com altitude variando entre 700 e 800m. Os principais mananciais fornecedores desta bacia são os rios: Divisa, Panela, Mangueirinha, Lambedor, Pinheiro e Conrado (MELLO, 2002).

A região compõe-se de solos planos e acentuadamente ondulados. Os solos de declive mais suave são latossolos que estão sendo utilizados para o cultivo anual através de plantio direto, principalmente no verão. Logo após são utilizados para cobertura de inverno utilizada na bovinocultura de leite. Os solos mais declivosos, litólicos ou cambissolos, são utilizados principalmente com pastagens ou com florestas secundárias, de acordo com Diagnóstico realizado em 1998 (SILVA, 1998).

As águas da "Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco" e afluentes, segundo a Resolução do CONAMA n° 357/05, se enquadram na classificação de água doce, classe 2, desta forma, podendo ser utilizada para o abastecimento doméstico após tratamento convencional.

No que se refere à questão ambiental, de acordo com estudos realizados desde 1998 através do "Diagnóstico da Bacia do Rio Pato Branco", a maioria das propriedades vizinhas da bacia hidrográfica não satisfazem as premissas legais que são 20% da área coberta com vegetação nativa (Reserva Legal) e 30 metros de cada lado do curso de água com mata ciliar, contribuindo assim para a inclusão de qualquer espécie química até o corpo d'água.

De acordo com dados apresentados pela SINDAG, a região sudoeste faz parte da rota do tráfico de agrotóxicos inclusive sendo um dos possíveis destinos finais desses produtos (proibidos ou ilegais), o monitoramento dos princípios ativos proibidos por lei é de grande relevância neste sistema hidrológico que se tem a suspeita da utilização de agroquímicos que não se conhece a procedência e formulação dos mesmos, especialmente porque a água desta bacia abastece a população da cidade de Pato Branco - PR.

A metodologia de MLLE proposta neste trabalho foi aplicada em amostras de águas coletadas da Bacia do Rio Pato Branco e seus afluentes. A coleta foi realizada a uma profundidade de 50 centímetros da superfície das águas, em períodos sem chuvas e fora da época de plantio. Foram determinados *in situ* os parâmetros: pH, temperatura da água e do ar. O pH manteve-se dentro do esperado para águas naturais, entre 6,5 a 7,3. A temperatura variou entre 15°C a 17°C, conforme tabela 15.

Para determinar a concentração dos agroquímicos na água fez-se uma pré-concentração destes, utilizando o frasco de Murray modificado, como solvente extrator foi usado o hexano e os demais fatores foram ajustados de acordo com as condições ótimas para extração, obtidas através do planejamento fatorial estudado neste trabalho.

Desta forma, cada amostra de águas coletada de cada afluente contribuinte da Bacia do Rio Pato Branco, recebeu 5g de NaCl, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl ou NaOH, 0,1Mol. dm<sup>-3</sup> (quando necessário) o tempo de agitação da amostra foi 10 minutos e o tempo de repouso também foi otimizado em 10 minutos. Os extratos depois de coletados foram armazenados em vials e analisados por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas.

Tabela 15

Descrição dos pontos de amostragem na Bacia do Rio Pato Branco: pH, temperatura do ar e temperatura da água

<b>Pontos de coleta - Local</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura do ar (°C)</b>	<b>Temperatura da água (°C)</b>
01 – Rio Divisa	7,3	15	17
02 – Rio Pinheiro	6,8	16	17
03 – Captação Rio Pato Branco	7,2	15	17
04 – Rio Lambedor	6,8	16	18
05 – Rio Mangueirinha	6,4	17	18
06 – Rio Panela	6,7	17	18

Os resultados obtidos através da cromatografia gasosa indicaram a presença dos três compostos organoclorados estudados neste trabalho no ponto 02 correspondente ao Rio Pinheiro. As amostras foram analisadas em duplicata e as concentrações obtidas para o Aldrin,  $\gamma$ -BHC (Lindane) e Heptacloro foram de 0,3 a 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  demonstrados na Tabela 16, indicando que essa região pode estar sendo contaminada com organoclorados em dias atuais mesmo estando proibidos ou ainda pode ser reflexo da utilização desses produtos em épocas passadas.

Tabela 16

Concentração de organoclorados nas amostras de águas naturais da Bacia do Rio Pato Branco

Ponto	Localização	Área/Cromatograma	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
01	Rio Divisa	0	0
02	Rio Pinheiro	Aldrin = 1395 (1)	0,394 (1)
		1720 (2)	0,485 (2)
		$\gamma$ -BHC = 2344 (1)	0,420 (1)
		2133 (2)	0,382 (2)
		Heptacloro = 1055 (1)	0,328 (1)
		1999 (2)	0,414 (2)
03	Captação Rio Pato Branco	0	0
04	Rio Lambedor	0	0
05	Rio Mangueirinha	0	0
06	Rio Panela	0	0

A concentração desses agentes tóxicos na água não é constante, pois o lançamento agrícola é intermitente, ou seja, não é contínuo. Desta forma, a presença desses compostos na água pode variar ao longo de um mesmo dia e, em escala maior ou menor, dependendo da diluição.

A Figura 25 apresenta o cromatograma referente às amostras de águas naturais contaminadas por organoclorados: Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro coletada no ponto 02 - Rio Pinheiro.

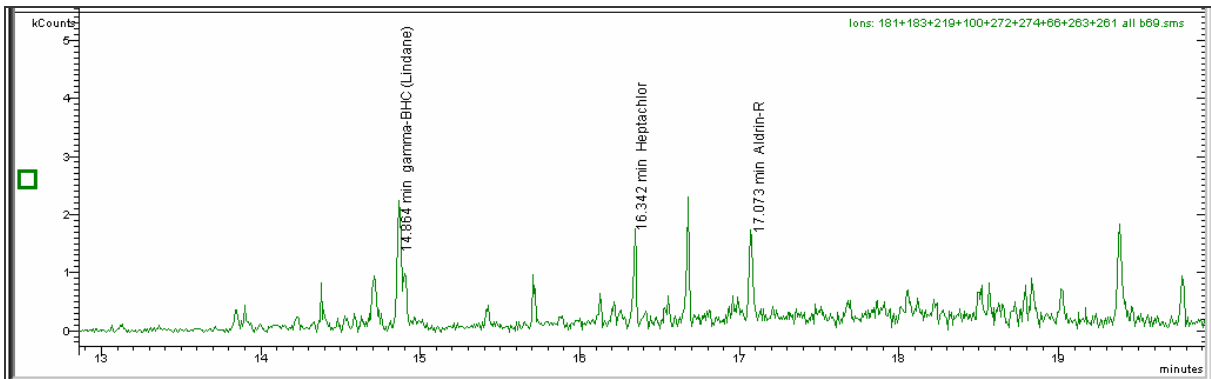


Figura 25: Cromatograma da amostra de águas naturais do ponto 02 - Rio Pinheiro, na presença dos agroquímicos Aldrin,  $\gamma$ -BHC (Lindane) e Heptacloro

Na observação visual, o Rio Pinheiro foi um dos pontos de coleta em que aparentemente a água era menos turva comparando como os demais. A turbidez das águas naturais, especialmente no caso dos rios, pode ser considerada como um fator positivo para a remoção dos organoclorados, pois no caso os agroquímicos ficam retidos na matéria orgânica (Amato, 2002). Levando em consideração esse conceito, há possibilidade dos outros afluentes também estarem contaminados por moléculas de organoclorados. Uma análise de água e sedimento poderia confirmar essa hipótese.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o método de microextração líquido-líquido, utilizando o frasco de Murray modificado, na pré-concentração dos agroquímicos organoclorados (Aldrin,  $\gamma$ -BHC(Lindane) e Heptacloro, foi eficiente, simples e rápido.

A utilização da técnica de MLLE em amostras de águas teve como característica relevante na preparação da amostra, a redução do volume de solvente orgânico utilizado na pré-concentração, diminuindo desta forma, rejeitos tóxicos que, em geral, são descartados para o meio ambiente e também ofereceu a vantagem de adequar o volume recuperado ao requerido pelas técnicas cromatográficas.

A utilização do planejamento fatorial de experimentos foi uma ferramenta estatística de extrema importância, pois permitiu extrair um número elevado de informações com um número mínimo de ensaios laboratoriais, oferecendo vantagens como: economia de tempo, diminuição nos gastos com reagentes e informações eficazes no processo de avaliação do método.

As melhores condições de análise demonstradas pelo método MLLE foram determinadas através da cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa. Para a pré-concentração dos analitos na amostra, o solvente orgânico que se mostrou mais eficiente foi o hexano e o volume utilizado foi de 1mL em 1 litro de amostra. Os solventes extratores utilizados na análise de agroquímicos podem ser particularmente problemáticos, pois as impurezas presentes desde o manuseio até o momento da análise podem dificultar a interpretação dos resultados obtidos.

As variáveis estudadas, através de planejamento fatorial de experimentos foram: pH,  $\mu$  e tempo de agitação da amostra. Os resultados obtidos demonstraram interação entre dois fatores e as combinações mais relevantes. Desta forma, o pH encontrado como adequado para a recuperação de todos os agroquímicos estudados foi na faixa de 7,0, sendo demonstrado ganhos entre 9,4 e 27,5 pontos percentuais comparados aos resultados de extração onde se trabalha com o pH 3,0.

A sensibilidade do método de microextração também aumenta quando existe a presença de sal na amostra. Os resultados demonstraram que quando utilizado o nível (-) do planejamento (5g de NaCl), há aumento na eficiência de recuperação do Aldrin e Heptacloro de 19,38 e 22,40 pontos percentuais. O  $\gamma$ -BHC(Lindane) foi o único que demonstrou a sua eficiência melhorada em 5,63 pontos percentuais,

quando se utilizou um nível (+)de  $\mu$ , nos experimentos, quando avaliado de forma isolada dos outros fatores.

O tempo de agitação da amostra foi analisado como um fator independente de acordo com o planejamento, pois através dos cálculos estatísticos foi demonstrado que não houve a interação entre o T.A com os outros dois fatores. Este fator foi analisado isoladamente e a condição mais adequada de trabalho foi a de 10 minutos para agitação da amostra.

A técnica permitiu a construção de curvas analíticas com coeficientes de correlação de 0,9892 para o Aldrin, 0,9986 para o  $\gamma$ -BHC(Lindane) e 0,9962 para o Heptacloro. Estes valores indicaram a linearidade da curva de calibração na faixa de  $0,4\mu\text{g. dm}^{-3}$  e  $4,800\mu\text{g. dm}^{-3}$ .

A metodologia, nas suas condições otimizadas como as melhores através do planejamento de experimentos, foi aplicada em amostras reais da Bacia Hidrográfica do Rio Pato Branco e seus afluentes, através da microextração líquido-líquido, com a utilização do frasco de Murray modificado, foram encontradas no ponto 02, referente ao Rio Pinheiro, concentrações entre  $0,3$  e  $0,5\mu\text{g.dm}^{-3}$ , dos organoclorados estudados, já proibidos em legislação desde 1985. As contaminações podem ter ocorrido pelo uso inadequado de produtos ilegais que não trazem especificações dos princípios ativos ou ainda pela aplicação em épocas passadas.

A procedimento analítico foi validado podendo ser recomendado para a pré-concentração e monitoramento de poluentes em nível de traço nas amostras de águas naturais. O custo é baixo, o processo de operação é fácil e relativamente rápido.



## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo de um procedimento para viabilizar mais de uma etapa de extração, utilizando a mesma amostra.

Verificação da influência da concentração salina em níveis diferentes dos realizados neste trabalho.

Avaliação das respostas em níveis de recuperação através de outros detectores, como ECD acoplado a cromatografia gasosa.

Quantificação e influência do volume de solvente extrator retirado de acordo com as concentrações adicionadas e retiradas, para verificar a estabilidade do sistema de acordo com o procedimento da análise.

## REFERÊNCIAS

AMATO, C. D'; TORRES, J. P. M.; MALM, O. **DDT(Dicloro Difenil, Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão.** Revista Química Nova, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, 995-1002, 2002.

ANA – Agência Nacional de Águas. **Catchment Restoration Programme Brazil.** Brasília: ANA, PRODES, 2001. Disponível em: <[www.ana.gov.br](http://www.ana.gov.br)> Acesso em: 26 abr. 2006.

ANDREOLI, C. V.; HOPPEN, C.; FERREIRA, A. C. **Avaliação dos Níveis de Agrotóxicos Encontrados na Água de Abastecimento nas Regiões de Curitiba e Londrina.** ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Curitiba, 2004.

ANDREU, V.; PICÓ, Y. **Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods.** Trends in Analytical Chemistry, Spain, v. 23, n. 10-11, 772-789, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RE,** número 899 de 29 de maio de 2003.

ATTYGALLE, A. B.; MORGAN, E. D. **Versatile Microreactor and Extractor.** Analytical Chemistry, Great Britain, v. 58, 3054-3058, 1986.

BAGHERI, H.; KHALILIAN, F. **Immersed Solvent Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometric Detection of s-triazine Herbicides in Aquatic Media.** Journal of chromatography A. Iran, v. 1046, n. 1-2, 27-33, 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental.** 2. ed. São Paulo: Bookmann, 2002.

BAKAN, G. E. U.; ARIMAN, S. **Persistent Organochlorine Residues in Sediments Along the Coast of Mid-Black Sea Region of Turkey.** Marine Pollution Bulletin, Turkey, v. 48(11-12), 1031-1039, 2004.

BALINOVA, A. **Strategies for Chromatographic Analysis of Pesticide Residues in Water.** Journal of Chromatography A. Bulgaria, n. 754, 125-135, 1996.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. **Comparison of Liquid-Liquid Extraction (LLE), Solid-Phase Extraction (SPE), and Solid-Phase Microextraction (SPME) for Pyrethroid Pesticides Analysis from Enriched River Water.** Magazine Environmental Contamination and Toxicology, São Carlos, n. 69, 123-128, 2002.

BARROS, NETO B. de; PIMENTEL, M.F; ARAÚJO, M.C.U.; **Recomendações para a Calibração em Química Analítica – Parte I. Fundamentos e Calibração com um componente (Calibração Univariada)** Revista Química Nova, Recife, v. 25, n. 5, 856-865, 2002.

BASHEER, C.; OBBARD, J. P.; LEE, H. K. **Analysis of Persistent Organic Pollutants in Marine Sediments using a Novel Microwave Assisted Solvent**

**Extraction and Liquid-Phase Microextraction Technique.** Journal of Chromatography A, Singapore, n. 1068, 221-228, 2005.

BORTOLUZZI, E. C.; SANTOS, D. R. dos; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R. **Contaminação de Águas Superficiais de Microbacias Hidrográficas por Agrotóxicos usados na Cultura do Fumo.** In: Reunião Brasileira de Manejo e Conservação de Solo e da água. Anais. UFSM, 2005.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.** In: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 julho 1989. Secção 1.

BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M. **Development and Validation of a Multi-Residue Analytical Methodology to Determine the Presence of Selected Pesticides in Water Through Liquid Chromatography.** Journal of the Brazilian Chemical Society, São Carlos, v. 16, n. 3B, 650-653, 2005.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. B. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** 2 ed. Campinas: UNICAMP, 1996.

BUCHMANN, J. H.; SARKIS, J. E de S. **O Conceito de Incerteza Aplicado aos Processos de Mediação Associados à preparação de uma Solução de Referência para Calibração.** Revista Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 1, 111-116, 2002.

CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J. **Gás Chromatography-high-resolution Time-of-Mass Spectrometry in Pesticide Residue Analysis: Advantages and a Limitations.** Journal of Chromatography A, Prague, v. 26, n. 1058, 251-261 2004.

CAMPANILLI, M. **Estudo Permite Identificar POPs em Mamíferos Marinhos.** Disponível em: <<http://www.estadão.com.br/ext/ciencia/oceanos/sinais/sinais5.htm>> Acesso em: 17 fev. 2004.

CARASEK, E. R.; PINI, G. F.; AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P. **Modificação de um Micro-extrator de Vidro para Pré-enriquecimento de Traços de Pesticidas Organoclorados de Água para Análise por Cromatografia Gasosa.** Revista Química Nova. Campinas, v. 21, 109-113, 1998.

CARAZEK, E. R. **Desenvolvimento de Métodos de Preparação de Amostras de Pesticidas Organoclorados e Compostos Orgânicos Voláteis, em uma Única Etapa, para Análise por Cromatografia Gasosa.** Campinas: UNICAMP, 1997. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

CARAZEK, E.; TONJES, J. W.; SCHARF, M. **Pré-concentração de Chumbo e Cádmio em um Sistema de Microextração Líquido e Determinação por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.** Revista Química Nova, Florianópolis, v. 25, n. 5, 748-752, 2002.

CETESB – **Manual de Produtos Químicos Perigosos.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/>> Acesso em: 12 jan. 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 2. ed. São Paulo: UNICAMP, 1990.

COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES. **Index of Common Names**. <<http://www.hclrss.demon.co.uk/sitemap.html>> Acesso em: 16 de jan 2006.

CONAMA – **RESOLUÇÃO N. 20, de 18 de junho de 1986**. Disponível em: <[www.mma.gov.br/por/conama/res/res](http://www.mma.gov.br/por/conama/res/res)> Acesso em: 17 mar. 2006.

DALVIE, M. A.; SINANOVIC, E.; LONDON, L.; CAIRNCROSS, E.; SOLOMON, A.; ADAM, H. **Cost Analysis of ELISA, Solid-phase Extraction, and Solid-phase Microextraction for the Monitoring of Pesticides in Water**. Environmental Research, South África, n. 98, 143-150, 2005.

DINIZ, M. C. T.; FATILBELLO FILHO, O.; ROHWEDDER J. R. **An Automated System for Liquid-Liquid Extraction based on a New Micro-Batch Extraction Chamber with on-line Detection Preconcentration and Determination of Copper(II)**. Analytica Chimica Acta, São Carlos, n. 525, 281-287, 2004.

DONG, C.; ZENG, Z.; LI, X. **Determination of Organochlorine Pesticides and their Metabolites in Radish After Headspace Solid-Phase Microextraction using Calyx(4)arene Fiber**. Talanta, China, 2005.

DOONG, R.; LEE, C. **Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Foods using Solid-Phase Extraction Clean-up Cartridges**. The Analyst, Taiwan, n. 124, 1287-1289, 1999.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. **Aplicação da Técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) na Análise de Pesticidas em Quiabo por CG-EM**. Revista Química Nova, São Cristóvão, v. 27, n. 6, 892-896, 2004.

DORES, E. F. G. C.; FREIRE, E. M. D. **Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticidas, Estudo de Caso: Águas usadas para Consumo Humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar**. Revista Química Nova, Cuiabá, v. 24, n. 1, 27-36, 2001.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. **Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Fluxo**. Revista Química Nova, Campinas, v. 21, 60-68, 1997.

FAO/WHO. **Codex Alimentarius**. v. 2, Pesticides residues in food. 2ed. Rome: FAO. Pt1: Methods of analysis and sampling, p.39-47. 2000

FARIA, L. J. S. **Avaliação de Diferentes Sorventes na Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. Desenvolvimento e Validação de Metodologia**. Campinas: UNICAMP, 2004. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

FATOKI, O. S.; AWOFOLU, R. O. **Methods for Selective Determination of Persistent Organochlorine Pesticide Residues in Water and Sediments by**

**Capillary Gas Chromatography and Electron-Capture Detection.** Journal of Chromatography A, South Africa, n. 983, 225-236, 2003.

FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; GOMES, M. A. F.; SANTOS, G. L. **Método para a Determinação de Hexazinone e Tebutiuron em Água.** Revista Química, Jaguariúna, v. 28, n. 3, 380-382, 2005.

FIDALGO-USED, N.; CENTINEO, G.; BLANCO-GONZÁLES, E.; SANZ-MEDEL, A. **Solid-Phase Microextraction as a Clean-up and Preconcentration Procedure for Organochlorine Pesticides Determination in Fish Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture Detection.** Journal of Chromatography A, Spain, n. 1017, 35-44, 2003.

FLORES, A. V.; QUEIROZ, M. E. L. R. de; NEVES, A. A.; GOULART, S. M. **Extração e Análise de Organoclorados em Sedimentos do Ribeirão São Bartolomeu, Viçosa – MG.** Revista Analytica, Campinas, n. 13, 42-47, 2004-a.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. de. **Organoclorados: Um Problema de Saúde Pública.** Revista Ambiente & Sociedade, São Paulo, v. 7, n. 2, 2004.

GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M. F. **Multiresidue Method for the Simultaneous Determination of Four Groups of Pesticides in Ground and Drinking Waters, using Solid-Phase Microextraction-gas Chromatography with Electron-capture and Thermionic Specific Detection.** Journal of Chromatography A, Portugal, n. 968, 177-190, 2002.

GRANDE, M. de; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, O. **Distribuição de Compostos Organoclorados nas Águas e Sedimentos da Bacia do Rio Piracicaba/SP.** Revista Química Nova, São Carlos, v. 26, n. 5, 678-686, 2003.

GROB, K.; GROB JUNIOR, K.; GROB, G. **Organic Substances in Potable Water and in its Precursor.** Journal of Chromatography, ETH Zürich, v. 106, n. 2, 299-315, 1975.

GROSSER, Z. A.; RYAN J. F.; DOND, M. W. **Environmental chromatographic methods and regulations in the U.S.A.** Journal of Chromatography A. v.642,75-87,1993.

GUZZELLA, L.; ROSCIOLI, C.; VIGANÓ, L.; SAHA, M.; SARKAR, S. K.; BHATTACHARYA, A. **Evaluation of the Concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the Sediments Along the Lower Stretch of Hugli Estuary, West Bengal, Northeast India.** Environment International. India, n. 31, 523-534, 2004.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** Rio de Janeiro: 6. ed. LTC, 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.**

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. **Otimização dos Parâmetros de Extração para Determinação Multi-resíduo de Pesticidas em Amostras de Água Empregando Microextração em Fase Sólida.** Revista Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, 720-724, 2004.

KONRADSEN, F.; VAN DER HOEK, W.; AMERASINGHE, F.P.; MUTERO, C. & BOELEEE, E. **Engineering and malaria control: learning from the past 100 years.** Acta Tropica, v. 89, 99-108, 2004.

KRUTZ, L. J.; SENSEMAN, S. A.; SCIUMBATO, A. S. **Solid-Phase Microextraction for Herbicide Determination in Environmental Samples.** Journal of Chromatography A, Texas, n. 999, 103-121, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** São Carlos: RiMa, 2004.

LEITE, F. **Validação em Análise Química.** 4. ed. Campinas: Átomo, 2002.

LOPES, W. G.; DÓREA, H. S. **Determinação de Pesticidas em Feijão por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS).** Revista Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, 73-82, 2003.

LÓPEZ-BLANCO, M. C.; BLANCO-CID, S.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. **Application of Single-Drop Microextraction and Comparison with Solid-Phase Microextraction and Solid-Phase Extraction for the Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan in Water Samples by Gas Chromatography-Electron-Capture Detection.** Journal of Chromatography A, Spain, n. 984, 245-252, 2003.

LUTHJE, K.; HYOTYLAINEN, T.; RIEKKOLA M. L. **On-line Coupling of Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography in the Analysis of Organic Pollutants in Water.** Anal Bioanal Chem n. 378, 1991-1998, 2004.

LYYTIKÄINEN, M.; KUKKONEN, J. V. K.; LYDY, M. J. **Analysis of Pesticides in Water and Sediment Under Different Storage Conditions using Gas Chromatography.** Environmental Contamination and Toxicology, Finland, n. 44, 437-444, 2003.

MACÊDO, J. A. B. de. **Introdução a Química Ambiental - Química & Meio Ambiente & Sociedade.** Juiz de Fora: CRQ-MG, 2002.

MELLO, N. A.; BELLO, I. C. R. **Avaliação de Turbidez, Uso da Terra, Uso do Solo e Qualidade da Água em um Rio da Região Sudeste do Brasil.** In: ISCO Conference, 12 th, 2002, Beijing. **Conference**, 149-153.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 04/DISAD/MS, de 30 de abril de 1980. Classificação dos Defensivos Agrícolas em classes de risco agudo para a saúde. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=17697>> Acesso em: 24 jan 2006.

MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria n. 8 de 26 de janeiro de 1998. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sqa/mercosul/docmerc/atas/ata402/questi.html>> Acesso em: 02 mar 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 329/2002, de 02 de setembro de 1985. Proibir, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/legislacao/port329.asp>> Acesso em: 10 de mar 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10959>> Acesso em: 12 mar 2006.

MONTGOMERY, J. H. **Agrochemicals Desk Reference**. 2. ed. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1997.

MOZAZ, S. R.; ALDA, M.J. L. de; BARCELÓ, D. **Monitoring of Estrogens, Pesticides and Bisphenol A in Natural Waters and Drinking Water Treatment Plants by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. Journal of Chromatography A. Barcelona, n. 1045, 85-92, 2004.

MÜHLEN, C. V.; LANÇAS, F. M. **Cromatografia Unificada**. Revista Química Nova, São Carlos, v. 27, n. 5, 747-753, 2004.

NEUMAN, R. C. **Experimental Design for Non-statiscians**. Journal of Vinyl Technology, v. 15 (1), 34-37, 1993.

OLIVEIRA, R. M; BRILHANTE, O. M.; MOREIRA, J. C.; MIRANDA, A. C. **Contaminação por Hexaclorociclohexanos em Área Urbana da Região Sudeste do Brasil**. Revista Saúde Pública, v. 29(3), 228-233, 1995.

OLIVEIRA, R. T.S.; MACHADO, S. A. S. **Quantificação do Pesticida Diclorvos por Voltametria de Onda Quadrada em Águas Puras e Naturais**, Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 6, 911-915, 2004.

PEREZ-TRUJILLO J. P.; FRIAS S.; CONDE J. E.; RODRIGUEZ-DELGADO M. A. **Comparison of Different Coatings in Solid-Phase Microextraction for the Determination of Organochlorine Pesticides in Ground Water..** Journal of Chromatography A, Spain, n. 963, 95-105, 2002.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluídos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica**. Revista Química Nova, Campinas, v. 24, n. 1, 68-76, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Revista Química Nova, Campinas, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. **Determinação de Pesticidas Organoclorados em Água de Manancial, Água Potável e Solo na Região de Bauru (SP)**. Revista Química Nova, Bauru, v. 27, n. 5, 739-743, 2004.

ROBERTS, T., HUTSON, D. **Metabolic pathways of Agrochemicals - Part two - Inseticides and Fungicides**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, v. 3, 1460-1468, 1999.

ROUTTI, H.; NYMAN, M.; BACKMAN, C.; KOISTINEN, J.; HELLE, E. **Accumulation of dietary organochlorines and vitamins in Baltic seals**. Marine Environmental Research, Finland, v. 06, 267-287, 2005.

SANTOS NETO, A. J. dos; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. **Análise de Praguicidas Organofosforados em Água por Extração em Fase Sólida (SPE) utilizando Discos C18 e Cromatografia em Fase Gasosa: Avaliação da Contaminação do Reservatório de Furnas (MG – Brasil)**. Revista Química Nova, Alfenas, v. 28, n. 5, 747-750, 2005.

SHERMA, J. **Thin-Layer Chromatography of pesticides - A Review of Applications for 2002-2004**. Acta Chromatographica, Easton, n. 15, 2005.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L.; CARVALHO, C. R. de. **Determinação de Pesticidas Organofosforados em Água usando Microextração em Fase Sólida e CGAR-EM**. Revista Química Nova, São Paulo, v. 22, n. 2, 5-30, 1999.

SILVA, M. R. da; TONIAL, I. B. **Verificação dos Teores Residuais de Agroquímicos Organoclorados em Águas, no Rio Chopim e seus Afluentes: Rio Caldeiras, Rio Bandeira e Rio Lontras no Município de Palmas - PR**. Revista Brasileira de Recursos Hídricos, Blumenau, v. 9, 261-269, 2004.

SILVA, N. L. S. da.; MELLO, N. A. M. de.; BRAIDA, J. A. Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. CEFET-PR. **Diagnóstico da Bacia do Rio Pato Branco no Município de Mariópolis – PR**. Pato Branco: 1998, Relatório de Estágio.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/new/informativo>> Acesso em: 29 out 2005.

SOLOMONS, T. W. G.; **Química Orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996.

**Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.**; ASSOCIATION, AMERICAN WATER, WORKS, EATON, ANDREW, D. 1998.

TAHBOUB, Y. R.; ZAATER, M. F.; AL-TALLA, Z. A. **Determination of the Limits of Identification and Quantitation of Selected Organochlorine and Organophosphorous Pesticide Residues in Surface Water by Full-Scan Gas**



**Chromatography/Mass Spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1098, n. 1-2, 150-155, 2005.

TEÓFILO, R. F., FERREIRA, M. M. C.; **Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um tutorial.** Revista Química Nova, Campinas, v. 29, n. 2, 338-350, 2006.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P. **Contaminação de Águas por BTXS e Processos utilizados na Remediação de Sítios Contaminados.** Revista Química Nova, Curitiba, v. 27, n. 3, 441-446, 2004.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. **Validação de Métodos Cromatográficos em Análise de Resíduos de Pesticidas.** Resumo Expandido, Arq. Inst. Biol, São Paulo, v. 71, 1-749, 2004.

ZAPF, A.; HEYER, R.; STAN, H. J. **Rapid Micro Liquid-Liquid Extraction Method for Trace Analysis of Organic Contaminants in Drinking Water.** Journal of Chromatography A, Germany, N. 694, 453-461, 1995.