

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA COM
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA**

BLUMENAU – SC

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA MENEZHINI

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA COM
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA**

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

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA COM
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA**

Por

ROBERTA MENEHINI

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. Luiz Augusto dos Santos Madureira - UFSC

Membro: Prof. Dr. Paulo Cesar de Jesus - FURB

Blumenau, setembro de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Ao meu esposo Leocir pelo amor sempre dedicado...

Aos meus pais: Genor e Orildes, que abriram as portas do meu futuro, iluminando o meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar...
O estudo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Doutor Marcos Rivail da Silva pelo compromisso que assumiu, orientações profissionais e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Mestre Alberto Wisniewski Júnior pelas essenciais contribuições para o desenvolvimento desta dissertação. Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha existência e por ter me permitido alcançar mais esta etapa de minha vida;

Aos meus professores da FURB: Ricardo Andrade Rebello, Ieda Maria Begnini, Edésio Simionatto, pelos conhecimentos e colocações durante as disciplinas cursadas;

Aos professores da UFSC: Eduardo Carasek da Rocha e Luiz Madureira, pelas contribuições na parte experimental;

A CAPES pela bolsa de estudos concedida;

As minhas colegas e amigas: Beth, Vanessa e Cleci;

Aos meus colegas da FURB: Aneli, Daniela, Adolfo, Gílson, Jussara, Ana Paula, Patrícia, Rafael;

Aos meus amigos do laboratório: Patrícia e Rodrigo;

Aos meus irmãos: Edi-Roni, Simone, Paulo Roberto e Tafarel;

A minha tia Sirlei;

Ao amigo Adenílson que conheci a partir da coleta de amostras;

A direção da Escola Estadual Castro Alves, principalmente ao Véio, pelas liberações e incentivos a estudar.

*“Não é a força, mas
a perseverança que realiza
grandes sonhos”.*

S. Johnson

RESUMO

Muitos resíduos de agroquímicos orgânicos estão presentes em águas em baixas concentrações. Devido a isto, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras que possibilitem a pré-concentração dos analitos presentes na matriz para adequar ao sistema de detecção. Foi empregado neste trabalho como método analítico a microextração líquido-líquido, utilizando o frasco extrator de Murray modificado para extração dos contaminantes, usando hexano como solvente extrator, sendo posteriormente aplicado em amostras de águas naturais. Os agroquímicos organofosforados analisados e estudados foram: Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos. Utilizou-se para a separação dos agroquímicos a Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa (CG-EM). O volume da amostra utilizada na extração foi de 1000mL. Parâmetros significantes como, o tempo de agitação, o pH, a força iônica, a forma e o tempo de agitação do sistema foram testados e avaliados na pré-concentração dos analitos. A pré-concentração dos analitos foi realizada com o tempo de agitação de 10 minutos. A adição de Cloreto de Sódio (NaCl), na quantidade de 2,0 mol/L, melhorou os resultados de recuperação para todos os agroquímicos em comparação com as faixas de concentração de 0,1 a 3,0 mol/L. Outro fator importante na comparação foi a faixa de pH utilizada, que foi ajustada com ácido clorídrico para pH igual a 5,0, já que em solução alcalina ocorre instabilidade das moléculas. Na separação cromatográfica, bons resultados para os tempos de retenção foram obtidos, estando numa faixa de 15,239 a 16,893 minutos. Os limites de detecção e quantificação estiveram entre 0,083 a 0,756µg/L e 0,254 a 2,292µg.L⁻¹, respectivamente. O método desenvolvido permitiu a determinação dos agroquímicos em estudo numa faixa de até 21 pontos percentuais em amostras de água do Rio da Várzea.

PALAVRAS-CHAVE: Agroquímicos, microextração líquido-líquido, água.

ABSTRACT

Many organic agro-chemicals residues are presented in low concentrations waters. Due to this, has been increasing the interest on the development of sample preparation techniques that give the possibility of analits pre concentration present in the matrix to adjust in the detection system. In this work, was used analytical method, the liquid-liquid microextraction, using the modified Murray`s extraction bottle to extract the contamination agents, using hexane as extraction solvent, being later applied in samples of natural water. The analysed and studied organophosphorated agro-chemicals were: dissulfoton, paration methyl, chloryirifos and fenclorfos. The Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection (GC-MS) was used for the agro-chemicals identification. The volume of the sample used in the extraction was 1000mL. Significant parameters like: the agitation time, the pH, the ionic strength, the way and time of the system`s agitation were tested and valued in the analits pre concentration was carried analitos it was carried out with the best agitation time of 10 minutes. The addition of 2,0 mol/L of sodium chloride salt (NaCl), improved the recovery results for all the agro-chemicals in comparison with the concentration range from 0,1 to 3,0 mol/L. Another important factor in the comparison was the pH range used, which was adjusted with hydrochloric acid (HCl) to 5,0 pH once that in alkaline solution the instability of the molecules takes place. In the chromatography separation, good results for the retention times were obtained, being in a rate between 15.239 to 16.893 minutes. The limits of detection and quantification were between 0,083 to 0,756 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 0,254 to 2,292 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The developed method allowed the determination of the agro-chemicals in study in rate of until 21 per cent in samples of water Várzea in river.

Key-Words: agro-chemicals, liquid-liquid microextraction, water.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Distribuição dos agroquímicos comercializados no Brasil..... | 20 |
| Figura 2: Representação esquemática dos processos de transporte ambiental, possíveis para um agente liberado em um corpo hídrico..... | 21 |
| Figura 3: Ilustração de vários fenômenos que podem afetar a qualidade da água..... | 23 |
| Figura 4: Fórmulas estruturais de alguns agroquímicos da classe organofosforados..... | 27 |
| Figura 5: Frasco de microextração líquido-líquido modificado..... | 38 |
| Figura 6: Frasco de microextração..... | 39 |
| Figura 7: Esquema de representação de um cromatógrafo gasoso..... | 41 |
| Figura 8: Processo de operação da microextração líquido-líquido..... | 47 |
| Figura 9: Localização no mapa do rio em estudo..... | 53 |
| Figura 10: Representação dos pontos de coleta das amostras de água do Rio da Várzea..... | 53 |
| Figura 11: Efeito do tipo de solvente extrator sobre a recuperação dos agroquímicos..... | 56 |
| Figura 12: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Dissulfoton. | 58 |
| Figura 13: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Paration Metílico..... | 59 |
| Figura 14: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Clorpirifos. | 59 |
| Figura 15: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Fenclorfos. | 60 |
| Figura 16: Efeito do pH na extração dos agroquímicos organofosforados, com adição de $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ em água ultrapura e concentração salina de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl..... | 61 |
| Figura 17: Fragmentograma do extrato obtido pela agitação manual do frasco micro extrator por um período de tempo igual a 10 minutos..... | 63 |
| Figura 18: Fragmentograma do extrato obtido pela agitação magnética do frasco micro extrator por um período de tempo igual a 10 minutos..... | 64 |
| Figura 19: Efeito dos diferentes períodos de tempo de agitação do sistema..... | 65 |
| Figura 20: Intensidade de Sinal em função da concentração de Dissulfoton..... | 66 |
| Figura 21: Intensidade de Sinal em função da concentração de Paration Metílico..... | 67 |
| Figura 22: Intensidade de Sinal em função da concentração de Clorpirifos..... | 67 |
| Figura 23: Intensidade de Sinal em função da concentração de Fenclorfos..... | 68 |
| Figura 24: Fragmentograma parcial com a indicação da seletividade do agroquímico Dissulfoton..... | 70 |
| Figura 25: Fragmentograma parcial com a indicação da seletividade do agroquímico Paration Metílico..... | 71 |
| Figura 26: Cromatograma obtido para o branco, após microextração líquido-líquido..... | 72 |
| Figura 27: Cromatograma obtido para uma amostra controle | 72 |
| Figura 28: Dispersão do solvente no braço lateral do frasco microextrator..... | 76 |
| Figura 29: Cromatograma obtido com o método CG-EM para a amostra de água coletada no Rio da Várzea. P-3..... | 78 |
| Figura 30: Cromatograma obtido com o método CG-EM para a amostra de água coletada no Rio da Várzea. P-4..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agroquímicos em função da LD ₅₀ | 24 |
| Tabela 2 – Valores Máximos Permitidos (VMP) em $\mu\text{g.L}^{-1}$ para alguns agroquímicos em águas destinados ao consumo | 24 |
| Tabela 3 – Níveis permitidos para alguns agroquímicos selecionados, presentes em água potável... 25 | |
| Tabela 4 – Relação dos agroquímicos organofosforados analisados, seus respectivos tempos de retenção e os íons característicos..... | 52 |
| Tabela 5 – Volume total do solvente extraído da mistura com a água para cinco amostras..... | 55 |
| Tabela 6 – Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação dos agroquímicos organofosforados Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos. Valores expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 58 |
| Tabela 7 – Diferença porcentual nas extrações quando comparadas a adição de NaCl à 0,1 mol.L ⁻¹ e 2,0 mol.L ⁻¹ | 60 |
| Tabela 8 – Comparação da eficiência das extrações para as diferentes formas de agitação do sistema. | 62 |
| Tabela 9 – Recuperação dos agroquímicos organofosforados em diferentes períodos de tempo de agitação do sistema. Valores expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 64 |
| Tabela 10 – Resultados do estudo de linearidade..... | 69 |
| Tabela 11 – Valores do limite de detecção e quantificação para os agroquímicos organofosforados em estudo..... | 69 |
| Tabela 12 – Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Dissulfoton..... | 73 |
| Tabela 13 – Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Paration Metílico..... | 74 |
| Tabela 14 – Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Clorpirifos..... | 74 |
| Tabela 15 – Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Fenclorfos..... | 74 |
| Tabela 16 – Teores de agroquímicos encontrados em água do Rio da Várzea. Os valores estão expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 77 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CE | Comunidade Européia |
| CGAR-EM | Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Detector por Espectrometria de Massa |
| CG-DNF | Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio e Fósforo |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DDT | Dicloro Difenil Tricloroetano |
| DP | Desvio Padrão |
| EC | Comunidade Européia |
| EFSC | Extração com Fluido Supercrítico |
| EPA | Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) |
| GPS | Global Positioning System |
| HPLC-MS | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa |
| IAEA | International Atomic Energy Agency (Agência Internacional de Energia Atômica) |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Nacional |
| Kd | Constante de Distribuição |
| LD ₅₀ | Dose Letal para 50 % da espécie testada |
| LLE | Extração Líquido-Líquido |
| LOD | Limite de Detecção |
| LOQ | Limite de Quantificação |
| MEFS | Microextração Fase Sólida |
| MILLE | Microextração Líquido-Líquido |
| pH | Potencial de Hidrogeniônico |
| rpm | Rotação por minutos |
| R ² | Coeficiente de Correlação |
| RSD | Desvio Padrão Relativo |
| SPD | Sistema de Plantio Direto |
| SPE | Extração em Fase Sólida |
| SPME | Microextração em Fase Sólida |
| µg.L ⁻¹ | Micrograma por Litro |
| µL | Microlitros |
| VMP | Valor Máximo Permitido |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 15 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 17 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 17 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1 A IMPORTÂNCIA DO USO DOS AGROQUÍMICOS..... | 18 |
| 2.2 O USO DOS AGROQUÍMICOS NO BRASIL..... | 19 |
| 2.3 DISPERSÃO DOS AGROQUÍMICOS..... | 20 |
| 2.4 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR AGROQUÍMICOS..... | 21 |
| 2.5 TOXICOLOGIA DOS AGROQUÍMICOS | 23 |
| 2.6 AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS – CARACTERÍSTICAS E ESTRUTURAS..... | 26 |
| 2.7 ESCOLHA DOS AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS | 28 |
| 2.7.1 Dissulfoton | 28 |
| 2.7.2 Paration Metílico | 29 |
| 2.7.3 Clorpirifos | 30 |
| 2.7.4 Fenclorfos | 31 |
| 2.8 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA | 32 |
| 2.8.1 Técnicas de Extração de Agroquímicos em Água | 32 |
| 2.8.1.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)..... | 33 |
| 2.8.1.2 Extração em Fase Sólida (SPE)..... | 35 |
| 2.8.1.3 Microextração em Fase Sólida (SPME)..... | 36 |
| 2.8.1.4 Microextração Líquido-Líquido (MLLE)..... | 36 |
| 2.8.2 Métodos Cromatográficos na Análise de Agroquímicos | 40 |
| 2.9 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 41 |
| 2.9.1 Seletividade | 42 |
| 2.9.2 Linearidade e Faixa de Aplicação | 42 |
| 2.9.3 Precisão | 42 |
| 2.9.4 Exatidão | 43 |
| 2.9.5 Limite de Detecção (LOD) | 44 |
| 2.9.6 Limite de Quantificação (LOQ) | 44 |
| 2.9.7 Robustez | 44 |
| 3 METODOLOGIA..... | 45 |
| 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1.1 Reagentes e Solventes | 45 |
| 3.1.2 Limpeza da Vidraria | 45 |
| 3.1.3 Condições Cromatográficas | 45 |

| | |
|--|----|
| 3.1.4 Solução Padrão | 46 |
| 3.2 EXTRAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS | 46 |
| 3.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO | 47 |
| 3.3.1 Escolha do Solvente Extrator | 48 |
| 3.3.2 Efeito da Concentração Salina | 48 |
| 3.3.3 Efeito do pH | 49 |
| 3.3.4 Forma e Tempo de Agitação do Sistema | 49 |
| 3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM ÁGUA | 50 |
| 3.4.1 Curva Analítica | 50 |
| 3.4.2 Detectabilidade | 50 |
| 3.4.3 Recuperação | 51 |
| 3.4.4 Linearidade e Faixa Linear | 51 |
| 3.4.5 Seletividade | 51 |
| 3.5 AMOSTRAGEM..... | 52 |
| 3.5.1 Coleta e Preservação das Amostras..... | 54 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO..... | 55 |
| 4.1.1 Escolha do Solvente Extrator | 55 |
| 4.1.2 Valores de Recuperação dos Agroquímicos sob Efeito da Concentração Salina | 57 |
| 4.1.3 Avaliação do pH da Amostra | 61 |
| 4.1.4 Influência da Forma de Agitação do Sistema | 62 |
| 4.1.5 Influência do Tempo de Agitação do Sistema | 64 |
| 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS EM ÁGUA | 66 |
| 4.2.1 Linearidade | 66 |
| 4.2.2 Valores de Detectabilidade | 69 |
| 4.2.3 Seletividade | 70 |
| 4.2.4 Recuperação dos Agroquímicos | 71 |
| 4.3 AMOSTRA REAL | 76 |
| | |
| CONCLUSÃO..... | 80 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 83 |

INTRODUÇÃO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Devido à utilização cada vez mais intensa de inúmeros agroquímicos nas atividades agrícolas, graves prejuízos têm sido observados no meio ambiente e na saúde humana. Têm-se buscado, portanto, incrementos nos meios de produção e condições sanitárias favoráveis para evitar tais prejuízos. No entanto, o aparecimento de populações de pragas resistentes aos agroquímicos existentes, proporcionando um aumento na densidade populacional das mesmas, tornando-as competidoras em potencial por espaço físico e alimentação, tem sido largamente observado.

Levado pela necessidade em controlar populações de pragas cada vez mais resistentes ao uso dos produtos já existentes, surgiu no mercado produtos sintéticos, entre os quais encontra-se a classe dos agroquímicos organofosforados, objeto de nosso trabalho. Estes agroquímicos surgiram em substituição aos agroquímicos organoclorados, por possuírem uma degradação no solo mais rápida.

Os agroquímicos podem ser classificados de acordo com o tipo de aplicação como algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas, moluscidas, nematocidas, ovicidas, entre outros. Além disso, podem ser incluídas substâncias desfolhantes, dessecantes ou reguladoras do crescimento de plantas ou insetos. Os tipos e categorias de agroquímicos conhecidos classificam-se em: ocorrência natural, seus derivados e cópias antrópicas, organoclorados, organofosforados, carbamatos, biperidílicos, clorofenóxidos, amidas e nitrogenados.

Devido a sua persistência os agroquímicos podem ser encontrados nos diferentes compartimentos ambientais. No ar, são originários dos procedimentos de pulverizações na forma de aerossóis. No solo são encontrados devido aos derramamentos ou descartes inadequados, que por percolação podem atingir lençóis de águas subterrâneas. Em águas superficiais são originários do carregamento através de chuvas e derramamentos.

Dentre as propriedades dos agroquímicos, a mais importante é a capacidade em

destruir, causando devido a sua toxicidade, inúmeros malefícios à natureza, trazendo como consequência o impacto ambiental negativo.

Dentre os tipos de agroquímicos citados acima, os organofosforados, objeto de nosso estudo, degradam-se rapidamente, devido a isso, ocupam atualmente um lugar preponderante entre os compostos mais utilizados na agricultura, apesar de sua principal limitação, a alta toxicidade.

No caso de amostras aquosas, a determinação de agroquímicos organofosforados usualmente é precedida por etapas de pré-concentração e extração dos analitos, antes de se efetuar a quantificação dos mesmos. Dentre as técnicas de extração, destaca-se a microextração líquido – líquido, onde o volume do solvente orgânico utilizado é reduzido, e somente uma etapa de manipulação é necessária, reduzindo problemas de contaminação e perdas do analito. Trata-se de um procedimento analítico rápido e de baixo custo para a pré-concentração de agroquímicos organofosforados, utilizando cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa. Esta metodologia analítica utilizada para detectar agroquímicos organofosforados em amostras de águas naturais em concentração que a legislação vigente permite, possui grande confiabilidade e muito boa sensibilidade.

Desde o início da década de 80, o uso de agroquímicos organoclorados foi proibido no Brasil, em consequência, tem aumentado o uso dos agroquímicos organofosforados. Sabe-se que em inúmeros casos, resíduos dessas espécies químicas têm sido encontrados em águas e cuja origem está relacionada ao combate de pestes em diversas culturas agrícolas. Em nosso trabalho, desenvolvemos e validamos uma metodologia para a determinação destes resíduos. O desenvolvimento da metodologia se deu, empregando um processo de microextração líquido-líquido em um frasco extrator, denominado frasco modificado de Murray, verificando a eficiência de extração frente a diversos parâmetros experimentais. Com o método desenvolvido, analisamos a água superficial do Rio da Várzea que circunda vários municípios da região do Alto Uruguai – RS, com objetivo de encontrar os teores residuais destes agroquímicos organofosforados.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para determinar agroquímicos organofosforados em água, empregando a técnica de microextração líquido-líquido.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o pH, força iônica, solvente extrator, forma e tempo de agitação para pré-concentrar agroquímicos organofosforados em amostras de águas naturais.
- Utilizar técnicas de amostragem, coleta e preservação de amostras de águas naturais para a verificação de teores de agroquímicos organofosforados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DO USO DOS AGROQUÍMICOS

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) define agroquímicos como qualquer substância ou mistura de substâncias com a capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste. São destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais. Segundo a ANVISA, a finalidade dos agroquímicos é alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa dos seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

A utilização de compostos químicos como agroquímicos, utilizados no controle e combate às pestes é bastante antiga, tendo sido utilizado pela primeira vez em 1000 a.C. por Homero, que utilizou enxofre. Partindo desta data, os agroquímicos foram se intensificando cada vez mais; em 900 a.C. existem registros de que os romanos usavam venenos para controlar insetos roedores. Os chineses fizeram uso de arsênico, também o tabaco começou a ser usado em 1690 como agroquímico de contato (SHEPPARD, 1951).

A partir do século XVIII surgiram as sínteses a nível industrial, substituindo extratos naturais, vegetais e minerais. O primeiro agroquímico sintético produzido foi o diclo difenil tricloroetano (DDT), por Zeidler em 1874 na Alemanha (MARICONI, 1983).

A agricultura praticada em nosso país é altamente dependente de insumos químicos, dentre os quais, os agroquímicos popularmente denominados de agrotóxicos ou ainda defensivos agrícolas. Eles têm sido utilizados na tentativa de controlar uma grande variedade de pragas, doenças e ervas daninhas que infestam lavouras, garantindo assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, o retorno econômico da atividade agrícola. Sem o uso dos agroquímicos, a produção e a qualidade dos

alimentos é drasticamente afetada.

O uso indiscriminado e a persistência dos agroquímicos têm levado ao aparecimento de resíduos que podem ser encontrados nos diferentes compartimentos ambientais. No ar, são originários dos procedimentos de pulverizações na forma de aerossóis. No solo, são encontrados devido aos derramamentos ou descartes inadequados, que por percolação podem atingir lençóis de águas subterrâneas. Em águas superficiais são originários do carregamento através de chuvas e derramamentos (BRUZZONITI, 2000; BALINOVA, 1996). Diante desse fato e da periculosidade que os agroquímicos apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, há necessidade de se intensificarem estudos que possibilitam um monitoramento eficiente de possíveis contaminações do ambiente, visando reduções dos riscos de contaminação. Contudo, muitos agroquímicos foram proibidos devido à constatação dos efeitos cumulativos e prejudiciais, que ocorrem pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (JORGENSEN, 2001).

2.2 O USO DOS AGROQUÍMICOS NO BRASIL

O Brasil é o quarto maior mercado de agroquímicos no mundo e o oitavo em uso por área cultivada. Até dezembro de 1999, 322 ingredientes ativos tiveram seu uso aprovado no país com quase 2.000 produtos registrados, os quais incluem inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores de crescimento, feromônios, moluscidas e protetores de sementes. Cerca de 2.300 limites máximos de resíduos foram estabelecidos em 265 culturas (RAND, 1985).

De acordo com a ANVISA, cerca de 88% do total dos agroquímicos que são comercializados no Brasil estão distribuídos nos Estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. As culturas de soja, milho, citros e cana-de-açúcar consomem cerca de 66% do total, sendo que apenas a cultura de soja é responsável pelo consumo de 33% dessa quantidade. A distribuição percentual dos agroquímicos comercializados no Brasil está representada na Figura 1.

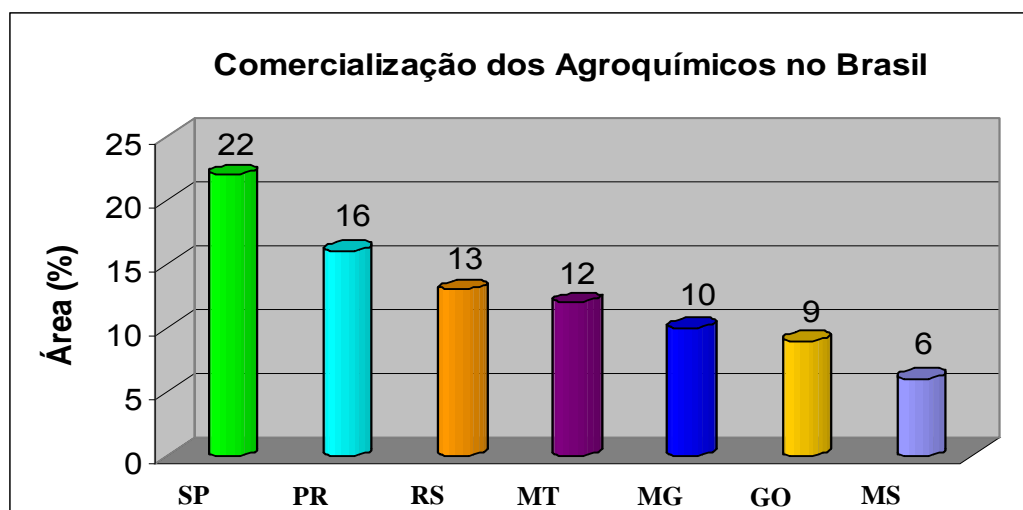


Figura 1: Distribuição dos agroquímicos comercializados no Brasil.

2.3 DISPERSÃO DOS AGROQUÍMICOS

Apesar dos benefícios que trazem os agroquímicos, o problema das intoxicações devido a eles, preocupa as autoridades, especialmente se essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que venham a contaminar a água, o solo e uma variedade de alimentos (RAND, 1985). Geralmente são aplicados sobre as plantas ou diretamente no solo, porém, mesmo quando aplicados sobre as plantas, cerca de 90% da dose aplicada poderá ter como destino final o solo. Após o agroquímico chegar ao solo, ele poderá ter seu destino influenciado por três formas principais de transporte: volatilização, lixiviação e escoamento superficial (MURTI, 1991).

A transferência do agroquímico do solo para a atmosfera corresponde à volatilização. Com relação à contaminação dos recursos hídricos, a volatilização dos agroquímicos possibilita o carregamento desses compostos através da atmosfera e posteriormente à deposição na água superficial através das chuvas.

A lixiviação corresponde ao transporte vertical dos agroquímicos no perfil do solo juntamente com a água da chuva ou irrigação que desce pelos poros, sendo apontada como a principal causadora da contaminação das águas subterrâneas (lençol freático).

O transporte dos agroquímicos através da água de enxurrada na superfície do solo, que pode ter como destino final os rios e lagos, ocasionando suas contaminações, corresponde ao escoamento superficial. A adoção da prática do Sistema de Plantio Direto (SPD) serve de exemplo para diminuir a formação de enxurradas. Contudo, causa diminuição do escoamento superficial e, conseqüentemente, a poluição dos rios e lagos, onde permanece constante a cobertura vegetal no solo. A Figura 2 representa a trajetória dos contaminantes químicos desde a liberação no meio ambiente até o organismo humano.

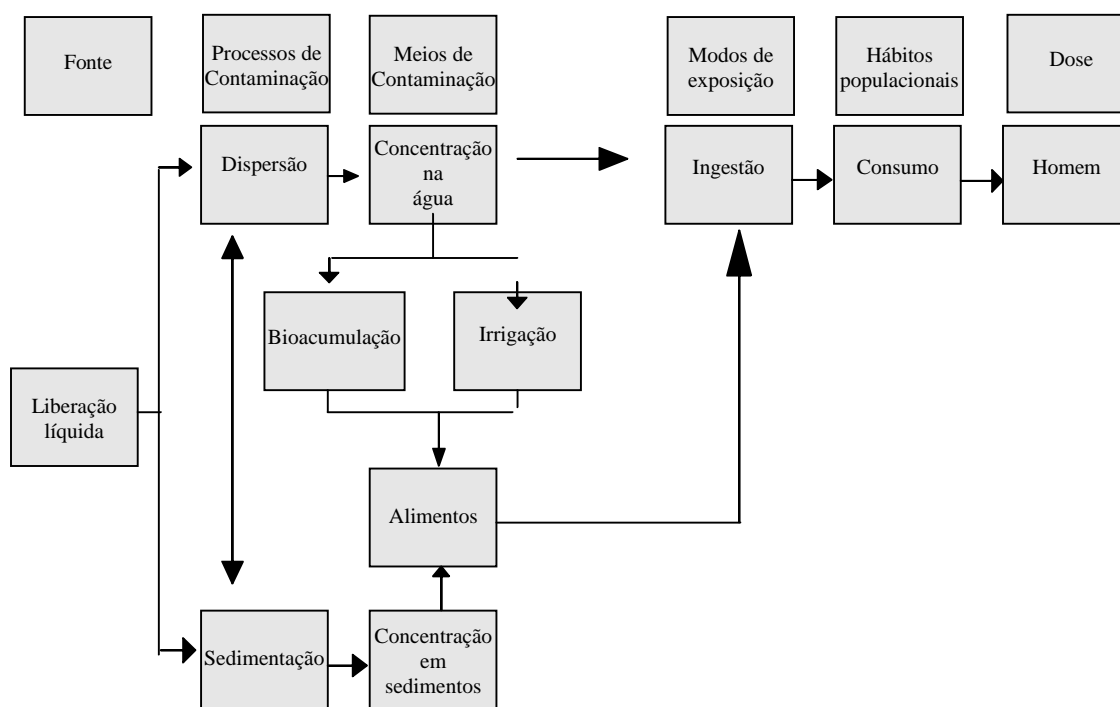


Figura 2: Representação esquemática dos processos de transporte ambiental, possíveis para um agente liberado em um corpo hídrico.

Fonte: IAEA, 1986

2.4 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR AGROQUÍMICOS

A água é necessária para todas as formas de vida na terra, em especial os recursos de água doce, indispensáveis para todos os ecossistemas terrestres. Além

disso, transportam diversos compostos nutritivos para o interior do solo e ajudam a controlar a temperatura da atmosfera.

A poluição das águas é consequência da atuação do homem sobre o meio ambiente. O despejo de substâncias tóxicas pela agricultura é uma das fontes de contaminação das águas, pois cada vez mais se utilizam inseticidas, herbicidas, fungicidas e toda uma série de praguicidas.

A concentração da maioria das substâncias químicas em água é baixa em parte, devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis, e em parte devido ao efeito da diluição (DORES, 2001). No entanto, não exclui a possibilidade de ocorrer concentrações altas depois de pesadas chuvas, quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses de substâncias tóxicas. Mesmo em concentrações baixas, essas substâncias tóxicas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos.

Muitos processos bioquímicos podem afetar a qualidade da água, principalmente a biodegradação da matéria orgânica e a eutrofização. Tais atividades podem mudar significativamente a concentração de várias substâncias no meio aquático, gerando grandes impactos ambientais no uso dos recursos hídricos (MANCUSO, 2003). A Figura 3 ilustra fenômenos que podem afetar a qualidade da água, tais como: gases atmosféricos, sedimentos contaminados, bioacumulações, entre outros.

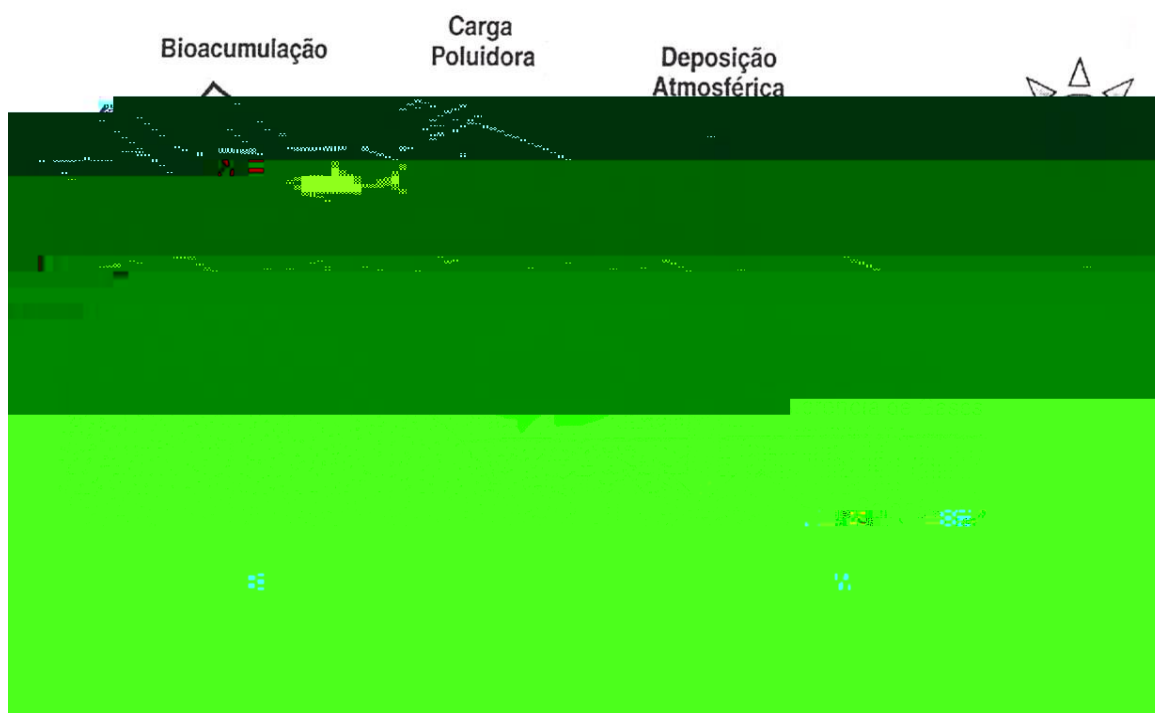


Figura 3: Ilustração de vários fenômenos que podem afetar a qualidade da água.

Fonte: Mancuso, 2003

2.5 TOXICOLOGIA DOS AGROQUÍMICOS

Segundo Baird (2002), toxicologia é o estudo dos efeitos nocivos de substâncias estranhas sobre os seres vivos, incluindo produtos químicos sintéticos e aqueles que existem naturalmente no ambiente.

A toxicidade da maioria dos agroquímicos é expressa em termos do valor da Dose Letal (LD_{50}), para 50% da população dos animais testados com a substância. Quanto menor o valor de LD_{50} , mais potente (i.e, mais tóxico) é o produto químico, já que é requerida uma menor quantidade (miligramas) da substância por quilo vivo do animal teste (BAIRD, 2002).

Segundo o Grupo de Analistas de Resíduos de Agroquímicos (GARP, 1999) para fins de prescrição das medidas de segurança contra riscos para a saúde humana, os produtos são enquadrados em função LD_{50} , inerente a cada um deles, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1
Classificação toxicológica dos agroquímicos em função da LD₅₀

| Classe Toxicológica | Descrição |
|----------------------------|--|
| I | Extremamente tóxicos (LD ₅₀ < 50mg/kg) |
| II | Muito tóxicos (LD ₅₀ – 50 a 500mg/kg) |
| III | Moderadamente tóxicos (LD ₅₀ – 500 a 5000mg/kg) |
| IV | Pouco tóxicos (LD ₅₀ > 5000mg/kg) |

Fonte: GARP, 1999

Como as águas superficiais são fontes vitais de água potável, a qualidade da água tem recebido considerável atenção nas legislações ambientais. Órgãos internacionais como a EPA dos Estados Unidos e a Comunidade Européia (EC) iniciaram um controle estabelecendo limites em relação às concentrações dos agroquímicos encontrados em água.

A legislação do Brasil apresenta os níveis máximos de agroquímicos em água potável similarmente a EPA. A portaria nº 1469 do Ministério da Saúde (MS), de 29 de Dezembro de 2000, estabelece os padrões de potabilidade para substâncias químicas que apresentam riscos à saúde. A Tabela 2 apresenta valores máximos permitidos para alguns agroquímicos selecionados em $\mu\text{g.L}^{-1}$ em águas destinadas ao consumo humano.

Tabela 2
Valores Máximos Permitidos (VMP) em $\mu\text{g.L}^{-1}$ para alguns agroquímicos em águas destinadas ao consumo.

| Compostos | VMP ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
|-------------------|--|
| Alaclor | 20,0 |
| Aldrin e Dieldrin | 0,03 |
| 2,4-D | 30 |
| Glifosato | 500 |
| Simazina | 2 |
| Trifluralina | 20 |

Fonte: Portaria nº 1469 do MS de 29/12/2000

Na Tabela 3 estão os níveis permitidos para alguns agroquímicos presentes em água, segundo EPA (FARIA, 2004).

Tabela 3

Níveis permitidos para alguns agroquímicos selecionados, presentes em água potável.

| Compostos | Nível (g.L⁻¹) |
|------------------|----------------------------------|
| Alaclor | 2 |
| 2,4-D | 70 |
| Endrin | 2 |
| Glifosato | 700 |
| Metilparationa | 2 |
| Simazina | 4 |
| Trifluralina | 2 |

Fonte: Faria, 2004

A Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde estabelece uma das formas para avaliar a presença de agroquímicos organofosforados em água, que é determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase, observando os limites máximos de 15% ou 20% de inibição enzimática quando a enzima utilizada for proveniente de insetos ou mamíferos, respectivamente.

Agroquímicos organofosforados que podem ser considerados uma segunda geração de praguicidas, sintéticos, se tornaram populares por serem geralmente de baixa persistência biodegradável, e não tendem a se acumularem na cadeia alimentar. Porém, eles são geralmente mais tóxicos que inseticidas organoclorados (HANSON, 1981).

Agroquímicos de maior periculosidade, sendo avaliados de acordo com a toxicidade, persistência e uso estão incluídos na classe sintética dos organofosforados: Diclorvos, Dimetoato, Disulfoton, Metamidofos, Mevinfos, Paration etila e Paration metila. Além dos organofosforados, outras classes de agroquímicos estão incluídas na lista de periculosidade, também chamadas de Lista Negra desenvolvida pela Diretriz 76/464/CEE (BARCELÓ, 1993).

2.6 AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS – CARACTERÍSTICAS E ESTRUTURAS

Dentre os diversos compostos químicos utilizados na agricultura e para outros fins, a maioria apresenta características tóxicas, enquadrando-se aqui os agroquímicos organofosforados.

Os agroquímicos organofosforados são do tipo não-persistente. Devido a isto, representam um avanço sobre os agroquímicos organoclorados. Contudo, eles apresentam geralmente um efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os organoclorados. Muitos organofosforados representam um grave perigo para a saúde daqueles que os aplicam e para qualquer pessoa que possa entrar em contato com os mesmos. A exposição a estes produtos químicos, por inalação, ingestão oral, ou absorção através da pele, pode levar a problemas imediatos de saúde. Como os hidrocarbonetos clorados, os organofosforados concentram-se nos tecidos gordurosos. Por outro lado, estes se decompõem em dias, ou semanas, por este motivo raramente são encontrados nas cadeias alimentares.

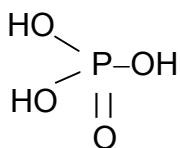
Os agroquímicos organofosforados contém, sem exceção, um átomo central de fósforo pentavalente ao qual estão conectados:

- > um átomo de oxigênio ou enxofre, unido ao átomo de fósforo mediante uma dupla ligação;
- > dois grupos metóxi (OCH_3) ou etóxi (OCH_2CH_3) unidos ao átomo de fósforo por uma ligação simples;
- > um grupo R mais longo e mais complexo, conectado ao átomo de fósforo, usualmente através de um átomo de oxigênio ou enxofre mediante ligação simples;

As três subclasses principais de agroquímicos organofosforados estão representadas na Figura 4 (BAIRD, 2002).

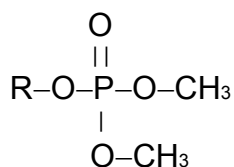
Tipo A: Fosfatos

Estrutura Fundamental

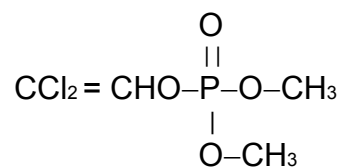


Ácido fosfórico

Estrutura Geral



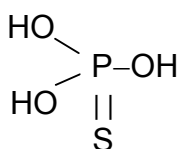
Exemplo Específico



Diclorvos

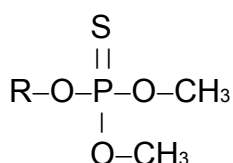
Tipo B: Fosforotioatos

Estrutura Fundamental

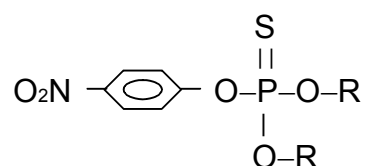


Ácido tionofosfórico

Estrutura Geral



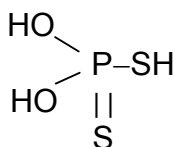
Exemplo Específico



Paration metílico

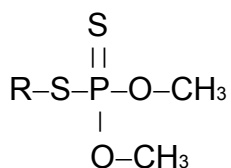
Tipo C: Fosforoditioatos

Estrutura Fundamental

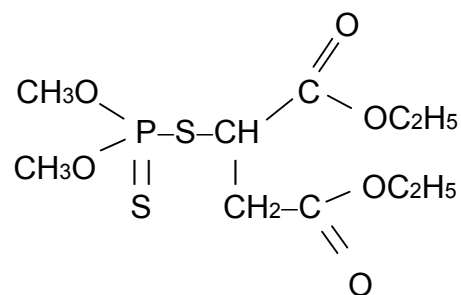
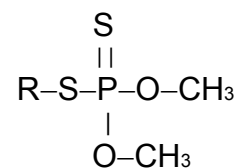


Ácido ditionofosfórico

Estrutura Geral



Exemplo Específico



Malation

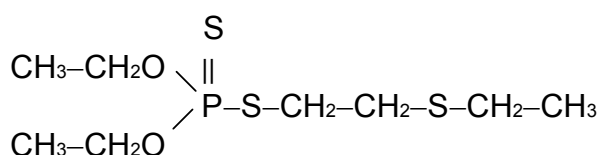
Figura 4: Fórmulas estruturais de alguns agroquímicos da classe organofosforados.

Fonte: Baird, 2002

2.7 ESCOLHA DOS AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS

A escolha dos agroquímicos organofosforados, a serem estudados neste trabalho foi avaliada de acordo com o seguinte critério: frequência de aplicação desses produtos (Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos) na agricultura e/ou pecuária na área de estudo – região do Médio Alto Uruguai do RS. A seguir são listados os agroquímicos organofosforados escolhidos:

2.7.1 Dissulfoton



- > Grupo Químico: Fosforoditioato
- > Nome Químico: Fosforoditioato de O, O – dietil – S – (2-etiltioetil)
- > Fórmula Molecular: $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_2\text{PS}_3$
- > Massa Molar: $274,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- > Solubilidade em água: $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (20°C)
- > Coeficiente de Partição: 3,95
- > Pressão a vapor: $7,2 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ (20°C)
- > Classe Toxicológica: I (Extremamente tóxico)
- > Dose letal: 8 – 10mg/kg (oral/ratos)
- > Sintomas de envenenamento: náusea, diarreia, tremor, forte salivação, falta de ar, febre e lacrimação.
- > Nomes comerciais: Disyston, Tiodemeton, Ditosistox, Frumin AR, Solvirex.

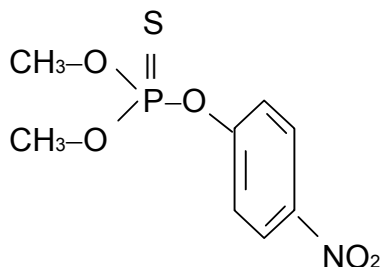
Este agroquímico organofosforado foi desenvolvido por Shrader na Alemanha em 1956. É um produto inseticida com ação sistêmica. De forma líquida, incolor e de odor desagradável. Este composto é estável em meio ácido, porém instável em meio alcalino.

No Brasil sua utilização se dá em culturas de café, feijão, tomate, amendoim e

algodão.

O dissulfoton possui persistência média no ambiente degradando-se em sulfóxido e sulfonas.

2.7.2 Paration Metílico



- > Grupo Químico: Fosforotioato
- > Nome Químico: Tiofosfato de O,O – dimetil – O – (p-nitrofenila)
- > Fórmula Molecular: $C_8H_{10}NO_5PS$
- > Massa Molar: $263,2 \text{ g.mol}^{-1}$
- > Solubilidade em água: 55mg.L^{-1} (20°C)
- > Coeficiente de Partição: 3,0
- > Pressão a vapor: $4,1 \times 10^{-4}$ (20°C)
- > Classe Toxicológica: I (Extremamente tóxico)
- > Dose letal: 8 – 10mg/kg (oral/ratos)
- > Nomes comerciais: Metacide, Folidol.

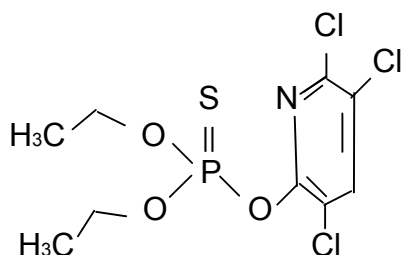
O Paration Metílico é muito tóxico e é provavelmente o maior responsável por mortes de trabalhadores agrícolas do que quaisquer outros agroquímicos. Atualmente, está proibido em alguns países ocidentais industrializados, mas ainda é amplamente usado em países de desenvolvimento.

No Brasil é utilizado em culturas de soja, plantações de algodão, frutas e amendoim.

O agroquímico organofosforado Paration Metílico é um dos mais importantes

organofosforados. Sua persistência é curta no ambiente, não se acumula no organismo. É possível um acúmulo de efeitos.

2.7.3 Clorpirifos



> Grupo Químico: Tiofosfato de O,O – dietil –O– (3,5,6 – tricloro -2- piridila)

> Fórmula Molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

> Massa Molar: $350,6 \text{ g.mol}^{-1}$

> Solubilidade em água: $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (25°C)

> Coeficiente de Partição: 4,7

> Pressão a vapor: $2,7 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ (25°C)

> Classe Toxicológica: II (Muito tóxico)

> Dose letal: 135 – 163mg/kg (oral/ratos)

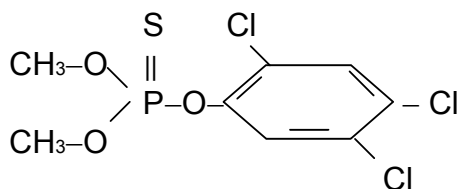
> Sintomas de envenenamento: tremor, heperreflexia, lacrimejamento, salivação e piloereção.

> Nomes comerciais: Durban, Lorsban.

Inseticida inibidor da colinesterase é bastante utilizado em culturas de soja, milho, algodão, café, citros e batata. Clorpirifos é altamente tóxico para organismos aquáticos e aves, bioconcentrável em peixes.

Possui propriedade estável nas condições normais de armazenamento e em soluções aquosas neutras e levemente ácidas; porém instável em meio alcalino, aumentando a instabilidade com a elevação da temperatura.

2.7.4 Fenclorfos



Grupo Químico: Tiofosfato;

Nome Químico: Tiofosfato de O,O – dimetil – O – (2,4,5 – tricloro fenila);

Fórmula Molecular: $C_8H_8Cl_3O_3PS$;

Massa Molar: $321,57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;

Solubilidade em água: $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (25°C);

Coefficiente de Partição: 4,88;

Limite de exposição: $10\text{mg}/\text{m}^3$;

Nomes Comerciais: Ronnel, Nankor, Trolene, Korlan;

Este agroquímico organofosforado é tóxico para os insetos, pois inibe enzimas de seu sistema nervoso, interrompendo a comunicação entre as células, que é efetuada pela acetilcolina. Esta transmissão de célula para célula não pode operar adequadamente, a menos que a molécula de acetilcolina seja destruída após ter executado sua função.

Os agroquímicos organofosforados ligam-se seletivamente a enzimas cuja função é destruir acetilcolina, bloqueando, dessa maneira, sua ação. A molécula do agroquímico tem, então, o efeito de suprimir a transmissão continuada de impulsos entre células nervosas, que é essencial para a coordenação dos processos vitais dos organismos, provocando a morte (é o átomo de fósforo da molécula do agroquímico organofosforado que se liga, permanecendo ligada à mesma durante horas).

2.8 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE AGROQUÍMICOS PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA

2.8.1 Técnicas de Extração de Agroquímicos em Água

A maioria dos agroquímicos presentes na água está em nível de traços. Devido a isso, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras efetuando previamente a pré-concentração destes compostos para adequá-los ao sistema de detecção (SILVA, 1999; HENNION, 1999).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferências, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ, 2001).

Para extrair e/ou, pré-concentrar compostos presentes em amostras, as técnicas mais comumente utilizadas são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), extração com fluido supercrítico (EFSC) e extração com membranas sólidas (Diálise e Ultrafiltração) ou líquidas. Estas técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para o uso em análises de rotina, pois eliminam erros humanos de manipulação, diminuem tempo de assistência do analista durante a análise, evitam o risco de contato com substâncias prejudiciais à saúde e aumentam, significativamente, o número de análises de amostra por tempo.

Muitas das técnicas de preparação de amostras podem ser executadas on-line ou off-line com o cromatógrafo gasoso ou líquido. A combinação on-line tem significantes vantagens sobre os trabalhos realizados no modo off-line. O método on-line não necessita de etapas intermediárias de manipulação da amostra, o que reduz riscos de contaminação e de perda de analitos. Na combinação on-line, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada no próprio sistema cromatográfico. Na técnica off-line, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada

separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor, como qualquer outra amostra. Hoje em dia, muitos equipamentos para extração múltipla são disponíveis comercialmente. Alguns fazem o processo de extração automaticamente, mas a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual (sistema semi-automático), enquanto outros, além de extração automatizada, são também capazes de transferir a amostra ao sistema cromatográfico (sistema completamente automático).

De acordo com Carasek (1997), as técnicas empregadas na extração e pré-concentração de agroquímicos geralmente utilizam a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. A extração com destilação por arraste de vapor d'água também é viável, pois torna possível conseguir a eficiência da extração superior às extrações realizadas por headspace e processos de stripping com gás. Essas técnicas utilizam solventes ou misturas de solventes orgânicos para a extração, seguida de limpeza e redução de volume para concentrar as espécies de interesse.

2.8.1.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)

Na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis, fase orgânica e fase aquosa. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, K_d , entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização, ou pela adição de sais neutros para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa (SNYDER, 1997).

A LLE apresenta a vantagem de ser simples e poder utilizar um número grande de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma alta taxa de solubilidade e seletividade. Apesar de sua eficiência na remoção de interferentes e na pré-concentração de analitos, o processo de extração líquido-líquido é lento e responsável pela geração de grandes volumes dos resíduos de solventes orgânicos

gerando problemas de descarte. A extração líquido-líquido embora apresente desvantagens, é considerada uma boa técnica de preparação de amostra e tem sido muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias (QUEIROZ, 2001).

A aplicação da LLE requer a escolha adequada de um solvente orgânico, pois quanto maior à afinidade do analito pelo solvente maior é a recuperação. Vários tipos de solventes orgânicos têm sido empregados na extração de agroquímicos presentes em amostras de água, tais como: hexano (THEURILLAT, 1998), tolueno (KOVES, 1992; KOVES, 1995), acetato de etila (LO, 1997; OJANPERÄ, 1991), diclorometano (CHIBA, 1995; TURCANT, 1991), isoctano (ROCHA, 1997) e misturas de solventes segundo LILLSUNDE e colaboradores (1996). Ferracini e colaboradores (2005), descreveram recentemente a extração dos agroquímicos hexazinona e tebutiuron em água. Os autores utilizaram 50mL de diclorometano como solvente extrator. Em seguida o solvente foi evaporado até cerca de 0,5mL e seco com sulfato de sódio anidro. O resíduo foi redissolvido em 1mL de água, sendo analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados indicaram que o método é suficientemente sensível para detectar a presença dos herbicidas em níveis baixos de concentração. Outro exemplo da aplicação da LLE é a determinação de 25 agroquímicos organofosforados em soro humano, por meio de extração com a mistura dos solventes n-hexano/acetato de etila (75:25, v/v) seguida por cromatografia líquida de alta eficiência. Neste método utilizou-se 1mL de amostra, 1mL do solvente orgânico e 1mL de solução aquosa de cloreto de sódio saturada, sendo que o sal foi empregado para diminuir a solubilidade do analito na fase aquosa e também para evitar a formação de emulsões. Os resultados dos limites de detecção foram suficientemente baixos para detectar os agroquímicos em pacientes intoxicados (FUGATAMI, 1997).

Com o surgimento de técnicas modernas de separação, atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM) e a cromatografia gasosa de alta resolução com detecção por espectrometria de massa (CGAR-EM) têm sido muito utilizadas na separação dos componentes da matriz.

Na tentativa de aprimorar a técnica extração líquido-líquido, numerosos esforços têm sido realizados para melhorá-la, principalmente quanto ao consumo de solvente orgânico e o tempo de análise.

2.8.1.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

Existem vários procedimentos de tratamento de amostras por extração em fase sólida com cartuchos, que variam no emprego dos sorventes, nos volumes de amostra, assim como nos volumes de solvente para ativação dos cartuchos e de eluição dos analitos. As etapas da extração em fase sólida resumem-se na ativação dos cartuchos, adsorção dos analitos ao sorvente, eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos e posterior concentração do composto interesse. A extração em fase sólida é hoje o método mais popular de preparo de amostras (HENNION, 1999).

Um número grande de sorventes são disponíveis comercialmente. O sorvente mais popular para extração de agroquímicos em água é o grupo octadecil (C-18) ligado à sílica, onde os mecanismos principais, como a retenção e a eluição dos analitos pela fase sólida, ocorrem através de forças intermoleculares entre o analito e a superfície da fase sólida.

O'Hara e colaboradores (1999), realizaram a extração de agroquímicos organoclorados em águas naturais, utilizando a técnica SPE, usando cartucho de extração constituído de uma coluna C-18. Os solventes de extração empregados foram acetato de etila e metanol. O material coletado teve seu volume reduzido para 1 mL com posterior análise. Outra aplicação da SPE é a de Rissato e colaboradores (2004), que recentemente determinaram agroquímicos em água de manancial, água potável e solo através da extração em fase sólida. O método utilizado apresentou eficiência com níveis de recuperação acima de 80% para as amostras de água e solo. Assim como a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida desenvolvida para análise de agroquímicos utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa. Entretanto, métodos como cromatografia em camada delgada (CCD) e

cromatografia por fluido supercrítico estão em grande desenvolvimento. Os limites de detecção alcançados em CLAE são a níveis de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e são usualmente comparáveis aos obtidos por CG-EM (WELLS, 2000).

2.8.1.3 Microextração em Fase Sólida (SPME)

A SPME difere das técnicas de extração para amostras aquosas pelo menor tempo de análise e principalmente pela não utilização de solventes, minimizando a geração de descartes e a exposição ocupacional. É uma técnica moderna desenvolvida por Arthur e colaboradores (1990) apud Fugatami (1997). Neste procedimento é empregada uma fibra óptica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. Esta fibra óptica atua como uma fase extratora, sendo acondicionada dentro da agulha de uma microsseringa, para extração dos analitos.

A extração pode ser feita das seguintes maneiras:

a) Mergulhando a fibra diretamente na solução da amostra. Durante a extração a amostra é agitada e o tempo é controlado. Os analitos são concentrados de 2 a 15 min; após esta etapa a fibra é recolhida para dentro da agulha;

b) Através da técnica de “headspace”, na qual a amostra é freqüentemente aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra.

Após a extração os analitos presentes na fibra são dessorvidos termicamente pela sua introdução no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás. O analito necessita ser volátil e termicamente estável para ser dessorvido e determinado por CG.

Em relação às técnicas LLE e SPE, a SPME possui vantagens de ser mais simples, mais rápida e de fácil manuseio, além da vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas, tais como a ambiental, farmacêutica, alimentícia, entre outras.

2.8.1.4 Microextração Líquido-Líquido (MLLE)

A microextração é uma forma de extração líquido-líquido convencional, na qual a extração é realizada com a razão entre fases superior a 100 (MAJORS, 1996). Na extração convencional os extratos obtidos são comumente muito diluídos e impedem a detecção de traços de compostos em nível de ng.L^{-1} . Processos de redução da razão solvente-água levam a extratos mais concentrados, porém podem acarretar perdas de componentes-traços. Contudo, métodos de microextração líquido-líquido, utilizando pequenos volumes de solvente, são atrativos e compatíveis com o tamanho da amostra requeridos pelas técnicas cromatográficas (NAMIESNIK, 1990).

A técnica microextração líquido-líquido tornou-se popular devido à facilidade de extrair, rapidez em analisar e principalmente na economia de solvente orgânico.

Grob (1975) desenvolveu um dispositivo para pré-concentrar e extrair substâncias de interesse. Um microextrator de operação rápida e simples, com capacidade para 1000mL de solução aquosa, sendo utilizados de 0,5 a 1mL de solvente extrator. Este microextrator permite determinar ao nível de partes por trilhão. Posteriormente, foi desenvolvido um dispositivo similar ao de Grob que permite extrações de até 1000mL de amostra de água, utilizando 200 μL de solvente extrator de menor densidade que a de amostra. Os analitos são extraídos por agitação e, após a separação das fases por decantação, adiciona-se água através do braço lateral forçando o solvente a sair pelo tubo capilar, onde ele pode ser amostrado por uma seringa (MURRAY, 1979). Este microextrator é conhecido como frasco de Murray que posteriormente foi reproduzido por Carasek (1997), um novo microextrator líquido-líquido com modificações no braço lateral para que as condições de extrações sucessivas fossem aperfeiçoadas, que passou a ser conhecido como o frasco de Murray modificado. A Figura 5 apresenta o frasco microextrator modificado de Murray reproduzido por Carasek (1997).

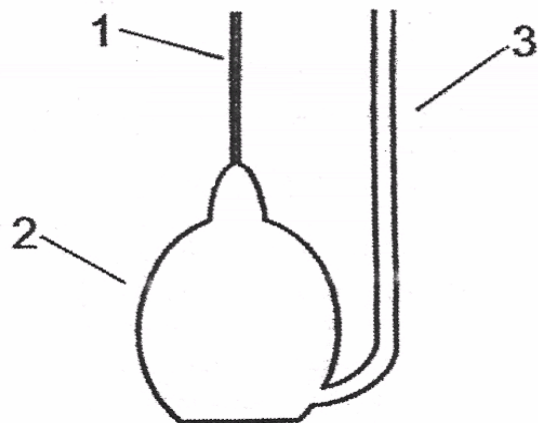


Figura 5: Frasco de microextração líquido-líquido modificado. (1) tubo capilar (diâmetro interno de 3 mm e altura de 10 cm); (2) frasco de 1L modificado e (3) braço lateral (diâmetro interno de 20 mm e altura de 30 cm).

Fonte: Carasek, 2002

O frasco de Murray modificado tem sido útil para a pré-concentração e determinação de baixos níveis de analitos, como íons Pb^{2+} e Cd^{2+} (CARASEK e colaboradores 2002) e agroquímicos organoclorados (CARASEK, 1997). Neste trabalho, foi utilizado o frasco de Murray modificado para determinar as concentrações de agroquímicos organofosforados.

Zapf e colaboradores (1995) desenvolveram um dispositivo para a técnica de microextração líquido-líquido, representado na Figura 6, que utilizava 400 mL de amostra aquosa saturada com cloreto de sódio (NaCl) e 500 μ L de solvente tolueno para a extração. O esquema utilizado para a extração da fase orgânica assim como o frasco de Murray modificado, também permite apenas a utilização de solventes orgânicos com densidades menores que a da amostra.

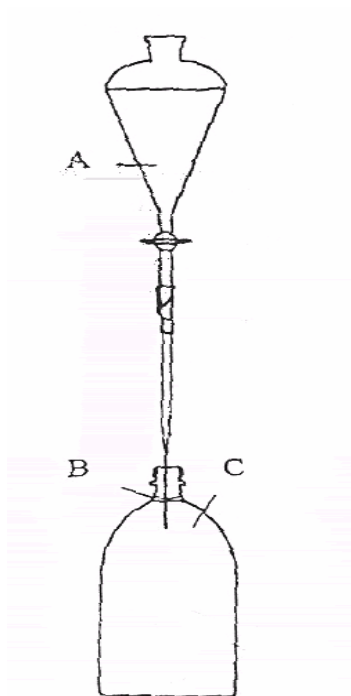


Figura 6: Frasco de microextração.

Equipamentos: (a) funil de separação, (b) camada de solvente e (c) amostra.

Fonte: Zapf, Heyer e Stan, 1995

De acordo com Carasek e colaboradores (2002), comparada com a extração líquido-líquido convencional, a microextração se caracteriza por piores recuperações do analito, mas a concentração na fase orgânica é aumentada. O volume de solvente orgânico usado é reduzido, e somente uma etapa de manipulação é necessária, o que reduz problemas de contaminação e perdas do analito.

Devido às vantagens desta técnica, vimos em nosso trabalho a necessidade de desenvolver uma metodologia para pré-concentrar agroquímicos organofosforados em amostras de águas naturais, e analisar pelo método instrumental a cromatografia gasosa com o emprego de um detector de espectrometria de massa (CG-EM), por apresentar confiabilidade e sensibilidade.

2.8.2 Métodos Cromatográficos na Análise de Agroquímicos

Segundo Harris (2003), 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.

Inúmeros métodos instrumentais têm sido utilizados na determinação e quantificação dos agroquímicos, normalmente são empregadas técnicas de separação (TEKEL, 1996; HOFF, 1999) e entre as mais comuns para amostras ambientais podem ser observadas a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Segundo Dórea (2004), a análise de agroquímicos organofosforados em água tem sido realizada por CG-DNF (Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio e Fósforo) ou CG-EM (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Detector de Espectrometria de Massa), isto devido ao fato de que se aliando a capacidade de resolução cromatográfica da CG, com seletividade e sensibilidade do DNF ou EM para organofosforados, é possível processar amostras complexas e viabilizar a monitoração destes compostos em baixos níveis de concentração. Os limites de detecção alcançados por CG-EM são a níveis de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e são usualmente comparáveis aos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (MAJORS, 1996). A figura 7 representa o modelo de um cromatógrafo gasoso utilizado para a determinação e quantificação de substâncias de interesse.

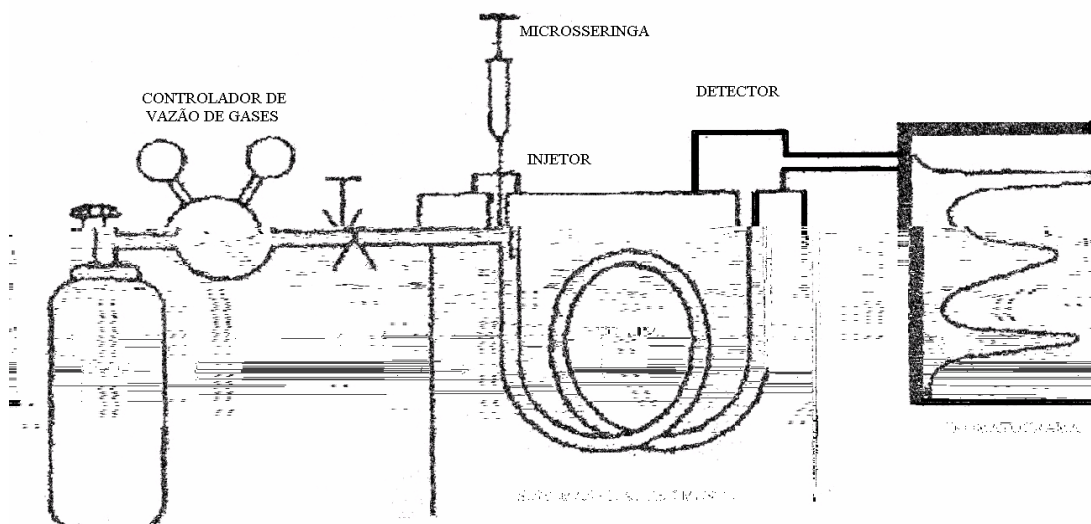


Figura 7: Esquema de representação de um cromatógrafo gasoso.

Fonte: Ortunio, 1997

2.9 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, deve sofrer uma avaliação denominada validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI, 2004).

No Brasil existem duas agências credenciadoras para verificar a competência dos laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Segundo a ANVISA “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Contudo, não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Assim, as agências credenciadoras são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de

laboratórios de ensaios.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez, também conhecidos como parâmetros de desempenho ou figuras analíticas de mérito (SWARTZ e KRULL, 1998).

2.9.1 Seletividade

Para Ribani (2004), seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, que possui capacidade de avaliar de forma inequívoca as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.

2.9.2 Linearidade e Faixa de Aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação. A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método, e depende do uso em questão (SWARTZ, 1998).

2.9.3 Precisão

Representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas.

A precisão é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV%) em um número significativo de amostras. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998). Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas (RIBANI, 2004). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes:

I) Repetitividade – representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A ICH (International Conference on Harmonisation) e a ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, três repetições cada um) ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

II) Precisão intermediária – expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004).

III) Reprodutibilidade – representa a concordância entre os resultados das medidas de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local e equipamentos, etc).

2.9.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e, um valor aceitável como referência. Sendo que, um valor exato ou referência é o valor obtido por uma medição perfeita.

O número de ensaios para avaliar a exatidão varia segundo a legislação ou diretriz adotada. A ICH e a ANVISA recomendam a coleta de dados referentes a um

mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes concentrações. A exatidão é expressa como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com os respectivos intervalos de confiança.

2.9.5 Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído (normalmente três vezes) e método baseado em parâmetros da curva analítica.

2.9.6 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame, que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. Os critérios para calcular o LOD podem ser adotados para calcular o LOQ, ou seja, o LOQ pode ser calculado utilizando o método visual, método relação sinal-ruído (normalmente dez vezes) e método baseado em parâmetros da curva analítica. Sendo que, o método baseado em parâmetros da curva analítica é estatisticamente mais confiável.

2.9.7 Robustez

A robustez de um método corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena variação em seus parâmetros. A robustez de um método é avaliada pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH, força iônica da fase móvel, agitação, etc, e a provável determinação do seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes e Solventes

Os solventes, n-hexano, tolueno, acetona e acetato de etila foram de grau HPLC, da marca J.T. Baker, o hidróxido de sódio PA utilizado foi da marca VETEC, o etanol utilizado na limpeza da vidraria foi comercial. O ácido clorídrico foi de grau PA, da marca Merck. Toda água utilizada foi do tipo ultrapura (MILLI-Q), com aparelho da Millipore. Além das vidrarias comuns ao processo de extração, foi utilizado um frasco de Murray modificado com capacidade de 1000mL, marca BOMEX e frascos com capacidade para 1mL obtido junto a Supelco.

Os instrumentos e equipamentos utilizados neste trabalho foram: Balança Analítica AG-200 GEHAKA, pH-metro B474 Micronal, Agitador Magnético Mecânico, Microquímica MQAMA-301, Bomba a Vácuo TE-058 da TECNAL e um Cromatógrafo Gasoso modelo CP-3800 da VARIAN acoplado ao Espectrômetro de Massa modelo Saturn-2000 CG-EM com o Software versão Workstation 5.51. A seringa utilizada foi uma Hamilton CO # 702, com capacidade de 25 mL.

3.1.2 Limpeza da Vidraria

Toda a vidraria utilizada durante a realização deste trabalho foi limpa de acordo com a seqüência abaixo:

Lavagem com água corrente e detergente → Imersão em solução alcoólica (KOH – C₂H₆O) → Enxágüe → Rinsagem com acetona grau HPLC.

3.1.3 Condições Cromatográficas

Coluna: OV-5 (5% fenildimetilpolissiloxano/95% dimetilpolissiloxano) apolar, com

dimensões de 30m X 0,25 mm – 0,25 μ m fase estacionária;

Volume da amostra injetado: 2 μ L – Splitless;

Gás de arraste: Hélio (He);

Temperatura do Forno: 80°C (2 min) – 250°C (10°C/min) – 11 minutos;

Fluxo do gás de arraste na coluna: 1,0 mL/min;

Temperatura do Injetor: 250°C.

3.1.4 Solução Padrão

Os padrões dos agroquímicos Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos foram obtidos da Supelco S.A. A solução estoque mix A, de concentração 2000 μ g/mL, foi preparada com n-hexano : Acetona (v/v-9:1). A partir dessa solução estoque, foram preparadas soluções diluídas até 10 vezes, dissolvendo-se a quantidade apropriada dos padrões com n-hexano e acetona grau HPLC. Após a diluição, a solução padrão foi armazenada a 4°C, para evitar a degradação da mesma.

3.2 EXTRAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS

Os procedimentos utilizados na extração dos agroquímicos organofosforados nas águas do rio em estudo, envolveram a técnica microextração líquido-líquido, com a utilização do frasco extrator citado na Figura 6. Neste dispositivo de microextração, 1000mL de amostra de água foram misturadas com 1mL de hexano. A mistura sofreu agitação magnética por um período de 10 minutos. Encerrado o tempo de agitação, o sistema foi deixado em repouso até completar separação entre as fases orgânica e aquosa – item A da Figura 8. Em seguida, por meio da adição de água pelo braço lateral, o solvente extrator foi deslocado pelo tubo capilar do frasco. O solvente extrator foi coletado com uma micropipeta Labmate de 1000 μ L – item B da Figura 8. Em seguida, a fase orgânica foi estocada num frasco com capacidade de 1mL, apropriado para posterior análise por cromatografia gasosa. A adição da água pelo braço lateral

fez com que o nível da amostra no frasco microextrator atingisse a parte superior do tubo capilar do frasco, o que impossibilita nova introdução de solvente extrator para iniciar um novo ciclo de extração com a mesma amostra, devido o aumento do volume da amostra.

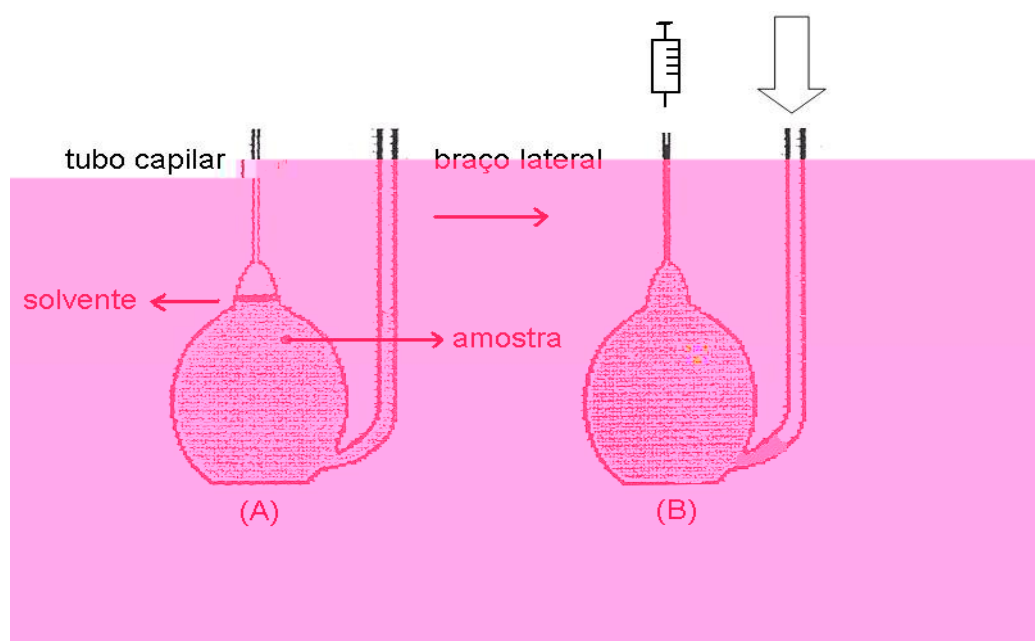


Figura 8: Processo de operação da microextração líquido-líquido.

Fonte: Carasek, 1997

3.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

A eficiência da técnica MLE depende de uma série de parâmetros experimentais. Com o objetivo de realizar extrações quantitativas de amostras com baixas concentrações foi realizado um estudo da otimização dos parâmetros de extração. Este estudo envolveu parâmetros como: tipo de solvente extrator, efeito da concentração salina, efeito do pH da solução, forma e tempo de agitação do sistema. Em todas as extrações foram utilizados volumes de 1000mL de amostra contendo os agroquímicos organofosforados Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos. Os extratos obtidos foram analisados em um cromatógrafo gasoso equipado com um

espectrômetro de massa (EM). As condições de análise estão descritas no item 3.1.3.

A reprodutibilidade é um parâmetro de grande importância em métodos de separação de amostra, impondo-se inclusive sobre a eficiência de extração, esta foi determinada utilizando a estimativa do Desvio Padrão Relativo (RSD), que é um parâmetro que indica a repetibilidade do método. Considera-se que este parâmetro varia até 5% (THOMPSON, 2002). Todas as extrações foram feitas em triplicata para a avaliação da repetitividade das amostras com os procedimentos utilizados.

3.3.1 Escolha do Solvente Extrator

A escolha adequada do solvente extrator é necessária para assegurar uma boa recuperação do analito. O fator essencial na escolha do solvente é a sua solubilidade, no caso, o solvente extrator deve ser pouco solúvel em água, devido que mesmo uma pequena fração do solvente dissolvido em água pode carregar consigo traços de material orgânico. Neste trabalho, um fator limitante foi a densidade do solvente, pois como a extração da fase orgânica se dá pelo topo do frasco, a densidade do solvente deve ser inferior à da amostra realizados. Neste estudo 1000mL de água ultrapura (MILLI-Q) foi misturada com 1mL dos solventes: tolueno, hexano e mistura dos solventes (hexano: acetato de etila – 9:1 v/v) a cada vez. A mistura da amostra com cada tipo de solvente foi agitada mecanicamente por um período de tempo igual a 10 minutos. Finalmente, após um tempo de repouso da amostra, onde ocorreu a separação das fases (aproximadamente 10 minutos), a fase orgânica foi extraída com o auxílio de uma microsseringa, sendo observado e determinado o volume final de cada solvente em experimento. Cada experimento foi repetido cinco vezes.

3.3.2 Efeito da Concentração Salina

A sensibilidade do método de extração freqüentemente aumenta na presença de sal na solução. Uma forma de alterar a distribuição entre a fase aquosa e a fase orgânica, para favorecer o enriquecimento de agroquímicos no solvente orgânico é

aumentar a força iônica do meio. Isso consiste em adicionar sal à solução aquosa. Além disso, a adição do sal na fase aquosa diminui a solubilidade dos analitos, este efeito é mais forte para analitos com coeficiente de partição pequeno, como exemplo os agroquímicos organofosforados: paration metílico, fenitrothion, malation e fenamilos (SHELLIN, 2004). A partir dos relatos encontrados na literatura de operação da fase aquosa saturada com KCl ou NaCl, a influência da concentração salina foi determinada empregando-se no frasco microextrator o volume da amostra igual a 1000mL com presença dos agroquímicos em estudo e concentrações de NaCl 0,1 mol/L, 1 mol/L, 2 mol/L e 3 mol/L. A cada experimento a massa correspondente de NaCl foi adicionada à solução.

3.3.3 Efeito do pH

Segundo Wercinski (1999), para compostos com grupamentos ácidos ou básicos o método de extração para amostras aquosas no modo direto pode ser dificultado, devido à alta afinidade do analito com a matriz.

A influência do pH foi determinada empregando o frasco microextrator com volume da amostra igual a 1000mL, com velocidade de agitação magnética do sistema de 900 rpm durante um período de 10 minutos e concentração salina a 2,0 mol/L de NaCl. Devido as moléculas dos agroquímicos organofosforados em estudo, Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos possuírem instabilidade em meio alcalino, as amostras foram testadas com pH em meio ácido. Os valores de pH testados foram: pH=2, pH=3, pH=5, pH=6, e foram ajustados com solução ácida a 0,1 mol/L e 2,0 mol/L de ácido clorídrico (HCl). As amostras isentas da solução ácida permitiram a verificação do pH da água ultrapura ser igual a 7. Contudo, houve a necessidade de ajustar o pH da amostra, evitando-se assim a instabilidade das moléculas.

3.3.4 Forma e Tempo de Agitação do Sistema

O contato entre o solvente extrator e a amostra é um fator determinante para

boa recuperação dos agroquímicos. A quantidade de analito extraído depende da forma de agitação do sistema na qual o processo da MLLE alcança o equilíbrio através da razão de transferência de massa da fase aquosa para a fase orgânica (DUGAY, 1998). Para propiciar este contato, foram testados diferentes tempos de agitação, empregando-se a agitação magnética de aproximadamente 3,0 cm de comprimento, e agitação manual do frasco microextrator.

Assim como a forma de agitação do sistema foi um parâmetro a ser determinado, o tempo de agitação também influencia na recuperação dos agroquímicos. Os períodos de tempo testados com agitação magnética e agitação manual foram de 5, 10, 20 e 30 minutos em uma velocidade de agitação de 900 rpm, para a primeira forma testada. Sendo que, para cada quantidade de tempo testado, a amostra foi mantida em repouso o tempo suficiente para que ocorra a separação da

presente trabalho, se deu a partir da construção das curvas analíticas com soluções nas concentrações de: 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 e 25,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e obtiveram-se os valores de equação da reta para cada agroquímico. Estes valores foram utilizados nas equações A e B, que posteriormente foram empregados na determinação do LOD e LOQ dos instrumentos.

$$(A) \text{ LOD} = 3,3 \times \text{DP}/a$$

$$(B) \text{ LOQ} = 10 \times \text{DP}/a$$

Sendo **DP** a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e **a** o coeficiente angular.

3.4.3 Recuperação

A recuperação do método foi testada através da fortificação das amostras e submetida ao procedimento de extração e os valores de recuperação foram obtidos pelo método de padronização externa, sendo cada experimento realizado em triplicata. A recuperação (R) foi calculada através da equação abaixo:

$$R = \text{concentração obtida} \times 100 / \text{concentração esperada}$$

3.4.4 Linearidade e Faixa Linear

Foi obtida a faixa linear traçando-se a curva analítica (concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$ x intensidade de sinal), e quando a reta começou a sofrer um desvio de linearidade, este valor de concentração foi tomado como sendo o valor máximo a ser determinado, o valor mínimo da faixa corresponde ao limite de quantificação de cada método.

3.4.5 Seletividade

A seletividade foi obtida comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (solução padrão), sendo que neste caso,

nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. A avaliação da seletividade é dada pelo detector espectrômetro de massa, uma vez que o mesmo é de grande sensibilidade.

Tabela 4

Relação dos agroquímicos organofosforados analisados, seus respectivos tempos de retenção e os íons característicos.

| Composto | Tempo de retenção (min) | Íons característicos |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Dissulfoton | 15.239 | 89, 88, 60 |
| Paration Metílico | 16.134 | 263, 109, 125 |
| Clorpirifos | 16.893 | 285, 287, 125 |
| Fenclorfos | 16.352 | 314, 352, 350 |

3.5 AMOSTRAGEM

A planificação do processo de coleta das amostras das águas superficiais do Rio da Várzea, visando determinar os teores dos agroquímicos organofosforados, foi realizada levando-se em conta as características agrícolas e pecuárias da região em estudo. O rio está situado na região sul do país, mais precisamente ao norte do estado do Rio Grande do Sul, com altitude de 323m a 369m em relação ao nível do mar, latitude de 27° 44' 139" a 27° 55' 582" entre os pontos de coleta e longitude de 53° 02' 846" a 53° 06' 839" entre os pontos de coleta, e possui grande utilização na atividade de consumo, agrícola e pecuária.

O solo que predomina próximo as margens do rio em estudo é formado por latossolos profundos, com alto teor de argila e de coloração avermelhada e parte com latossolos escuros e rasos, o relevo é formado por Planalto, seu solo é fértil e constituído de terras rochas e similares.

Os pontos de amostragem foram selecionados utilizando pontos estratégicos marcados com o aparelho GPS (Global Positioning System) ao longo do Rio em locais

onde haveria maior probabilidade de contaminação por agroquímicos. As Figuras 9 e 10 representam a região que abrange o rio em estudo e os pontos escolhidos para a coleta das amostras de água superficial.

As amostras de águas superficiais foram coletadas em duplicata.



Figura 9: Localização no mapa do rio em estudo.

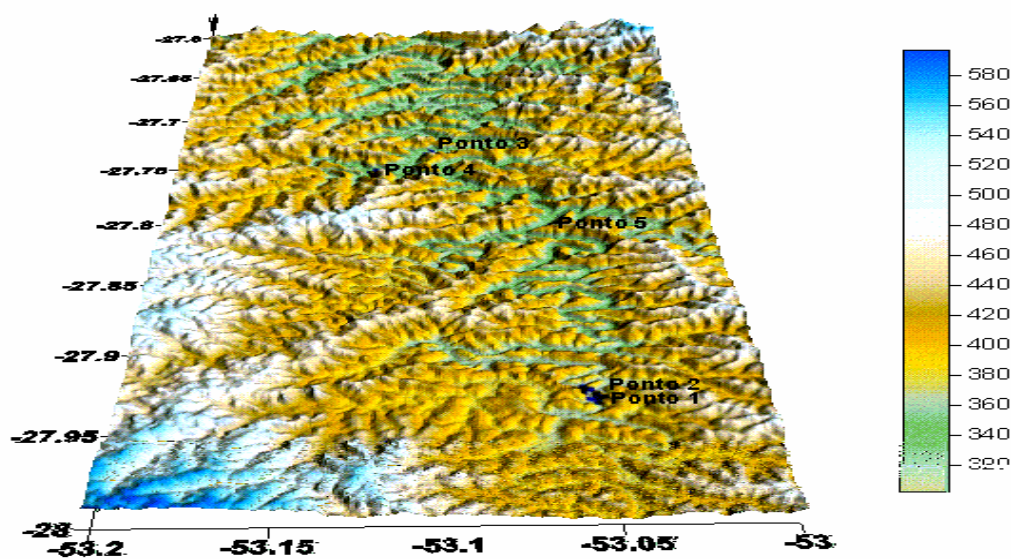


Figura 10: Representação dos pontos de coleta das amostras de água do Rio da Várzea.

3.5.1 Coleta e Preservação das Amostras

As amostras de água no rio em estudo foram coletadas no mês de julho de 2005, num dia ensolarado, sem previsões de chuva e de acordo com a metodologia Standard Methods (1998), utilizando frascos de polietileno para evitar possíveis contaminações. Cada frasco foi previamente limpo com detergente, água, solução alcoólica, enxaguado com hexano e finalmente com a própria amostra. As amostras foram coletadas a uma profundidade de 0,5m e no centro do rio evitando possíveis interferências das margens. O volume de amostra coletada foi de 1000mL.

Foram determinadas no local as condições de pH, temperatura da água, temperatura atmosférica, condições de vazão do rio e condições climáticas, com o objetivo de obter amostras semelhantes. Informações sobre as aplicações de agroquímicos nas culturas próximas ao rio também foram observadas.

Após a coleta das amostras de água, foi adicionado 1mL de álcool metílico, sendo conservadas em um isopor com gelo até o acondicionamento final em refrigerador a 4°C para evitar possíveis degradações dos agroquímicos sendo finalmente filtradas com filtros de diâmetro de poro 0,45 μm utilizando o sistema a vácuo, a fim de eliminar material particulado presente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

4.1.1 Escolha do Solvente Extrator

O experimento foi realizado com o objetivo de escolher qual solvente seria mais apropriado para promover a extração dos agroquímicos organofosforados em estudo. Para o teste foi utilizado o solvente hexano, tolueno e uma mistura de hexano : acetato de etila (9:1 v/v). A escolha destes solventes se deu com base numa pesquisa bibliográfica onde se verificou uma frequência elevada na utilização dos mesmos no processo de extração dos agroquímicos. Além deste fator, considerou-se a solubilidade de cada um deles e a densidade dos mesmos, uma vez que a técnica empregada, a MLLE, exigiu solventes menos densos do que a da amostra, devido o dispositivo empregado no processo de extração. A solubilidade é de extrema importância, pois a menor quantidade de solvente dissolvido na água, pode carregar traços do material a ser extraído. A Tabela 5 apresenta o volume total recuperado de cada solvente utilizado neste trabalho. Sendo que, para cada solvente foram realizadas cinco extrações.

Tabela 5

Volume total de solvente extraído da mistura com a água para cinco amostras.

| H₂O:Hexano (1000:1mL) | H₂O:Tolueno (1000:1mL) | H₂O: Hexano/Acetato de Etila (1000:1 (v/v – 9:1) mL) |
|---|--|--|
| 0,90mL | 0,90mL | 0,79mL |
| 0,92mL | 0,85mL | 0,75mL |
| 0,95mL | 0,80mL | 0,75mL |
| 0,90mL | 0,85mL | 0,79mL |
| 0,95mL | 0,85mL | 0,77mL |
| DP= 0,025mL | DP= 0,035mL | DP= 0,020mL |

Analisando os resultados referentes à recuperação dos solventes utilizados no processo de extração, o hexano se mostrou o mais adequado com 92,4% de recuperação do volume adicionado, com um baixo desvio padrão. O tolueno assim como a mistura dos solventes hexano e acetato de etila (v/v – 9:1) apresentaram volumes recuperados menores, o que indica a maior solubilidade destes solventes em água. Sendo assim, podemos avaliar que quanto menor a solubilidade do solvente em água, menor a possibilidade de restarem moléculas a serem extraídas na solução. Foram testadas diversas proporções da mistura hexano: acetato de etila, sendo que a proporção 9:1 apresentou melhores resultados. Isto se deve ao fato de o acetato de etila ser bastante solúvel em água, o que dificultava a sua recuperação. Para os agroquímicos em estudo, o hexano foi o solvente mais eficaz no processo de extração. A Figura 11 representa o efeito de cada tipo de solvente extrator na recuperação dos agroquímicos em estudo.

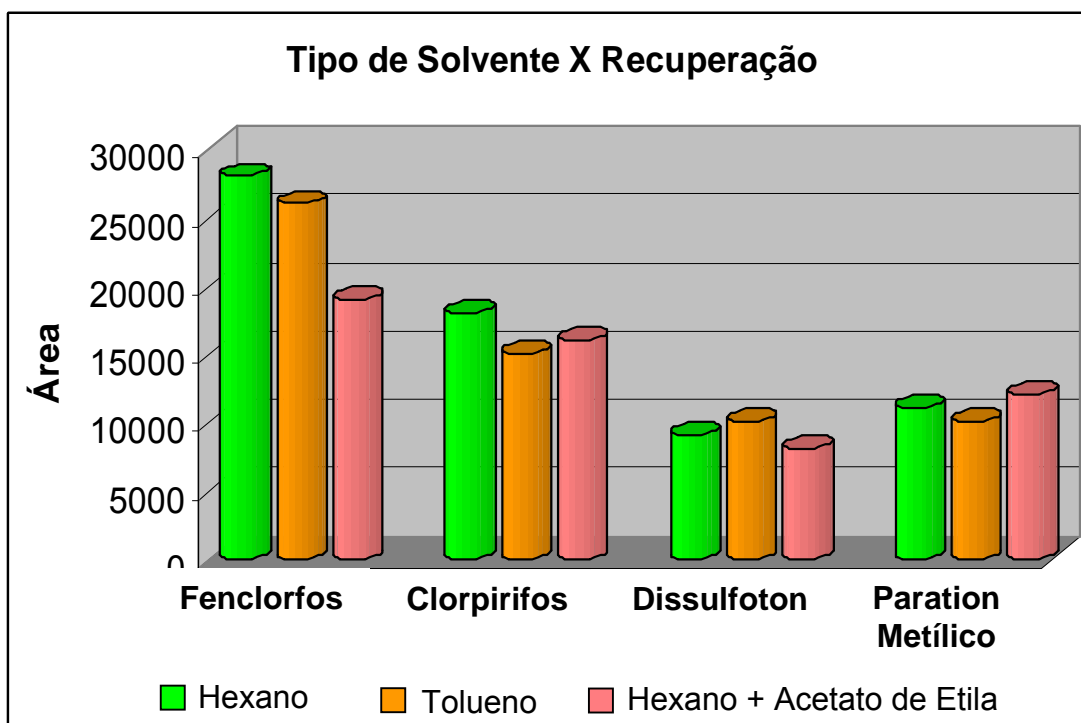


Figura 11: Efeito do tipo de solvente extrator sobre a recuperação dos agroquímicos.

Analisando os resultados da Figura 11 quanto à escolha do solvente extrator,

nota-se um aumento significativo na recuperação do agroquímico Fenclorfos quando utilizado os solventes hexano e tolueno.

O hexano (C_6H_{14}) é o solvente que apresentou menor densidade entre os solventes estudados, $0,659 \text{ g.mL}^{-1}$ a 20°C (líquido) e solubilidade de $0,01\text{g}/100\text{mL}$, sendo o menos solúvel em água, comparado aos demais solventes utilizados (CETESB, 2005).

A mistura dos solventes hexano e acetato de etila também foi um fator de grande importância quando comparado ao solvente hexano na análise do agroquímico Fenclorfos. A comparação da recuperação é destacada devido à solubilidade do solvente tolueno, e principalmente do acetato de etila, por serem maiores que a da amostra, havendo perdas como mostra a Tabela 4. A recuperação do volume da mistura dos solventes é de 77%, mostrando a solubilidade dos mesmos em água.

4.1.2 Valores de Recuperação dos Agroquímicos sob Efeito da Concentração Salina

Devido ao aumento da concentração iônica da fase aquosa, os analitos são conduzidos do seio da solução para a fase orgânica, este é o efeito “salting out” (DUGAY, 1998).

A Tabela 5 representa os resultados do estudo do efeito da adição de NaCl em amostras contaminadas com os agroquímicos organofosforados Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos em soluções contendo $3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ da solução padrão. Estes resultados são referentes às extrações realizadas com 1mL de hexano e agitação magnética por um período de 10 minutos, empregando-se diferentes concentrações molares de NaCl. O processo todo entre agitação e repouso realizou-se num período de 30 minutos.

Tabela 6

Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação dos agroquímicos organofosforados Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos. Valores expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$.

| NaCl \ Compostos | 0,1 mol/L (5,85 g) | 1,0 mol/L (58,44g) | 2,0 mol/L (117,88g) | 3,0 mol/L (176,32g) |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Dissulfoton | n.d* | 0,051 | 0,094 | 0,099 |
| Paration Metílico | 0,146 | 0,260 | 0,313 | 0,320 |
| Clorpirifos | 0,335 | 0,359 | 0,416 | 0,425 |
| Fenclorfos | 0,346 | 0,457 | 0,626 | 0,640 |

* Não detectado;

As Figuras 12 a 15, representam as tendências de aumento das extrações de cada agroquímico conforme é aumentada a massa de NaCl e a diferença percentual das extrações realizadas com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

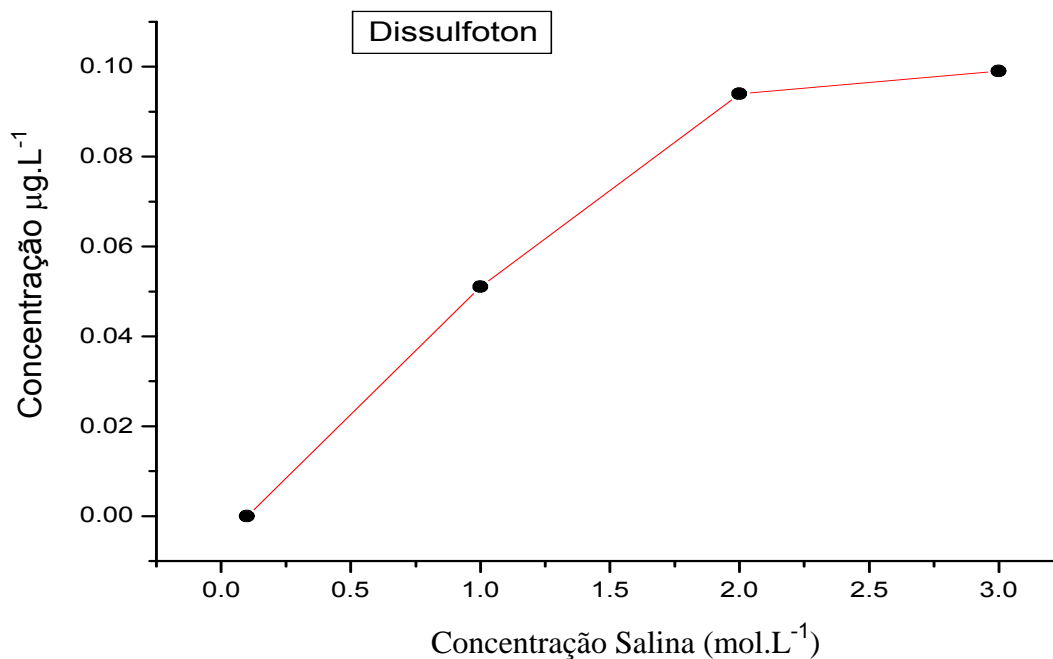


Figura 12: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Dissulfoton.

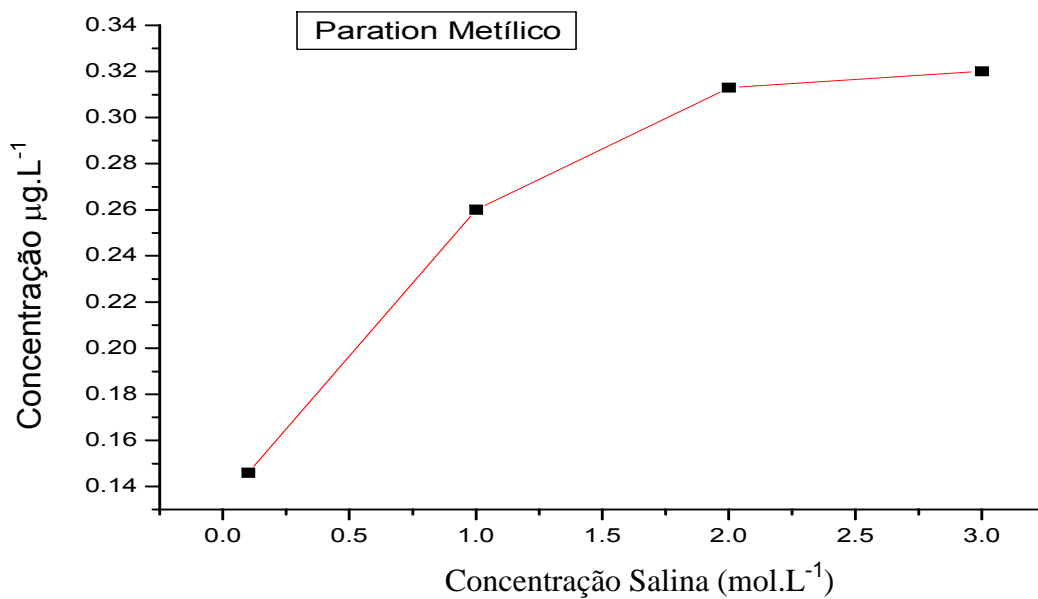


Figura 13: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Paration Metílico.

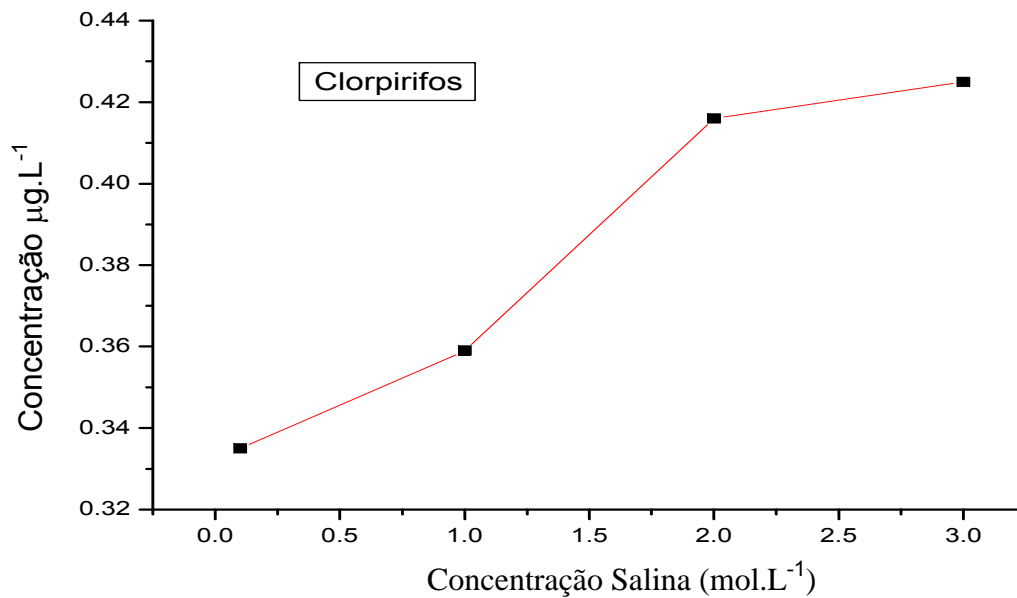


Figura 14: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Clorpirifos

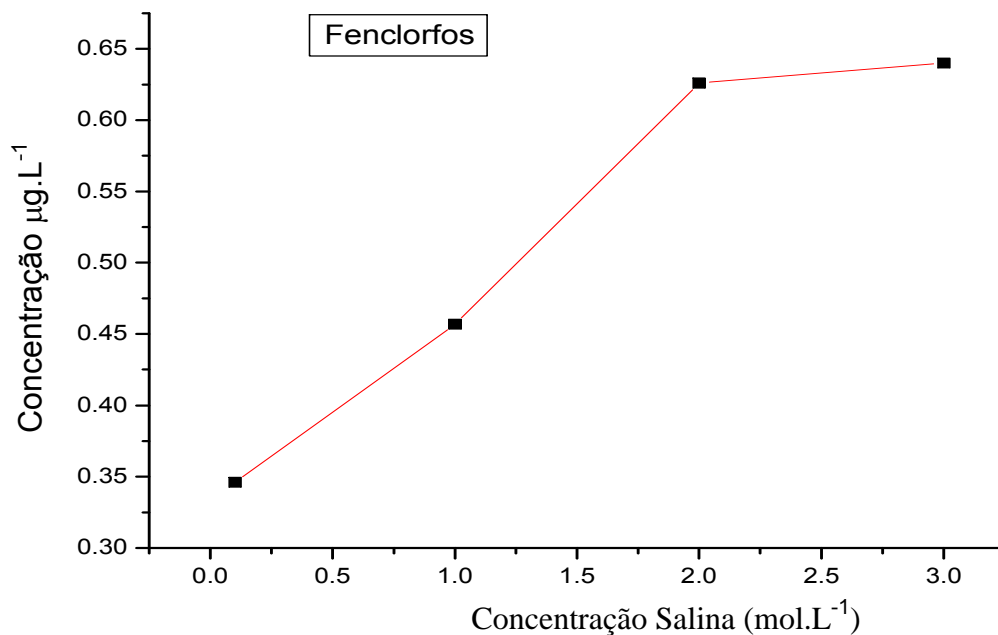


Figura 15: Efeito da adição de NaCl sobre a recuperação do agroquímico Fenclorfos.

Se compararmos as extrações obtidas com 0,1 mol.L⁻¹ e 2,0 mol.L⁻¹ de NaCl, podemos observar um aumento significativo nos valores extraídos, cujos resultados podem ser observados na Tabela 7.

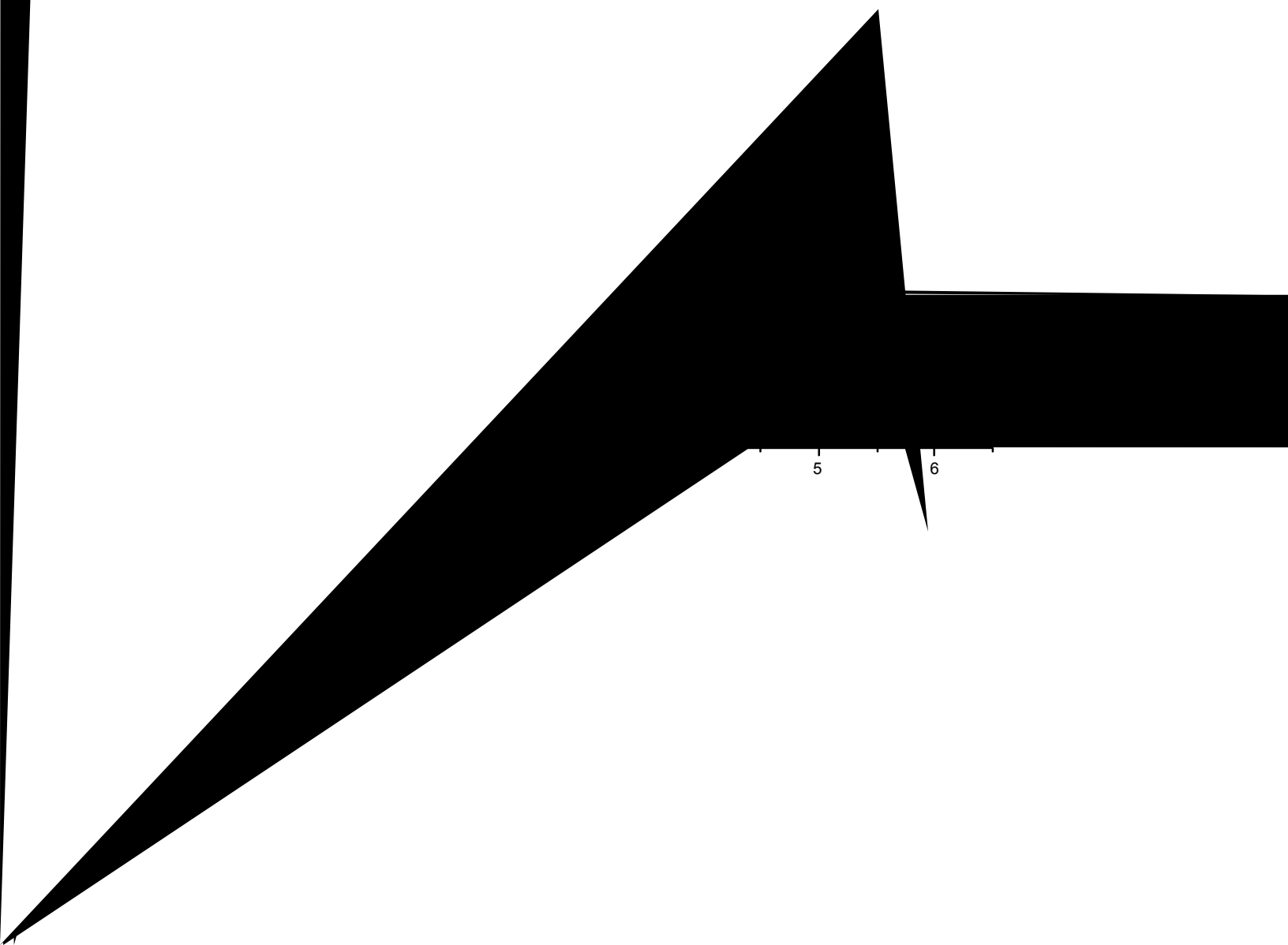
Tabela 7

Diferença porcentual nas extrações quando comparadas a adição de NaCl à 0,1 mol.L⁻¹ e 2,0 mol.L⁻¹.

| Compostos | Aumento (%) |
|------------------|--------------------|
| Dissulfoton | 11,750 |
| Paration | 20,870 |
| Clorpirifos | 10,130 |
| Fenclorfos | 35,000 |

Analisando as Tabelas 6 e 7, e os gráficos das Figuras 12 a 15, verifica-se que há um aumento da recuperação para os quatro agroquímicos organofosforados conforme é aumentada a massa de NaCl. A partir desses resultados, concluímos que a

ação do pH
mostra de 1000



pH 6, pois aumentando o valor do pH ocorre queda dos valores de recuperação para todos os agroquímicos. Quando o pH torna-se menor, os compostos passam a ter maiores interações com o solvente, e por este motivo tendem a ficar mais retidos no solvente. Devido a isso foi adotado no procedimento analítico de extração o valor do pH da amostra igual a 5.

4.1.4 Influência da Forma de Agitação do Sistema

A Tabela 8 mostra o estudo comparativo da eficiência nas extrações, empregando-se duas formas diferentes de agitação do sistema amostra-solvente: agitação manual e agitação magnética. Nas duas formas de agitação do sistema, o período de agitação foi de 10 minutos e a concentração de contaminação da amostra $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. A forma da agitação manual foi de ritmo moderado, no sentido vai e vem.

De acordo com a Tabela 8, a agitação magnética apresentou os melhores resultados. Os agroquímicos Dissulfoton e Clorpirifos não foram detectados na forma de agitação manual, o que nos leva a crer que a agitação magnética homogeneiza melhor o sistema do que a manual. Nas colunas referentes à agitação manual e agitação magnética do sistema são mostradas as estimativas dos desvios padrão relativo para extrações em triplicata, cujos valores são considerados normais para este tipo de trabalho.

Tabela 8

Comparação da eficiência das extrações para as diferentes formas de agitação do sistema.

| Composto | Agitação Manual e DP | Recuperação (%) | Agitação Magnética e DP | Recuperação (%) |
|--|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Dissulfoton ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | n.d.* | - | $0,069 \pm 0,008$ | 17,25 |
| Paration Metílico ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $0,089 \pm 0,004$ | 22,25 | $0,120 \pm 0,006$ | 30,00 |
| Clorpirifos ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | n.d.* | - | $0,219 \pm 0,02$ | 54,75 |
| Fenclorfos ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $0,243 \pm 0,005$ | 60,75 | $0,336 \pm 0,04$ | 84,00 |

(*) Não detectado, (DP) Desvio Padrão, (n) Número de repetições.

Os cromatogramas das Figuras 17 e 18 foram obtidos nas extrações que utilizaram agitação manual e agitação magnética respectivamente. A comparação dos mesmos permite dizer que o fato das áreas dos picos das moléculas em estudo serem maiores no processo de agitação magnética do que às de agitação manual comprova que a agitação magnética possui maior eficiência em homogeneizar o processo de extração dos agroquímicos.

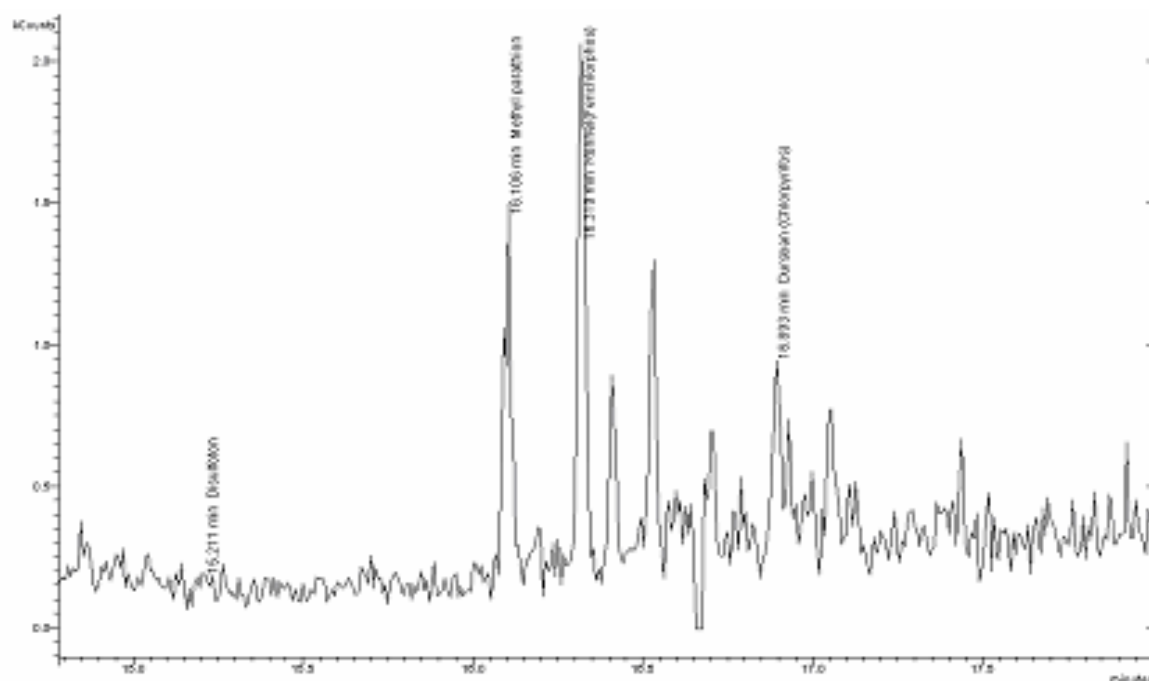


Figura 17: Fragmentograma do extrato obtido pela agitação manual do frasco micro extrator por período de tempo igual a 10 minutos.

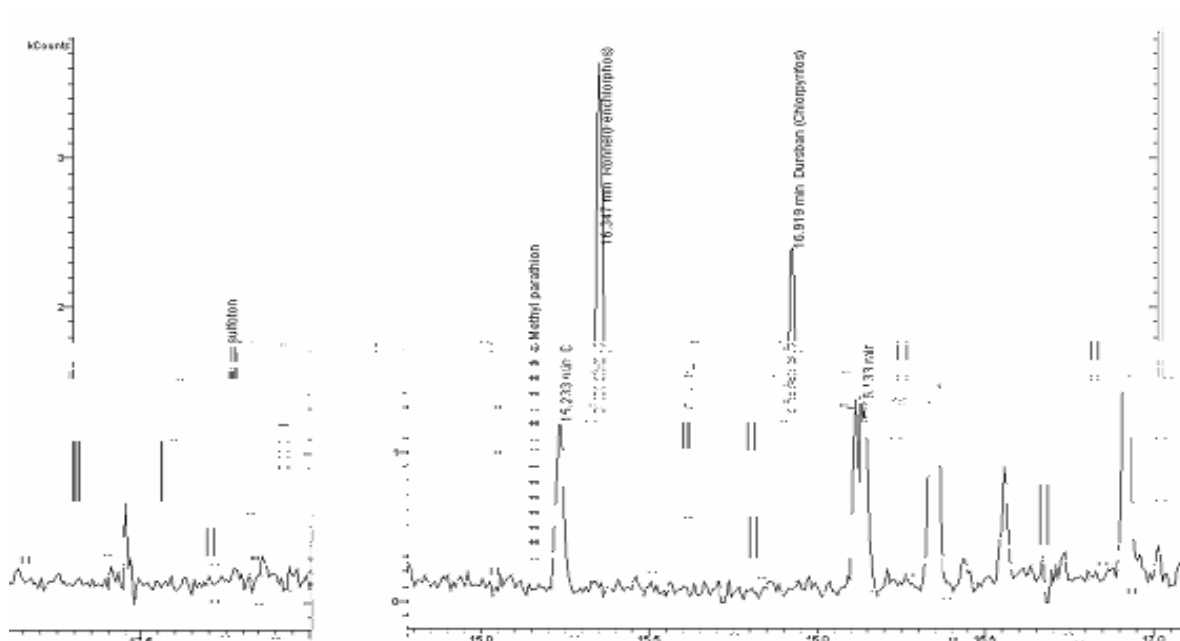


Figura 18: Fragmentograma do extrato obtido pela agitação magnética do frasco micro extrator por período de tempo igual a 10 minutos.

4.1.5 Influência do Tempo de Agitação do Sistema

Definida a forma de agitação do sistema, foi testado ainda o período de tempo de agitação. Os períodos de tempo de agitação do sistema indicados no item 3.3.4 estão representados na Tabela 9, onde se verifica a recuperação dos agroquímicos nos diferentes períodos de tempo de agitação testados na amostra. Para este estudo foi adicionada uma concentração da solução padrão igual a $3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 9

Recuperação dos agroquímicos organofosforados em diferentes períodos de tempo de agitação do sistema. Valores expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$.

| Composto | 5 min | 10 min | 20 min | 30 min |
|-------------------|-------|--------|--------|--------|
| Dissulfoton | 0,038 | 0,093 | 0,090 | 0,091 |
| Paration Metílico | 0,151 | 0,315 | 0,316 | 0,316 |
| Clorpirifos | 0,301 | 0,415 | 0,420 | 0,418 |
| Fenclorfos | 0,314 | 0,618 | 0,619 | 0,617 |

Analisando a Tabela 9, o período de 5 minutos de agitação magnética foi o que apresentou piores resultados na recuperação dos agroquímicos, este tempo de agitação do sistema não foi suficiente para que os analitos realizassem sua transferência para a fase orgânica. Assim, entre os períodos 10, 20 e 30 minutos de agitação do sistema, os resultados foram similares e apresentaram melhores recuperações dos analitos em estudo. Para os agroquímicos Paration Metílico e Clorpirifos o período de tempo de 20 e 30 minutos apresentou resultados com uma pequena vantagem sobre o período de 10 minutos, mesmo assim foi adotado o período de 10 minutos, devido ser similar aos resultados de recuperação dos analitos nos períodos de 20 e 30 minutos. A Figura 19 representa o efeito dos quatro períodos de tempo de agitação testados.

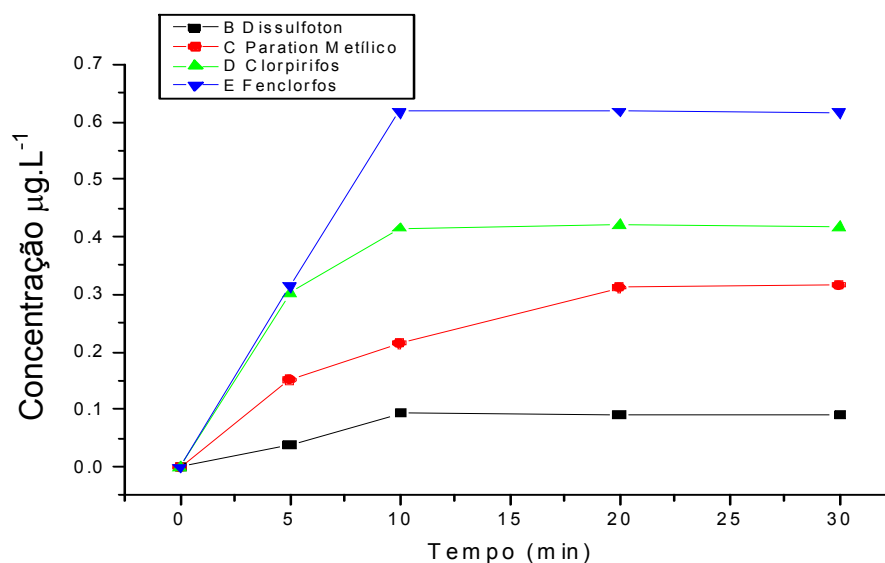


Figura 19: Efeito dos diferentes períodos de tempo de agitação do sistema.

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM ÁGUA

4.2.1 Linearidade

As Figuras 20 a 23 apresentam os resultados do estudo de linearidade, na validação do método desenvolvido para análise de agroquímicos em água, utilizando os parâmetros determinados para a quantificação por CG-EM.

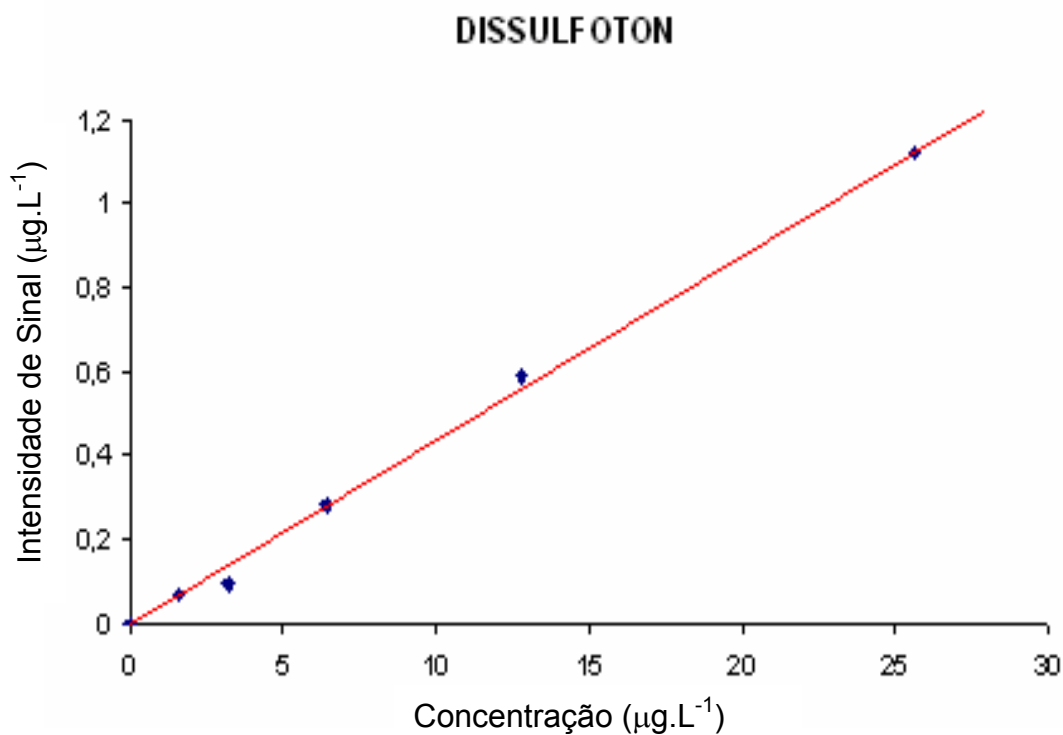


Figura 20: Intensidade de Sinal em função da concentração do Dissulfoton.

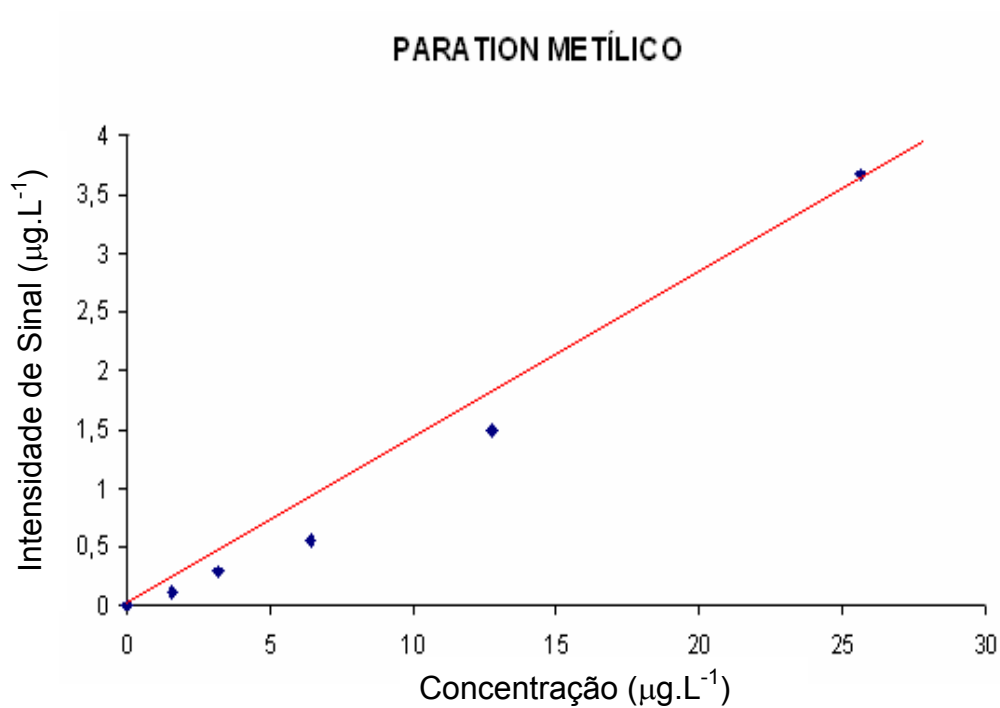


Figura 21: Intensidade de Sinal em função da concentração do Paration Metílico.

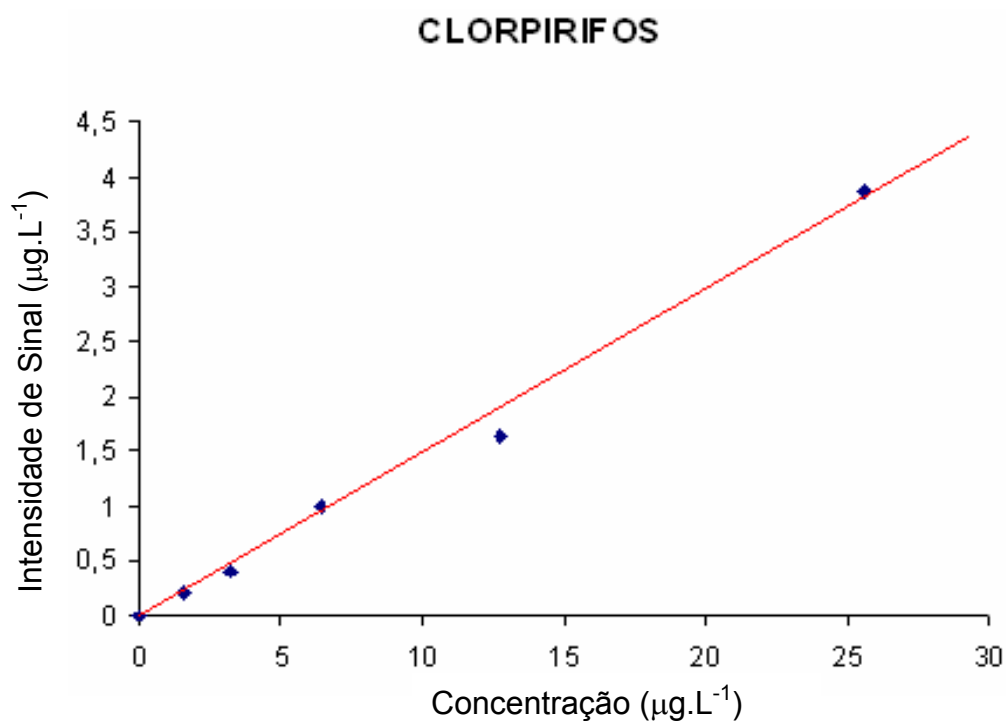


Figura 22: Intensidade de Sinal em função da concentração do Clorpirifos.

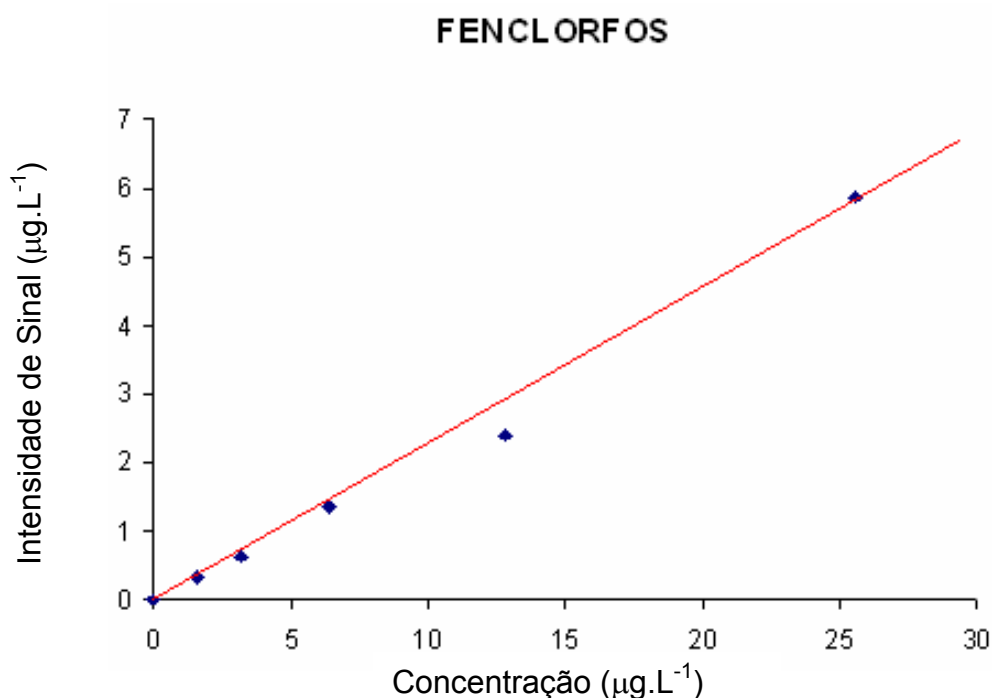


Figura 23: Intensidade de Sinal em função da concentração do Fenclorfos.

As curvas analíticas para os agroquímicos Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos indicaram boa linearidade no 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 maiores que 0,99 para os quatro agroquímicos. 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 incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros e resultados obtidos através das curvas analíticas (inclinação e intersecção), intervalo linear, coeficiente linear, coeficiente angular e correlação linear para o método desenvolvido para análise de agroquímicos em água, empregando a técnica da microextração líquido-líquido e análise por CG.

Tabela 10
Resultados do estudo de linearidade

| Composto | Intervalo | Coefficiente | Coefficiente | Correlação R ² |
|-------------------|------------------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| | Linear (µg.L ⁻¹) | Linear | Angular | |
| Dissulfoton | 1,6 – 25,6 | 0,2273 | 22,3937 | 0,99859 |
| Paration Metílico | 1,6 – 25,6 | 1,2869 | 6,8006 | 0,99372 |
| Clorpirifos | 1,6 – 25,6 | 0,3337 | 6,6551 | 0,99661 |
| Fenclorfos | 1,6 – 25,6 | 0,5299 | 4,3792 | 0,99563 |

Observando os resultados da Tabela 10 e Figuras 20 a 23, nota-se que todas as curvas analíticas apresentam boa linearidade do método na faixa de concentração estudada com todos os coeficientes de correlação maiores que 0,99 e os coeficientes angulares das curvas analíticas mostraram a seguinte ordem crescente de sensibilidade: Dissulfoton > Paration Metílico > Clorpirifos > Fenclorfos.

4.2.2 Valores de Detectabilidade

Os limites de detecção, quantificação e desvio padrão do método proposto estão representados na Tabela 11. O LOD e LOQ foram determinados conforme as equações citadas no item 3.4.2.

Tabela 11

Valores do limite de detecção e quantificação para os agroquímicos organofosforados em estudo.

| Composto | DP | LOD | LOQ |
|-------------------|-------|-------|-------|
| Dissulfoton | 0,570 | 0,083 | 0,254 |
| Paration Metílico | 1,204 | 0,584 | 1,770 |
| Clorpirifos | 0,884 | 0,438 | 1,328 |
| Fenclorfos | 1,004 | 0,756 | 2,292 |

Para os quatro agroquímicos estudados foram calculados os limites de detecção

considerando os resultados da linearidade oferecidos pelas curvas analíticas em relação as suas concentrações. Os valores do limite de detecção são de ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$, indicando a viabilidade deste método para a determinação de quantidades de traços dos agroquímicos em águas. Os valores do LOD estão numa faixa de 0,083 a 0,756 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e os valores do LOQ estão entre 0,254 e 2,292 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados indicam que o método é sensível para detectar a presença de agroquímicos em níveis baixos de concentrações nas matrizes aquosas.

4.2.3 Seletividade

Compara-se a alta sensibilidade do método cromatográfico CG-EM relacionando o tempo de retenção e seus íons característicos. As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas dos agroquímicos Dissulfoton e Paration Metílico, analisando a seletividade do método instrumental.

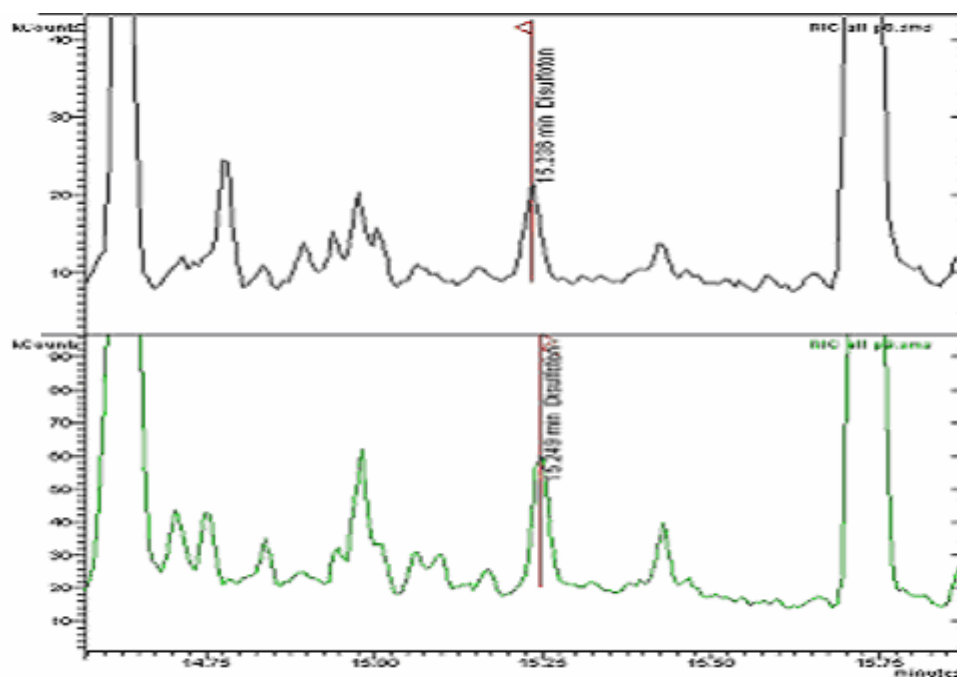


Figura 24: Fragmentograma parcial com a indicação da seletividade do agroquímico Dissulfoton.

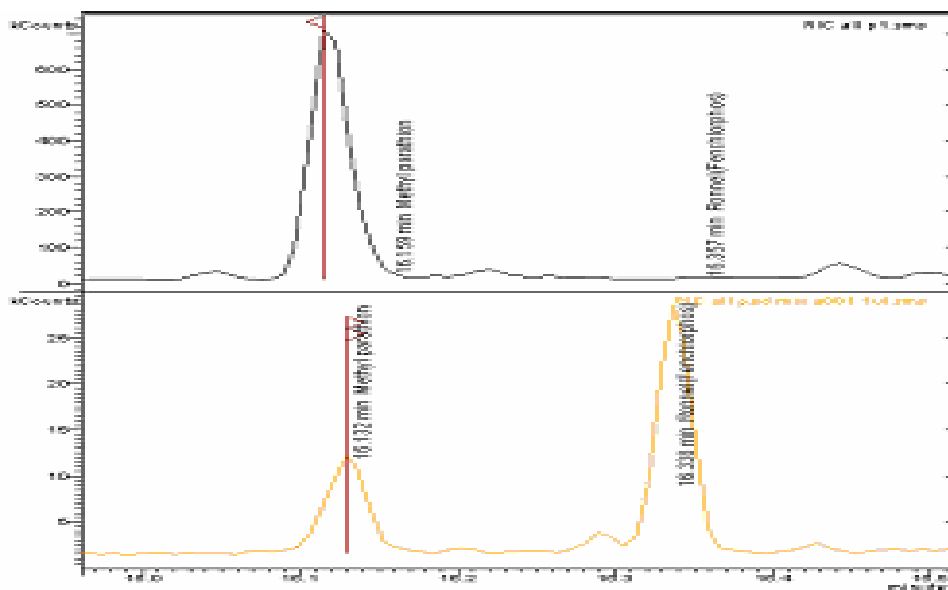


Figura 25: Fragmentograma parcial com a indicação da seletividade do agroquímico Paration Metílico.

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAM, 2001).

Analisando os fragmentogramas das Figuras 24 e 25, verifica-se que há uma boa seletividade do método instrumental para os agroquímicos Dissulfoton e Paration Metílico, assim como para os agroquímicos Clorpirifos e Fenclorfos. Nota-se que nenhum interferente ou contaminante eluiu no tempo de retenção dos agroquímicos organofosforados analisados.

4.2.4 Recuperação dos Agroquímicos.

As Figuras 26 e 27 apresentam os cromatogramas obtido após microextração líquido-líquido para o branco e uma amostra controle.

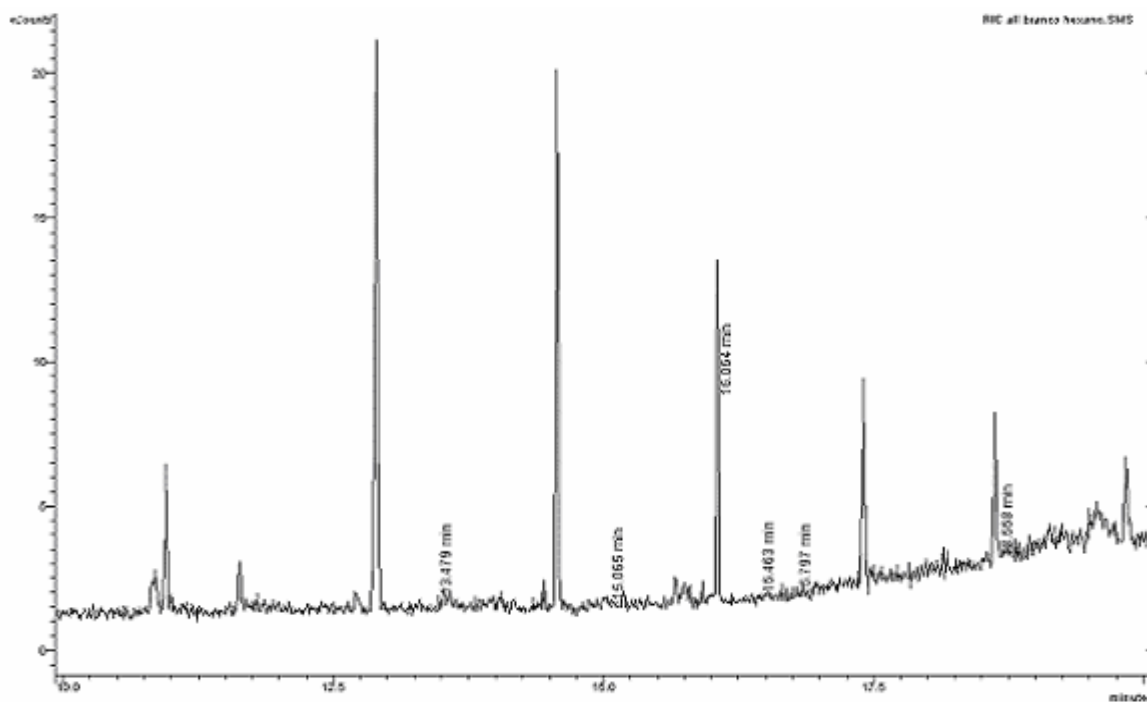


Figura 26: Cromatograma obtido para o branco, após microextração líquido-líquido.

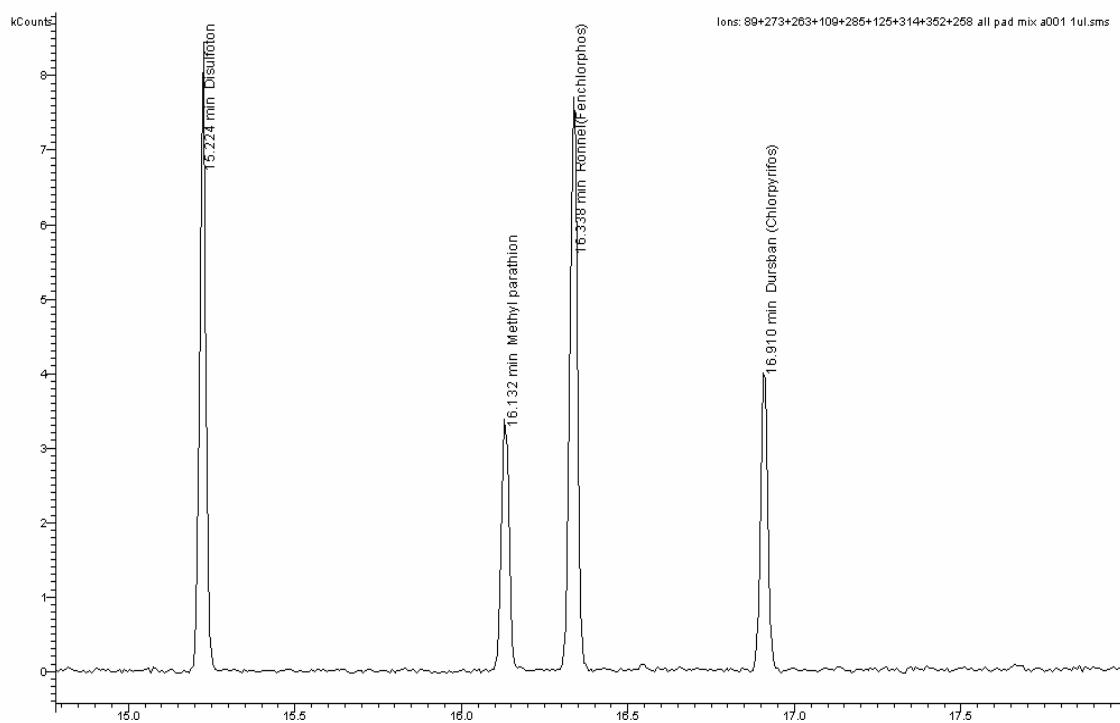


Figura 27: Cromatograma obtido para uma amostra controle.

Observando o cromatograma da amostra controle e do branco após a microextração líquido-líquido, verifica-se que o método desenvolvido baseado na microextração líquido-líquido e determinação por CG-EM permitem a quantificação de cada analito, sem que ocorram interferências.

As recuperações foram determinadas a partir de uma única etapa de extração e a faixa de concentrações adicionadas nas amostras foi de 1,6 a 25,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

As Tabelas 12, 13, 14 e 15 demonstram a recuperação quantificada através da cromatografia gasosa que se dá através da comparação das concentrações definidas dos analitos adicionados e extraídos de acordo com a relação já demonstrada no item 3.4.3.

$$R = \text{concentração obtida} \times 100 / \text{concentração esperada}$$

A recuperação do método foi testada através da fortificação de 5 amostras nas diferentes concentrações. A porcentagem de recuperação para cada agroquímico organofosforado neste estudo, assim como a quantidade de fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$), a concentração média encontrada, o desvio padrão (DP), e o coeficiente de variação (CV) estão demonstradas nas Tabelas de 12 a 15.

Tabela 12

Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Dissulfoton.

| Composto | Fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentração Média Encontrada | DP | CV (%) | Recuperação (%) |
|-------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------|--------|-----------------|
| Dissulfoton | 1,6 | 0,0696 | 0,0080 | 11,494 | 4,35 |
| | 3,2 | 0,0943 | 0,0058 | 6,150 | 2,94 |
| | 6,4 | 0,2830 | 0,0251 | 8,869 | 4,42 |
| | 12,8 | 0,5880 | 0,0103 | 17,670 | 4,59 |
| | 25,6 | 1,1200 | 0,1965 | 17,551 | 4,37 |

Tabela 13

Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Paration Metílico.

| Composto | Fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentração Média Encontrada | DP | CV (%) | Recuperação (%) |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------|--------|-----------------|
| Paration Metílico | 1,6 | 0,120 | 0,0062 | 5,204 | 7,5 |
| | 3,2 | 0,298 | 0,00141 | 0,473 | 9,31 |
| | 6,4 | 0,558 | 0,0480 | 8,617 | 8,71 |
| | 12,8 | 1,504 | 0,0608 | 4,043 | 11,75 |
| | 25,6 | 3,678 | 0,336 | 9,151 | 14,36 |

Tabela 14

Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Clorpirifos.

| Composto | Fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentração Média Encontrada | DP | CV (%) | Recuperação (%) |
|-------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------|--------|-----------------|
| Clorpirifos | 1,6 | 0,2195 | 0,0148 | 6,765 | 13,71 |
| | 3,2 | 0,4155 | 0,007 | 1,6847 | 12,98 |
| | 6,4 | 1,005 | 0,05 | 4,9751 | 15,70 |
| | 12,8 | 1,6435 | 0,098 | 5,980 | 12,83 |
| | 25,6 | 3,8705 | 0,170 | 4,40 | 15,11 |

Tabela 15

Valores de fortificação da amostra, concentração média encontrada, desvio padrão, coeficiente de variação e recuperação do agroquímico Fenclorfos.

| Composto | Fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentração Média Encontrada | DP | CV (%) | Recuperação (%) |
|------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------|--------|-----------------|
| Fenclorfos | 1,6 | 0,3365 | 0,00636 | 1,890 | 21,03 |
| | 3,2 | 0,6305 | 0,0176 | 2,80 | 19,70 |
| | 6,4 | 1,3585 | 0,0148 | 1,09 | 21,22 |
| | 12,8 | 2,398 | 0,2672 | 11,14 | 18,73 |
| | 25,6 | 5,878 | 0,1753 | 2,983 | 22,96 |

Analisando as Tabelas de 12 a 15, verifica-se que o coeficiente de variação percentual (CV%) em relação à média global de todos os níveis de fortificação foi inferior a 15%. O resultado de recuperação (%) para os quatro agroquímicos estudados esteve numa faixa de até 23 pontos percentuais, dentro da otimização dos parâmetros estabelecidos. Um dos fatores que pode estar relacionado a estes resultados é a constante de distribuição (K_d) entre a fase aquosa e a fase orgânica. Também pode estar associado à influência da temperatura, podendo ser possível a evaporação do solvente, uma vez que os ensaios foram realizados em temperatura ambiente. O cuidado tomado foi quanto ao transporte das amostras até o cromatógrafo, colocando-as em caixa de isopor com gelo, evitando parte da evaporação. Observou-se no braço lateral do dispositivo utilizado, para pré-concentrar os analitos, bolhas do solvente que ficavam grudadas umas nas outras e na parede do braço lateral do frasco, como mostrado na Figura 28, contribuindo, portanto, para que não fosse possível a recuperação de todo o volume adicionado no frasco microextrator de Murray modificado e consigo carregando parte dos analitos. A utilização de outros solventes como por exemplo o diclorometano poderia contribuir para maiores recuperações dos agroquímicos, uma vez que os agroquímicos organofosforados possuem grupos polares, porém, possuem densidades superior a da amostra. Contudo, o dispositivo utilizado para a pré-concentração não permite o uso dos mesmos. A afinidade entre solvente extrator e analito implica na diferença da recuperação.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação. Para a exatidão, pode-se expressar a relação do resultado obtido com o resultado esperado.

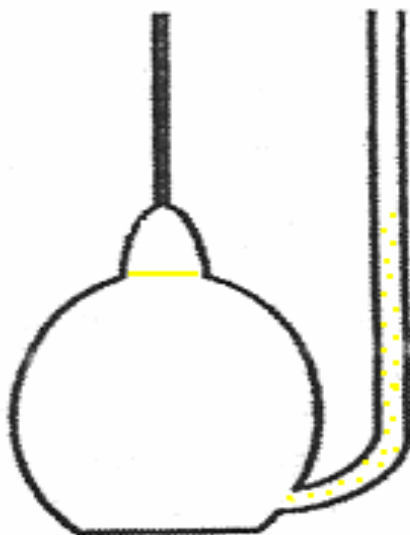


Figura 28: Dispersão do solvente no braço lateral do frasco microextrator.

4.3 Amostra Real

As amostras de água coletadas no Rio da Várzea – RS foram analisadas empregando a técnica microextração líquido-líquido para pré-concentração dos analitos e posterior análise por CG-EM, utilizando todos os parâmetros estudados neste trabalho, volume da amostra 1000mL, 1mL de solvente hexano, 2,0 mol.L⁻¹ de NaCl, pH igual a 5, ajustado com solução de HCl, realizados sob forma de agitação magnética por um período de 10 minutos. A coleta foi realizada a uma profundidade de 0,5m da superfície da água, e num período sem chuvas. Foram determinados os parâmetros, pH e temperatura da água. O pH manteve-se dentro do esperado para as águas naturais, de 6,4 a 7,3 e a variação da temperatura foi de 20 a 23°C. Os resultados obtidos indicaram quatro arómatizados (estudados) -28 (neste) TJ0-1.73 Td (trabalho) analisadas sem duplicata e -concentrações obtidas para Diesel e fotossíntese,

uso intenso dos agroquímicos na tentativa de controlar insetos em cultura de soja, frutas, amendoim, tomate, batata e feijão.

Os pontos P-1 e P-2 correspondem aos primeiros pontos de coleta realizados no Rio da Várzea, onde a atividade agrícola envolvendo o cultivo do trigo, soja, milho e batata são desenvolvidos. Nestes pontos não foram encontrados resultados positivos em relação aos agroquímicos organofosforados estudados.

A área dos pontos P-3 e P-4 apresentam grande lixiviação, que segundo diagnósticos realizados é uma das principais causadoras da contaminação da água, e a maioria das propriedades vizinhas do Rio não satisfazem as leis que são 20% da área coberta com a vegetação nativa e 30m de cada lado do curso d'água com mata ciliar, contribuindo assim para a entrada de agroquímicos e/ou qualquer outra espécie de contaminação.

O ponto P-5 não apresentou resultados nas duas amostras coletadas.

Tabela 16

Teores de agroquímicos encontrados em água do Rio da Várzea. Os valores estão expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$

| Composto | P-1 | P-2 | P-3 | P-4 | P-5 |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Dissulfoton | - | - | 0,098 | 0,116 | - |
| Paration Metílico | - | - | 0,406 | 0,422 | - |
| Clorpirifos | - | - | 0,419 | 0,494 | - |
| Fenclorfos | - | - | 0,557 | 0,688 | - |

Para ilustrar melhor o resultado, as Figuras 29 e 30 mostram os cromatogramas obtidos para as amostras de água no Rio da Várzea nos pontos P-3 e P-4.

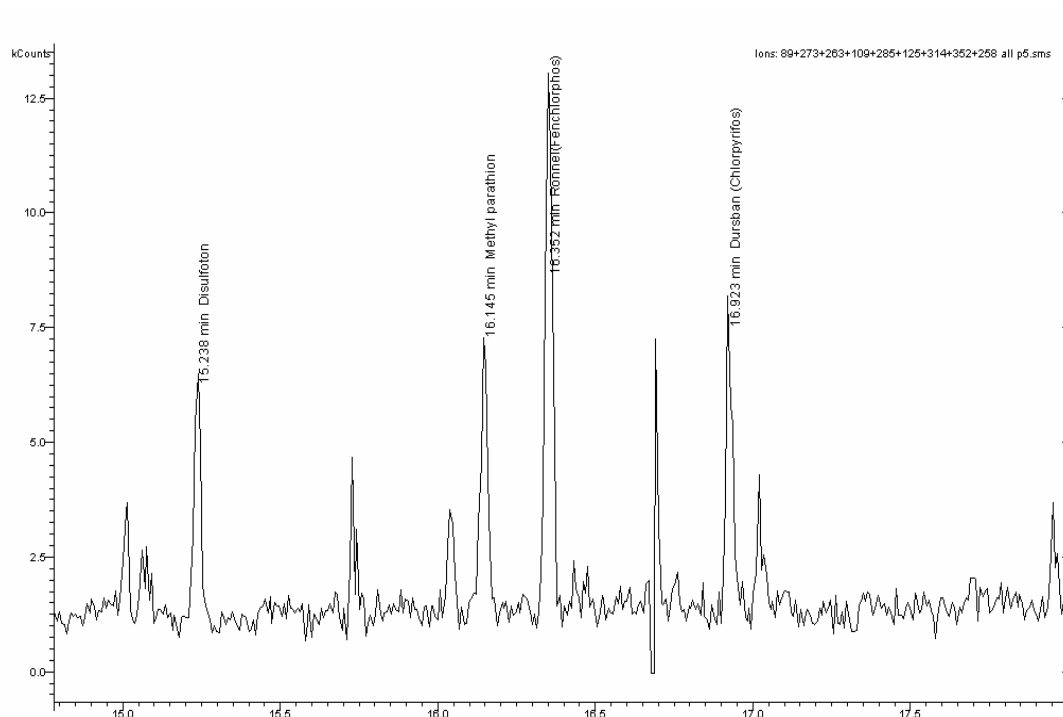


Figura 29: Cromatograma obtido com o método CG-EM para a amostra de água coletada no Rio da Várzea. P-3.

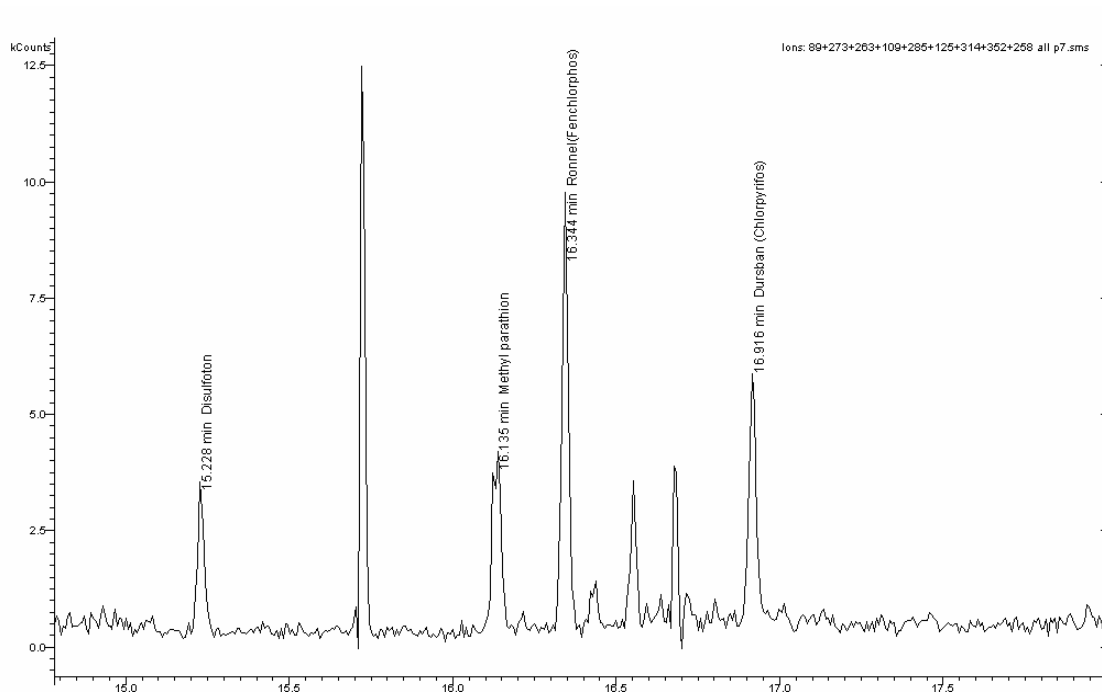


Figura 30: Cromatograma obtido com o método CG-EM para a amostra de água coletada no Rio da Várzea. P-4.

As Figuras 29 e 30 representam os resultados para os agroquímicos em estudo. Os valores encontrados são residuais e refletem uma tendência da utilização destas substâncias químicas na região.

CONCLUSÃO

Ao se fazer uso da técnica microextração líquido-líquido para pré-concentrar agroquímicos em amostras de águas, foi possível reduzir o volume de solvente extrator, o que resulta menor custo do método, reduzindo também problemas de descartes no ambiente, sendo necessária somente uma etapa da manipulação, reduzindo problemas de contaminação e perdas dos analitos.

Utilizando 1mL do solvente hexano foi possível alcançar maiores áreas para os agroquímicos Fenclorfos e Clorpirifos.

O ajuste do pH igual a 5 nas amostras para realizar a extração dos agroquímicos organofosforados mostrou ser um fator positivo, aumentando os valores de todos os agroquímicos, uma vez que em meio alcalino os agroquímicos em estudo são instáveis. Também ficou constatado a grande importância da adição do sal NaCl na amostra para proporcionar aumentos significativos na recuperação dos agroquímicos. Com a adição de NaCl $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ houve um aumento de 11,75% para o Dissulfoton, 20,87% para o Paration Metílico, 10,13% para o Clorpirifos e 35% para o Fenclorfos comparada a adição de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl.

A forma e o tempo de agitação do sistema micro extrator líquido-líquido foi fundamental no processo de extração dos agroquímicos. Em 10 minutos de agitação magnética foram observadas melhores taxas de recuperação dos quatro agroquímicos em relação à agitação manual do sistema.

Usando a técnica de cromatografia gasosa com o detector espectrômetro de massa foi possível obter cromatogramas comparando o pico obtido com o da solução padrão, o que auxilia em muito na identificação dos picos dos analitos de interesse.

O método desenvolvido mostrou bons resultados de linearidade com coeficientes de correlação de 0,99859 para o Dissulfoton, 0,99372 para o Paration Metílico, 0,99661 para o Clorpirifos e 0,99563 para o Fenclorfos dentro da faixa de concentração $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $25,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. O coeficiente de variação (CV%) foi inferior a 15% em relação à média global de todos os níveis de fortificação. Os valores de

recuperação obtidos para os agroquímicos foram de até 23% dentro dos parâmetros analíticos testados. Os valores de quantificação permitem que sejam atendidos os limites estabelecidos dentro da faixa do método desenvolvido. Muitas vezes, na prática, um limite de quantificação tão baixo não é necessário e o tempo de análise torna-se inviável, isso implica em um tempo de análise muito grande para uma análise rotineira. Assim, a técnica microextração líquido-líquido atende a um tempo de análise rápido e de baixo custo.

Os agroquímicos organofosforados estudados nesta dissertação, foram selecionados em função dos tipos de culturas existentes na região em estudo. Foram determinados a presença e os teores dos agroquímicos organofosforados Dissulfoton, Paration Metílico, Clorpirifos e Fenclorfos. Considerando os resultados obtidos nas amostras reais, dos 05 pontos de coleta em estudo foram encontrados resultados positivos em 02 pontos, nestes, as concentrações encontradas estiveram numa faixa de $0,098 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $0,688 \mu\text{g.L}^{-1}$. As contaminações podem ter ocorrido pelo uso inadequado dos produtos.

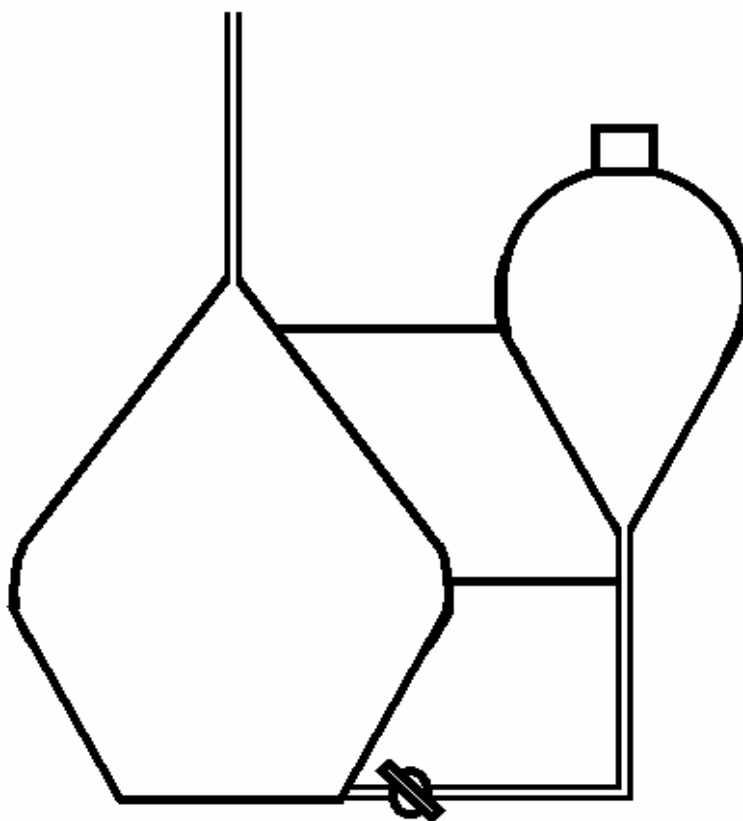
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Desenvolvimento de um programa de monitoramento dos agroquímicos a um longo período de tempo, que se faz necessário para verificar se os teores encontrados apresentam tendência a aumentarem ou diminuir.

Determinação de otimização de outros parâmetros, como: volume de amostra, volume de solvente extrator.

Fazer uso da técnica empregada com maior número de agroquímicos para pré-concentrar e analisar por este método analítico estudado.

Confecção de um frasco micro extrator que permite a utilização de solventes com densidades maiores que a da água, conforme figura abaixo.



REFERÊNCIAS

ANSON, H. M. **Analysis of Remainder Pesticides**. v. 58, EEVV, Wiley, Nova York, 1981.

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

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers**, Anal.Chem. 62, 2142 - 2144, 1990.

BALINOVA, A. **Strategies for Chromatography Analysis of Pesticide Residues in Water**. J. Chromatogr., A 754, 125 – 135 1996.

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

BARCELÓ, D. **Environmental Protection Agency and Other Methods for the Determination of Priority Pesticides and Their Transformation Products in Water**. J. Chromatogr., A 643, 117-143, 1993.

BERTHAULT, F.; KINTZ, P.; MANGIN, P. **Simultaneous High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Flunitrazepam and Four Metabolites in Serum**. J. Chromatogr., 685, 386, 1996.

BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. **Preconcentration of Contaminants in Water Analysis**. J. Chromatogr., A 902, 289 – 309, 2000.

CARASEK, E. R.; PINI, G. F.; AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P. **Modificações de um Micro Extrator de Vidro para Pré-enriquecimento de Traços de Agroquímicos**

Organoclorados de Água para Análise por Cromatografia Gasosa. Instituto de Química-Unicamp, Campinas, 109 -113, 1997.

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

CARASEK, E. R.; TONJES, J. W.; SCHARF, M. **Pré-concentração de Chumbo e Cádmiu em um Sistema de Microextração Líquido-líquido e Determinação por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.** Quím. Nova. 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 14 dez 2005.

CHIBA, K.; HORII, H.; CHIBA, T.; KATO, Y.; HIRANO, T.; ISHIZAKI, T. **Development and Preliminary Application of High-performance Liquid Chromatography Assay of Urinary Metabolites of Diazepam in Humans.** J. Chromatogr., B, 668,77,1995.

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

DORES, E. C. G. F.; FREIRE, E. M. D. **Contaminação do Ambiente Aquático por Agroquímicos. Estudo de Caso: Águas Usadas para Consumo Humano em Primavera do Leste – Mato Grosso – Análise preliminar.** Quím. Nova, v. 24, n. 1, 27 – 36, 2001.

DUGAY, J.; MIÉGE, C.; HENNION, M. C. **Effect of the Various Parameters Governing Solid-phase Microextraction for the Trace – Determination of Pesticides in Water.** J. Chromatogr., 759, 27, 1998.

EPA - Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/pesticides/about/>, acessado em 26 de maio de 2005.

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

FUGATAMI, K.; NARAZAKI, C.; KATAOKA, Y.; SHUTO, H.; OISHI, R. **Application of High-performance Thin-layer Chromatography for the Detection of Organophosphorus Insecticides in Human Serum after Acute Poisoning.** J. Chromatogr., B, 704, 369 - 373, 1997.

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

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Agroquímicos; **Manual de Resíduos de Agroquímicos em Alimentos.** 1999.

GROB, K.; GROB Jr. K.; GROB, G. **Organic Substances in Potable Water and in its Precursor.** J. Chromatogr., v. 106, n. 2, 299 - 315, 1975.

HANSON, H.M.; **Analysis of Remainder.** EEVV, vol 58. 1981.

HOFF, G. R.; ZONEN, P. **Trace Analysis of Pesticides by Gas Chromatography.** J. Chromatogr. 843, 301 – 322, 1999.

HENNION, M. C. **Solid-phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography.** J. Chromatogr. A, 856, 3 - 54, 1999.

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

HUBER, L. **Validation of Analytical Methods: Review and Strategy.** LC-GC Int., 11, 96 - 105, 1998.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology.** Q2A (CPMP/ICH), 381, 95, 1995.

IAEA – International Atomic Energy Agency. **Principles for Limiting Releases of Radioactive Effluents into the Environment.** Safety Series, n. 77, 1986.

JORGENSON, J.; Environ. Health Perspect. 185, 113, 2001.

KOVES, E. M.; WELLS, J.; **Evaluation of a Photodiode Array/HPLC-based System for the Detection and Quantitation of Basic Drugs in Postmortem Blood.** J. Forensic Sci. 37, 42 - 60, 1992.

KOVES, E. M.; **Use of High-performance Liquid Chromatography-diode Array Detection in Forensic Toxicology.** J. Chromatogr. A, 692, 103 - 119, 1995.

LO, D.; CHAO, T.; NG-ONG, S.; YAO, K.; KOH, T. **Acidic and Neutral Drugs Screen in Blood with Quantitation Using Microbore High-performance Liquid**

Chromatography-diode Array Detection Capillary Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. Forensic Sci. Int. 90, 205 - 214, 1997.

LILLSUNDE, P.; MICHELSON, L.; FORSSTRON, T.; KORTE, T.; SHULTZ, E.; ARINIEMI, K.; PORTMAN, M.; SIHVONEN, M. L.; SEPPALA, T. Forensic Sci.Int. 77, 191, 1996.

MAJORS, R. E. **The Use of Membrane in Sample Preparation.** LC-GC, v. 14, 936 – 939, 1996.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, A. F. **Reuso de Água.** São Paulo: Manole, 2003.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu Emprego no Combate as Pragas.** São Paulo: Nobel, 1983.

MURTI, C. R. K.; NAG, D. **Human Health Impact of Pesticides in the Environment.**In **Chimistry, Agriculture and the Environment.** Cambridge: Richardson, 1991.

MURRAY, D. A. J. **Rapid Micro Extraction Procedure for Analyses of Trace Amounts of Organic Compounds in Water by Gas Chromatography and Comparisons with Macro Extraction Methods.** J. Chromatogr., v. 177, 135 – 140, 1979.

NAMIESNIK, J.; GÓRECKI, T.; BIZIUK, M.; TORRES, L. **Isolation and Preconcentration of Volatile Organic Compounds from Water.** Anal. Chim. Acta. Analytical Chemistry, 237, 1 - 60, 1990.

OJANPERÄ, I.; RASANEN, J.; VUORI, E. **Automated Quantitative Screening for**

Acidic and Neutral Drugs in Whole Blood by Dual-column Capillary Gas Chromatography. J. Anal. Toxicol., 15: 8 - 204, 1991.

ORTUNIO, W. R. **Estudo da Influência do Volume da Amostra na Análise Quantitativa de Etanol por Cromatografia Gasosa.** 1 - 14, 1997.

O'HARA, P. B.; SANBORN, J. A. **Pesticides in Drinking Water: Project - Based Learning within the Introductory Chemistry Curriculum.** J. Chemical Education, v. 76, n. 12, 1673 - 1677, 1999.

Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil, 29 de Dezembro de 2000.

QUEIROZ, S. 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.** Quím. Nova. v. 24, n. 1, 68 - 76, 2001.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Application.** Hemisphere Publishing Co: Washington, 1985.

RISSATO, S. R.; LIBANIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. **Determinação de Agroquímicos Organoclorados em Água de Manancial, Água Potável e Solo na Região de Bauru – SP.** Quím. Nova, v. 27, n. 5, 739 - 743, 2004.

RIBANI, M. BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.** Quím. Nova, v. 27, n. 5, 771 - 780, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.; GLAJC.; **Practical HPLC Method Development.**

Jonh Wiley and Sons, New York, 110, 1997.

SONG, D. M.; ZHANG, S.; KOHLHOF, K. **Gas-Chromatographic-mass Spectrometric Method for the Determination of Flurazepam and its Major Metabolites in Mouse and Rat Plasma.** J. Chromatogr., B, 658, 142 - 148, 1994.

SILVA, F. A.; CARDEAL, Z. L.; CARVALHO, C. R. **Determinação de Agroquímicos Organofosforados em Águas Usando a Microextração em Fase Sólida e CGAR – EM.** Quím. Nova. v. 22, n. 2, 197 - 204, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Validação de Métodos Cromatográficos.** Technol. Pharm. 2, 12 – 18, 1998.

SHEPPARD, H. H.; **The Chemistry and Action of Insecticides.** New York, Mc Graw Hill Book Company, 504, 1951.

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

SHELLIN, M.; HAUSER, B.; PETTER, P. **Determination of Organophosphorus Pesticides using Membrane-assisted Solvent Extraction with Large Volume Injection – Gas Chromatography – Mas Spectrometric Detection.** J. Chromatogr., 1040, 251 - 258, 2004.

TEKEL, J.; HATRÍK, S. **Pesticide Residue Analyses in Plant Material by Chromatography Methods: Clean-up Procedures and Selective Detectors.** J. Chromatogr., 754, 397 – 410, 1996.

THEURILLAT, R.; THORMANN, W. **Monitoring of Tricyclic Antidepressants in**

Human Serum and Plasma by HPLC: Characterization of a Simple, Laboratory Developed Method Via External Quality Assessment. J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 751 - 760, 1998.

TURCANT, A.; PREMEL - CABIC, A.; CAILLEUX, A.; ALLAIN, P. **Toxicological Screening of Drugs by Microbore High-performance Liquid Chromatography with Photodiode-array Detection and Ultraviolet Spectral Library Searches.** Clin. Chem. 37, 1210 - 1215, 1991.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized Guidelines for Singlelaboratory Validation of Methods of Analysis.** Pure Applicaed Chemistry, 74, 835 – 855, 2002.

VESSMAM, J. STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGEL, A.; MULLER, H. **Selectivity in Analytical Chemistry.** Pure Applicaed Chemistry, v. 73, n. 8, 1381 – 1386, 2001.

WERCINSKI, S. A. S. **Solid Phase Microextraction.** A Practical Guide, Marcel Dekker: USA, 1999.

WELLS, M. J. M.; YU, Z. **Solid-phase Extraction of Acidic Herbicides.** J. Chromatogr. A, v. 8851, n. 241, 237 - 250, 2000.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)