



DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA DE MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS EM MEIOS HÍDRICOS

GABRIEL LAENDER TELES DE FREITAS

*Tese de Mestrado em Engenharia Química no contexto do Programa de Dupla
Diplomação entre o Instituto Politécnico de Bragança e o Centro Federal de
Educação Tecnológica de Minas Gerais*

Orientação

**Prof. Doutora Ana Queiroz
Prof. Doutor Paulo Brito
Prof. Doutor António Ribeiro**

Coorientação

Prof. Doutora Patrícia Patrício

BRAGANÇA

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus que me ofereceu essa oportunidade e que permitiu que o projeto fosse desenvolvido.

Gostaria de agradecer ao Instituto Politécnico de Bragança e ao CEFET-MG, pela oportunidade de participar do projeto de dupla diplomação e por oferecer todas condições para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também aos seus respectivos corpos docentes, direção e administração, que me ofereceram a oportunidade da realização do projeto nas duas instituições.

Aos meus orientadores Prof.^a Dr.^a Ana Queiroz, Prof. Dr. Paulo Brito, Prof. Dr. António Ribeiro e Prof.^a Dr.^a Patrícia Santiago de Oliveira Patrício, pelo suporte no tempo que lhe couberam, pelas suas correções, pelo apoio e compreensão, ensinamentos e pelas oportunidades que me foram oferecidas. Agradeço também ao Prof. Rolando Dias pela autorização para utilização do equipamento necessário para realização da extração em fase sólida.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

E a todos meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha pesquisa, da minha vida e do meu trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

O trabalho realizado tem o objetivo de desenvolver uma metodologia analítica para a monitorização de micropoluentes em meios hídricos. Foi selecionado para estudo um grupo de 11 pesticidas tendo por base aqueles mais utilizados na região nordeste de Portugal e no Brasil.

Esta metodologia baseia-se numa etapa de extração em fase sólida (SPE) seguida de quantificação por cromatografia gasosa em fase acoplada com espetrometria de massas (GC-MS).

Na otimização da etapa de extração utilizam-se cartuchos com adsorvente de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona (Chromabond HLB). Optou-se por desenvolver os estudos de SPE utilizando um grupo de pesticidas solúveis em metanol e outro grupo solúvel em hexano. A metodologia de extração proposta obteve recuperações superiores a 78% para uma mistura composta pelos pesticidas dimetoato, terbutilazina e heptacloro.

Na identificação e quantificação por GC-MS, os limites de deteção e de quantificação foram estimados através das curvas de calibração obtidas por análise sem extração de soluções padrão de dimetoato, terbutilazina e heptacloro. Os limites de deteção obtidos, são de 0,003 mg/L para o heptacloro, 0,066 mg/L para a terbutilazina e 1,98 mg/L para o dimetoato. Devido à pouca exatidão dos resultados, decidiu-se a utilização do método do padrão interno para melhores resultados.

Devido à situação de pandemia e à obrigatoriedade de confinamento imposta pelo governo português, foi possível estudar apenas as condições operatórias de análise utilizando padrões analíticos e sem utilizar a etapa inicial de extração por SPE. Estava prevista a validação do método utilizando amostras recolhidas de 3 rios de Bragança, rio Fervença, Sabor e Onor, contudo, esta não foi realizada.

Palavras-chave: poluentes emergentes; pesticidas; risco ambiental; extração em fase sólida; cromatografia gasosa acoplada com espetrometria de massas.

ABSTRACT

The work has the objective of developing an analytical methodology for the monitoring of micropollutants in water environments. A group of 11 pesticides was selected for study based on those most used in the northeast region of Portugal and in Brazil.

This methodology is based on a solid phase extraction (SPE) followed by quantification by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

In the optimization of the extraction step, cartridges with poly (divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone adsorbent (Chromabond HLB) adsorbent are used. It was decided to develop the SPE studies using a group of pesticides soluble in methanol and another group soluble in hexane. The proposed extraction methodology obtained recoveries greater than 78% for a mixture composed of the pesticides dimethoate, terbuthylazine and heptachlor.

In the identification and quantification by GC-MS, the limits of detection and quantification were estimated through the calibration curves obtained by analysis without extraction of standard solutions of dimethoate, terbuthylazine and heptachlor. The detection limits obtained are 0,003 mg/L for heptachlor, 0,066 mg/L for terbuthylazine and 1,98 mg/L for dimethoate. Due to the low accuracy of the results, it was decided to use the internal standard method for better results.

Due to the pandemic situation and the mandatory confinement imposed by the Portuguese government, it was possible to study only the operational conditions of analysis using analytical standards and without using the initial stage of extraction by SPE. The validation of the method was foreseen using samples collected from 3 rivers of Bragança, river Fervença, Sabor and Onor, however, this was not carried out.

Keywords: emerging pollutants; pesticides; environmental risk; solid phase extraction; gas chromatography coupled with mass spectrometry.

ÍNDICE

<i>Lista de Tabelas</i>	<i>i</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>ii</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>iii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Descrição dos capítulos do trabalho	3
2. POLUENTES EMERGENTES EM RECURSOS HÍDRICOS	5
2.1 Classificação dos poluentes emergentes	7
2.2 Os pesticidas como grupo prioritário	8
2.2.1 Fungicidas	10
2.2.2 Bactericidas	11
2.2.3 Herbicidas	11
2.2.4 Inseticidas	12
2.3 Legislação brasileira e portuguesa sobre os pesticidas	13
2.4 Métodos de remoção de poluentes emergentes em meios hídricos	14
3. TÉCNICAS E MÉTODOS PARA MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS	16
3.1 Monitorização de pesticidas	16
3.2 Pesticidas selecionados	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Reagentes	36
4.2 Material e equipamento	36
4.2.1 Sistema de extração em fase sólida	37
4.2.2 Sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas	37
4.3 Metodologia experimental	38
4.3.1 Otimização das condições operatórias em GC-MS	39

4.3.2 Otimização das condições operatórias em SPE	42
4.3.3 Validação da metodologia experimental desenvolvida	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Otimização do método de análise e quantificação por GC-MS	49
5.1.1 Separação e identificação dos 11 pesticidas	50
5.1.2 Análises realizadas com injetor em modo <i>Split</i> e detetor de massas em modo de varrimento <i>FullScan</i>	58
5.1.3 Influência do método do padrão interno em análises sem extração	62
5.1.4 Estudo das análises em modo SIM ou <i>FullScan</i>	68
5.1.5 Influência do modo de injeção <i>Split/Splitless</i> em modo SIM	71
5.1.6 Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade em análises sem extração	72
5.2 Otimização da técnica de extração por SPE	74
5.2.1 Seleção do tipo de adsorvente utilizado	75
5.2.2 Otimização do tipo de solvente a utilizar na etapa de eluição	75
5.2.3 Seleção das condições operatórias das 4 etapas de SPE	76
5.2.4 Determinação das recuperações	78
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	82
6.1 Conclusões	82
6.2 Sugestões para trabalho futuro	84
7. REFERÊNCIAS	86
8. ANEXOS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Classes e exemplos de poluentes emergentes.	7
Tabela 2.2	Legislação para potabilidade da água no Brasil.	14
Tabela 3.1	Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para estudo.	18
Tabela 3.2	Nível de solubilidade em água dos pesticidas selecionados para estudo.	19
Tabela 3.3	Principais referências encontradas na literatura, relativamente às técnicas de extração, métodos de quantificação, limites de detecção e quantificação para os pesticidas propostos para estudo e referidos na Tabela 3.1.	22
Tabela 5.1	Condições operatórias do “Método 1” utilizado na análise por GC-MS.	50
Tabela 5.2	Tempo de retenção para cada pesticida com uma concentração de 50 mg/L em metanol, utilizando o Método 1.	53
Tabela 5.3	Tempo de retenção e área obtida por GC-MS para os 5 pesticidas com uma concentração de 50 mg/L em hexano e utilizando o Método 2.	57
Tabela 5.4	Tempos de retenção e valores das áreas cromatográficas obtidas na análise dos padrões individuais dos 8 pesticidas com uma concentração de 100 mg/L, por GC-MS utilizando uma razão de <i>Split</i> de 1:10 e em modo de varrimento <i>FullScan</i> .	60
Tabela 5.5	Resultados do estudo da linearidade das análises por GC-MS sem extração e sem utilizar o método do padrão interno, gamas de linearidade ($y=a+bx$), ordenada na origem (a), declive (b) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CVm) para os 3 pesticidas estudados.	65
Tabela 5.6	Resultados do estudo da linearidade das análises por GC-MS sem extração e utilizando o método do padrão interno, gamas de linearidade ($y=a+bx$), ordenada na origem (a), declive (b) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CVm) para os 3 pesticidas estudados.	65
Tabela 5.7	Iões selecionados para a análise de cada um dos 8 pesticidas utilizando o modo SIM.	69
Tabela 5.8	Resultados experimentais obtidos para a repetibilidade utilizando a mistura M1 com uma concentração de 10 mg/L.	72
Tabela 5.9	Resultados experimentais obtidos para a reprodutibilidade utilizando a Mistura M1 com uma concentração de 10 mg/L.	73
Tabela 5.10	Áreas obtidas para as amostras recolhidas nas duas etapas finais de eluição em cada uma das 3 réplicas da solução padrão de cada pesticida com uma concentração de 10 mg/L.	78
Tabela 5.11	Valores de massa, concentração, áreas médias, razão entre as áreas dos pesticidas e do PI $(A/A_{PI})_{média}$, razão entre a concentração dos pesticidas e do PI (C/C_{PI}) e constante (K) calculados no estudo do padrão 10 mg/L.	79
Tabela 5.12	Concentrações e massas determinadas de cada pesticida para o padrão 1	80
Tabela 5.13	Concentrações e massas determinadas de cada pesticida para o padrão 2	80
Tabela 5.14	Concentrações e massas determinadas de cada pesticida para o padrão 3	80
Tabela 5.15	Resultados da percentagem de recuperação média dos 3 padrões para os pesticidas estudados.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Representação esquemática das 4 etapas fundamentais da extração por SPE.	20
Figura 3.2	Esquema de funcionamento de um sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas.	20
Figura 3.3	Estrutura química do acetocloro.	26
Figura 3.4	Estrutura química do alacloro.	26
Figura 3.5	Estrutura química do dimetoato.	28
Figura 3.6	Estrutura química do epoxiconazol.	29
Figura 3.7	Estrutura química do glifosato.	29
Figura 3.8	Estrutura química do heptacloro.	31
Figura 3.9	Estrutura química do imidacloprida.	32
Figura 3.10	Estrutura química do MCPA.	33
Figura 3.11	Estrutura química do metolacloro.	33
Figura 3.12	Estrutura química do tebuconazol.	34
Figura 3.13	Estrutura química do terbutilazina.	35
Figura 4.1	Sistema de extração em fase sólida (a) e Cartuchos utilizados para o processo de extração Chromabond (b).	37
Figura 4.2	Sistema de GC-MS da Shimadzu, modelo QP2020.	38
Figura 5.1	Cromatogramas individuais dos 11 pesticidas preparados em metanol, com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 1.	51
Figura 5.2	Cromatogramas individuais dos 5 pesticidas com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 2.	55
Figura 5.3	Cromatogramas individuais dos 5 pesticidas, preparados em hexano com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 2.	56
Figura 5.4	Cromatogramas dos 8 padrões individuais dos pesticidas com uma concentração de 100 mg/L e utilizando o Método 3.	59
Figura 5.5	Sobreposição dos cromatogramas dos 6 pesticidas preparados em metanol com concentração de 100 ppm.	61
Figura 5.6	Sobreposição dos cromatogramas dos 2 pesticidas preparados em hexano com concentração de 100 ppm.	62
Figura 5.7	Cromatograma do trifenilmetano.	63
Figura 5.8	Curva de calibração dos 3 pesticidas presentes na mistura 1 sem utilizar o padrão interno.	66
Figura 5.9	Curvas de calibração dos 3 pesticidas presentes na mistura 1 utilizando o padrão interno.	66
Figura 5.10	Cromatogramas da Mistura 1, obtidos com o injetor em <i>Splitless</i> e (a) em modo SIM e (b) em modo <i>FullScan</i> .	70
Figura 5.11	Cromatogramas da mistura 1, obtidos em SIM e com o injetor em (a) <i>Splitless</i> e (b) <i>Split</i> (1:10).	71
Figura 5.12	Diagrama representativo da técnica de SPE otimizada para a extração de pesticidas em amostras aquosas.	77

LISTA DE ABREVIATURAS

CEFET-MG	Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
CTN	Nanotubos de Carbono
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
GC	Cromatografia em fase Gasosa
GC-ECD	Cromatografia Gasosa com Detetor de Captura de Eletrões
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada com Espetrometria de Massas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Fluorescência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida com Detetor de Arranjo de Díodos
HPLC-ESI	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ionização por Eletronebulização
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Espetrometria de Massas.
HSF	Hormonas Sexuais Femininas
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
LC-APCI-MS/MS	Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada com Espetrometria de Massas.
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada com espectrometria de massas
LD	Limite de Deteção
LLE	Extração Líquido-Líquido
LQ	Limite de Quantificação
mNTC	Nanotubos de Carbono Híbridos e Anfífilicos com Propriedades Magnéticas
PE	Poluentes Emergentes
PI	Padrão Interno
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta de Eficiência em Fase Reversa
SIM	Monitoramento de Ião Seleccionado
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
TIC	Cromatograma obtido pela soma das intensidades de corrente iónica total de todos os fragmentos de massa
UPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada com Espetrometria de massa

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

A análise da poluição em meios hídricos tem sido um tema cada vez mais relevante no âmbito dos estudos ambientais. Com o passar dos anos, os meios hídricos tornaram-se recetores de diferentes tipos de poluentes oriundos de diversas fontes, como sejam o setor industrial, as atividades agrárias e pecuárias, os resíduos hospitalares, entre outros.

Com o desenvolvimento de novas atividades e novas reações químicas, os resíduos têm-se tornado cada vez mais complexos podendo vir a representar um perigo potencial não só para a fauna e flora aquática, como também para o ser humano. Dentre os diversos poluentes, destacam-se os pesticidas, os fármacos, os produtos de higiene pessoal, os nanomateriais, entre outros.

Os poluentes emergentes têm sido encontrados em diversos corpos de água em concentrações muito baixas, chegando até mesmo a níveis inferiores a 1 miligrama por bilião (ppb), dificultando não só a sua identificação e quantificação, como também o desenvolvimento de métodos eficientes para o tratamento de águas contaminadas.

Atualmente, as estações de tratamento de água (ETA) e de esgoto (ETE) não têm condições de realizar o tratamento eficaz de água e lixiviados contendo esses poluentes, existindo assim um interesse crescente em desenvolver metodologias para identificar e quantificar e remover esses compostos, garantindo a proteção do ser humano.

Um dos principais grupos de poluentes são os pesticidas, normalmente utilizados na agricultura. Estes compostos são classificados em herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outras classes. Uma das principais características que definem os pesticidas como possível problema para o meio ambiente é a capacidade que alguns destes compostos tem de migrar para os solos, alimentos ou aquíferos, contaminando toda a cadeia alimentar.

Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias e técnicas experimentais ou o aperfeiçoamento das já existentes, para quantificação e identificação desses compostos, seja por questões ambientais ou de saúde pública.

Este trabalho propõe um método de análise e quantificação para 11 pesticidas em meios aquosos, sendo eles, o acetocloro, alacloro, dimetoato, epoxiconazol, glifosato, heptacloro, imidacloprida, metolacloro, MCPA, tebuconazol e a terbutilazina. A metodologia proposta baseia-se na extração em fase sólida (SPE) seguida da análise e quantificação por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS).

Realiza-se o estudo e a otimização das condições operatórias quer para a técnica de extração/concentração por SPE, quer das condições operatórias do sistema de análise e quantificação utilizando um sistema de GC-MS.

A otimização do método de extração por SPE engloba a seleção do tipo de adsorvente, do volume e tipo de solventes, assim como os caudais a utilizar em cada passo do processo de extração para cada pesticida ou classe de pesticidas. No processo cromatográfico, otimizam-se as condições operatórias como sejam o programa de temperaturas e a razão de *Split* na injeção da amostra de forma a maximizar a resolução e a aumentar os limites de deteção e quantificação. Estudou-se ainda a utilização do método do padrão interno (PI) na otimização da linearidade das curvas de calibração. Em relação à deteção por espectrometria de massas compararam-se análises em modo de deteção por *FullScan* (Varrimento completo) e modo *SIM* (Monitoramento do ião selecionado)

1.2 Objetivos

Com este trabalho pretende-se realizar uma revisão bibliográfica sistemática sobre as diferentes classes de poluentes emergentes (PE) em matrizes aquosas. Atendendo que na região de Bragança, o setor agrícola tem uma forte relevância, este estudo foi direcionado para a análise de pesticidas, mais especificamente aqueles que são mais utilizados no Nordeste de Portugal, no Brasil e em regiões com características socioeconómicas semelhantes às de Bragança.

Na revisão bibliográfica apresentada, pretende-se identificar claramente as técnicas de extração e concentração assim como os métodos instrumentais de análise atuais mais utilizados para a monitorização de pesticidas em meios hídricos.

De acordo com os equipamentos de análise disponíveis no Laboratório de Química Analítica do Instituto Politécnico de Bragança, deverá ser feita uma seleção de reagentes, técnicas analíticas e equipamentos de deteção e quantificação que permitam o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de monitorizar pesticidas em meios hídricos.

A metodologia experimental escolhida deve ser desenvolvida e os seus principais parâmetros de operação otimizados.

1.3 Descrição dos capítulos do trabalho

Este trabalho está dividido em 8 capítulos, sendo o primeiro deles a introdução, onde é apresentada a contextualização do tema, apresentando a problemática da crescente utilização dos poluentes emergentes e de como estes micropoluentes, incluindo os pesticidas, podem influenciar negativamente o meio ambiente e a saúde do ser humano. São também enumerados os objetivos propostos do trabalho.

No segundo capítulo é apresentado o conceito de poluentes emergentes, uma discussão sobre o problema do excesso desses compostos na natureza, em especial nos recursos hídricos, modo de atuação, classificações dos poluentes, discussão sobre os pesticidas, quais as classes nas quais os pesticidas são subdivididos, as legislações brasileira e portuguesa quanto à presença desses pesticidas na água, e os principais métodos utilizados atualmente para a remoção de poluentes emergentes em meios hídricos.

No capítulo 3 são apresentadas diferentes metodologias para a monitorização dos 11 pesticidas estudados neste trabalho. As diferentes metodologias foram propostas por diferentes autores, para monitorização de diferentes amostras, com diferentes técnicas de extração e métodos analíticos utilizados não só para identificação como para quantificação dos poluentes. Além disso, são apresentadas informações

referentes a cada um dos 11 pesticidas estudados neste trabalho, suas estruturas químicas, como atuam na proteção dos vegetais ou como atuam para combater as pragas e as suas principais características químicas.

No capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos propostos e utilizados neste trabalho, como, reagentes, equipamentos, método e etapas para otimização da extração por SPE proposta, método e etapas para otimização do método analítico proposto por GC-MS e uma discussão sobre a validação da metodologia desenvolvida.

No capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos em cada etapa da otimização do método de extração e do método analítico. Apresentam-se também os devidos tratamentos estatísticos para os resultados, de modo a se selecionar a metodologia mais completa e eficiente tanto na extração, quanto na identificação dos pesticidas.

No capítulo 6 apresentam-se as conclusões e algumas sugestões para trabalho futuro. No capítulo 7 enumeram-se as referências bibliográficas utilizadas para o enquadramento teórico do trabalho e o capítulo 8 contém os anexos.

2. POLUENTES EMERGENTES EM RECURSOS HÍDRICOS

Os poluentes emergentes (PE) são compostos que têm recebido muita atenção no cenário ambiental atual, pois trata-se de substâncias que normalmente não são monitorizadas, mas que apresentam um potencial elevado de provocar efeitos nocivos severos aos seres humanos e ao meio ambiente. Apesar de muitos dos poluentes emergentes não exibirem uma toxicidade aguda pronunciada, muitos deles, mesmo em valores de concentração extremamente baixa, podem levar a distúrbios na reprodução, fisiologia e desenvolvimento das espécies (Portal Saneamento Básico, 2018).

Uma característica importante dos poluentes é que cada uma das suas classes apresenta comportamentos diferentes no meio ambiente e, portanto, cada um deles pode resultar em impactos ambientais distintos (Montagner *et al.*, 2017).

Os principais contaminantes emergentes englobam os pesticidas, os fármacos, os produtos de beleza, as fragrâncias, os plastificantes, as hormonas, os retardadores de chama, as nanopartículas, os compostos perfluoro-alcalinos, as parafinas cloradas, os siloxanos, as toxinas de algas e os radionuclídeos. Deve-se salientar que existem diversos outros contaminantes, mas estes são alguns dos principais exemplos (Portal Saneamento Básico, 2018).

Um fator preponderante para o perigo dos poluentes emergentes consiste no facto de ainda não existir legislação para este tipo de compostos e, portanto, muitos deles podem representar uma ameaça potencial para os ecossistemas e para a saúde humana num futuro próximo (Ferreira *et al.*, 2009).

O facto de termos pouca informação sobre a sua proveniência, concentrações nos meios hídricos e efeitos toxicológicos no ambiente, faz com que o problema dos poluentes emergentes esteja a ser de especial importância a nível mundial (Ferreira *et al.*, 2009).

Apesar de, atualmente, ainda não ser possível avaliar a real gravidade da contaminação dos recursos hídricos, a crescente utilização destes compostos pode

representar um alto risco ambiental, principalmente devido às elevadas taxas de desenvolvimento industrial, síntese de novos compostos e reações químicas cada vez mais complexas. Por outro lado, existe ainda o crescimento da total despreocupação e desrespeito de diversas indústrias com a deposição e/ou libertação descontrolada dos seus resíduos para o meio ambiente (Antunes, 2013).

Na literatura (Sodré *et al.*, 2007), encontram-se destacados inúmeros efeitos tóxicos provocados pelas diversas classes de contaminantes emergentes nos organismos vivos, mesmo em concentrações consideradas muito baixas:

- Disfunção do sistema endócrino e reprodutivo de seres humanos e animais;
- Antecipação da idade da menarca;
- Abortos espontâneos;
- Distúrbios metabólicos, como a disfunção na tiroide;
- Aumento de casos de cancro como da mama, testículo e próstata;
- Bactérias resistentes;
- Defeitos congénitos;
- Infertilidade masculina (devido à queda da taxa de espermatozoides);
- Alterações no sistema neurológico;

Apesar de serem ainda estudos recentes, sabe-se que a persistência, bioacumulação e transformação destes compostos no corpo humano são os três fatores preponderantes para os danos que eles podem causar, já que alguns deles são resistentes à degradação fotoquímica e biológica e têm afinidade com os tecidos animais, podendo concentrar-se sobre estes e se transformar noutras substâncias, que podem ser ainda mais tóxicas do que as iniciais (Bila e Dezotti, 2007).

O principal desafio para a determinação de um tratamento para cada um dos diferentes poluentes emergentes, deve-se ao facto de ser difícil prever o seu efeito nos ecossistemas e para a saúde humana, já que são várias as reações resultantes da mistura entre diferentes poluentes e também as interações entre diferentes substâncias que geram novos compostos cada vez mais complexos, em concentrações e com efeitos desconhecidos (Silva, 2016a).

2.1 Classificação dos poluentes emergentes

São exemplos de poluentes emergentes os produtos farmacêuticos, toxinas provenientes de algas, antioxidantes, biocidas, detergentes, subprodutos de tratamento de água, fragrâncias, produtos de higiene pessoal, pesticidas, resíduos oriundos de obras de alvenaria, entre outros. As principais fontes desses contaminantes são os esgotos domésticos, efluentes de unidades de saúde, atividades de agricultura, pecuária e aquacultura e principalmente, resíduos de indústrias dos mais diferentes tipos (Arias, 2013).

Os contaminantes emergentes podem ser divididos em diferentes classes, como representado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Classes e exemplos de poluentes emergentes. (Fonte: Adaptado de Arias, 2013)

Poluentes Emergentes	Exemplos
<i>Pesticidas</i>	<i>Dieldrina, aldrina, endrina, heptacloro, piretrina, sabatina, rotenona, clorados, clorofosforados, fosforados, carbamatos</i>
Antibióticos	Trimetropina, eritromicina, lincomicina, sulfametazona.
Analgésicos e anti-inflamatórios	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenoprofeno.
Esteroides e hormonas (contracetivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol.
Retardantes de chama	Éteres difenílicos polibromados, tetrabromobis fenol A.
Aditivos industriais	EDTA, sulfonatos aromáticos.
Produtos de desinfecção	Bromoácidos, bromoaldeídos, cianoformaldeídos, bromatos, iodo.

A lista de contaminantes emergentes inclui uma ampla variedade de produtos que são de uso diário industrial e doméstico. Segundo Ghiselli e Jardim (2007), “*Estima-se que uma pessoa utilize, em média, dez produtos entre cosméticos e produtos de higiene todos os dias antes de sair de casa*”.

A fonte mais importante dos poluentes emergentes, na maioria dos países, são as estações de tratamento de esgotos, devido à ausência de uma rede coletora adequada e uma baixa eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes, os quais não conseguem remover os contaminantes emergentes por completo (Silva e Collins, 2011).

Dentre os diversos poluentes emergentes, os pesticidas são considerados uma das principais classes desses compostos, uma vez que têm sido cada vez mais utilizados em culturas agrícolas, para ampliar e proteger as plantações de organismos indesejados.

Apesar de cada país possuir uma legislação própria quanto a estes compostos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas em diversos países, nos últimos anos, de modo a estudar a influência dos pesticidas, no solo, ar, nos vegetais, assim como os possíveis efeitos na saúde dos seres vivos em geral.

2.2 Os pesticidas como grupo prioritário

Os pesticidas são compostos utilizados na agricultura com a função de prevenir e ou reduzir os efeitos causados por pragas ou doenças em plantações. Estas substâncias são geralmente compostos orgânicos sintéticos de baixa solubilidade em água e alta atividade biológica. Estes compostos podem ser classificados em inseticidas, fungicidas e herbicidas, entre outras classificações (Silva e Fay, 2004).

O principal mecanismo de ação dos pesticidas consiste em bloquear uma das vias metabólicas de um organismo, levando à sua morte. A eficácia da ação dos pesticidas reside nalgumas das suas propriedades, como por exemplo, a sua elevada persistência no meio ambiente, grande estabilidade química e bioacumulação (Ghiselli e Jardim, 2007). Por outro lado, estas características são também nefastas em termos ambientais.

O uso de pesticidas na agricultura pode conduzir à contaminação das águas superficiais e subterrâneas quer pelo vento, escoamento, drenagem e ou lixiviação. A contaminação da água tem quase sempre efeitos tóxicos para a fauna e flora aquática e para a saúde humana (Cerejeira *et al.*, 2003).

Os pesticidas sofrem transformações químicas após a sua aplicação na agricultura e, portanto, tornam-se substâncias mais complexas (Batista *et al.*, 2000). Os principais efeitos dos pesticidas para a saúde humana, quando da ingestão de águas contaminadas com estes compostos, é o possível desenvolvimento de diversas

formas de mutações, alterações imunológicas na reprodução, além de possíveis desregulações endócrinas (Batista, 2003).

O comportamento e distribuição dos pesticidas no ambiente depende das suas propriedades físico-químicas, como solubilidade na água, pressão de vapor e constante de ionização, ácido ou base, porém uma das propriedades consideradas mais importantes é a constante de partição octanol-água (Cerejeira, 1993).

Em termos ambientais, um pesticida ideal depois de alcançar o seu efeito toxicológico, dever-se-ia degradar em substâncias não tóxicas. Atualmente, existem muitas pesquisas para garantir que os pesticidas tenham aplicações não só eficazes, como também que não produzam danos no meio ambiente (Ferreira *et al.*, 2009).

Os pesticidas são mais persistentes em águas subterrâneas do que em corpos de água superficiais e no solo devido à presença de microrganismos e luz solar em águas superficiais, facilitando os processos de degradação desses compostos, diferentemente de águas subterrâneas, que não apresentam muita atividade microbiana e não sofrem ação da luz ultravioleta (Batista, 2003).

Existem três vias principais pelas quais o homem pode expor-se aos pesticidas: consumo de água contaminada, inalação de vapores de água contaminada ou absorção cutânea através de banho com água contaminada.

A maioria dos pesticidas são desenvolvidos para atuar sobre um tipo de peste agrícola específica, mas após a sua utilização, muitos compostos remanescentes da aplicação dos pesticidas podem afetar negativamente inúmeras espécies da fauna e da flora.

Outro problema causado pelo excesso de pesticidas no meio ambiente consiste no facto de que alguns microrganismos desenvolvem-se degradando e consumindo alguns compostos oriundos dos pesticidas, enquanto para outros esses compostos são tóxicos e levam à sua morte. Esse cenário tem alterado biologicamente o meio ambiente, levando à seleção natural de algumas espécies (Cedergreen, 2014).

A aplicação dos pesticidas, depende das suas formulações e estado físico, sendo que as mais utilizadas são a técnica de polvilhação, pulverização, nebulização e distribuição. Dentre esses métodos, o mais utilizado atualmente é a pulverização devido, principalmente, à sua dinâmica de aplicação. Para esta técnica é importante escolher o equipamento adequado e garantir a aplicação direta sobre o alvo, evitando contaminações diretas do solo, água, ar ou outras plantas (Lovecka *et al.*, 2012).

Devido à grande diversidade de formulações disponíveis de pesticidas, eles passaram a ser classificados comercialmente de acordo com o alvo a ser atingido pela utilização do produto, destacando-se os fungicidas, bactericidas, herbicidas e inseticidas. Existem também os rodenticidas, acaricidas, hematicidas, vermífugos, entre outros.

2.2.1 Fungicidas

Os fungicidas são compostos químicos ou organismos biológicos utilizados principalmente em atividades agrícolas, para inibir ou matar fungos e esporos. Os fungos são considerados um sério problema para a agricultura, devido aos danos causados por estes microrganismos, que levam a perdas críticas de qualidade e rendimento de diversas culturas de plantações (Costa *et al.*, 2013).

Os fungicidas configuram-se como compostos de alto risco de poluição uma vez que a sua aplicação, armazenamento e eliminação são frequentemente realizadas de forma inadequada. Outro fator que contribui para o risco na utilização destes compostos é a poluição causada principalmente pela lixiviação e escoamento para os lençóis freáticos. Alguns estudos indicam que qualquer que seja o trajeto dos fungicidas no meio ambiente, o homem acaba sendo o seu potencial receptor (Costa *et al.*, 2013). Os fungicidas atuam diretamente sobre a membrana celular dos microrganismos núcleo e/ou respiração dos fungos, levando à sua morte (Gavrilescu, 2005).

Os fungicidas mais persistentes têm maior probabilidade de permanecer no meio ambiente por mais tempo podendo contaminar mais facilmente o solo e a água. Os principais fatores que afetam a degradação dos pesticidas são a temperatura, o valor de pH, a humidade e o teor de matéria orgânica (Pierzynski *et al.*, 1994). Alguns

pesticidas são degradados rapidamente em solos com elevados níveis de matéria orgânica, enquanto outros são degradados mais lentamente (Bollag e Liu, 1990) e apesar da proibição da comercialização e utilização de alguns fungicidas mais persistentes, em muitos países, a utilização destes continua a ser feita.

2.2.2 Bactericidas

Os bactericidas podem chegar até os meios hídricos através do seu escoamento a partir das plantas e dos solos tratados. O Serviço Geológico dos EUA indica que 90% das amostras de água e peixe de todos os lagos dos EUA contêm diversos tipos de pesticidas (Kole *et al.*, 2001).

Apesar de existir uma pesquisa intensa sobre poluição nos meios hídricos, ainda existe dificuldade na avaliação real dos riscos para a saúde humana causados pelos bactericidas, devido a existir uma grande gama de parâmetros humanos a avaliar, como sejam o seu efeito em relação à idade, sexo, saúde, entre outros.

Mesmo com diversos estudos indicando os riscos dos bactericidas, os benefícios oferecidos, principalmente económicos, são sempre os que prevalecem, sendo normalmente uma alternativa fácil e relativamente barata para a proteção e o tratamento de culturas agrícolas.

2.2.3 Herbicidas

Os herbicidas são utilizados principalmente em aplicações agrícolas, sendo substâncias na sua grande maioria persistentes no meio ambiente. O escoamento superficial e a lixiviação são as vias de contaminação preferenciais dos meios hídricos. Alguns estudos indicam que por todo o mundo, os efluentes das estações de tratamento de águas residuais contêm elevados teores de diversos herbicidas, comprovando a dificuldade em eliminar estes poluentes nos processos de tratamento de águas (Filizola *et al.*, 2002).

Os efeitos causados por um herbicida numa planta variam de acordo com a suscetibilidade da mesma, já que os herbicidas demonstram seletividade sobre determinados vegetais. Os herbicidas conhecidos como não-seletivos são

considerados os mais perigosos, pois podem exercer uma ação nefasta sobre a vida vegetal quando aplicados de forma incorreta (Sherwani; Arif; Khan, 2015).

Apesar dos danos que podem ser causados pelos herbicidas, estes, são desenvolvidos para possuir ação unicamente em vegetais, portanto, são compostos que apresentam uma baixa toxicidade em mamíferos.

Alguns herbicidas são solúveis em água podendo deslocar-se pelo solo através da erosão, atingindo os lençóis freáticos e podendo ser transportados até corpos de água próximos à sua aplicação. Um herbicida mesmo sendo considerado específico para uma ou mais espécies de plantas, caso entre em contato com um sistema de água, pode representar um risco para animais e seres humanos (Sherwani; Arif; Khan, 2015).

Quando contaminadas por herbicidas, as águas subterrâneas passam a necessitar de um tratamento dispendioso de forma a evitar riscos à saúde humana. Desta forma, é importante considerar algumas medidas preventivas no momento da aplicação do produto de forma a evitar que estes cheguem até às águas.

2.2.4 Inseticidas

Os inseticidas são a classe de pesticidas utilizada no combate de insetos. Nessa classe estão incluídos os ovicidas e os larvicidas, utilizados no combate contra os ovos e larvas de insetos, respetivamente. Os inseticidas são utilizados na agricultura, na medicina, na indústria e no ambiente doméstico.

Os inseticidas têm um potencial elevado para alterar ecossistemas, apesar de muitos destes compostos serem tóxicos para os seres humanos. Os inseticidas aplicados nas culturas agrícolas e nas áreas urbanas não se degradam facilmente. Os organoclorados, por exemplo, permanecem no ambiente por longos períodos, podendo aí ficar durante anos. Em certas circunstâncias, esta característica pode ser benéfica para a ação do pesticida, pois compostos mais persistentes são potencialmente mais eficazes no combate de pragas por mais tempo. Por outro lado,

os compostos persistentes também terão mais facilidade para contaminar fontes de água provocando danos aos organismos aquáticos por períodos mais longos.

Os inseticidas podem acumular-se biologicamente em invertebrados e espécies de peixes, avançando na cadeia alimentar através das aves que se alimentam de insetos, depois de mamíferos que se alimentem de aves ou plantas e, finalmente, alcançar os seres humanos. Existe também a possibilidade mais direta de contaminação quando os humanos se alimentam diretamente das plantas contaminadas.

2.3 Legislação brasileira e portuguesa sobre pesticidas

O Brasil é um país de enorme extensão tendo grande parte de sua economia voltada para a agricultura. A importância dessa atividade para o país, faz com que sejam utilizados diversos métodos para garantir a qualidade e proteção das culturas agrícolas. Um dos métodos mais utilizados é a aplicação intensiva de pesticidas para proteção das plantações. Alguns estudos realizados em 2015 indicam que foram pulverizados 899 milhões de litros de pesticidas em 21 áreas agrícolas por todo o Brasil, destacando-se a soja como alimento em que foi utilizada a maior quantidade de pesticidas, seguida do milho e da cana-de-açúcar (IBGE, 2015).

Dentre as regiões que mais utilizam pesticidas, destacam-se os estados de São Paulo, Tocantins e Paraná, uma vez que são estados brasileiros com elevada atividade agrícola. Os princípios ativos dos pesticidas mais utilizados são os herbicidas alacloro, a atrazina, o diuron, o glifosato e a trifluralina, o fungicida carbendazim, uma mistura dos inseticidas heptacloro, clordano e nonacloro, com o nome de clordano e a permetrina utilizada como inseticida, repelente e acaricida. (Pignati, *et al.*, 2017).

O principal problema da aplicação destes compostos é a falta de controle e legislação, sendo a aplicação feita em grande parte por equipamentos pulverizadores, atingindo não só as plantações, como também leitos de água e solos circundantes às plantações.

Segundo a legislação brasileira, são vários os pesticidas que devem ser controlados para garantir o padrão mínimo de potabilidade da água para consumo humano. Os

anexos da portaria brasileira Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 destacam alguns compostos, enumerados na Tabela 2.2, como tendo limites máximos a serem respeitados. Dos compostos enumerados, destacam-se o alacloro, o glifosato e o ácido aminometilfosfónico (AMPA), o diuron, o metolacloro e o tebuconazol (Ministério da Saúde do Brasil, 2011).

Tabela 2.2 – Legislação para potabilidade da água no Brasil.
(Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2013)

Agrotóxicos	Valor máximo permitido (µg/L)
Alacloro	20
Glifosato + AMPA	500
Diuron	90
Metolacloro	10
Tebuconazol	180

O Brasil tem ajustado a atual legislação e por outro lado tem feito nova legislação mais rígida em relação à utilização de pesticidas, à semelhança da Europa onde muitos dos pesticidas utilizados já possuem um valor limite máximo de utilização muito inferior, chegando mesmo a ser proibida a utilização de alguns pesticidas.

Quanto à legislação portuguesa para a monitorização das águas destinadas ao consumo humano, ao abrigo do Decreto-Lei n.º 306/2007, atualizado no ano de 2018, são feitas indicações de quais os contaminantes que devem ser monitorizados para cada região do país. Em relação ao distrito de Bragança, existe ênfase na necessidade na monitorização dos herbicidas MCPA (ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético) e terbutilazina, do inseticida imidacloprida e do inseticida dimetoato. Este documento também destaca que devem ser feitas monitorizações anuais quanto ao nível do herbicida glifosato em águas.

2.4 Métodos de remoção de poluentes emergentes em meios hídricos

Apesar da concentração dos poluentes emergentes no meio ambiente poder ser muitíssimo baixa, chegando a situar-se na escala do miligrama por bilião ou mesmo por trilião, os possíveis efeitos adversos no ser humano ou nos ecossistemas podem ser enormes. Este problema tem vindo a impulsionar a comunidade científica para o

desenvolvimento de esforços no aperfeiçoar de métodos para identificar e eliminar estes poluentes em meios hídricos uma vez que os métodos de tratamento convencionais utilizados nas estações de tratamento de água e esgoto (ETA e ETE) não são eficientes na remoção desses poluentes.

Atualmente, nas estações de tratamento utilizam-se métodos físicos, biológicos e químicos. Destacam-se os métodos químicos de processos de permuta de fase, como sejam os métodos de adsorção em diferentes matrizes sólidas e os processos de separação por membrana, assim como os processos biológicos e de oxidação avançados, os quais têm tido um desenvolvimento significativo nos últimos anos, podendo alcançar remoções até cerca de 98% para alguns poluentes (Marcelino, 2014).

Os jardins filtrantes ou “*Wetlands*”, têm-se mostrado uma alternativa promissora na remoção de alguns poluentes emergentes, destacando-se principalmente na remoção de pesticidas e de fármacos. Estes sistemas de tratamento naturais para tratamento de águas residuais, são constituídos por plantas aquáticas e substratos, como areia, brita, orgânicos, entre outros. São considerados sistemas de baixo custo e de fácil operação. Atualmente, a implementação destes jardins tem crescido em diversos países sendo principalmente utilizados no tratamento secundário e terciário de esgotos. Este processo de tratamento pode ser combinado com processos químicos, físicos e biológicos, aumentando a eficiência do tratamento de diferentes tipos de efluentes (Poças, 2015).

3. TÉCNICAS E MÉTODOS PARA MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS

3.1 Monitorização de pesticidas

A poluição da água pode ser definida como qualquer alteração nas suas características originais pela adição de contaminantes, fazendo com que esta deixe de servir para consumo humano ou para sobrevivência do ecossistema aquático (Agrawal *et al.*, 2010).

A agricultura pode contribuir para a poluição da água de confinamentos, pastagens e plantações, além das atividades agrícolas, a mineração, perfuração de petróleo e aterros sanitários também podem ser fontes importantes de poluição da água. Outras fontes de poluição da água, relacionadas aos seres humanos são os esgotos sanitários, águas pluviais, efluentes da indústria e da construção civil.

Os pesticidas são amplamente utilizados na agricultura para reduzir a quebra de produção causada por pragas. No entanto, os pesticidas são compostos diretamente responsáveis pela poluição do meio ambiente já que a sua presença na água ou no solo representa um risco para os organismos aquáticos ou terrestres e para a saúde humana (Hallberg, 1989; Sankhla *et al.*, 2018).

Segundo algumas pesquisas da Organização das Nações Unidas, menos de 1% dos pesticidas aplicados afetam exclusivamente o seu alvo, enquanto o restante se distribui pelo solo, ar e água. Portanto, o tratamento de águas contaminadas com pesticidas é uma grande preocupação, uma vez que os pesticidas são compostos tóxicos, podendo ser carcinogénicos, resultando em riscos significativos para a saúde (Barcelo *et al.*, 1996; Readman *et al.*, 1992).

Na produção agrícola, a utilização de pesticidas tem sido uma estratégia de controlar diferentes tipos de doenças, pragas e ervas daninhas. Contudo, a sua utilização intensiva e de forma descoordenada, tem causado inúmeros problemas ambientais, como a poluição da água e dos solos.

Os pesticidas são desenvolvidos para atuar contra insetos e pragas em geral e, portanto, muitas vezes não são específicos para uma única espécie. Assim, quando

aplicados, entram em contato com as pragas-alvo, mas também com organismos não-alvo.

Atualmente, o principal objetivo dos fabricantes é a produção de pesticidas que tenham não só uma ótima eficiência biológica, com uma boa relação custo-benefício, sejam produtos fáceis de se utilizar e que causem o mínimo impacto ambiental possível.

A monitorização de pesticidas em amostras aquosas é feita através de métodos analíticos, tanto no que diz respeito à sua detecção como à sua quantificação. Para determinar e quantificar pesticidas em matrizes complexas, é normalmente necessária uma etapa inicial onde se realiza a extração e a concentração simultâneas, permitindo um aumento significativo da sensibilidade do método de análise permitindo alcançar limites de detecção e quantificação muito baixos. Por outro lado, esta etapa permite igualmente eliminar compostos interferentes que possam estar presentes na matriz, e que afetem a exatidão dos resultados obtidos. Existem diferentes técnicas de extração, devendo a sua escolha depender do tipo de matriz estudada, do objetivo da análise e das propriedades físico-químicas do pesticida ou classe de pesticidas que se deseja analisar.

De entre os métodos analíticos utilizados atualmente, destacam-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), assim como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Estes métodos instrumentais combinam as vantagens da alta seletividade e eficiência de separação, com detecção por espectrometria de massa, a qual fornece uma informação estrutural detalhada do composto analisado (Trocewicz, 1996).

No início do trabalho elaborou-se um inventário dos reagentes e selecionaram-se para estudo 11 pesticidas existentes no Laboratório de Química Analítica (LQA). Todos os pesticidas foram catalogados, com as suas respetivas fórmulas moleculares, massas molares, solubilidade em água, ponto de ebulição e coeficiente de partição octanol-água.

Realizou-se de seguida uma pesquisa sobre todos os pesticidas que seriam estudados, de modo a avaliar o comportamento destes na água e no solo, produtos de degradação e seus efeitos na saúde humana, além dos meios de contaminação e dissipação no meio ambiente.

Na Tabela 3.1 apresentam-se algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas existentes no Laboratório de Química Analítica (LQA) do IPB.

Tabela 3.1 - Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para estudo.

(Fonte: PUBCHEM; IUPAC; PPDB, agosto 2019)

Classe	Nome	Fórmula molecular	Nº CAS	Massa molar (g/mol)	Solubilidade em água a 20°C (mg/L)	Ponto de ebulição (°C)	Log (K _{ow})
Herbicida	Acetocloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	34256-82-1	269,8	233	391,5	4,14
	Alacloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	15972-60-8	269,8	240	404,1	3,5
	Metolacloro	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	51218-45-2	283,8	530	100,0	3,1
	Glifosato	C ₃ H ₈ NO ₅ P	1071-83-6	169,1	12000	465,8	-3,2
	MCPA	C ₉ H ₉ ClO ₃	94-74-6	200,6	29390	327,0	2,8
	Terbutilazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	5915-41-3	229,7	6,6	373,1	3,4
Fungicida	Epoxiconazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	133855-98-8	329,8	7,1	463,1	3,6
	Tebuconazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	80443-41-0	307,8	3,7	476,9	3,7
Inseticida	Heptacloro	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	76-44-8	373,3	0,056	392,3	6,1
	Imidacloprida	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	105827-78-9	255,7	610	442,3	0,57
	Dimetoato	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	60-51-5	229,3	25000	440,6	0,78

Quanto à solubilidade dos pesticidas em água, segundo a Tabela 3.1 é possível perceber a diferença entre o nível de solubilidade em água existente entre os compostos em estudo. Por conta disso existe uma maior probabilidade de se encontrar alguns pesticidas que são mais solúveis em água em diferentes matrizes aquosas, diferentemente de pesticidas que são menos solúveis e, portanto, têm menor probabilidade de serem encontrados em meios hídricos. Na Tabela 3.2 os pesticidas foram classificados de acordo com o nível de solubilidade dos mesmos.

Tabela 3.2 – Nível de solubilidade em água dos pesticidas selecionados para estudo.

Pesticidas	Nível de Solubilidade
Dimetoato, MCPA e Glifosato	Muito elevada
Acetocloro, alacloro, imidacloprida e metolacoloro	Moderada
Epoxiconazol, tebuconazol e terbutilazina	Baixa
Heptacloro	Muito baixa

Quanto ao coeficiente de partição K_{ow} , que relaciona as concentrações da substância num solvente orgânico como o octanol, e em água, foi possível observar a diferença de polaridade entre as substâncias segundo a Tabela 3.1. Quanto maior o valor desse coeficiente, menor a polaridade do composto. Os compostos mais polares tendem a ser mais miscíveis em água, enquanto compostos menos polares tem a tendência de serem mais miscíveis em solventes orgânicos.

A partir das informações contidas nas Tabelas 3.1 e 3.2 é possível perceber que o glifosato é o pesticida mais solúvel em água entre aqueles em estudo e que, inversamente a ele, o heptacloro trata-se do pesticida menos solúvel em água.

Com base nas pesquisas realizadas e tendo por base os métodos instrumentais presentes no LQA, decidiu-se desenvolver um método analítico utilizando a extração em fase sólida (SPE) para extrair e concentrar as amostras e a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) como método de identificação e quantificação dos pesticidas.

A extração por SPE consiste em 4 etapas: o acondicionamento do adsorvente contido nos cartuchos, o carregamento dos cartuchos com a amostra, a lavagem do adsorvente e por fim a eluição dos analitos. Este procedimento geral está esquematizado na Figura 3.1.

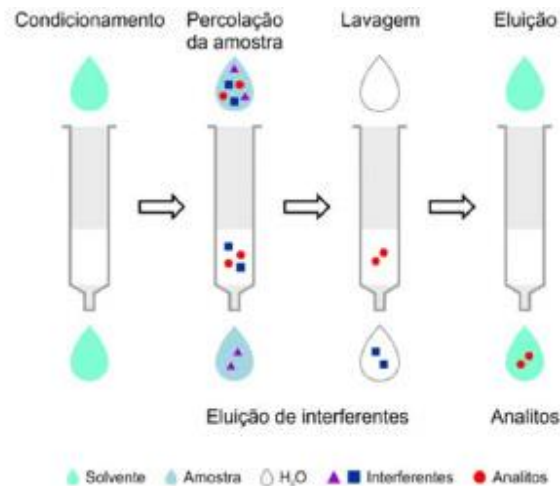


Figura 3.1 – Representação esquemática das 4 etapas fundamentais da extração por SPE.

(Fonte: Caldas *et al.*, 2011)

A cromatografia gasosa é uma técnica de quantificação de compostos, com alto poder de resolução e sensibilidade que tem como metodologia de análise a partição dos componentes da amostra entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária normalmente sólida. O processo de funcionamento do GC é representado na Figura 3.2.

O processo inicia-se com a introdução da amostra gasosa ou líquida numa coluna capilar contendo a fase estacionária. Uma corrente de um gás inerte, contínua, arrasta então a amostra pela coluna. Durante esse percurso, a amostra que é arrastada pelo gás, interage com a fase estacionária. Essa interação faz com que os analitos presentes na amostra tenham velocidades de arraste diferentes, provocando uma separação entre estes (Diniz, 2011).

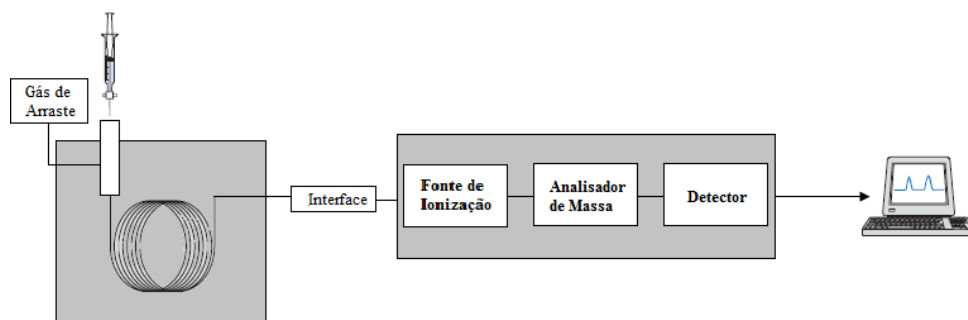


Figura 3.2 – Esquema de funcionamento de um sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas. (Fonte: Ferreira, 2011)

A principal desvantagem da técnica de cromatografia gasosa é que a amostra a ser analisada deve ser termicamente estável e facilmente volatilizada (Grob, 1995). A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para identificar as moléculas de interesse da amostra com base na sua relação massa/carga e caracterizar a sua estrutura química.

Num sistema de GC-MS, as moléculas provenientes do GC são ionizadas, o que causa a sua quebra gerando íons positivos, negativos e radicais, que são separados pelas suas diferenças de relação massa/carga. O equipamento faz a leitura dos íons positivos que por possuírem alta energia podem ser divididos em fragmentos ainda menores (Fowlis, 1995).

A partir da massa molecular dos fragmentos, o equipamento a partir de uma base de dados interna, propõe algumas estruturas moleculares que possam ser referentes ao composto em estudo.

Tabela 3.3 – Principais referências encontradas na literatura, relativamente às técnicas de extração, métodos de quantificação, limites de detecção e quantificação para os pesticidas propostos para estudo e referidos na Tabela 3.1.

Pesticida	Técnica de extração	Método de quantificação	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Referência
Acetocloro	QuEChERS	GC-ECD	4	7	Marcilio <i>et al.</i> , 2008
	SPE	LC-MS	0,001	0,005	Lazarov <i>et al.</i> , 2013
Alacloro	mNTC	GC-MS	0,640	1,494	Barbosa, 2015
	SPE	GC-MS	0,007	0,02	Lavor <i>et al.</i> , 2015
	QuEChERS	GC-ECD	11	22	Marcilio <i>et al.</i> 2008
Dimetoato	LLE	HPLC	110	330	Kumar e Gurupadayya, 2013
	SPE	HPLC-DAD	0,5	1,7	Martins, 2015
	QuEChERS	LC-APCI-MS	0,016	0,05	Tomasini, 2011
Epoxiconazol	LLE	RP-HPLC	1,6	19	Kaliyan e Tamilselvan, 2018
	SPE	HPLC-DAD	0,17	0,39	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
Glifosato	SPE com derivatização	UPLC-MS	0,07	0,24	Olivo <i>et al.</i> , 2015
	Resina complexante	HPLC	0,01	1	Armas <i>et al.</i> , 2007
	SPE com Derivatização	HPLC-FLD	0,025	0,0125	Mendonça, 2018
Heptacloro	LLE	GC-MS	0,0023	0,0038	Kivrack e Gokturk, 2017
	SPE	GC-MS	0,031	0,103	Silva, 2012
	SPME	GC-ECD	0,003	0,1	Carlos <i>et al.</i> , 2011
Imidacloprida	LLE	RP-HPLC	6	20	Samnani <i>et al.</i> , 2011
	SPE	HPLC-DAD	0,12	0,19	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
	QuEChERS	LC-APCI-MS	0,033	0,1	Tomasini, 2011
MCPA	SPE	HPLC-ESI	0,003	0,005	Sklivagou <i>et al.</i> , 2010
	SPE	HPLC-DAD	0,17	1	Coelho <i>et al.</i> , 2018
	SPE	HPLC-DAD	0,07	0,20	Caldas, 2009
Metolaclo	SPE	GC-MS	0,005	0,016	Lavor <i>et al.</i> , 2015
	SPE	GC-MS	0,02	0,05	Cassoli <i>et al.</i> , 2015
Tebuconazol	SPE	HPLC-DAD	0,07	0,20	Caldas, 2009
	SPE	GC-MS	0,015	0,048	Lavor <i>et al.</i> , 2015
	SPE	HPLC-DAD	0,19	0,39	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
Terbutilazina	LLE	RP-HPLC	0,09	0,389	Kaliyan e Tamilselvan, 2018
	SPE	HPLC-DAD	0,02	0,06	Martins, 2015
	SPE	HPLC-DAD	0,26	0,80	González <i>et al.</i> , 2013

Na Tabela 3.3 apresentam-se as principais referências encontradas sobre a monitorização de cada um dos pesticidas selecionados para este estudo, em diferentes matrizes. Enumeram-se as técnicas de extração, os métodos de análise e de quantificação e os limites de deteção e quantificação obtidos por cada referência.

Em relação aos métodos de extração, encontram-se a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME), a extração líquido-líquido (LLE), uma metodologia semelhante a extração em fase sólida (QuEChERS), na qual seu nome é uma abreviação das palavras em inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*, utilizada no estudo de poluentes emergentes em amostras alimentícias, nanotubos de carbono híbridos e anfífilicos com propriedades magnéticas (mNTC) e nanotubos de carbono (CTN) baseadas em nanotubos de carbono e extração com resinas complexantes, respetivamente.

Quanto aos métodos de quantificação, os mais utilizados são baseados em cromatografia líquida ou em cromatografia gasosa.

Em relação aos métodos que utilizam a cromatografia líquida, encontram-se estudos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), de alta eficiência com ionização por eletronebulização (HPLC-ESI), de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FLD), de alta eficiência com detetor de arranjo de díodos (HPLC-DAD), cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS), cromatografia líquida com fonte de ionização química à pressão atmosférica acoplada com espectrometria de massas (LC-APCI-MS/MS) e a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com espectrometria de massas (UPLC-MS).

Em relação aos métodos que utilizam a cromatografia gasosa, encontram-se estudos que referem a utilização de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) e com detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

Da análise das referências apresentadas na Tabela 3.3 é possível perceber a preferência dos autores pela utilização da cromatografia líquida, além de optarem na

sua maioria pela técnica de SPE. A cromatografia líquida tem-se destacado no estudo de pesticidas, pois tem apresentado análises melhores não só dos pesticidas, como também de seus produtos de degradação, além de se tratar de uma técnica rápida, sensível e de baixo custo. Outro fator importante são os diversos detetores que podem ser associados a essa técnica, garantindo ainda mais especificidade para o estudo dos pesticidas escolhidos para serem analisados.

A extração SPE é a técnica de extração mais utilizada para o pré tratamento de amostras na maioria das pesquisas, devido a algumas vantagens comparadas com as outras técnicas, destacando-se principalmente pela pouca quantidade de solvente necessária, não necessita de grande quantidade de amostra, trata-se de uma técnica eficiente e rápida que se tem destacado com bons resultados na extração de pesticidas, além de que alguns estudos indicam que os cartuchos utilizados para a metodologia podem ser reaproveitados, considerando os analitos que foram analisados, os compostos que serão analisados em seguida, as concentrações das amostras, a polaridade dos compostos, tipo de adsorvente e finalidade da técnica (Morrison, 2017).

Dentre as diversas referências analisadas, há a destacar alguns autores que utilizaram o método de extração em fase sólida, seguida de análise por cromatografia gasosa (SPE/GC-MS), assim como o proposto neste trabalho e tiveram sucesso na identificação e quantificação dos pesticidas. Lavor e colaboradores em 2015, conseguiram alcançar para o alacloro um LD de 0,007 µg/L e um LQ de 0,02 µg/L, para o tebuconazol um LD de 0,015 µg/L e um LQ de 0,048 µg/L e para o metolacoloro foram obtidos 0,005 µg/L e 0,016 µg/L como limites de detecção e quantificação, respectivamente. O autor Silva em 2012 obteve em seu estudo do heptacloro, valores de 0,031 µg/L e 0,103 µg/L como limites de detecção e quantificação, respectivamente e em 2015 o autor Cassoli e colaboradores obtiveram resultados consideráveis no estudo do metolacoloro, alcançado um LD de 0,02 µg/L e um LQ de 0,05 µg/L.

Outros autores realizaram os estudos de diferentes pesticidas também utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, porém com outras técnicas de extração. Barbosa, em 2015, para o estudo do alacloro optou pela

técnica de extração baseada nos nanotubos de carbono (mNTC). Alcançando 0,640 µg/L e 1,494 µg/L como limites de detecção e quantificação, respectivamente. Os autores Kivrack e Gokturk em 2017 optaram pela técnica de extração líquido-líquido seguida da análise por GC-MS para o estudo do heptacloro. A partir dessa metodologia foram obtidos valores muito satisfatórios para o limite de detecção de 0,0023 µg/L e para o limite de quantificação de 0,0038 µg/L.

Dentre os pesticidas enumerados na tabela, existem alguns com mais metodologias de pesquisas e estudos que outros. Isso ocorre devido à existência de mais informações e conhecimento sobre alguns pesticidas, seus comportamentos no meio ambiente e seus malefícios sobre os seres vivos. Além disso, outro fator é que cada país e região apresentam diferentes características e diferentes pestes e, portanto, são utilizados diferentes pesticidas.

Nas seções seguintes apresenta-se de uma forma resumida algumas informações encontradas em cada um dos trabalhos encontrados na literatura e apresentados na Tabela 3.3.

3.2 Pesticidas selecionados

Acetocloro

O acetocloro, cuja estrutura química é apresentada na Figura 3.3, é utilizado para o controle de pré-emergência das plantações de milho e soja e para proteção de plantações de gramíneas (Guo *et al.*, 2000; Weed *et al.*, 1995).

O acetocloro é considerado um composto pouco polar, com moderada solubilidade em água o configurando como um composto perigoso para o ambiente aquático. A lixiviação do herbicida reduz a sua persistência e sua interação com as plantas, o que faz diminuir também a sua eficácia. Deste modo, a facilidade que o composto tem em sofrer lixiviação, aumenta o risco de contaminação de águas subterrâneas (Lengyel e Foldenyi, 2003; Stamper e Tuovinen, 1998).

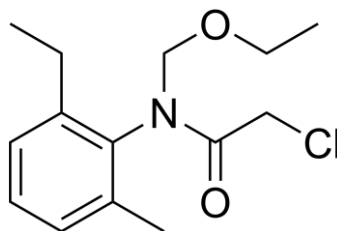


Figura 3.3 – Estrutura química do acetocloro. (Fonte: Pubchem, 2109)

Marcilio e seus colaboradores, em 2008, apresentaram uma metodologia para a análise e quantificação de alguns pesticidas, entre eles o acetocloro. No processo de extração, utilizam a técnica QuEChERS, sendo esta uma modificação da SPE, seguida de uma análise por GC-ECD, alcançando um LD de 4 µg/L e um LQ de 7 µg/L.

Em 2013, Lazarov e colaboradores, apresentaram o desenvolvimento de uma metodologia também baseada na extração por SPE, seguida de análise por cromatografia líquida com espectrometria de massas, LC-MS. Dentre os pesticidas estudados e quantificados encontra-se o acetocloro. Com a metodologia proposta, alcançaram o limite de detecção de 0,001 µg/L e o limite de quantificação de 0,005 µg/L, valores estes consideravelmente inferiores aos obtidos no estudo de Marcilio *et al.*, em 2008.

Alacloro

O alacloro, cuja estrutura química se apresenta na Figura 3.4 é um herbicida usado para o controlo de ervas daninhas nas culturas de milho, soja, amendoim e feijão. É um herbicida sistémico seletivo, absorvido pelos brotos e pelas raízes dos vegetais. Este pesticida atua interferindo na capacidade de uma planta produzir determinadas proteínas interferindo diretamente no alongamento da raiz (EPA, 1998).

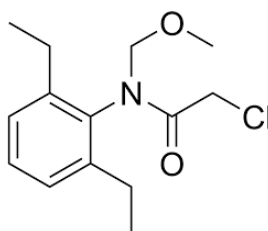


Figura 3.4 – Estrutura química do alacloro. (Fonte: Pubchem, 2019)

Assim como foi feito para o acetocloro, Marcilio *et al.*, em 2008, propõem um método com QuEChERS seguido de GC-ECD para o estudo do alacloro, obtendo 11 µg/L para o LD e 22 µg/L para o LQ.

No ano de 2015, Barbosa propôs um método de extração não comumente utilizado, baseado na aplicação de efeitos magnéticos dos nanotubos de carbono para a concentração das amostras, que posteriormente são analisadas por GC-MS. A partir dessa metodologia o autor obteve valores de 0,640 µg/L e 1,494 µg/L para o LD e LQ, respectivamente.

Lavor e colaboradores, em 2015, propuseram um método mais eficiente para quantificação do alacloro, comparados com os autores citados anteriormente. O método proposto era baseado na extração SPE, seguido de GC-MS e foram obtidos valores de LD e LQ baixos, quando comparados com os demais autores estudados, alcançando 0,007 µg/L e 0,02 µg/L, respectivamente.

Dimetoato

O dimetoato é um inseticida organofosforado sistêmico utilizado em várias culturas de trigo, algodão, milho, entre outras. A sua estrutura química é apresentada na Figura 3.5. Trata-se de um composto não volátil, que é solúvel em água e não apresenta alta mobilidade no solo, onde se degrada com uma meia-vida de aproximadamente 2 a 4 dias, com base nas condições do meio em que se encontra (US EPA, 2006).

Os autores Kumar e Gurupadayya, utilizaram em 2013, uma metodologia de extração por LLE, seguida de análise por HPLC para a determinação e quantificação de dimetoato, obtendo valores de 110 e 330 µg/L, para LD e LQ, respectivamente. Em 2015, Martins, optou pela técnica de extração por SPE, seguida de análise por HPLC, em que obteve resultados melhores, quando comparados com os autores citados anteriormente, alcançando um LD e um LQ de 0,5 µg/L e 1,7 µg/L, respectivamente.

Em 2011, o autor Tomasini propôs uma técnica que se mostrou mais eficiente do que a proposta pelos outros autores para a quantificação do dimetoato, baseada na

extração pelo método de QuEChERS, seguida de LC-APCI-MS com a qual obteve um LD de 0,016 µg/L e um LQ de 0,05 µg/L.

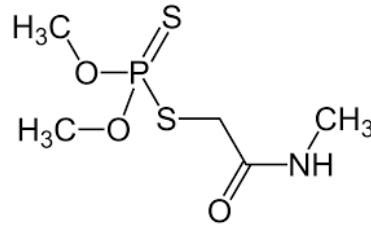


Figura 3.5 – Estrutura química do dimetoato. (Fonte: Pubchem, 2019)

Epoxiconazol

O epoxiconazol é um ingrediente ativo de fungicidas desenvolvidos para proteger culturas de cereais, arroz, café, banana, entre outras do ataque fúngico. Esse composto atua com a inibição do metabolismo de células fúngicas que infestam plantas. O epoxiconazol, com a estrutura representada na Figura 3.6, pode ser encontrado adicionado a muitos produtos aumentando o seu potencial de proteção contra os patógenos (Passeport *et al.*, 2011).

Kaliyan e Tamilselvan, em 2018, desenvolveram um método de análise do micropoluente epoxiconazol em mistura com outro pesticida, a azoxistrobina. O epoxiconazol foi extraído por extração líquido-líquido, seguido de análise por HPLC com detetor de ultravioleta-visível em modo de fase reversa, como limite de detecção foi obtido o valor de 0,09 µg/L e para o limite de quantificação foi obtido o valor de 0,389 µg/L.

Ribeiro *et al.*, 2013, utilizam a extração por SPE, seguida pela análise por HPLC-DAD obtendo resultados para o LD e LQ, de 0,17 µg/L e 0,39 µg/L, respectivamente.

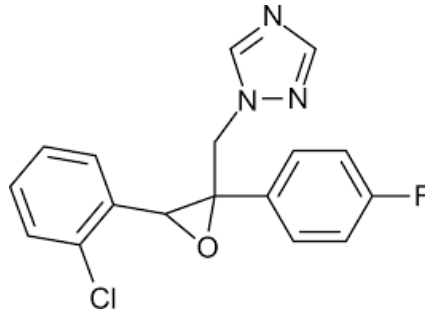


Figura 3.6 – Estrutura química do Epoxiconazol. (Fonte: Pubchem, 2019)

Glifosato

O glifosato, cuja estrutura química se apresenta na Figura 3.7, é um herbicida não seletivo, que é aplicado após a germinação e crescimento das plantas, evitando o crescimento de outras culturas no meio da plantação. O seu principal mecanismo de ação baseia-se no bloqueio de uma enzima, necessária para que as plantas produzam aminoácidos e proteínas. O bloqueio dessa enzima faz com que plantas daninhas morram em alguns dias (Noori *et al.*, 2018; Josson *et al.*, 2013). Mesmo sendo considerado um composto perigoso quando presente nos solos, o glifosato não é considerado um grande problema, porque raramente consegue deslocar-se até alguma corrente de água ou mesmo até águas subterrâneas, já que a sua interação com os solos pode ser muito forte (Mink *et al.*, 2012).

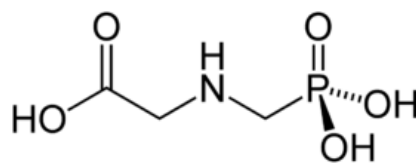


Figura 3.7 – Estrutura química do glifosato. (Fonte: Pubchem, 2019)

Olivo *et al.*, em 2015, propuseram um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com espectrometria de massas (UPLC-MS), para determinar o glifosato em amostras de águas subterrâneas, utilizando filtros de extração em fase sólida (SPE) após derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetoxicarbonil (FMOC-Cl). Em 2018, Mendonça também utilizou do mesmo método de extração, mas optou pelo HPLC com detetor de fluorescência. Ambos autores, obtiveram bons resultados na quantificação do glifosato, sendo que Mendonça, em 2018, obteve um

LD de 0,025 µg/L e um LQ de 0,0125 µg/L, enquanto que, Olivo e colaboradores alcançaram valores de 0,07 µg/L para LD e 0,24 µg/L para LQ.

Armas e colaboradores em 2007, também obtiveram bons valores de LD e LQ, utilizando uma metodologia baseada na extração por resina complexante, seguida de análise por HPLC com detecção por fluorescência. Neste estudo, apresentam-se os valores de 0,01 µg/L para o LD e 1 µg/L para o LQ.

Heptacloro

O heptacloro, cuja estrutura química se apresenta na Figura 3.8, foi um pesticida muito utilizado na década passada sendo utilizado para matar insetos em plantações, casas e prédios, no combate de pragas. Este pesticida foi banido na União Europeia em 1984 e nos anos seguintes na maioria dos outros países do mundo devido à alta persistência desse composto e dos seus produtos de degradação no ambiente (NIOSH, 1997).

Este inseticida tem a capacidade de se ligar ao solo e evaporar lentamente no ar, não se dissolvendo facilmente na água. Quando no solo e na água, o heptacloro pode ser transformado por bactérias no epóxido de heptacloro, um produto mais tóxico, podendo ser absorvido pelas plantas através das raízes no solo e passar para os animais que se alimentarem dessas plantas contaminadas (NIOSH, 1997).

Em 2017, Kivrack e Gokturk, realizaram um estudo para detecção e a quantificação do heptacloro, a partir de uma extração líquido-líquido para concentração da amostra, seguida por uma técnica analítica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação para o heptacloro foram de 0,0023 µg/L e 0,0038 µg/L, respectivamente.

Outros autores propuseram métodos diferentes, como Silva, em 2012, que quantificou o heptacloro através da extração por SPE, seguida de análise por GC-MS, e Carlos e colaboradores, em 2011, que propõem uma metodologia com microextração em fase sólida (SPME), seguida de análise por GC-ECD. Tanto Silva quanto Carlos obtiveram bons valores de LD e LQ, mesmo que as suas técnicas de extração tenham sido bem

distintas. Silva obteve um LD de 0,031 $\mu\text{g/L}$ e um LQ de 0,103 $\mu\text{g/L}$, enquanto Carlos *et al.*, em 2011, obteve 0,003 $\mu\text{g/L}$ e 0,1 $\mu\text{g/L}$ de LD e LQ, respectivamente.

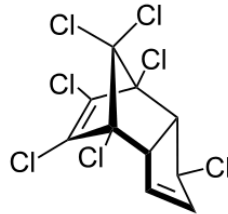


Figura 3.8 – Estrutura química do heptacloro. (Fonte: Pubchem, 2019)

Imidacloprida

O imidacloprida, cuja estrutura se encontra representada na Figura 3.9, é um princípio ativo muito utilizado em inseticidas para proteger as plantas por inteiro, interferindo na transmissão de estímulos do sistema nervoso dos insetos, levando à sua morte (Armbrust e Peeler, 2002). Este composto protege toda a planta durante o seu crescimento, por se tratar de um composto de ação sistêmica, sendo transportado desde a seiva até toda a extensão da planta. Apesar disso, o nível de imidacloprida diminui durante o crescimento do vegetal, chegando a níveis muito baixos durante a floração (Armbrust e Peeler, 2002).

Em 2011, Samnani e colaboradores, propuseram a análise e quantificação do pesticida imidacloprida, através de um método de HPLC de fase reversa com detetor de fluorescência, com uma etapa de extração através de um processo líquido-líquido. A metodologia proposta pelos autores apresentou um limite de detecção de 6 $\mu\text{g/L}$ e um limite de quantificação de 20 $\mu\text{g/L}$. Estes valores são considerados elevados, quando comparados com as metodologias propostas por Ribeiro *et al.* em 2013 e por Tomasini em 2011 para quantificação do mesmo pesticida.

Ribeiro *et al.*, em 2013, propuseram um método de extração por SPE, seguida por uma análise em HPLC-DAD, enquanto que, Tomasini em 2011, propôs um método baseado na extração por QuEChERS, seguida de uma análise por cromatografia líquida com fonte de ionização química à pressão atmosférica acoplada com espectrometria de massas. Enquanto Tomasini em 2011 obteve 0,033 $\mu\text{g/L}$ de LD e 0,1

$\mu\text{g/L}$ de LQ, Ribeiro *et al.*, 2013, obteve um LD e LQ de 0,12 $\mu\text{g/L}$ e 0,19 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

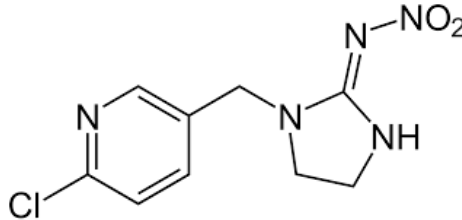


Figura 3.9 – Estrutura química do Imidacloprida. (Fonte: Pubchem, 2019)

MCPA

O MCPA, abreviatura utilizada para o ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético, com a estrutura química representada na Figura 3.10, é um herbicida regulador de crescimento vegetal seletivo e bastante eficaz, pois a absorção do produto ocorre tanto através das raízes, como também da folhagem da planta, o que faz com que ocorra uma distribuição do material para todos os tecidos da planta de forma rápida (WSSA, 1989).

Coelho *et al.* em 2018 e Caldas em 2009, utilizaram técnicas semelhantes para identificação e quantificação do MCPA. Os processos foram realizados através de uma extração por SPE, seguida por uma análise por HPLC-DAD. Apesar de metodologias semelhantes, Coelho *et al.* em 2018 obteve um LD de 0,17 $\mu\text{g/L}$ e um LQ de 1 $\mu\text{g/L}$, enquanto Caldas, em 2009, conseguiu obter limites mais baixos, sendo estes de 0,07 $\mu\text{g/L}$ e 0,20 $\mu\text{g/L}$ para LD e LQ, respectivamente.

Sklivagou e colaboradores, em 2010, propuseram a determinação do MCPA recorrendo à extração por SPE seguida de HPLC-ESI. O limite de quantificação obtido para o MCPA foi de 0,005 $\mu\text{g/L}$ e o limite de detecção do método foi de 0,003 $\mu\text{g/L}$. Resultados esses considerados satisfatórios, quando comparadas com as demais literaturas.

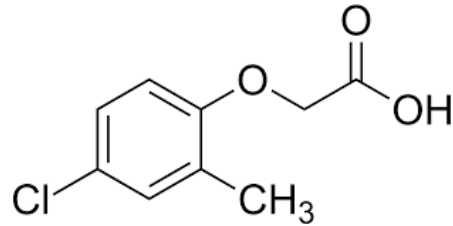


Figura 3.10 – Estrutura química do MCPA. (Fonte: Pubchem, 2019)

Metolacoloro

O metolacoloro, representado na Figura 3.11, é um herbicida que inibe o crescimento da raiz do vegetal e é utilizado para o controlo e proteção de gramíneas, milho, algodão, soja e feijão (Carvalho, 2013).

Este pesticida é formado por dois isómeros R e S, que estão presentes em proporções iguais (mistura racémica) no composto, sendo que o isómero S apresenta maior atividade herbicida do que o isómero R (Liu *et al.*, 1989).

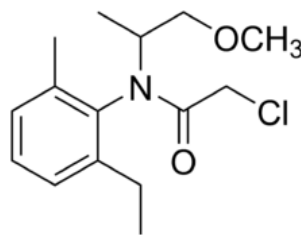


Figura 3.11 – Estrutura química do metolacoloro. (Fonte: Pubchem, 2019)

Lavor e colaboradores, em 2015, e Cassoli e colaboradores, no mesmo ano, utilizaram métodos semelhantes para o estudo do metolacoloro. Ambos iniciaram o processo com uma extração por SPE, seguida de uma análise dos padrões e amostras por GC-MS.

Apesar da utilização de metodologias semelhantes, os autores obtiveram resultados muito diferentes. Lavor *et al.*, alcançaram um limite de deteção de 0,005 µg/L e um limite de quantificação de 0,016 µg/L, enquanto Cassoli *et al.* obtiveram limites em concentrações superiores, sendo o LD de 0,02 µg/L e o LQ de 0,05 µg/L.

Tebuconazol

O tebuconazol pertencente à classe dos triazóis é o ingrediente ativo do herbicida comercial *Mirage Stressgard*, que é utilizado para controlar certas doenças de verão e de inverno de relva em campos de golfe, amplamente utilizado para controlar patógenos fúngicos foliares (Strickland *et al.*, 2004).

O tebuconazol, cuja estrutura química está representada na Figura 3.12, pode adentrar e persistir no solo e na água resultante de resíduos de pulverização e escoamento. Trata-se de um composto estável quimicamente, que não se decompõe reagindo com luz ou água, podendo a sua estrutura ser quebrada lentamente por microrganismos quando presente no meio ambiente (Li *et al.*, 2012).

No trabalho de Lavor *et al.*, em 2015, a determinação do tebuconazol é proposta em amostras a partir de uma extração por SPE e uma posterior análise por GC-MS. O limite de quantificação e de detecção obtidos para o tebuconazol são de 0,015 µg/L e 0,048 µg/L, respetivamente.

Caldas, em 2009, e Ribeiro *et al.*, em 2013, propuseram como metodologia para a identificação e quantificação do tebuconazol, uma extração SPE, seguida de uma análise por HPLC-DAD. Apesar de as metodologias propostas serem semelhantes, estes autores apresentam resultados de LD e LQ relativamente diferentes. Enquanto Ribeiro e seus colaboradores apresentaram um LD de 0,19 µg/L e um LQ de 0,39 µg/L, Caldas apresentou limites ainda inferiores, sendo o LD de 0,07 µg/L e o LQ de 0,20 µg/L.

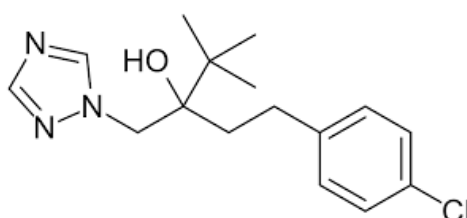


Figura 3.12 – Estrutura química do Tebuconazol. (Fonte: Pubchem, 2019)

Terbutilazina

A terbutilazina é um herbicida que atua inibindo a fotossíntese, levando à morte da planta. A sua estrutura química está representada na Figura 3.13. Este composto é absorvido pelas raízes e pelas folhas, sendo posteriormente distribuído por toda a estrutura da planta (WHO, 2003). Trata-se de um pesticida seletivo para milho, batata, ervilha, cana-de-açúcar, árvores frutíferas, café, entre outras culturas (Gikas *et al.*, 2018).

Os autores Kaliyan e Tamilselvan, em 2018, propuseram um método de análise para a terbutilazina contida numa mistura com o composto Bromacil. Neste trabalho, utilizam a extração líquido-líquido, seguida por uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa. O limite de quantificação e de detecção obtidos para a terbutilazina foram de 0,09 µg/L e 0,389 µg/L, respetivamente.

Martins, em 2015, e González *et al.*, em 2013, utilizaram metodologias semelhantes. Ambos propõem a identificação e quantificação da terbutilazina, partindo-se de uma extração em fase sólida, seguido por um método de análise e quantificação de HPLC-DAD. Os autores apresentam limites de detecção e quantificação diferentes, sendo que o método proposto por Martins, se mostrou mais eficiente, obtendo um LD de 0,02 µg/L e um LQ de 0,06 µg/L, quando comparados com os 0,26 µg/L e 0,80 µg/L de LD e LQ, respetivamente, obtidos por González *et al.*

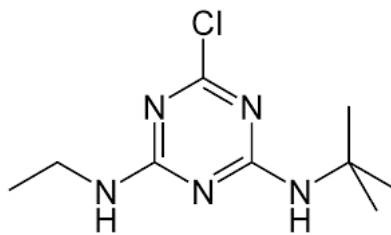


Figura 3.13 – Estrutura química do terbutilazina. (Fonte: Pubchem, 2019)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento da metodologia experimental para a monitorização de pesticidas em meios hídricos encontra-se dividida em duas etapas principais.

Na primeira etapa, faz-se o desenvolvimento e a otimização do método de deteção e quantificação por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS).

Na segunda etapa e última etapa, otimiza-se e avalia-se o processo extração em fase sólida (SPE) para os pesticidas selecionados, através da análise das amostras recolhidas após a SPE utilizando a metodologia de análise por GC-MS já desenvolvida na primeira etapa.

4.1 Reagentes

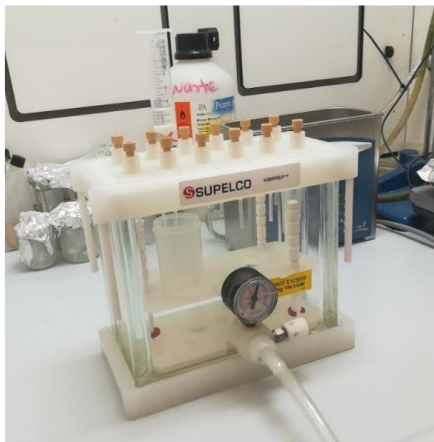
Todos os 11 reagentes analíticos individuais dos pesticidas, assim como o trifenilmetano, utilizado como padrão interno, possuem uma pureza superior a 95%, tendo sido adquiridos à Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como solventes foram utilizados água ultrapura, metanol, hexano e acetonitrilo. A água ultrapura possui uma resistividade inferior a 18.2 M Ω .cm (Tipo I), tendo sido obtida com um equipamento laboratorial da marca Merck Millipore, modelo Direct Q3 UV. O metanol com pureza de HPLC foi adquirido à Carlo Erba (Val de Reuil, França), o hexano foi adquirido à Fisher Scientific (Madrid, Espanha) e o acetonitrilo à Fluka (Neu Wulmstorf, Alemanha).

4.2 Material e equipamento

Na preparação dos padrões analíticos a medição de massas foi realizada numa balança analítica da Adam Equipment, modelo ADA 210/C com uma precisão de $\pm 0,0002$ g. Todos os padrões utilizados foram preparados por diluição de uma solução mãe com a concentração de 1000 mg/L. Tanto as soluções mãe como as soluções diluídas ou misturas de pesticidas foram, após a sua preparação, guardadas em frascos de amostras de vidro âmbar e colocadas a -20°C até ao momento de extração por SPE e/ou análise por GC-MS.

4.2.1 Sistema de extração em fase sólida

Todas as extrações foram realizadas com um equipamento de SPE da Supelco, modelo Visiprep acoplado com uma bomba de vácuo de regulação manual (manómetro) de caudal de eluente. Devido à sua grande versatilidade relativamente à afinidade com diversas classes de pesticidas, foram utilizados cartuchos Chromabond HLB, da marca Macherey-Nagel, com 6 mL de capacidade e com 500 mg de enchimento de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) com um diâmetro de partícula de 60 μm (Figura 4.1).



(a)



(b)

Figura 4.1 – Sistema de extração em fase sólida (a) e Cartuchos utilizados na extração SPE (b).

4.2.2 Sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas

Na identificação e quantificação dos padrões e das amostras de pesticidas utilizou-se um sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas, da marca Shimadzu, modelo QP2020, como ilustrado na Figura 4.2. Este sistema encontra-se equipado com um amostrador automático AOC-20i e uma coluna capilar *Low bleed* Rxi-5ms (30 m \times 0,25mm I.D., com 0,25 μm de espessura de filme) da Restek (Bellefonte, USA).

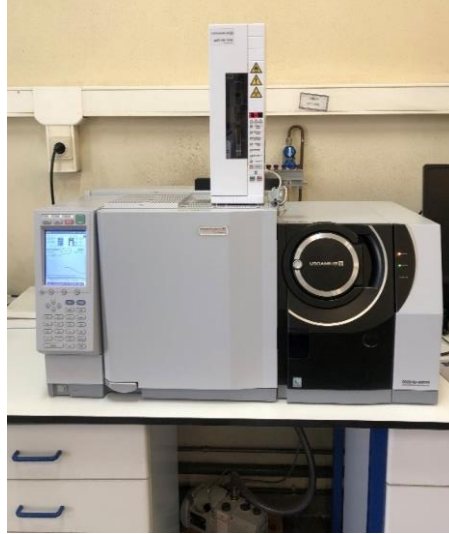


Figura 4.2 – Sistema de GC-MS da Shimadzu, modelo QP2020.

4.3 Metodologia experimental

Como já foi referido no Capítulo 3, os pesticidas disponíveis para estudo são o acetocloro, alacloro, metolacloro, terbutilazina, dimetoato, heptacloro, epoxiconazol, imidacloprida, glifosato, tebuconazol e MCPA. Estes pesticidas são utilizados em diversas regiões do Brasil assim como na região nordeste de Portugal, sendo também citados na legislação sobre a monitorização de pesticidas dos dois países (Ministério da saúde do Brasil, 2011 e Decreto-Lei nº 306/2007 atualizado no ano de 2018 em Portugal). No início do trabalho foi decidido utilizar a totalidade do conjunto destes 11 pesticidas e estudar a viabilidade da sua análise com a metodologia experimental a desenvolver.

A metodologia experimental inclui as seguintes etapas:

I. Otimização das condições operatórias da análise por GC-MS. Esta etapa inclui a otimização das condições operatórias na separação cromatográfica e na identificação por espectrometria de massas. Em relação à separação cromatográfica otimiza-se o programa de temperaturas de forma a obter uma separação completa e identificação de todos os pesticidas. Estuda-se igualmente o efeito do modo de injeção da amostra, comparando os cromatogramas obtidos com o modo *Split* e os cromatogramas obtidos com o modo *Splitless*. Em relação à análise por espectrometria de massas, apresenta-

se um estudo da influência dos modos *SIM* (Monitorização de íão único) e *FullScan* (Varrimento completo) na sensibilidade do método.

II. Otimização dos parâmetros de operação da extração em fase sólida, como o tempo de extração, o tipo de fase sólida, o volume da amostra e o volume e a composição do solvente de eluição.

III. Determinação de todos os parâmetros estatísticos associados à metodologia desenvolvida. Na cromatografia gasosa, determina-se a linearidade das curvas de calibração e apresenta-se também um estudo sobre o efeito da utilização do método do padrão interno na otimização da linearidade das curvas de calibração.

4.3.1 Otimização das condições operatórias em GC-MS

Preparação de padrões

Inicialmente, preparou-se uma solução mãe com uma concentração de 1000 mg/L para cada um dos 11 pesticidas e do padrão interno, utilizando metanol como solvente. As massas medidas para balões volumétricos de 5 mL, encontram-se registadas no Anexo A.

Optou-se pelo metanol como solvente devido a polaridade dos pesticidas, que indicava que possivelmente seriam solúveis e identificáveis nesse solvente, além do metanol ser um solvente mais ecologicamente correto que alguns outros disponíveis em laboratório.

De seguida, foram preparadas diluições, também em metanol, de cada pesticida para as concentrações de 100 e 50 ppm, utilizando uma micropipeta de capacidade adequada, de forma a se poder encontrar um sinal do detetor de massas que permitisse uma boa identificação.

A preparação e a análise cromatográfica dos padrões individuais de cada pesticida, são importantes para o estudo dos tempos de retenção e separação dos pesticidas. Com a análise cromatográfica é possível avaliar a resolução entre compostos e por outro lado estudar a linearidade das curvas de calibração individuais. Refira-se que as

curvas de calibração obtidas sem extração servem como referência para avaliar a capacidade do processo prévio de extração e concentração (SPE) em fazer baixar consideravelmente os valores dos limites de detecção e quantificação.

Para a determinação das curvas de calibração individuais, foram preparadas 3 misturas com 3 ou 2 pesticidas cada e com trifenilmetano (utilizado como padrão interno), denominadas de “M1”, “M2” e “M3”. Os pesticidas presentes na mistura 1 preparada em metanol, são o dimetoato, a terbutilazina e o heptacloro. A mistura 2 também preparada em metanol contém os pesticidas alacloro, metolacloro e o acetocloro. A mistura 3 foi preparada em hexano e contém os pesticidas epoxiconazol e o tebuconazol. As misturas foram preparadas de modo a agilizar a metodologia em termos de tempos e número de análises necessárias nos passos de extração e análise. Por outro lado, verificou-se que os resultados obtidos na análise cromatográfica dos padrões individuais não diferem dos resultados obtidos com as respectivas misturas (tempos de retenção e intensidade de sinal). É importante referir que a seleção do solvente utilizado para cada mistura e a composição das misturas foram decididas em função das solubilidades que estes compostos apresentaram em metanol/hexano individualmente, em função dos tempos de retenção e finalmente do processo de degradação que as suas soluções sofrem ao longo o tempo. Para a determinação das curvas de calibração sem utilizar o processo de extração, foram preparadas soluções padrão para as misturas 1 e 3, sendo que o padrão com concentração mais alta foi o de 100 ppm e o de menor concentração foi de 0,001 ppm (ou seja, 1 ppb).

As misturas também foram utilizadas para o estudo da técnica de extração SPE. Foram feitos diferentes ensaios para otimizar os tempos/caudais a utilizar nas 4 etapas do procedimento de extração. De seguida realizaram-se extrações com as misturas M1 e M3, seguidas de análise por GC-MS para avaliar as recuperações obtidas para cada pesticida.

As análises dos compostos em diferentes concentrações foram feitas com o método de adição de trifenilmetano, sólido incolor, utilizado como padrão interno. Neste método adiciona-se um composto à mistura, que não esteja presente na amostra e

que não reaja com os pesticidas. O composto utilizado como padrão interno deve também ter o pico cromatográfico bem resolvido, além de não introduzir impurezas e não reagir com nenhum dos componentes presentes da amostra. Este composto é adicionado à solução numa concentração conhecida e a razão entre a área cromatográfica de cada pesticida e a área cromatográfica do padrão interno obtidas na mesma análise funciona como parâmetro analítico de correção do volume de amostra e conseqüentemente de concentração de cada padrão injetado.

A utilização do método do padrão interno permite minimizar os erros experimentais cometidos aquando da introdução das amostras no sistema cromatográfico. Contudo, existem sempre os erros provenientes das incertezas das leituras das massas e dos volumes na preparação e diluição das soluções padrão.

Deve-se referir que após a preparação das soluções mãe dos pesticidas ou misturas e respetivas diluições, todas as soluções foram armazenadas em frascos de amostras para cromatografia de 2 e/ou 4 mL, fechados com tampa, protegidos com parafilme, envoltos em papel de alumínio e colocados a -20°C até ao momento da sua utilização.

As condições operatórias iniciais, utilizadas no sistema GC-MS, para a identificação dos tempos de retenção e estudo da resolução, foram adaptadas de Gonçalves e Alpendurada, 2004.

Limpeza do sistema de GC-MS

A limpeza de um sistema de GC-MS é uma condição imprescindível para a obtenção de resultados com boa reprodutibilidade e sensibilidade, para além de proteger o tempo de vida útil da coluna cromatográfica e do detetor. Neste sentido, decidiu-se construir no sistema de GC-MS um “método de limpeza” o qual era utilizado sempre que se verificava a eluição de compostos contaminantes ou “estranhos” no cromatograma obtido. A utilização deste método revelou-se de grande utilidade já que o equipamento era utilizado por outros grupos de investigação e com diferentes matrizes e famílias de compostos. No método de limpeza, utiliza-se quer no vial de limpeza, quer no vial de amostra, o mesmo solvente em que a amostra é preparada. O injetor é colocado a 300°C, o forno é colocado a uma temperatura constante de

310°C, 40°C abaixo da sua temperatura máxima, e durante um tempo de 60 min. De referir que o equipamento permite fazer a limpeza inicial da seringa com solvente, depois com a amostra e finalmente novamente com solvente um número de vezes e a uma velocidade pré-definida.

4.3.2 Otimização das condições operatórias em SPE

A preparação das amostras para a análise por GC-MS, neste caso a extração/concentração do analito por SPE é uma etapa crucial, podendo levar à perda do analito por extração incompleta e à contaminação da amostra, uma vez que no caso de existirem compostos interferentes, pode resultar em contaminação e consequente perda de exatidão nos resultados obtidos por cromatografia.

Após a otimização do método de separação e quantificação por GC-MS, realiza-se em seguida a otimização dos principais parâmetros da técnica de SPE.

A extração em fase sólida geralmente é utilizada como forma de se aumentar consideravelmente as concentrações presentes em amostras muito diluídas. É também muito utilizada para purificar amostras, processo no qual as impurezas ficam retidas na fase adsorvente, enquanto os compostos de interesse são recolhidos na fase líquida ou vice-versa (Oliveira, 1999).

As vantagens deste tipo de extração relativamente à extração líquido-líquido, baseia-se no menor consumo de solventes e a simplicidade e facilidade de aplicação da técnica. Vale o destaque também para a possibilidade de se reutilizar o cartucho levando-se em consideração a finalidade e a precisão desejada para as análises e os compostos que são estudados na extração (Morrison, 2017).

O procedimento geral adotado na técnica de extração por SPE foi escolhido tendo por base as indicações do fabricante dos cartuchos Macherey-Nagel e a metodologia já desenvolvida em trabalhos anteriores para a extração de fármacos em amostras aquosas (Oliveira, 2019; Nemoto, 2019).

Na primeira utilização de cada cartucho, utiliza-se água ultrapura como amostra na etapa do carregamento. Todo o restante procedimento de extração é realizado de acordo como o descrito nos parágrafos seguintes.

Numa extração típica de SPE o primeiro passo é a etapa de acondicionamento, na qual o cartucho é preenchido com 5 mL de metanol. De seguida, a bomba de vácuo é acionada e abre-se a válvula para libertação do metanol, gota a gota, de forma lenta e contínua. Após a eluição de todo o metanol, a válvula é fechada e desliga-se a bomba a vácuo. Em seguida, adiciona-se 5 mL de água ultrapura e o processo é repetido, finalizando-se a etapa de acondicionamento.

No segundo passo, designado por etapa de carregamento, são adicionados os 10 mL de uma amostra contendo um pesticida ou uma mistura de pesticidas com uma concentração previamente definida, e o processo anterior é repetido. Ou seja, a amostra é adicionada ao cartucho e ao acionar a bomba de vácuo, abre-se de forma lenta a válvula para que se tenha um caudal lento e gradual. Quando toda a amostra já foi filtrada, a válvula é então fechada e a bomba de vácuo desligada.

No terceiro passo, realiza-se a etapa de limpeza com a adição de 5 mL de água ultrapura, para remoção de possíveis impurezas que possam estar no adsorvente juntamente com os pesticidas. O procedimento desta etapa é semelhante ao das etapas anteriores.

Por último, na etapa de eluição, são adicionados 8 mL de metanol (ou hexano, no caso do epoxiconazol e do tebuconazol) ao cartucho, e deixa-se todo o solvente eluir de forma lenta e gradual. A solução eluída nesta etapa, contendo o(s) pesticida(s) é então armazenada num frasco de vidro. De forma a verificar se o processo de dessorção foi completo, repete-se esta etapa com mais 2 mL de eluente o qual é recolhido e posteriormente analisado. É importante que a última etapa, denominada de eluição, seja realizada no maior tempo possível para garantir maior recuperação do analito.

As amostras recolhidas após a eluição são transferidas para frascos com tampa para serem analisadas pelo sistema de GC-MS.

Realizando o procedimento completo de SPE utilizando uma solução de concentração conhecida de um dado pesticida é possível determinar a sua recuperação no processo de extração. Para a determinação da recuperação de um composto, as amostras a serem analisadas são fortificadas com uma quantidade conhecida de analito e os resultados obtidos pós extração são comparados com os valores iniciais antes da extração para as mesmas amostras.

A precisão de um método avalia a dispersão de resultados independentes repetidos com uma mesma amostra nas mesmas condições laboratoriais. Uma das formas mais comuns de se avaliar a precisão de um método de extração é pelas medições de recuperação do composto com a sua matriz. A recuperação representa a quantidade do composto recuperada no processo em relação à quantidade em que se apresentava na amostra (Pedroso, 2007).

As eficiências do método de extração foram calculadas através da recuperação (R) em massa dos pesticidas, utilizando a Equação 1. Sendo as massas iniciais (m_1) e residuais (m_2) de cada composto após o final de cada extração.

$$R = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [1]$$

4.3.3 Validação da metodologia experimental desenvolvida

A validação do método cromatográfico é normalmente realizada através da determinação dos parâmetros estatísticos associados com as análises. Assim, para a avaliação da precisão e da exatidão dos resultados, determinam-se os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade.

A precisão é uma medida que indica se os resultados obtidos estão próximos uns dos outros, ou seja, se existe um certo grau de concordância entre os valores obtidos numa dada experiência realizada repetidamente. Esta medida é diretamente afetada pelos erros aleatórios que podem ser provenientes da própria precisão dos

equipamentos de medição (massas, volumes, temperaturas, entre outros). (INMETRO, 2012).

A exatidão de um método é definida como o grau de concordância do resultado obtido com o resultado considerado real, ou seja, essa medida determina o quão próximo os valores obtidos estão do correto. Um dos fatores que pode influenciar negativamente na exatidão de um método são os erros sistemáticos, como por exemplo, um equipamento não calibrado e utilização de um equipamento em condições não ideais. São erros fáceis de identificar e que causa uma tendência de um instrumento registrar um valor sistematicamente acima ou abaixo do esperado (INMETRO, 2012).

A repetibilidade é definida como a concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, sob as mesmas condições no menor tempo possível, enquanto a reprodutibilidade é a concordância de resultados da concentração de um analito sob condições diferentes de análise (Pedroso, 2007).

Algumas das principais características que garantem uma boa repetibilidade é a repetição da análise no mesmo laboratório, utilizando-se os mesmos equipamentos, reagentes, intervalos de tempo e condições de operação do método.

A determinação da reprodutibilidade e da repetibilidade é feita com o cálculo do coeficiente de variação, CV, definido pela Equação 2. Esse valor é apresentado em percentagem. Se o valor do coeficiente de variação obtido for baixo, normalmente considerado abaixo de 5%, o método apresenta boa repetibilidade e reprodutibilidade. O parâmetro S representa o desvio padrão de 6 medidas da solução de calibração para um nível de concentração selecionado e o parâmetro \bar{x} é a média aritmética dos valores das 6 medidas da solução de calibração para um nível de concentração selecionado.

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad [2]$$

Além do estudo da repetibilidade e reprodutibilidade é também importante determinar a linearidade do sinal do detetor em função das diferentes gamas de concentrações

estudadas. Para esse efeito são determinadas as curvas de calibração (regressões lineares) a partir de soluções padrão preparadas com diferentes concentrações.

Através dos parâmetros da curva de calibração, como a ordenada na origem, o seu declive e os erros associados a estes dois parâmetros determinam-se a menor concentração do analito presente na amostra que o método permite detetar (limite de deteção) e quantificar (limite de quantificação), com um grau de confiança previamente definido, geralmente a 95%.

A linearidade do método pode ser representada por uma equação matemática utilizada para calcular a concentração do analito na amostra analisada. Normalmente o sinal do instrumento encontra-se no eixo das ordenadas (y) e a concentração do padrão no eixo das abcissas (x) (Vicente, 2001).

Em cromatografia, a Equação 3, relaciona a linearidade entre a área cromatográfica obtida em função da concentração do analito na amostra. O parâmetro b representa o declive e a o valor da ordenada na origem.

$$y = a + bx \quad [3]$$

Neste trabalho, na construção das curvas de calibração, são utilizados no mínimo cinco níveis de concentração e cada nível de concentração analisado em duplicado, garantindo maior precisão e exatidão aos resultados.

A linearidade do método é avaliada através do coeficiente de determinação, dado pelo quadrado do coeficiente de correlação (R^2) da regressão linear. Esse coeficiente permite obter uma estimativa da qualidade do ajuste do modelo linear aos pontos experimentais que são obtidos (Miller *et al.*, 2018).

O método dos mínimos quadrados é utilizado para determinar o valor mais provável de uma grandeza medida várias vezes, ou para determinar uma relação funcional entre duas ou mais grandezas. O método utiliza as Equações 4 e 5, na determinação

dos valores do declive e da ordenada na origem. A linha determinada a partir destas Equações é conhecida como a linha de regressão de y em x .

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad [4]$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad [5]$$

É importante também calcular os erros associados dos valores de a e b . A Equação 6 é referente à soma dos erros aleatórios na direção y , sendo que y_i^* são os pontos na linha de regressão calculada para os valores de x correspondentes. Com o valor de $S_{y/x}$, calculam-se o desvio padrão para o declive (S_b) e o desvio padrão para a ordenada na origem (S_a), utilizando as Equações 7 e 8, respetivamente.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_i^*)^2}{n-2}} \quad [6]$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad [7]$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad [8]$$

Para o cálculo do desvio padrão do método (S_m) é utilizada a Equação 9, enquanto o coeficiente de variação do método (CV_m) pode ser determinado pela Equação 10. Sendo que o $S_{y/x}$ como explicado anteriormente trata-se da soma de erros aleatórios na direção de y , o b é o valor do declive e o parâmetro \bar{x} é a média aritmética dos valores em estudo.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad [9]$$

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad [10]$$

Outro parâmetro que deve ser avaliado é o limite de quantificação (LQ). Este parâmetro é considerado a menor quantidade com precisão que pode ser determinada

de um analito numa amostra nas condições estabelecidas pelo método desenvolvido. Neste trabalho, foi considerado o limite de quantificação como sendo o valor referente ao valor de concentração mais baixo considerado na gama de linearidade estudada.

Com o valor de LQ é possível então calcular o limite de deteção (LD) de um analito segundo a Equação 11. O Limite de deteção é definido como a menor concentração do analito que se pode detetar pelo método desenvolvido, com um nível de confiança pré-definido.

$$LD = \frac{3.3}{10} \times LQ \quad [11]$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já foi descrito no capítulo anterior, o desenvolvimento da metodologia inicia-se com a otimização das condições operatórias da separação, deteção e quantificação dos pesticidas no sistema GC-MS.

Na segunda fase da etapa experimental, estudam-se alguns dos principais parâmetros que influenciam a recuperação nas extrações por SPE. Análises de extração em fase sólida (SPE) para alguns pesticidas, variando alguns parâmetros operatórios, de modo a maximizar os valores da recuperação.

5.1 Otimização do método de análise e quantificação por GC-MS

Importa referir que logo após a preparação das primeiras soluções padrão e com a sua análise cromatográfica verificou-se que alguns dos pesticidas estudados sofrem degradação quando em solução de metanol ou hexano. Após algumas semanas da preparação dos padrões, alguns deles já não eram identificados pelo GC-MS, devido ao facto de que se degradam no solvente e o seu pico cromatográfico característico tinha uma intensidade reduzida e por vezes observa-se no cromatograma obtido outros picos compostos com sinal de menor intensidade.

Os pesticidas dimetoato e a terbutilazina foram os compostos que se degradaram mais rapidamente no intervalo entre as análises. Além disso, outra questão relevante é referente à polaridade e solubilidade dos pesticidas tebuconazol e epoxiconazol. A presença de grupos polares nesses compostos, poderia induzir a sua miscibilidade em metanol, por ser também polar, e que por isso se poderia utilizar esse solvente na sua análise. Contudo, as análises realizadas destes dois pesticidas em metanol não permitiram a sua identificação, mesmo aumentando o tempo de análise ou a temperatura final do método cromatográfico. A solução encontrada foi a substituição desse solvente por hexano, no qual, apesar da solubilidade ser baixa, as análises realizadas com hexano como solvente permitiram a identificação destes pesticidas.

5.1.1 Separação e identificação dos 11 pesticidas

De acordo com o que já foi referido na seção 4.4.1, após a preparação das soluções individuais dos 11 pesticidas com uma concentração de 50 ppm, procedeu-se à sua análise utilizando o método proposto por Gonçalves e Alpendurada em 2004. Este método inicial foi denominado de “Método 1”, e as suas condições operatórias estão descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Condições operatórias do “Método 1” utilizado na análise por GC-MS.

CROMATOGRAFIA GASOSA
Injetor em modo <i>Split</i> 1:10 e a uma temperatura de 250°C durante 20 min.
Volume de injeção = 2 µL
Forno: Hélio a uma velocidade constante a 37 cm/s e com o seguinte programa de temperaturas: 2 min a 120°C, depois rampa de 10°C/min até 180°C, manteve-se esta temperatura por 2 min e depois nova rampa a 8°C/min até 250°C, mantendo-se esta temperatura por mais 1,25 min para um tempo total de análise de 20 min.
Integração = área mínima de integração de 10000 <i>counts</i> .
ESPECTROMETRIA DE MASSAS
Temperaturas: detetor e interface a 280°C
Varrimento de massas: 40 a 450 m/z
Modo de ionização: Impacto eletrónico (EI) com início retardado em 5 min.

Apesar do método desenvolvido ter início aos 5 minutos, todos os cromatogramas são apresentados a partir dos 6 min de análise, já que pouco depois dos 5 min, ainda ocorria uma pequena eluição do solvente pela coluna. O início com atraso do processo é importante para proteger o detetor de massas da ação do solvente, evitando a sua saturação.

Os cromatogramas referentes à análise das 11 soluções padrão dos pesticidas a uma concentração de 50 mg/L, utilizando este método são apresentados na Figura 5.1.

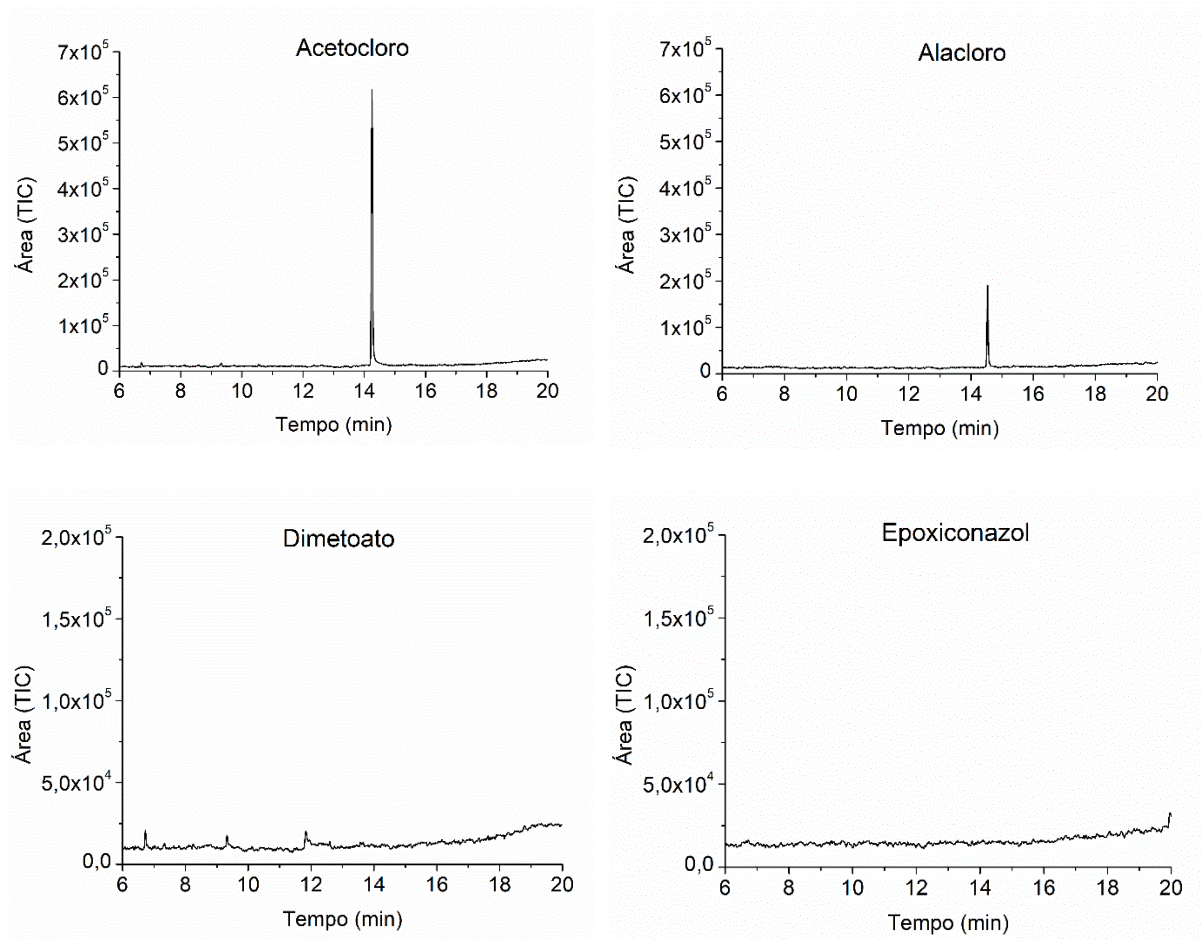


Figura 5.1 - Cromatogramas individuais dos 11 pesticidas preparados em metanol, com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 1.

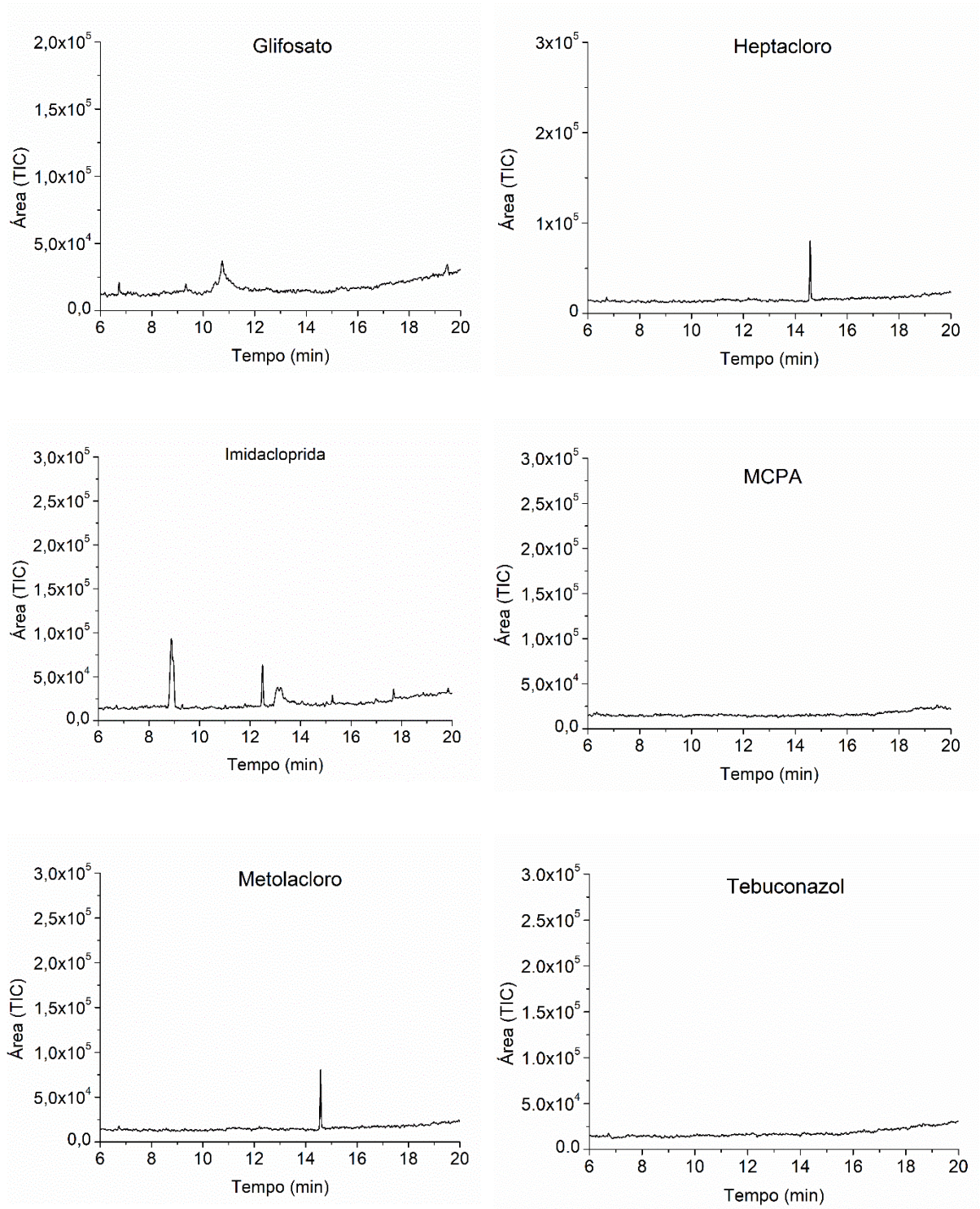


Figura 5.1 (Continuação) - Cromatogramas individuais dos 11 pesticidas preparados em metanol, com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 1.

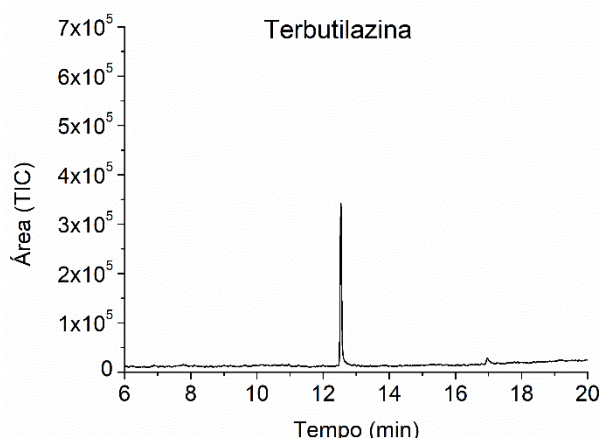


Figura 5.1 (Continuação) - Cromatogramas individuais dos 11 pesticidas preparados em metanol, com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 1.

Dos 11 pesticidas estudados, 8 deles apresentaram picos em seus cromatogramas, mas apenas 6 deles foram identificados com o “Método 1”. Após a obtenção de cada cromatograma, a identificação individual de cada pesticida foi comprovada com recurso à comparação do espectro de massa de cada composto com os espectros de massa existentes nas bibliotecas existentes no *software* do equipamento. Os espectros de massa experimentais obtidos para cada pesticida são apresentados no Anexo B e os tempos de retenção obtidos para cada um dos pesticidas, estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Tempo de retenção para cada pesticida com uma concentração de 50 mg/L em metanol, utilizando o Método 1.

Composto	Tempo de retenção (min)	Área (TIC)
Glifosato	10,73	325064
Dimetoato	11,83	45514
Terbutilazina	12,54	1041273
Imidacloprida	13,09	168835
Acetocloro	14,25	1736665
Heptacloro	14,52	177993
Alacloro	14,53	495444
Metolacloro	15,57	1613492
MCPA	Não identificado	-
Tebuconazol	Não identificado	-
Epoxiconazol	Não identificado	-

Os pesticidas identificados foram o acetocloro, alacloro, dimetoato, heptacloro, metolacloro e terbutilazina. Os pesticidas, glifosato, epoxiconazol, imidacloprida, MCPA e tebuconazol não foram identificados por esse método.

Como se pode observar pelos respetivos cromatogramas, o epoxiconazol, tebuconazol, MCPA não apresentam nenhum pico cromatográfico enquanto para o glifosato e a imidacloprida, apesar de se observarem alguns sinais, estes não foram identificados com os pesticidas respetivos quando comparados com os espetros de massa existentes nas bibliotecas.

Devido à não identificação dos 5 pesticidas, epoxiconazol, tebuconazol, MCPA, glifosato e imidacloprida, decidiu-se alterar a parte final da programação de temperaturas da coluna cromatográfica. Esta alteração consistiu em realizar a partir dos 20 minutos uma nova rampa de temperaturas a 8°C/min até uma temperatura final de 300°C, perfazendo um novo tempo total de análise de 30 minutos.

Manteve-se constante a velocidade do gás de arraste a 37 cm/s com o seguinte programa de temperaturas: 2 min a 120°C, depois rampa de 10°C/min até 180°C, manteve-se esta temperatura por 2 min e depois nova rampa a 8°C/min até 250°C, mantendo-se esta temperatura por mais 2 min, seguido de uma rampa de 8°C/min até alcançar a temperatura de 300°C que era mantida por 3 min, para um tempo total de análise de 30 min.

Após uma limpeza intermédia da coluna cromatográfica, foram novamente analisados com este novo método, designado por "Método 2", os mesmos padrões individuais, preparados em metanol com uma concentração de 50 mg/L dos 5 pesticidas não identificados.

Apesar do aumento do tempo de análise de 20 para 30 min e da temperatura final de 250 para 300°C, apenas foi possível a identificação de um composto no cromatograma do MCPA, sendo que este não era referente ao pesticida, como mostrou a base de dados do equipamento. Portanto, não foi possível identificar qualquer um dos 5

pesticidas referidos com o “Método 2”. Os cromatogramas obtidos para cada um destes 5 pesticidas, estão representados na Figura 5.2.

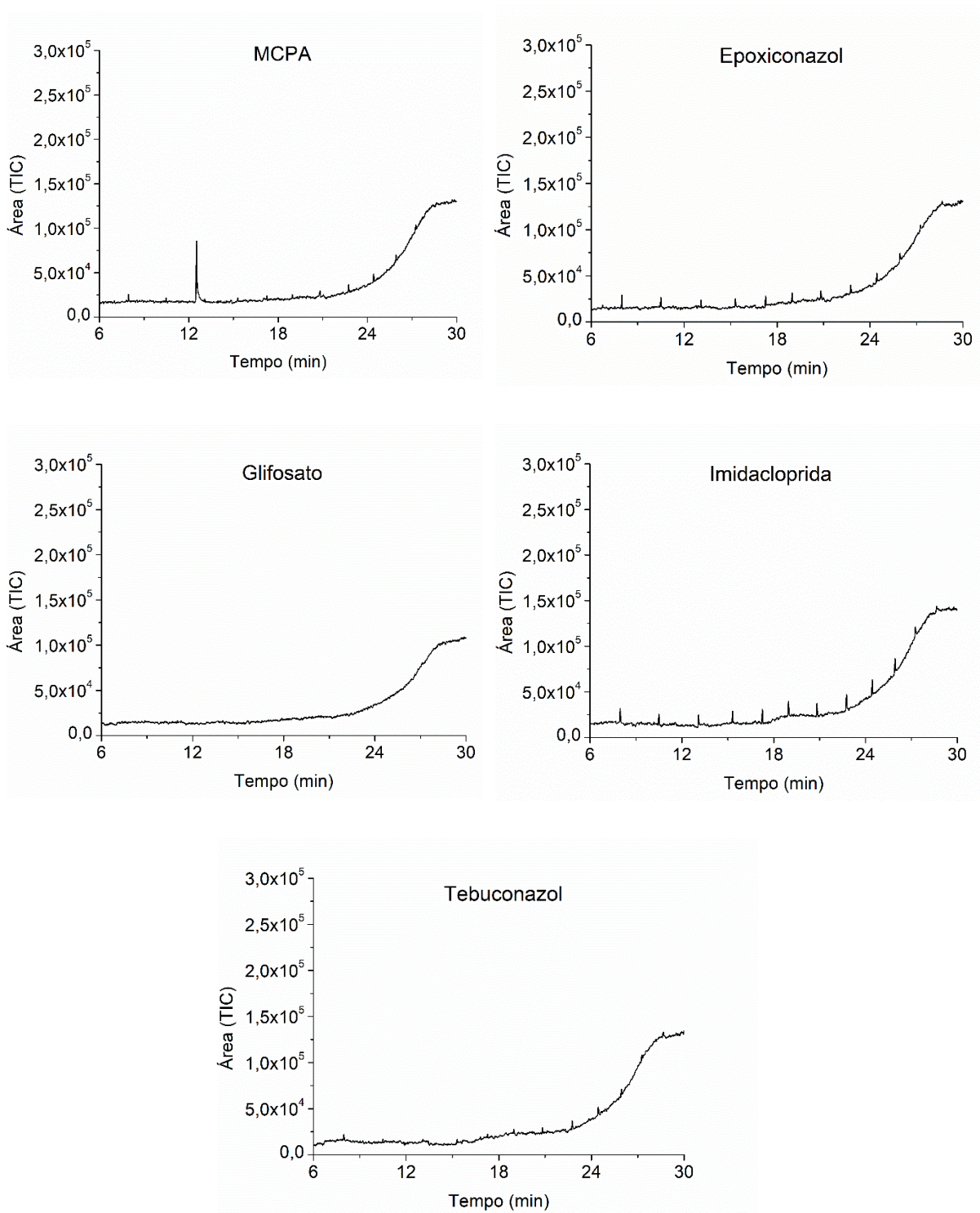


Figura 5.2 – Cromatogramas individuais dos 5 pesticidas com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 2.

A segunda estratégia para estudar a possibilidade de identificar estes compostos, consistiu em alterar o tipo de solvente utilizado na preparação destes padrões. Assim, prepararam-se 5 novas soluções individuais destes pesticidas a 50 mg/L utilizando hexano, um solvente apolar, mantendo-se o “Método 2” como método de análise. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 5.3.

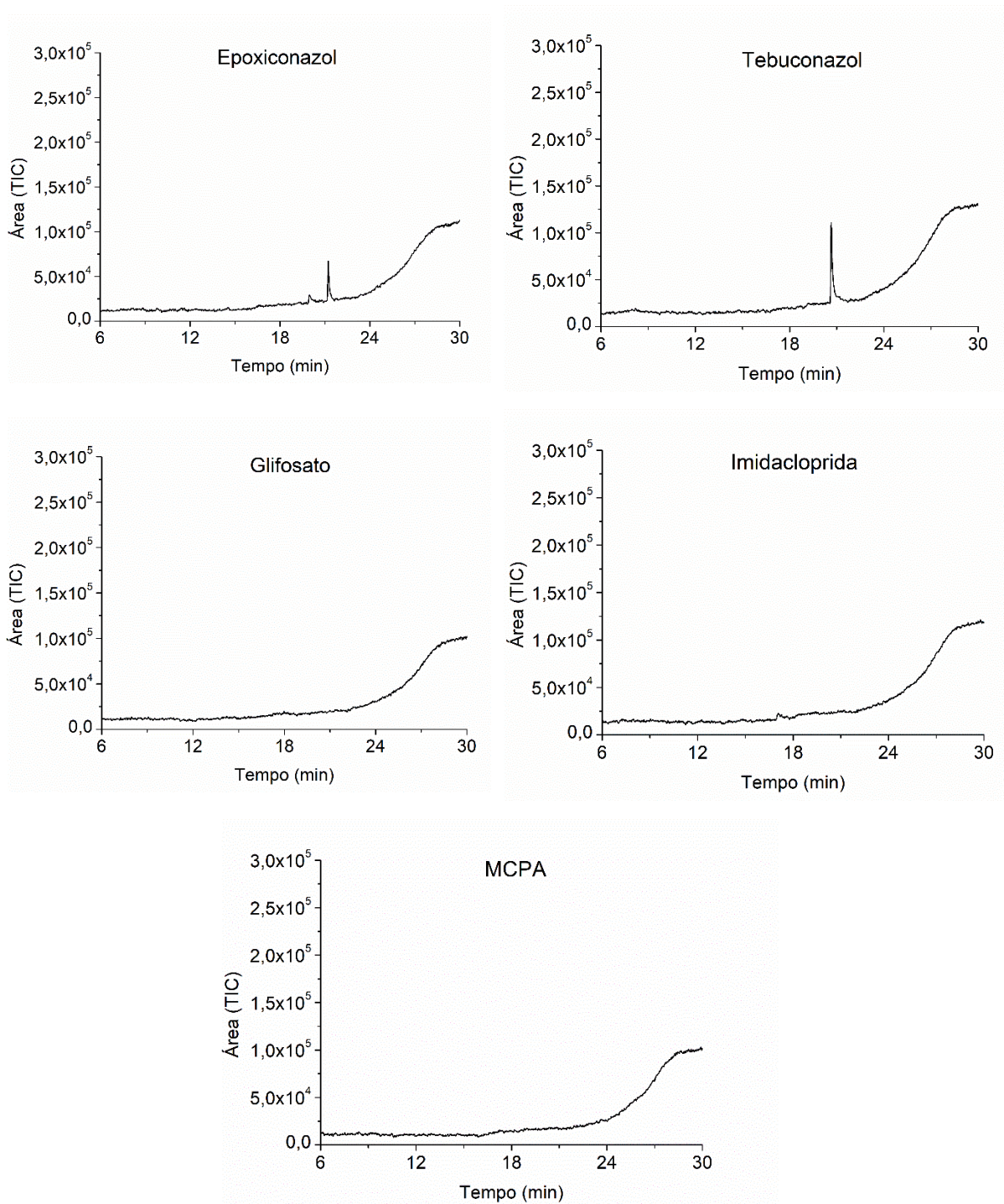


Figura 5.3 – Cromatogramas individuais dos 5 pesticidas, preparados em hexano com uma concentração de 50 mg/L e utilizando o Método 2.

Os resultados obtidos para os padrões em hexano são descritos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Tempo de retenção e área obtida por GC-MS para os 5 pesticidas com uma concentração de 50 mg/L em hexano e utilizando o Método 2.

Composto	Tempo de retenção (min)	Área (TIC)
Tebuconazol	20,65	622822
Epoxiconazol	21,22	304290
Glifosato	Não identificado	-
Imidacloprida	Não identificado	-
MCPA	Não identificado	-

Conforme se pode confirmar pela observação dos respectivos cromatogramas, apresentados na Figura 5.3, tanto o tebuconazol como o epoxiconazol apresentam picos com uma intensidade de sinal significativa e a sua identificação foi direta aquando da comparação dos respectivos espectros de massa com os existentes nas bibliotecas do equipamento. Os espectros de massa referentes à identificação do tebuconazol e do epoxiconazol encontram-se no Anexo C.

A partir deste ponto do trabalho experimental, e após uma pesquisa da literatura mais cuidada sobre a análise dos 3 pesticidas não identificados, imidacloprida, glifosato e MCPA, decidiu-se abandonar o estudo destes pesticidas utilizando a metodologia proposta. Alguns autores indicam diferentes processos de derivatização para a possível análise destes 3 pesticidas por GC-MS.

O processo de derivatização consiste em reações de transformação ou derivação dos compostos a serem estudados em outros compostos, os quais possuam uma estrutura química que possa ser mais facilmente identificada por cromatografia gasosa. Algumas das referências que utilizaram essa técnica para o estudo desses pesticidas foram Olivo e seus colaboradores que, em 2015, desenvolveram uma metodologia para o estudo do glifosato, baseada na derivatização seguida da SPE e a análise por HPLC-FLD. Weiping, Wei e Kevin, em 2007, desenvolveram um método para o estudo da degradação da imidacloprida em diferentes solos e matrizes aquosas. Por outro lado, Cai e colaboradores, no ano de 2010, propuseram um método para determinar

o MCPA em solos com a derivatização do composto, seguido de uma extração líquido-líquido e analisado por GC-ECD.

5.1.2 Análises realizadas com injetor em modo *Split* e detetor de massas em modo de varrimento *FullScan*

O passo experimental seguinte consistiu em realizar a análise das soluções padrão individuais com uma concentração de 100 mg/L de forma a obter o tempo de retenção de todos os 8 pesticidas com um novo “Método 3”. Este novo método resulta da constatação de que o tempo de análise do composto mais retido (epoxiconazol) utilizando o “Método 2” é de 21,22 min. Por este facto, não se torna necessária uma análise para além dos 22 min. As condições operatórias utilizadas com este método baseiam-se na utilização de uma velocidade constante de 37 cm/s do gás de arraste e com o seguinte programa de temperaturas: 2 min a 120°C, depois rampa de 10°C/min até 180°C, manteve-se esta temperatura por 2 min e depois nova rampa a 8°C/min até 250°C, mantendo-se esta temperatura por mais 3,25 min para um tempo total de análise de 22 minutos. O volume de injeção foi de 2 µL. O injetor foi mantido em modo *Split* 1:10 e a análise de massas foi realizada em modo de varrimento *FullScan*.

Por outro lado, o aumento do valor da concentração de 50 para 100 mg/L permite a obtenção de um sinal cromatográfico mais intenso para os pesticidas que apresentaram um menor sinal com o “Método 1”. Estas análises foram realizadas em duplicado para ser possível estudar a repetibilidade das análises cromatográficas sem o processo prévio de extração.

Os cromatogramas obtidos para a análise dos 8 pesticidas com uma concentração de 100 mg/L em metanol/hexano, conforme explicado previamente, são ilustrados na Figura 5.4.

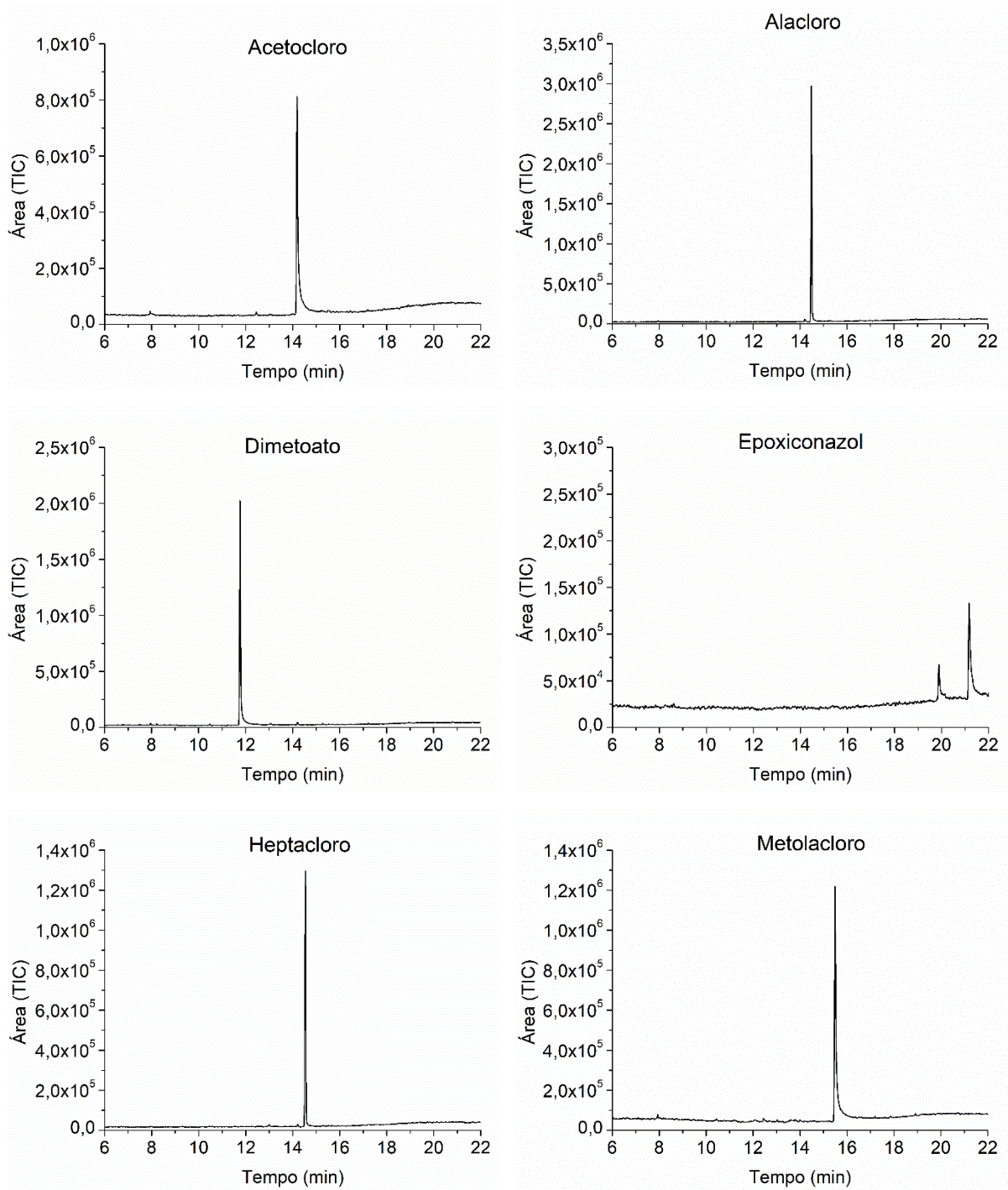


Figura 5.4 - Cromatogramas dos 8 padrões individuais dos pesticidas com uma concentração de 100 mg/L e utilizando o Método 3.

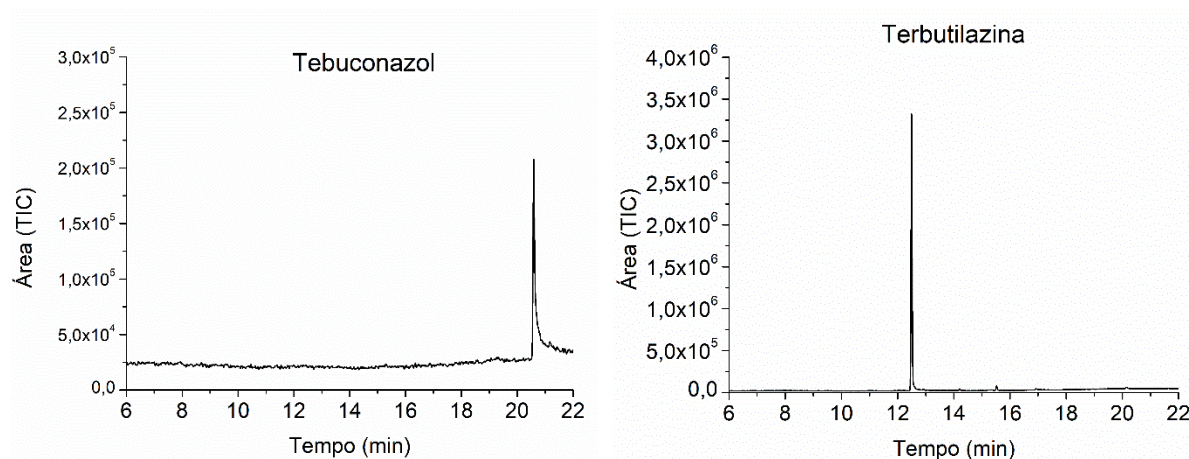


Figura 5.4 (Continuação) - Cromatogramas dos 8 padrões individuais dos pesticidas com uma concentração de 100 mg/L e utilizando o Método 3.

Os tempos de retenção assim como as intensidades dos sinais cromatográficos obtidos para cada pesticida encontram-se na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Tempos de retenção e valores das áreas cromatográficas obtidas na análise dos padrões individuais dos 8 pesticidas com uma concentração de 100 mg/L, por GC-MS utilizando uma razão de *Split* de 1:10 e em modo de varrimento *FullScan*.

Composto	Solvente	Tempo de retenção (min)	Área (TIC)	Área (TIC) Duplicata	CV (%)
Dimetoato	Metanol	11,77	1761287	1847116	3,36
Terbutilazina		12,50	1294104	943187	22,18
Acetocloro		14,18	183247	214782	11,20
Alacloro		14,48	1441083	2150636	27,94
Heptacloro		14,54	299509	382897	17,28
Metolacloro		15,49	1412342	634316	53,76
Tebuconazol	Hexano	20,59	35223	91114	62,56
Epoxiconazol		21,17	10800	4823	54,10

Os resultados obtidos na Tabela 5.4 indicam que a análise dos pesticidas com o injetor em *Split* 1:10 e varrimento de massas em *FullScan*, não garante repetibilidade do método de quantificação, obtendo-se coeficientes de variação bastante elevados, como é o caso para o pesticida tebuconazol, com um coeficiente superior a 60%, enquanto o menor coeficiente calculado foi para o dimetoato, com um valor pouco superior a 3%. A falta de reprodutibilidade nas áreas cromatográficas obtidas indica a necessidade de se testar uma nova metodologia para analisar as misturas de

pesticidas. Optou-se por estudar se a utilização do método do padrão interno permite aumentar a reprodutibilidade nas áreas cromatográficas.

Um dos principais motivos que pode ter ocasionado os altos coeficientes de variação obtido para as áreas dos pesticidas se deve pela instabilidade desses compostos, que se degradam, dificultando as análises e reduzindo a reprodutibilidade das análises.

Os cromatogramas obtidos nas análises referidas na Tabela 5.4, com o “Método 3”, são apresentados na Figura 5.5 utilizando metanol como solvente e na Figura 5.6, utilizando hexano como solvente.

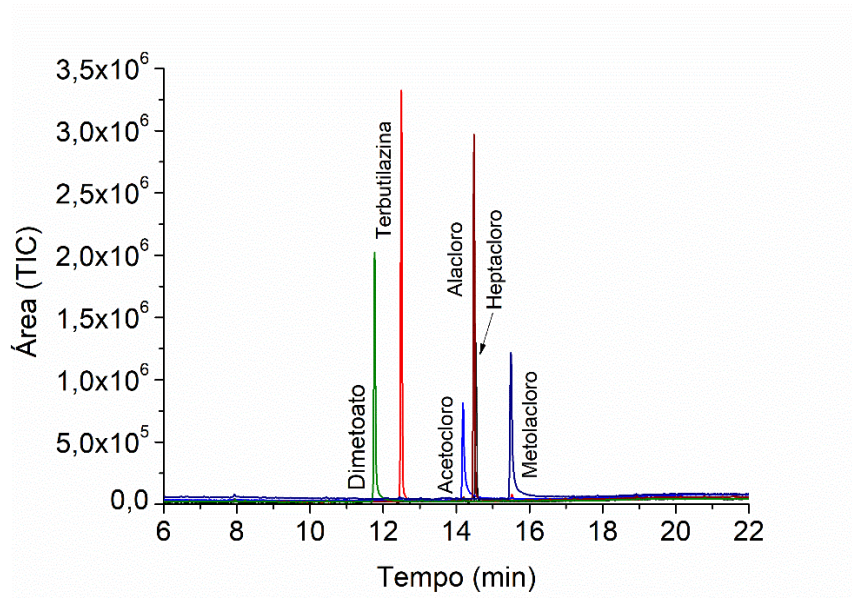


Figura 5.5 – Sobreposição dos cromatogramas dos 6 pesticidas preparados em metanol com concentração de 100 ppm.

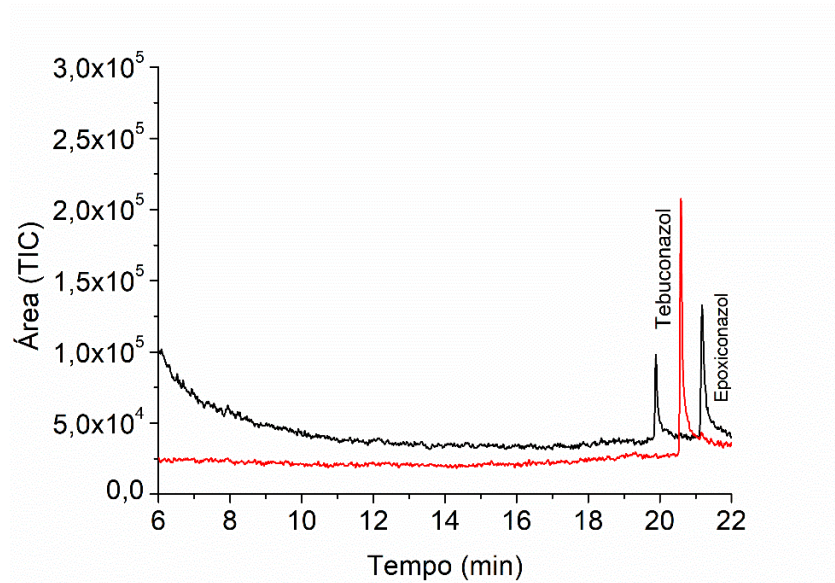


Figura 5.6 – Sobreposição dos cromatogramas dos 2 pesticidas preparados em hexano com concentração de 100 ppm.

Na Figura 5.6 é possível observar a existência de dois picos referentes ao epoxiconazol, sendo que o pico característico é o segundo identificado no gráfico (21,22 min). A presença de um segundo pico (20 min) pode ser justificada pela presença de um possível contaminante na solução preparada do pesticida, um possível composto presente na seringa ou na coluna do equipamento e que foi eluído durante a análise, ou até mesmo significar uma possível degradação do epoxiconazol quando preparado em hexano.

Estas análises com o injetor em modo *Split* 1:10 e a análise de massas feita por varrimento total de íons (*FullScan* ou TIC) permitiram não só determinar os tempos de retenção para cada pesticida, avaliar seus comportamentos nos solventes, como também confirmar a sua identificação utilizando a comparação do espectro de massa de cada pesticida com os espectros de massa existentes nas bibliotecas de espectros de massa do *software* do equipamento.

5.1.3 Influência do método do padrão interno em análises sem extração

Após tomada a decisão de utilizar o método do padrão interno (“PI”) para garantir que a metodologia fosse mais reprodutível, realizou-se a análise do padrão interno selecionado, o trifenilmetano, por GC-MS, de modo a avaliar o seu tempo de retenção,

o seu espectro de massas para determinar os seus íões quantitativos e estudar se o seu pico não se sobrepunha com outro pesticida estudado. O espectro de massas do PI encontra-se no Anexo D e o cromatograma obtido com o “Método 3”, está representado na Figura 5.7.

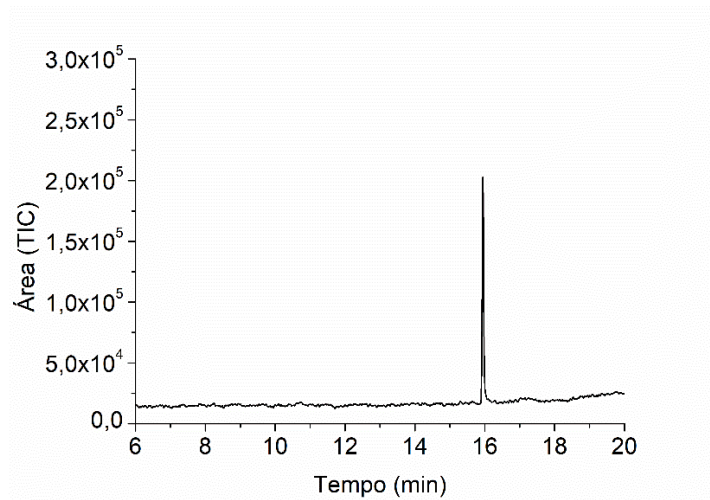


Figura 5.7 –Cromatograma do trifenilmetano.

Como ilustrado na Figura 5.7, o tempo de retenção para o PI foi de 15,95 min. De modo a avaliar a influência do método do padrão interno foram preparados padrões da Mistura 1 com e sem o padrão interno, nas concentrações de 1 a 100 ppm. Os volumes utilizados para a preparação dos padrões encontram-se nos Anexos E e F.

No final da análise, todos os cromatogramas foram estudados e obteve-se os valores para as áreas individuais de cada pesticida nas diferentes concentrações. Assim, foi feita uma relação entre as áreas e concentrações dos pesticidas com as áreas e concentrações do padrão interno, permitindo deste modo que fossem representadas as curvas de calibração para cada composto.

Nas Tabelas 5.5 e 5.6 apresentam-se os estudos de linearidade das análises realizadas sem utilizar a etapa de extração por SPE. Na Tabela 5.5 encontram-se os resultados de linearidade para a Mistura 1 de pesticidas sem a utilização do método do padrão interno. Na Tabela 5.6 apresenta-se um estudo idêntico, mas considerando o método do padrão interno. Nestas tabelas apresentam-se as curvas de calibração obtidas para os pesticidas da Mistura 1 estudados, assim como os respetivos dados

estatísticos calculados: gama(s) de linearidade, número de pontos utilizado em cada gama (n), declive (a), ordenada na origem (b), erros associados ao declive e ordenada na origem baseados num nível de significância de 95%, coeficiente de determinação, limites de deteção e de quantificação, valores dos coeficientes de determinação das equações de regressão linear, limite de deteção e limite de quantificação para cada pesticida estudado, em cada gama de linearidade, o número de pontos existentes em cada gama (n) obtidos por análise no GC-MS utilizando amostras sem extração.

A comparação dos valores dos coeficientes de determinação (R^2) permite verificar que para a generalidade dos pesticidas a linearidade é semelhante, contudo os coeficientes de variação são ligeiramente menores. Deste modo, de acordo com os resultados obtidos, sem a utilização de extração em fase sólida, pode-se dizer que não existem diferenças significativas na utilização ou não do método do padrão interno, pelo menos para esta metodologia e para os pesticidas em estudo.

A representação gráfica de todas as curvas de calibração obtidas, assim como as tabelas de dados necessários à sua construção encontra-se no Anexo G.

Tabela 5.5 – Resultados do estudo da linearidade das análises por GC-MS sem extração e sem utilizar o método do padrão interno, gamas de linearidade ($y=a+bx$), ordenada na origem (a), declive (b) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CV_m) para os 3 pesticidas estudados.

Composto	Solvente	Gama linear (mg.L ⁻¹)	n	Ordenada	Declive	R^2	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	CV_m (%)
				$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$				
Dimetoato	Metanol	6-100	8	-1071472 ± 1299573	85928 ± 24670	0,9237	1,980	6,000	27,60
		20-80	4	-1094537 ± 1029599	18798 ± 9799	0,9838	6,600	20,00	5,48
		6-20	4	-94636 ± 52339	14763 ± 4273	0,9910	1,980	6,000	6,59
Terbutilazina	Metanol	0,2-100	15	-279480 ± 435031	11302 ± 814	0,9807	0,066	0,200	18,31
		20-100	5	-337416 ± 4145889	157930 ± 62502	0,9557	6,600	20,00	13,11
		2-20	6	-108619 ± 121058	93019 ± 11909	0,9916	0,660	2,000	7,89
		0,4-2	5	-18452 ± 2068	54833 ± 1863	0,9997	0,132	0,400	1,39
Heptacloro	Metanol	0,01-100	21	-82794 ± 82140	53103 ± 2525	0,9903	0,003	0,010	18,63
		8-100	7	-347952 ± 347228	56938 ± 6171	0,9912	2,640	8,000	8,15
		0,01-8	14	-1304 ± 1149	19717 ± 417	0,9989	0,003	0,010	6,28

Tabela 5.6 – Resultados do estudo da linearidade das análises por GC-MS sem extração e utilizando o método do padrão interno, gamas de linearidade ($y=a+bx$), ordenada na origem (a), declive (b) e respetivos erros a 95% de confiança, coeficientes de determinação (R^2), limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) e coeficiente de variação do método (CV_m) para os 3 pesticidas estudados.

Composto	Solvente	Gama linear (mg.L ⁻¹)	n	Ordenada	Declive	R^2	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	CV_m (%)
				$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$				
Dimetoato	Metanol	10-100	6	-0,0919 ± 0,1323	0,4744 ± 0,2180	0,9013	3,300	10,00	24,98
Terbutilazina	Metanol	10-100	6	-0,0648 ± 0,0622	0,8610 ± 0,1025	0,9913	3,300	10,00	6,75
		1-8	5	-0,0345 ± 0,0238	0,4223 ± 0,0483	0,9961	0,330	1,000	4,90
		0,2-0,8	4	-0,0450 ± 0,0680	0,2063 ± 0,1037	0,9734	0,066	0,200	10,45
Heptacloro	Metanol	10-100	6	-0,0300 ± 0,0331	0,2936 ± 0,0545	0,9824	3,300	10,00	10,09
		1-8	5	-0,0087 ± 0,0107	0,1278 ± 0,0217	0,9915	0,330	1,000	7,28
		0,1-0,8	5	-0,0007 ± 0,0075	0,0892 ± 0,0153	0,9914	0,033	0,100	7,35
		0,02-0,08	4	0,0354 ± 0,0072	0,0303 ± 0,0131	0,9803	0,007	0,020	8,96

As Figuras 5.8 e 5.9 comparam e ilustram os resultados obtidos para a Mistura 1 (M1) contendo os pesticidas dimetoato, heptacloro e terbutilazina, com e sem padrão interno, para concentrações de 10 a 100 ppm, utilizando uma concentração constante de padrão interno de 100 ppm. Os valores de concentrações e áreas utilizados para a construção das curvas de calibração encontram-se no Anexo H. Os ensaios foram feitos em duplicado e, portanto, os tratamentos estatísticos foram feitos com a média dos resultados obtidos.

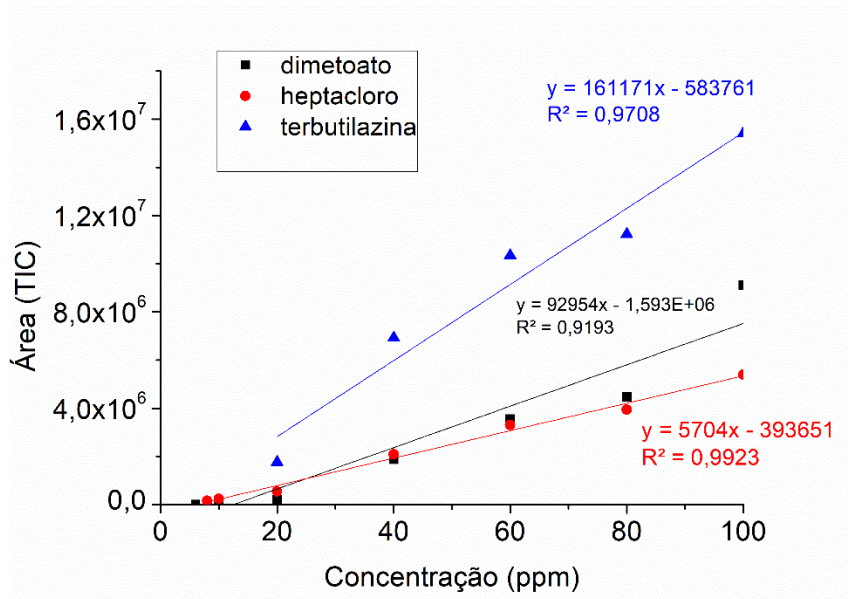


Figura 5.8 – Curva de calibração dos 3 pesticidas presentes na Mistura 1 sem utilizar o padrão interno.

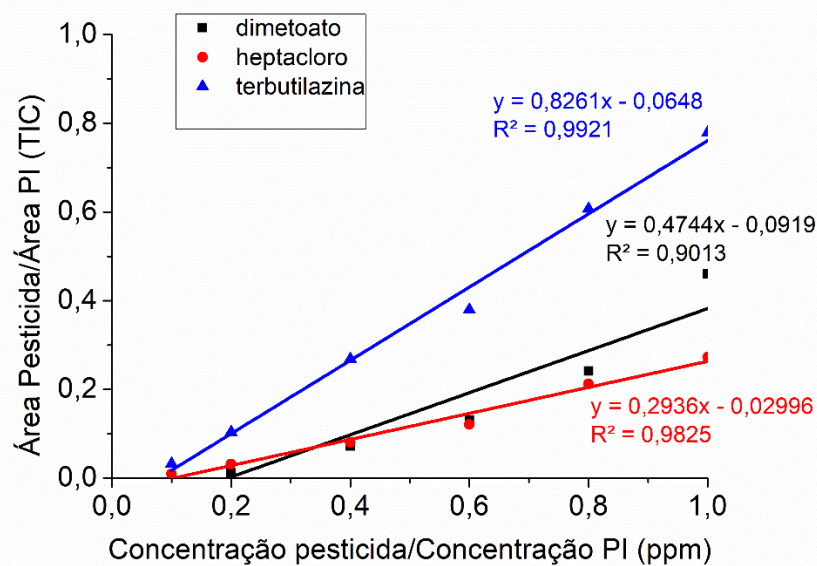


Figura 5.9 – Curvas de calibração dos 3 pesticidas presentes na Mistura 1 utilizando o padrão interno.

As curvas de concentração são a representação da relação entre a concentração do analito e o sinal gerado pelo equipamento. Para a construção das curvas de calibração foi aplicado o método dos mínimos quadrados, para que fossem determinados os parâmetros do modelo, o declive e o valor da ordenada na origem. A partir desses parâmetros eram feitos os cálculos para determinar os erros associados a esses parâmetros, utilizando de cálculos de desvio padrão e da distribuição de t de *student*, com intervalo de 95% de confiança, como citado anteriormente no capítulo 4.

As Figuras 5.8 e 5.9 indicam que não existiu uma diferença significativa para a linearidade das curvas de calibração com a utilização do padrão interno. Esperava-se, porém, que a utilização desse método fosse mais significativa do que os resultados apresentaram. Apesar dessa diferença, o método do padrão interno ainda se mostrou válido e se destaca por ser uma técnica que garante mais linearidade e confiança aos resultados, podendo compensar principalmente para gamas de valores de concentração mais baixas.

Nas Tabelas 5.5 e 5.6 para os pesticidas em metanol, há a destacar o dimetoato como o pesticida para o qual os resultados obtidos apresentaram maior coeficiente de variação, ultrapassando 24% para o método com padrão interno e 27% sem o método de padrão interno. Esses altos valores, conseqüentemente, refletem o baixo valor de R^2 e a menor linearidade dos resultados do dimetoato, quando comparados com os demais pesticidas em metanol. Os coeficientes de variação para o heptacloro e para a terbutilazina também não foram o esperado para os dois métodos. Para a terbutilazina no método sem padrão interno o coeficiente superou os 18%, comparados com os 6,75% quando da utilização do PI. Para o heptacloro no método sem padrão interno o coeficiente de variação também foi superior a 18%, enquanto ao se utilizar o PI, o coeficiente foi reduzido a pouco mais que 10%.

Dentre os pesticidas em metanol estudados, com e sem a utilização do método do padrão interno, aquele que permitiu alcançar as menores gamas de concentração foi o heptacloro.

Como representado na Tabela 5.5, foram obtidos resultados de limites de detecção e quantificação satisfatórios a partir do método sem a utilização do padrão interno. Para o heptacloro foram alcançados um limite de detecção de 0,003 mg/L e um limite de quantificação de 0,010 mg/L, enquanto para a terbutilazina foram alcançados 0,066 mg/L e 0,200 mg/L para o LD e LQ, respetivamente. Já para o dimetoato os limites foram superiores, obtendo-se 1,98 mg/L e 6,0 mg/L para o LD e LQ, respetivamente.

O estudo de linearidade do método cromatográfico, sem utilizar a etapa prévia de extração, mas com o método do padrão interno, representado na Tabela 5.6, permite verificar que se consegue detetar concentrações de 3,30 mg/L para os três pesticidas, dimetoato, terbutilazina e heptacloro, enquanto o limite de quantificação para os três pesticidas foi de 10 mg/L.

Na Tabela 3.3 é possível perceber que os estudos do autor Silva em 2012 para heptacloro basearam-se em uma metodologia semelhante à proposta neste trabalho. Ele utilizou a técnica de SPE para extração dos analitos e o GC-MS como metodologia analítica. Ao se comparar o LD e LQ obtidos por esse autor, com os valores dos limites obtidos neste trabalho, é possível afirmar que os resultados obtidos foram muito satisfatórios, pois Silva em seu trabalho, realizou o processo de linearização após a extração por SPE, etapa essa não realizada neste trabalho. Enquanto Silva em 2012, obteve um LD e LQ de 0,031 µg/L e 0,103 µg/L para o heptacloro, a metodologia agora proposta permitiu alcançar os valores de 0,003 mg/L de LD e 0,010 mg/L de LQ para o mesmo pesticida.

Dentre os fatores que podem ser responsáveis pela diferença dos limites LD e LQ obtidos neste trabalho relativamente aos limites estudados das outras referências citadas na Tabela 3.3, destaca-se as diferentes metodologias propostas para a quantificação de cada pesticida, diferentes condições e metodologias de extração, diferentes métodos analíticos, diferentes detetores e diferentes condições operatórias propostas e utilizadas por cada autor.

Comparando os valores obtidos nas Tabela 5.5 e 5.6 com outros estudos, destacados na Tabela 3.3, os limites de detecção e quantificação alcançados neste trabalho são

considerados satisfatórios, tendo em vista que com a utilização da técnica de SPE podem ser alcançados limites ainda mais inferiores, fazendo com que essa metodologia possivelmente seja eficaz na análise de amostras reais, nas quais esses analitos se encontram em concentrações bem pequenas.

5.1.4 Estudo das análises em modo SIM ou *FullScan*

Em análises por GC-MS o modo de aquisição por varrimento total de iões “TIC”, também designado por “*FullScan*”, é utilizado para a identificação dos compostos químicos presentes numa amostra utilizando os respetivos espectros de massa, assim como para a análise quantitativa e determinação de alguns parâmetros necessários na análise por varrimento seletivo de iões previamente selecionados designado por “SIM”. Por outro lado, a análise utilizando o modo SIM, permite a obtenção de limites de deteção mais baixos quando comparado com o modo de varrimento, uma vez que a sensibilidade em modo SIM é cerca de 10 a 100 vezes mais elevada.

Para a análise utilizando o modo SIM é necessário definir os iões a serem monitorizados pelo detetor de massas. Estes iões foram determinados de acordo com o espectro de massas da análise individual de cada pesticida, em que se avaliou quais os iões mais abundantes e aqueles que se destacavam para cada um dos compostos. Foram igualmente considerados os valores referidos no trabalho desenvolvido por Fang *et al.* em 2018. As razões m/z selecionadas para cada pesticida encontram-se descritas na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Iões selecionados para a análise de cada um dos 8 pesticidas utilizando o modo SIM.

Pesticidas	Iões Selecionados
Alacloro	45; 160; 188
Acetocloro	146; 162; 174; 223
Dimetoato	87; 93; 125
Heptacloro	100; 270; 272
Metolacloro	162; 211; 238
Terbutilazina	132; 174; 214; 229
Epoxiconazol	111; 138; 192
Tebuconazol	70; 125; 250
Trifenilmetano	152; 167; 244

Com o objetivo de comparar os dois modos de aquisição de massas, foram realizadas análises em duplicado, com a Mistura 1, composta por dimetoato, terbutilazina, heptacloro e padrão interno (trifenilmetano), na concentração de 100 ppm. O injetor foi mantido em modo de *Splitless*, tendo-se utilizado um volume de injeção de 1 μ L.

Os cromatogramas obtidos para a Mistura 1 na concentração de 100 ppm dos pesticidas, nos dois modos de detecção de massas, são apresentados na Figura 5.10.

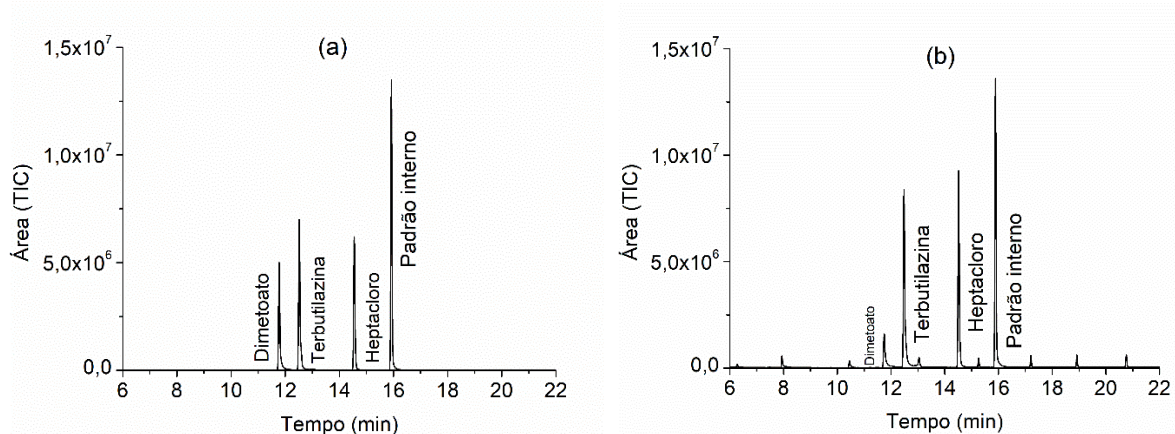


Figura 5.10 – Cromatogramas da Mistura 1, obtidos com o injetor em *Splitless* e (a) em modo SIM e (b) em modo *FullScan*.

A análise da Figura 5.10 permite verificar que, com a exceção do dimetoato, o modo *FullScan* apresenta valores de intensidade de sinal ligeiramente mais elevados. Uma explicação possível poderá relacionar-se com o facto de que quando a análise é feita em modo *FullScan* são analisados todos os iões para um dado tempo de retenção, o que poderá influenciar no resultado do sinal, sendo que por vezes, as somas dos sinais de um tempo de retenção podem não ser referentes a um só composto.

Quanto ao modo SIM, apesar de ter um sinal ligeiramente inferior para cada pesticida, os sinais obtidos são referentes aos iões que foram selecionados para serem analisados, portanto o sinal é mais específico de cada composto. Este modo de detecção destaca-se pela vantagem de que quando são analisadas amostras de concentrações inferiores, por se tratar de uma análise para iões específicos, são obtidos sinais maiores do que quando se utiliza o modo *FullScan*, que faz uma aquisição global de todos os iões. Outra vantagem do modo SIM, claramente visível

pela comparação dos dois cromatogramas apresentados na Figura 5.10, é que a linha de base obtida está isenta de contaminantes, uma vez que o detetor considera apenas as iões selecionados para cada pesticida.

5.1.5 Influência do modo de injeção *Split/Splitless* em modo SIM

A injeção da amostra com o injetor em modo *Split* é geralmente utilizada para amostras de concentrações elevadas, e permite obter picos cromatográficos bem resolvidos para os compostos analisados. A injeção da amostra com o injetor em modo *Splitless* é normalmente utilizada quando os compostos em análise estão presentes em concentrações baixas e quando esses compostos possuem pontos de ebulição altos, sendo superiores a 150°C, como é o caso dos pesticidas deste estudo (Grande, 2012).

Realizaram-se análises em duplicado da Mistura 1, na concentração de 100 ppm, utilizando o modo SIM para a detecção de massas e o injetor foi colocado em *Split* (1:10) e em *Splitless*. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 5.11.

GC

Temperatura do Injetor: 250°C

Volume de injeção: 1 µL

Split 1:10

MS

SIM

Temperaturas do detetor e interface: 280°C

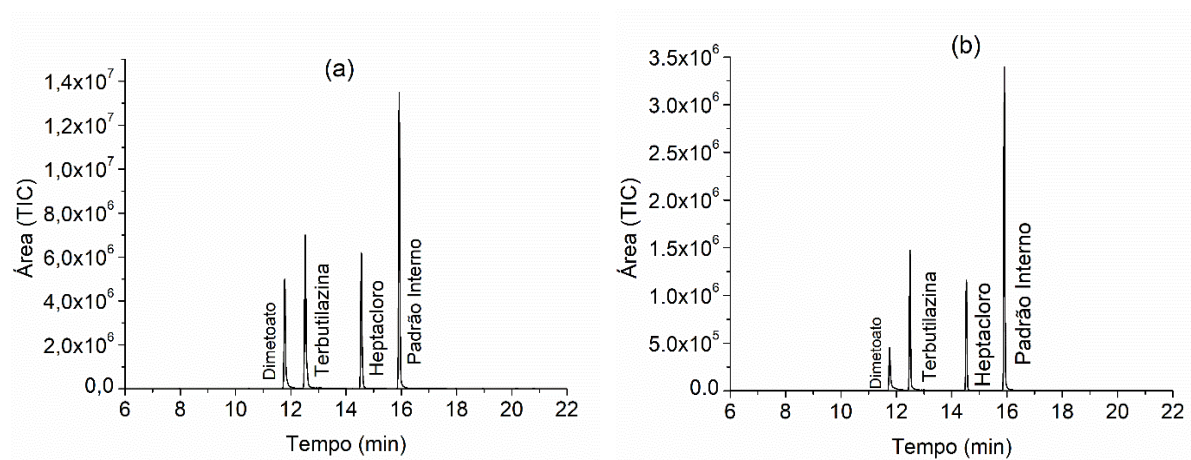


Figura 5.11 – Cromatogramas da Mistura 1, obtidos em SIM e com o injetor em (a) *Splitless* e (b) *Split* (1:10).

Estes resultados permitem verificar que o método de injeção por *Splitless* permite que sejam obtidas intensidades de sinais bastante superiores quando comparadas com as intensidades obtidas com a injeção em *Split* (1:10). Desta forma torna-se possível analisar compostos em menores concentrações, atingindo limites de detecção e quantificação inferiores, o que aumenta a sensibilidade do método para analisar amostras reais nas quais geralmente os analitos se encontram em concentrações muito baixas. Deste modo decidiu-se realizar, a partir desta fase experimental, todas as análises por GC-MS em modo SIM, com injeção de apenas 1 μL de amostra e com o injetor em *Splitless*, em um novo método denominado “Método 4”.

5.1.6 Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade em análises sem extração

De modo a se avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia proposta, foram feitas análise de 6 padrões na concentração 10 mg/L da mistura M1 sem realizar a técnica de SPE, em sequência, pelo “Método 4” e 6 análises do mesmo padrão em dias e condições diferentes, também pelo “Método 4”. Esses estudos permitem discutir sobre a repetibilidade e a reprodutibilidade do método, como representado nas Tabelas 5.8 e 5.9. Os cromatogramas dos padrões analisados nesse estudo estão representados no Anexo I.

Tabela 5.8 – Resultados experimentais obtidos para a repetibilidade utilizando a mistura M1 com uma concentração de 10 mg/L.

Pesticidas	Área 1 (SIM)	Área 2 (SIM)	Área 3 (SIM)	Área 4 (SIM)	Área 5 (SIM)	Área 6 (SIM)	Repetibilidade (CV%)
Dimetoato	42811	32356	34653	43088	42652	62487	24,67
Terbutilazina	1026658	881852	859259	741737	765661	931109	12,18
Heptacloro	407981	353445	326999	283865	288232	331221	13,80
Trifenilmetano	2381948	1961063	1929842	1766093	1766087	2119582	11,80

Tabela 5.9 – Resultados experimentais obtidos para a reprodutibilidade utilizando a mistura M1 com uma concentração de 10 mg/L.

Pesticidas	Área 1 (SIM)	Área 2 (SIM)	Área 3 (SIM)	Área 4 (SIM)	Área 5 (SIM)	Área 6 (SIM)	Reprodutibilidade (CV%)
Dimetoato	41196	18611	42652	15931	24831	30865	38,83
Terbutilazina	1027983	922674	765661	771416	746261	855227	13,02
Heptacloro	350775	360988	288232	285217	289982	336174	10,87
Trifenilmetano	2323581	2090290	1766087	1792723	1815575	1988487	11,07

Segundo os resultados da Tabela 5.8, as análises da mistura M1 por diversas vezes, sequencialmente, no mesmo dia e nas mesmas condições operatórias, permitiram inferir que o método não possui boa repetibilidade. Destaca-se o dimetoato como pesticida que apresentou maior coeficiente de variação, com quase 25%. Este valor é consideravelmente alto e uma das possíveis explicações para esse fenómeno é o facto de que este pesticida, como bem demonstrou este estudo, se degrada mais facilmente e rapidamente que os demais. Isso faz com que a cada análise a área de seu pico característico seja cada vez mais instável.

Quanto ao estudo da reprodutibilidade, salienta-se que foram realizadas duas análises por dia com intervalo de 5 horas entre elas, levando-se em consideração as degradações sofridas pelos pesticidas no solvente após um tempo da preparação do padrão, e, portanto, respeitou-se um tempo máximo para evitar que as possíveis degradações dos compostos tivessem influência nos resultados.

Os resultados expressos na Tabela 5.9 indicaram também coeficientes de variação bastante elevados, obtendo-se resultados diferentes para os valores das áreas dos pesticidas a cada análise, quer em análises no mesmo dia quer em análises realizadas em dias diferentes. O dimetoato destaca-se novamente como sendo o pesticida com maior coeficiente de variação, atingindo um valor de aproximadamente 39%. Uma hipótese poderá também ser a degradação do composto, que com o tempo faz com que seu pico e sua área sejam reduzidos. No segundo dia de análise já era possível observar a presença de pequenos picos no cromatograma do padrão como pode ser visto no Anexo I, referentes aos iões selecionados para o dimetoato, ilustrando a sua provável degradação.

Os altos valores do coeficiente de variação para a reprodutibilidade e a repetibilidade, superiores a 10%, dificultam no desenvolvimento do método e também na sua validação. Por isso a importância de se estudar meios de tornar o método mais seguro e válido, como a utilização do método do padrão interno, adotado neste trabalho, para garantir mais segurança aos resultados encontrados e assim tornar a metodologia mais segura.

5.2 Otimização da técnica de extração por SPE

Foi proposta uma primeira metodologia de SPE para ser realizada no estudo do heptacloro, como um teste, de modo a avaliar se o método proposto seria eficiente na extração do analito. Foram preparados 10 mL de um padrão na concentração 10 mg/L do pesticida, juntamente com o padrão interno em água ultrapura. Esse padrão foi então submetido ao processo de SPE proposto em duplicado.

O método consistiu nas etapas de acondicionamento, extração, lavagem e eluição. Na primeira etapa são adicionados 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura ao cartucho, a bomba de vácuo é acionada e a válvula é aberta para liberação do líquido gota a gota.

Na etapa seguinte, de extração, foram adicionados os 10 mL do padrão preparado no cartucho, a bomba a vácuo é acionada e controla-se a válvula para a liberação gota a gota do líquido de forma lenta. Na etapa de lavagem o processo é repetido, mas dessa vez com 5 mL de água ultrapura e na última etapa é feita a eluição do pesticida do polímero do cartucho através da adição de 8 mL de metanol no cartucho e o gotejamento de forma lenta e contínua do líquido.

O recolhido foi então analisado por GC-MS para avaliação dos resultados. Os cromatogramas obtidos após o processo de extração do heptacloro estão representados na Anexo J.

A partir dessa metodologia, do teste realizado e de referências estudadas, foi proposto um novo método com algumas alterações para garantir a otimização do processo.

5.2.1 Seleção do tipo de adsorvente utilizado

Para a realização da técnica de extração em fase sólida foi necessário pesquisar na literatura os tipos de adsorvente existentes, de modo a se determinar qual o mais indicado para ser utilizado, levando-se em consideração que os compostos em estudo são pesticidas.

Atualmente, a maioria dos cartuchos para SPE desenvolvidos pelos fabricantes pode ser utilizado para diferentes aplicações, sendo capazes muitas vezes de adsorver uma gama abrangente de poluentes emergentes. Alguns outros apresentam características mais específicas e são mais seletivos em relação a compostos específicos (Moreira, 2008).

Segundo alguns autores, os adsorventes mais adequados para a extração de compostos orgânicos são as partículas de sílica revestidas por cadeias apolares de C₁₈ e C₈, co-polímeros apolares com elevada superfície específica e ligações cruzadas e também materiais carbonáceos (Gonçalves, 2006).

Liu *et al* fizeram um estudo em 2004 para avaliar a eficiência da recuperação dos poluentes emergentes em relação a diferentes tipos de cartuchos com adsorventes diferentes. Segundo os autores, dentre os cartuchos estudados, a adsorção de poluentes emergentes revelou-se mais eficiente utilizando cartuchos Chromabond HLB, 500 mg de enchimento de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona).

Com base na revisão bibliográfica realizada, optou-se por se utilizar cartuchos Chromabond HLB, da marca Macherey-Nagel, com 6 mL de capacidade e com 500 mg de enchimento de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) com um diâmetro de partícula de 60 µm. Esse cartucho é indicado para o estudo de amostras que sejam aquosas, tendo a vantagem de poder ser utilizado para o estudo de poluentes emergentes em geral e de possuir uma boa relação custo/benefício.

5.2.2 Otimização do tipo de solvente a utilizar na etapa de eluição

Levando-se em consideração os ensaios que foram feitos para identificação dos pesticidas pela cromatografia gasosa, optou-se por utilizar os mesmos solventes para

eluição dos pesticidas na técnica de extração por SPE, que também foram utilizados para preparação dos padrões de cada um deles na primeira etapa experimental do trabalho.

Deste modo, para a mistura M1, contendo os pesticidas, dimetoato, heptacloro e terbutilazina o solvente utilizado na etapa de eluição da SPE foi o metanol, enquanto para a mistura M3, composta por epoxiconazol e tebuconazol, o eluente escolhido foi o hexano.

5.2.3 Seleção das condições operatórias das 4 etapas de SPE

De acordo com a metodologia de SPE proposta e explicada na seção 5.2, foi proposto um novo método, considerado otimizado para a análise dos compostos em estudo.

Os pesticidas estudados através dessa metodologia foram aqueles presentes nas misturas M1 e M3. Foram preparados 10 mL de 3 padrões de concentração 10 ppm, de cada uma das misturas em água ultrapura, denominados de padrão 1, 2 e 3, simulando uma matriz aquosa real. Cada um desses padrões continha também o padrão interno na concentração de 10 ppm. O cálculo das massas dos pesticidas e diluições para obtenção dos padrões encontram-se no Anexo K.

O método representado na Figura 5.12 ilustra as etapas propostas para a otimização da extração por SPE. Diferentemente do método anteriormente realizado, foi proposta uma 2ª etapa de eluição de modo a avaliar se todo o analito retido nos cartuchos seria eluído na primeira etapa, ou se algum pesticida ainda retido no cartucho pudesse ser eluído com a adição de mais solvente.

As amostras recolhidas nas diversas etapas de SPE foram de seguida analisadas utilizando o método otimizado de GC-MS.

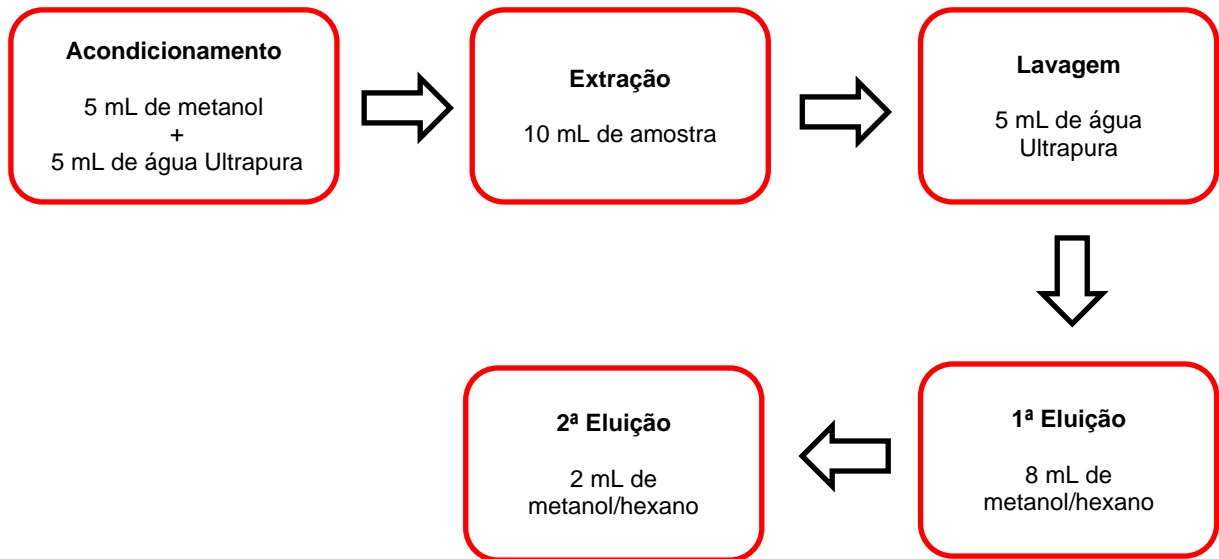


Figura 5.12 – Diagrama representativo da técnica de SPE otimizada para a extração de pesticidas em amostras aquosas.

O procedimento proposto e representado na Figura 5.12 mostrou-se eficiente para a extração dos pesticidas da mistura M1. Para a primeira etapa de eluição foi possível recuperar todos os pesticidas da mistura, com sinais cromatográficos bastante intensos, enquanto para a 2ª eluição apenas foram obtidos picos para a terbutilazina e para o heptacloro. A alta solubilidade dos pesticidas da mistura M1 em água e em metanol facilita a sua adsorção no cartucho e depois mais facilmente são eluídos pelo solvente.

Para a mistura M3 os cromatogramas ilustraram que o método não permitiu a recuperação dos pesticidas por essa metodologia. Possivelmente a utilização de hexano como eluente e a baixa solubilidade que os pesticidas têm em água não permite que estes não fiquem adsorvidos no cartucho e conseqüentemente não sejam extraídos com eficiência.

A utilização de outro solvente, como o acetonitrilo, ou até mesmo a utilização de um cartucho diferente do utilizado poderá ser mais indicado para esta família de pesticidas.

Todos os cromatogramas obtidos para os 3 padrões da mistura M1 e M3, submetidos a extração por SPE estão representados no Anexo L.

5.2.4 Determinação das recuperações

Para a determinação da recuperação dos pesticidas alcançada através da técnica de SPE, foi feito um tratamento estatístico com os resultados obtidos para os 3 padrões de concentração 10 mg/L da mistura M1, citados na etapa anterior, na seção 5.2.3. Para cada um dos padrões, 1, 2 e 3 foram obtidas duas amostras referentes às duas eluições. As áreas obtidas para cada um dos pesticidas através da extração por SPE encontram-se na Tabela 5.10. Destaca-se, como já citado anteriormente, o facto de que na 2ª etapa de eluição para todos os padrões, já não se observar a presença de dimetoato e os demais pesticidas aparecem em quantidades bastante reduzidas quando comparadas com a 1ª eluição.

A terbutilazina teve em média para os 3 padrões apenas 0,46% do pesticida eluídos na segunda etapa quando comparada com a primeira, enquanto para o heptacloro esse valor foi um pouco superior, atingindo 3,41% eluídos do pesticida na segunda eluição, quando comparada com a 1ª etapa.

Tabela 5.10 - Áreas obtidas para as amostras recolhidas nas duas etapas finais de eluição em cada uma das 3 réplicas da solução padrão de cada pesticida com uma concentração de 10 mg/L.

Pesticidas e padrão interno	Áreas (SIM) para o 1º Padrão		Áreas (SIM) para o 2º Padrão		Áreas (SIM) para o 3º Padrão	
	1ª eluição	2ª eluição	1ª eluição	2ª eluição	1ª eluição	2ª eluição
Dimetoato	35647	-	29265	-	41805	-
Terbutilazina	1385382	7006	1346166	6467	1582058	6569
Heptacloro	305124	10840	295021	10835	309467	9416
Padrão interno	1929241	984169	1795185	627630	2238296	908243

Foram analisados também os resultados obtidos da análise em duplicado de um padrão controlo de metanol da mistura M1, preparado num balão volumétrico de 10 mL. O cromatograma das análises desse padrão em metanol está representado no Anexo M. As massas medidas para cada pesticida, a concentração dos pesticidas e do padrão interno, as áreas médias determinadas em duplicada para os pesticidas e padrão interno, a razão média entre as áreas dos pesticidas obtidas pelo padrão em metanol com as áreas médias obtida para o PI para cada eluição $(A/A_{PI})_{média}$, a razão entre as concentrações dos pesticidas e do PI (C/C_{PI}) e uma constante (K), calculada

a partir da Equação 12 estão registados na Tabela 5.11. O parâmetro A e API se referem as áreas do pesticida e do padrão interno respetivamente, e os parâmetros C e CPI são referentes as concentrações dos pesticidas e do padrão interno.

$$K = \frac{A}{API} \times \frac{CPI}{C} \quad [12]$$

Tabela 5.11 – Valores de massa, concentração, áreas médias, razão entre as áreas dos pesticidas e do PI $(A/API)_{\text{média}}$, razão entre a concentração dos pesticidas e do PI (C/CPI) e constante (K) calculados no estudo do padrão 10 mg/L em metanol.

Pesticidas e padrão interno	Massa (mg)	Concentração (mg/L)	Área média	$(A/API)_{\text{média}}$	C/CPI	K
Dimetoato	0,101	10,1	34597,5	0,9352	0,0166	0,0155
Terbutilazina	0,105	10,5	945759,5	0,9722	0,4382	0,4260
Heptacloro	0,102	10,2	326855,5	0,9444	0,1560	0,1473
Trifenilmetano	0,108	10,8	2215972			

A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 5.10 e 5.11 foi feito o tratamento estatístico para o cálculo das recuperações. Primeiramente foram calculadas para cada padrão preparado as concentrações (c_1 e c_2) e massas de cada pesticida (m_1 e m_2) para as duas eluições. Com esses valores é possível determinar as recuperações em massa para cada eluição através da Equação 1. Os dados são detalhados na Tabela 5.12, Tabela 5.13 e Tabela 5.14.

Para determinar as concentrações foi utilizada a Equação 13.

$$\text{Concentração} = \frac{A}{API} \times \frac{CPI}{K} \quad [13]$$

Para o cálculo das massas m_1 e m_2 , referentes às duas eluições, foram utilizadas as Equações 14 e 15, considerando os volumes de eluição utilizados na 1ª e 2ª fases de eluição, 8 mL e 2 mL, respetivamente.

$$m_1 = \text{Concentração} \times 0,008 \quad [14]$$

$$m_2 = \text{Concentração} \times 0,002 \quad [15]$$

Tabela 5.12 – Concentrações e massas determinadas de cada pesticida com o 1º padrão.

Pesticida	c11 (mg/L)	m11 (mg)	c12 (mg/L)	m12 (mg)	R11 (%)	R12 (%)
Dimetoato	12,04	0,0963	0,00	0,0000	95,3	0,0
Terbutilazina	17,70	0,1416	0,18	0,0004	134,9	0,3
Heptacloro	10,95	0,0876	0,76	0,0015	85,9	1,5

Tabela 5.13 - Concentrações e massas determinadas de cada pesticida com o 2º padrão.

Pesticida	c21 (mg/L)	m21 (mg)	c22 (mg/L)	m22 (mg)	R21 (%)	R22 (%)
Dimetoato	9,88	0,0791	0,00	0,0000	78,3	0,0
Terbutilazina	17,20	0,1376	0,16	0,0003	131,0	0,3
Heptacloro	10,59	0,0847	0,76	0,0015	83,0	1,5

Tabela 5.14 – Concentrações e massas determinadas de cada pesticida com o 3º padrão.

Pesticida	c31 (mg/L)	m31 (mg)	c32 (mg/L)	m32 (mg)	R31 (%)	R32 (%)
Dimetoato	14,12	0,1129	0,00	0,0000	111,8	0,0
Terbutilazina	20,21	0,1617	0,16	0,0003	154,0	0,3
Heptacloro	11,11	0,0888	0,66	0,0013	87,1	1,3

Com a determinação da recuperação de cada etapa de eluição, foi feito também o cálculo das recuperações médias, em percentagem, para cada pesticida, como representado na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 - Resultados da percentagem de recuperação média dos 3 padrões para os pesticidas estudados.

Pesticida	Recuperação média 1 (%)	Recuperação média 2 (%)
Dimetoato	95,1	0,0
Terbutilazina	140,0	0,3
Heptacloro	85,3	1,4

Os resultados de recuperação foram satisfatórios obtendo-se um valor superior a 100% para a terbutilazina, e bons valores para o dimetoato (95%) e heptacloro (85%) para a primeira eluição dos padrões, enquanto para a segunda eluição a recuperação foi baixa, principalmente por se levar em consideração que a maior parte dos analitos já havia sido eluída na primeira etapa. Portanto o método se mostrou eficiente e capaz de garantir a extração de pesticidas eluídos em metanol.

Recuperações superiores a 100% podem ocorrer nesse tipo de metodologia, pois as concentrações medidas dos compostos, geralmente são próximas do limite instrumental da técnica analítica. Outro fator que pode originar esse fenômeno é a possível interação do eluente ou dos pesticidas com o material adsorvente do cartucho. Esses materiais podem se eluir juntamente com os pesticidas, aumentando as áreas de seus picos, gerando recuperações maiores do que realmente são.

A determinação das recuperações não foi calculada para a mistura M3, já que como visto anteriormente, a metodologia proposta de SPE não permitiu a extração dos pesticidas epoxiconazol e tebuconazol.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

6.1 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e a validação de uma metodologia experimental para identificar e quantificar 11 pesticidas diferentes, que são mais utilizados na região nordeste de Portugal e no Brasil. São eles o acetocloro, alacloro, dimetoato, epoxiconazol, glifosato, imidacloprida, heptacloro, MCPA, metolacloro, tebuconazol e terbutilazina. Infelizmente devido à pandemia e todas as limitações por ela imposta, algumas etapas não puderam ser devidamente realizadas.

Primeiramente, foi realizada uma pesquisa bibliográfica aprofundada para avaliar os métodos de extração e quantificação mais utilizados atualmente no estudo e quantificação de pesticidas em meios aquosos. Com base neste passo inicial, decidiu-se desenvolver uma metodologia baseada na extração em fase sólida, seguida de uma análise instrumental por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas.

No desenvolvimento da metodologia, realizou-se a otimização do método de análise e da metodologia de extração. Para isso foram realizadas diversas análises dos pesticidas, alterando, por exemplo, as suas concentrações, o solvente utilizado na diluição dos compostos, as condições operatórias do GC-MS e as condições operatórias de SPE. Foram feitos tratamentos estatísticos para os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, além dos cálculos de recuperação para o método de extração.

A mistura M1, contendo os pesticidas dimetoato, heptacloro e terbutilazina, foi utilizada para o estudo da repetibilidade e reprodutibilidade do método. Para a repetibilidade obteve-se um coeficiente de variação superior a 24% para o dimetoato, 12,18% para a terbutilazina e 13,80% para o heptacloro, já para a reprodutibilidade os coeficientes de variação foram de 38,83% para o dimetoato, 13,02% para a terbutilazina e 10,87% para o heptacloro. Devido aos altos valores desses parâmetros, principalmente para o dimetoato que se trata de um pesticida que se degrada rapidamente quando em solução com metanol, a implementação do método do padrão

interno mostrou-se como uma boa opção para garantir menor variação entre os resultados, tornando o método mais reprodutível.

Dos 11 pesticidas propostos para estudo neste trabalho, foi possível identificar e quantificar o acetocloro, o alacloro, o dimetoato, o epoxiconazol, o heptacloro, o metolacloro, o tebuconazol e a terbutilazina. Os pesticidas glifosato, imidacloprida e MCPA não foram identificados através da metodologia desenvolvida, nem estudados nas demais etapas do trabalho, pois necessitam de um processo químico de derivatização, para que sejam derivados em compostos que possam ser analisados por cromatografia gasosa.

Com o desenvolvimento de uma metodologia otimizada para análise dos pesticidas por GC-MS, a segunda etapa do trabalho foi o desenvolvimento também de uma metodologia otimizada para SPE. A extração por SPE realizada para os pesticidas da mistura M1, garantiu recuperações médias de 85% para o heptacloro, 140% para a terbutilazina e 95% para o dimetoato. Os elevados valores de recuperação indicam que o método foi devidamente otimizado para esses pesticidas e possivelmente também para os pesticidas da mistura M2, formada pelos pesticidas acetocloro, alacloro e metolacloro, porém para os pesticidas em hexano da mistura M3, o método deve ser alterado de forma a garantir a eluição e extração dos mesmos.

Só foi possível construir curvas de calibração e determinar a linearidade para os pesticidas da mistura M1, sem a realização anterior da técnica de SPE. Apesar disso, os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para o dimetoato, terbutilazina e heptacloro, sem a utilização do método do padrão interno alcançaram bons resultados, quando comparados com os estudos presentes na literatura. Para o dimetoato foram obtidos um limite de detecção de 1,98 mg/L e um limite de quantificação de 6,00 mg/L, com um coeficiente de variação de 27,60%, enquanto para a terbutilazina o LD foi de 0,066 mg/L e o LQ foi de 0,200 mg/L e um coeficiente de variação de 18,31%, já para o heptacloro os limites foram de 0,003 mg/L e 0,010 mg/L para o LD e LQ, respectivamente, com um coeficiente de variação de 18,63%. Os coeficientes de variação foram elevados o que indica que o método não apresenta

uma boa reprodutibilidade, sendo o motivo para o estudo da mesma metodologia com o padrão interno.

Para o método em que se utiliza o padrão interno os resultados já não foram tão satisfatórios, já que para os 3 pesticidas da M1 foram obtidos um LD de 3,3 mg/L e um LQ de 10 mg/L. Apesar do aumento nos limites de detecção e quantificação, os coeficientes de variação para os 3 pesticidas foram reduzidos. Para o dimetoato o coeficiente foi de 24,98%, para a terbutilazina o coeficiente foi de 6,75% e para o heptacloro foi obtido o menor coeficiente de variação com 10,09%. Mesmo com a redução dos coeficientes de variação, esses ainda se mostraram altos, principalmente para o dimetoato, o que compromete a reprodutibilidade do método.

A diferença entre os limites de detecção e quantificação obtidos neste trabalho e os resultados apresentados por outros autores, pode ser devida à utilização de diferentes metodologias e condições operatórias propostas por cada um. Além disso os autores terão utilizado alguma metodologia de extração antes da construção e linearização das curvas de calibração, podendo alcançar concentrações menores, atingindo assim limites de detecção e quantificação também menores. Por outro lado, não é possível fazer uma comparação direta com os demais autores e suas metodologias apresentadas, já que não foi possível realizar o estudo de linearidade na quantificação para todos os 11 pesticidas propostos nesse estudo.

O procedimento proposto nesse estudo mostrou-se fácil e expedito para a identificação de diferentes pesticidas numa mesma amostra de matriz aquosa. Apesar de serem necessários mais estudos, a partir deste trabalho foi possível desenvolver uma metodologia eficiente de extração e quantificação para os pesticidas da mistura M1 em metanol. Sugere-se que se realize um estudo semelhante para os pesticidas presentes na mistura M2.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para trabalhos futuros é indicado o estudo mais aprofundado dos pesticidas glifosato, imidacloprida e MCPA, tendo em vista a necessidade por um processo de derivatização para cada um desses compostos, de modo que eles

possam ser analisados pelo método proposto neste trabalho, e possivelmente possam ser identificados e quantificados numa mesma amostra juntamente com os demais. Além deles, os pesticidas acetocloro, alacloro e metolacloro devem ser estudados de modo a avaliar se o método de SPE proposto também é válido para extração e concentração desses compostos.

Sugere-se também a validação da metodologia proposta (SPE/GC-MS) através da determinação das recuperações do processo de extração, determinação de parâmetros estatísticos das novas curvas de calibração e a posterior determinação dos limites de detecção e quantificação do método, alcançando gamas de concentrações menores após ensaios com padrões submetidos a SPE. Com esses estudos já é possível a aplicação de ensaios com amostras reais de matrizes aquosas para detetar e quantificar estes pesticidas em rios na região de Bragança.

Além disso, os mesmos pesticidas podem ser estudados por outras metodologias, modificando por exemplo, o método de extração, como a microextração em fase sólida (SPME), seguida de análise por GC-MS ou até mesmo por algum tipo de cromatografia líquida. A comparação dos resultados obtidos neste trabalho, com o desenvolvimento de outras metodologias pode ajudar a determinar as melhores condições operatórias que garantam uma melhor identificação e quantificação de cada pesticida, de forma ainda mais otimizada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A; PANDEY, R. S; SHARMA, B. *Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. Journal of Water Resource and Protection, Scientific Research Publishing, Inc.* 2 (5) 432-448, **2010**.

ANTUNES, P. M. F. *Águas residuais domésticas – uma fonte importante na disseminação de poluentes orgânicos emergentes* in: Seminário “Poluentes emergentes e seus impactos em águas e solos. Um desafio do presente. Instituto Superior de Engenharia do Porto, Portugal, 8 de abril de **2013**.

ARIAS, D. G. *Contaminantes emergentes, seus efeitos no meio ambiente e desafios para novos mecanismos de purificação de água*. Campinas: Be_310 Ciências do Ambiente, Brasil. **2013**.

ARMAS, E. D; MONTEIRO, R. T. R; ANTUNES, P. M; SANTOS, M. A. P. F; CAMARGO, P. B; ABAKERLI, R. B. *Diagnóstico espaço temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes*. Química Nova, São Paulo, 30 (5) 1119-1127, outubro, **2007**.

ARMBRUST, K. L; PEELER, H. B. *Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf*. Pest Management Science, 58 702–706, **2002**.

BARBOSA, F. H. F. *Desenvolvimento de método de amostragem de agrotóxicos em águas utilizando nanotubos de carbono e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*. Dissertação de tese de Mestrado - Curso de Química, Icx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2015**.

BARCELO, D; CHIRON, S; ALBA, A. R. F; VALVERDE, A. *Monitoring pesticides and metabolites in surface waters and groundwater in Spain*. In: Herbicide Metabolites in Surface Water and Groundwater. Edited by Meyer, M. T and Thurman, E. M. American Chemical Society, Washington, DC, ACS Symposium Series 630 237-253, **1996**.

BATISTA, S. *Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do Ribatejo Oeste e da Beira Litoral*. Dissertação de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, **2003**.

BATISTA, S; CEREJEIRA, M. J; SILVA, E; VIANA, P; SERÔDIO, L. *Exposição de Águas Subterrâneas a Pesticidas e Nitratos (1996-2000)*. Relatório Final do Projeto Protocolo APA (Ex- DGA) / ISA, SAPI, DPPF, ISA, UTL, Lisboa, **2000**.

BILA, D. M; DEZOTTI, M. *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências*. Química Nova, 30 (3) 651–666, **2007**.

BOLLAG, J. M; LIU, S. Y. *Biological transformations processes of pesticides*. In: CHENG, H.H., ed. *Pesticides in the soil environment: process, impacts and modelling*. Madison, Soil Sci. Soc. Am. 169-212, **1990**.

CAI, K; ZHANG, Y. P; BHADURY, P.S; LIU, B; XU, W; HU, D. Y. *Derivatization and Determination of MCPA in Soil by GC. Chromatographia.* v.72, n.9, p.933-939, **2010**. DOI: 10.1365/s10337-010-1737-0.

CALDAS, S. S. *Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea.* Tese de Doutorado - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, **2009**.

CALDAS, S. S; GONÇALVES, F. F; PRIMEL, E. G; PRESTES, O. D; MARTINS, M. M; ZANELLA, R. *Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas.* Quím. Nova, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, Sept. **2011**. Acesso em 18 maio, 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>.

CARLOS, E. A; NEVES, A. A; REIS, C; QUEIROZ, M. E. L. R. *Determinação simultânea de trialomitanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa.* Química Nova, São Paulo, Brasil, 34 (2) 272-278, **2011**.

CARVALHO, L. B. *Herbicidas*, 1ª Edição, Lages, Brasil, cap. 4, p.72, **2013**.

CASSOLI, D. R; FERRACINI, V. L; QUEIROZ, S. C. N; VILHENA, E; NARDOCCI, A. C. *Desenvolvimento e validação de um método multiresíduo para determinação de pesticidas em água utilizando extração em fase sólida (spe) e gc-ms/ms.* VIII IBEROLAB. 2013–2016, **2015**.

CEDERGREEN, N. *Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology.* PLoS One. 9 (5), **2014**.

CEREJEIRA, M. J. *Estudo da distribuição e destino final dos pesticidas no ambiente numa abordagem integrada. Caso da atrazina na zona agrária da Chamusca.* Tese de Doutorado. Lisboa: ISA/UTL, Portugal, **1993**.

CEREJEIRA, M. J; VIANA, P; BATISTA, S; PEREIRA, T; SILVA, E; VALÉRIO, M. J; SILVA, A; FERREIRA, M; FERNANDES, A. M. S. *Pesticides in Portuguese surface and ground waters.* *Water Research*, 37 1055-1063, **2003**.

COELHO, E. R. C; LEAL, W. P; SOUZA, K. B; ROZARIO, A; ANTUNES, P. W. P. *Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T para monitoramento em água de abastecimento público.* Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, 23 (6) 1043-1051, **2018**.

COSTA, R. V; SILVA, D. D; COTA, L. V. *Efeito protetor de fungicidas no controle da ferrugem Polissora (Puccinia polysora) do milho.* Sete Lagoas. Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, p.81, Brasil, **2013**.

DINIZ, M. E. R. *Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas.* Monografia

(Especialização) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2011**.

EPA - *Environmental Protection Agency* (1998). *Alachlor*.

FERREIRA, C. *Caracterização por GC-MS de Glicídios Derivatização Assistida por Microondas*. 2011. p.95. Dissertação – Mestrado em química forense, Universidade de Coimbra, Portugal, **2011**.

FERREIRA, J. P. L; LEITÃO, T. E; OLIVEIRA, M. M; ROCHA, J. S; BARBOSA, A. E. *Proteção das Origens Superficiais E Subterrâneas nos Sistemas de Abastecimento de Água*. Série Guias Técnicos p.11. Europress, Lda. Lisboa: IRAR/LNEC, **2009**.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A; GOMES, M. A. F; FERREIRA, C. J. A. (2002). *Monitoramento e avaliação de risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37 659-667, **2002**.

FOWLIS I. A. *Gas Chromatography*. 2nd Ed. *Universal Greenwich*, UK. p.258. **1995**.

GAVRILESCU, M. *Fate of pesticides in the environment and its bioremediation*. *Engineering in Life Sciences*, 5 (6) 497-526, **2005**.

GIKAS, G. D; VILLANUEVA, M. P; TSIORAS, M; ALEXOUDIS, C; ROJAS, G. P; MORA, M. M; FALLAS, V. L; RODRIGUEZ, C. E. R; VRYZAS, Z; TSIHRINTZIS, V. A. *Low-cost approaches for the removal of terbuthylazine from agricultural wastewater: Constructed wetlands and biopurification system*. *Chemical Engineering Journal*, 335 647-656, **2018**.

GHISELLI, G; JARDIM, W. F. *Interferentes endócrinos no ambiente*. *Química Nova*, 30 (3) 695–706, **2007**.

GONÇALVES, C; ALPENDURADA, M. *Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities*. *Journal of Chromatography A*, 1026 239-250, **2004**.

GONÇALVES, C. M. O. *Desenvolvimento de métodos analíticos avançados para a avaliação da contaminação com pesticidas na área de proteção do aquífero livre entre Esposende e vila do conde*. 2006. p.338 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Porto, Portugal, **2006**.

GONZÁLEZ, N. R; GONZÁLEZ, E. B; CASTRO, M. J. G; LORENZO, S. M. *Application of a developed method for the extraction of triazines in surface waters and storage prior to analysis to seawaters of galicia (Northwest Spain)*. *The Scientific World Journal*, 19–23, **2013**.

GRANDE, M. D. *Cromatografia Gasosa Princípios Básicos*. Curso ministrado na Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE). Pernambuco: Sinc do Brasil, maio, **2012**.

GROB R. L. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 3ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. p.867. **1995**.

GUO, Q. M; MALEK, R. L; KIM, S. CHIAO, C; HE, M; RUFFY, M; SANKA, K; LEE, N. H; DANG, C. V; LIU, E. T. *Identification of c-mic responsive genes using rat cDNA microarray*. *Cancer Research*, 60 5922-5928, **2000**.

HALLBERG, G. R. *Pesticide Pollution of Groundwater in the Humid United States. Agriculture, Ecosystem and Environment*, 26 299-367, **1989**.

INMETRO. *Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012)*. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, p.94. **2012**.

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*. (Acesso em: 06 de agosto **2019**).

JARDIM, I. C. S. F. *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. *Scientia Chromatographica*, Campinas, 2 (1) 13-25, **2010**.

JÖNSSON, J; CAMM, R; HALL, T. *Removal and degradation of Glyphosate in water treatment: A review*. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA* 62 (7) 395-408, **2013**.

JOSÉ, V; FERREIRA, S. D. *Poluentes emergentes – uma perspectiva institucional*. In: *poluentes emergentes e seus impactos em águas e solos*. Um desafio do presente. 2013, Porto. *Poluentes emergentes e seus impactos em águas e solos*. Um desafio do presente. Porto, Portugal. Requite, 1-30, **2013**.

KALIYAN, A; TAMILSELVAN, C. *Analytical method development of the combination pesticide Azoxystrobin and Epoxiconazole by R- HPLC*. *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology*, 4 (3) 9, **2018**.

KIVRAK, Ş; GÖKTÜRK, T. *Pesticide Analysis and Method Validation with GC/MSD Instrument in Environmental Water Samples*. *Nevsehir Journal of Science and Technology*, 6 407-414, **2017**.

KOLE, R. K; BANERJEE, H; BHATTACHARYYA, A. *Monitoring of market fish samples for Endosulfan and Hexachlorocyclohexane residues in and around Calcutta*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 67 (4) 554-559, **2001**.

KUMAR, C. P; GURUPADAYYA, B. M. *Analytical Method Development and Validation of Dimethoate Pesticide using HPLC Method*. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2 (2) 2–4, **2013**.

LAVOR, M. B; PINHEIRO, A. I; OLIVEIRA, R. T; OLIVEIRA, S. J; FERREIRA, J. L; CASTRO, R. C; MILHOME, M. A. L. *Eficiência da extração em fase sólida usando c18 e florisil na recuperação de agrotóxicos de diferentes classes em matrizes aquosas.* in: congresso brasileiro de química, Goiânia: CQB, Brasil 55, **2015**.

LAZAROV, B; MANOVA, Y; DIMITROVA, A. *Priority substances in surface and ground water samples by liquid chromatography - mass. Environmental security assessment and management of obsolete pesticides in southeast Europe.* Springer Ed., Dordrecht **2013**.

LENGYEL, Z; FOLDENYI, R. *Acetochlor as a soil pollutant. Environmental Science and Pollution Research*, 10 (1) 13–18, **2003**.

LI, Y; DONG, F; LIU, X; XU, J; LI, J; KONG, Z; CHEN, X; ZHENG, Y. *Enantioselective determination of triazole fungicide tebuconazole in vegetables, fruits, soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science*, 35 206-215, **2012**.

LIU, R; ZHOU, J. L; WILDING, A. *Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A*, 1022 179-189, **2004**.

LIU, S. Y; ZHENG, Z; ZHANG, R. BOLLAG, J. M. *Sorption and metabolism of metolachlor by a bacterial community. Applied Environmental Microbiology*, 55 (3) 733–740, **1989**.

LOVECKA, P; JANU, P; UHLIK, O; MACKOVA, M; DEMNEROVA, K. *Environmental impact of organochlorinated pesticides. Environmental Engineering Management Journal*, 11 S103, **2012**.

MACHEREY-NAGEL (Germany) (org.). *Solid phase extraction (SPE)*. **2019**.

MARCELINO, R. B. P. *Aplicação de processos oxidativos avançados para o tratamento de efluente da produção de antibióticos.* 2014. p.148. Dissertação (Mestrado) - Curso de Meio ambiente, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2014**.

MARCÍLIO, K. M; FURLANI, R. P. Z; TFOUNI, S A. V. *Resíduos de pesticidas sistêmicos em caldos de cana comercializados na cidade de campinas.* 2º Congresso interinstitucional de iniciação científica. CIIC 2008. SP, Brasil, 1–6, **2008**.

MARTINS, N. M. C. *Análise Vestigial de Pesticidas em Azeite: Aplicação de Polímeros Molecularmente Impressos.* Tese de Doutorado - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade de Évora, Évora, Portugal, **2015**.

MENDONÇA, C. F. R. *Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3.* Dissertação de tese de Mestrado - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, Brasil, **2018**.

MILLER, J. N; MILLER, J. C; MILLER, R. D. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education Limited, 7th Edition, chapter 5, 312, **2018**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Congresso. Senado. Constituição. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. *Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade: Legislação sanitária federal*. Distrito federal. **2011**.

MINK, P. J; MANDEL, J. S; SWENOR, B. K; LUNDIN, J. I. *Epidemiologic studies of glyphosate and cancer. A review. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63 440-452, **2012**.

MONTAGNER, C. C; VIDALA, C; ACAYABA, R. D. *Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspetos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios*. Química Nova, 40 (9) 1094-1110, **2017**.

MOREIRA, D. S. *Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de belo horizonte*. 2008. p.124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, **2008**.

Morrison, E. R. "Can We Re-use "Single-Use" Solid Phase Extraction Cartridges?" *Graduate Theses and Dissertations*. 1-40, **2017**. Disponível em: <http://scholarcommons.usf.edu/etd/7065>

MSB - MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRO. *Descarte de Medicamentos*. **2013**
Disponível em
<<http://pisast.saude.gov.br:8080/descartemedicamentos/apresentacao-1>>

NEMOTO, A. C. M. *Monitoring of anti-inflammatory drugs in hydric media from Bragança district*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, **2019**.

NIOSH - NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. *Pocket Guide to Chemical Hazards*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention. Cincinnati, OH, USA, **1997**.

NOORI, J. S; DIMAKI, M; MORTENSEN, J; SVENDSEN, W. E. *Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment*. *Sensors*, 18 (9) 1-9, **2018**. doi:10.3390/s18092961

ÖIE. L; HERSOUG, L.G; MADSEN, JÖ. *Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma, Environmental Health Perspective*, 105 972-978, **1997**.

OLIVEIRA, A. T. L. B. *Extração e quantificação de fármacos em matrizes aquosas*. 2019. p.127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, **2019**.

OLIVEIRA, E. C. *Aplicação da extração em fase sólida na pré concentração de compostos fenólicos clorados em efluentes de branqueamento de celulose*. 1999. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia Química, Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, **1999**.

OLIVO, V. E; TANSINI, A; CARASEK, F; CORDENUZZI, D; FERNANDES, S; FIORI, M. A; FRAGOSO, A; MAGRO, J. D. *Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization*. *Revista Ambiente Água*, Taubaté, 10 (2) 286-297, **2015**.

PANG, G. F; FAN, C.L; CHANG, Q. Y; YANG, F; CAO, Y. Z; PANG, G. F; FAN, C. L; CHANG, Q. Y; YANG, F; CAO, Y.Z. *Simultaneous Determination of 653 Pesticide Residues in Teas by Solid Phase Extraction (SPE) with Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS)*. *Analysis of Pesticide in Tea*. China: Elsevier, 1-950 **2018**.

PASSEPORT, E; BENOIT, P; BERGHEAUD, V; COQUET, Y; TOURNEBIZE, J. *Epoxiconazole degradation from artificial wetland and forest buffer substrates under flooded conditions*. *Chemical Engineering Journal*, 173 (3) 760–765, **2011**.

PEDROSO, R. C. R. *Desenvolvimento de Métodos de Análise por Clae-Uv Sulfametoxazol e Trimetoprima Utilizando Sistemas de Pré-Concentração*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2007**.

Pesticidas a pesquisar em águas destinadas ao consumo humano. Direção geral de alimentação e veterinária. Ao abrigo do Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, **2018**.

PIERZYNSKI, G. M; SIMS, J. T; VANCE, G. F. *Soils and environmental quality*. Lewis Publishers. Boca Raton, CRC Press. p313, **1994**.

PIGNATI, W. A; LIMA, F. A. N. S; LARA, S. S; CORREA, M. L. M; BARBOSA, J. R; LEÃO, L. H. C; PIGNATTI, M. G. *Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde*. *Ciência. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, 22 (10) 3281-3293, **2017**.

POÇAS, C. D. *Utilização da tecnologia de wetlands para tratamento terciário: Controle de nutrientes*. 2015. Tese de Dissertação de Mestrado - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2015**.

PORTAL SANEAMENTO BÁSICO. Brasil. *O que são Contaminantes Emergentes?* **2018**.

PPDB - *Pesticides Properties DataBase*, University of Hertfordshire, UK. (Acesso em: 06 de agosto **2019**).

PUBCHEM – *Open database at the National Institutes of Health (NIH), USA.* (Acesso em: 06 de agosto **2019**).

QUEIROZ, F. B. *Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.* Tese de Mestrado em Engenharia Ambiental. PROÁGUA. Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil, **2011**.

READMAN, J. W; KWONG, L. L. W; MEE, L. D; BARTOCCI, J; NILVE, G; SOLANO, J. A. R; FARIAS, F. G. *Persistent organophosphorus pesticides in tropical marine environments. Marine Pollution Bulletin*, 24 398-402, **1992**.

RIBEIRO, A. C; DORES, E. F. G. C; AMORIM, R. S. S; LOURENCETTI, C. *Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida.* Química Nova, São Paulo, 36 (2) 284-290, **2013**.

SANKHLA, M. S; KUMARI, M; SHARMA, K; KUSHWAH, R. S; KUMAR, R. *Water Contamination through Pesticide & Their Toxic Effect on Human Health. International Journal For Research In Applied Science & Engineering Technology (ijraset).* India, 6 (1) 967–970, **2018**.

SAMNANI, P; VISHWAKARMA, K. PANDEY, Y. S. *Simple and Sensitive Method for Determination of Imidacloprid Residue in Soil and Water by HPLC. Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86 (5) 554–558, **2011**.

SHERWANI, S. S; ARIF, I. A; KHAN, H. A. *Modes of Action of Different Classes of Herbicides*, 166-186, **2015**.

SILVA, C. G. A; COLLINS, C. *Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes.* Química Nova, 34 (4) 665-676, **2011**.

SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. *Agrotóxicos e ambiente.* Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1, p.400, **2004**.

SILVA, I. G. (2016a). *Validação da metodologia de análise de contaminantes emergentes em águas naturais e análise por cromatografia a gás com espectrometria de massas (cg-em).* Monografia (Especialização) - Curso de Química Licenciatura, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, Brasil, **2016**.

SILVA, M. A. *Otimização de amostradores passivos para a determinação de pesticidas em água utilizando SPE e GC-MS.* Tese de Doutorado - Curso de Química Analítica Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, **2012**.

SILVA, R. F; SILVA, G. L; SILVA, P. T; SILVA, V. L. (2016b). *Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto.* Revista Virtual de Química, Petrolina, 8 (3) 702–715, junho **2016**.

SKLIVAGOU, E; PAPADOPOULOU, K; BAKOULIS, A. *Determination of acid herbicides in water by LC/ MS/MS. Desalination and Water Treatment*, 13 320–327, **2010**.

SKOOG, D.; HOLLER, F., CROUCH, J.R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th Ed. Chapter 27, **2007**.

SODRE, F. F; MONTAGNER, C. C; LOCATELLI, M. A. F; JARDIM, W. F. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil)*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 2 (2) 187-196, **2007**.

STAMPER, D. M; TUOVINEN, O. H. *Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor and propachlor. Critical Reviews in Microbiology*, 24 1–22, **1998**.

STRICKLAND, T.C; POTTER, T. L; JOO, H. *Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. Pest Management Science*, 60 (7) 703-709, **2004**.

TOMASINI, D. *Otimização e validação de método de extração (Quechers) e de análise (LC-DAD-DAD e LC-APCI-MS/MS) para determinação simultânea de agrotóxicos e hidroximetilfurfural em mel*. Tese de Doutorado - Curso de Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, **2011**.

TROCEWICZ, J. *Determination of Herbicides in Surface Water by Means of a Supported Liquid Membrane Technique and High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography A*, 725 (1) 121-1127, **1996**.

US EPA, U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Interim registration eligibility decision for dimethoate. Case N° 0088*. Junho, **2006**.

VICENTE, G. H. L. *Desenvolvimentos e Validação de um Método Analítico para Determinação dos Fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em Águas Superficiais da Cidade de São Carlos-SP*. Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos, Brasil. Dissertação de Mestrado, **2001**.

WEED, D. A. J; KANWAR, R. S.; STOLTENBERG, D. E.; PFEIFFER, R. L. *Dissipation and Distribution of Herbicides in the Soil Profile. Journal of Environmental Quality*, 24 (1) 68–79, **1995**.

WEIPING, L; WEI, Z; YUN, M; KEVIN K. L. *Sorption and Degradation of Imidacloprid in Soil and Water, Journal of Environmental, Science and Health, Part B*, 41 (5) 623-634, **2007**. Doi: 10.1080/03601230600701775

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Terbutylazine (TBA) in Drinking-water*. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, **2003**.

8. ANEXOS

ANEXO A – Soluções mãe preparadas para cada pesticida e para o padrão interno.

Tabela A.1 - Concentração das soluções mãe dos pesticidas e do padrão interno preparados em 5 mL de metanol.

Pesticida	Massa (mg)	Concentração (ppm)
Acetocloro	5,0	1000
Alacloro	5,0	1000
Dimetoato	5,3	1060
Epoxiconazol	5,1	1020
Glifosato	5,0	1000
Heptacloro	5,1	1020
Imidacloprida	5,1	1020
MCPA	4,9	980
Metolacloro	5,3	1060
Tebuconazol	5,3	1060
Terbutilazina	5,2	1040
Trifenilmetano	5,1	1020

ANEXO B - Espetros de massa referentes ao acetocloro, alacloro, dimetoato, heptacloro, metolacoloro, terbutilazina pelo Método 1 em metanol.

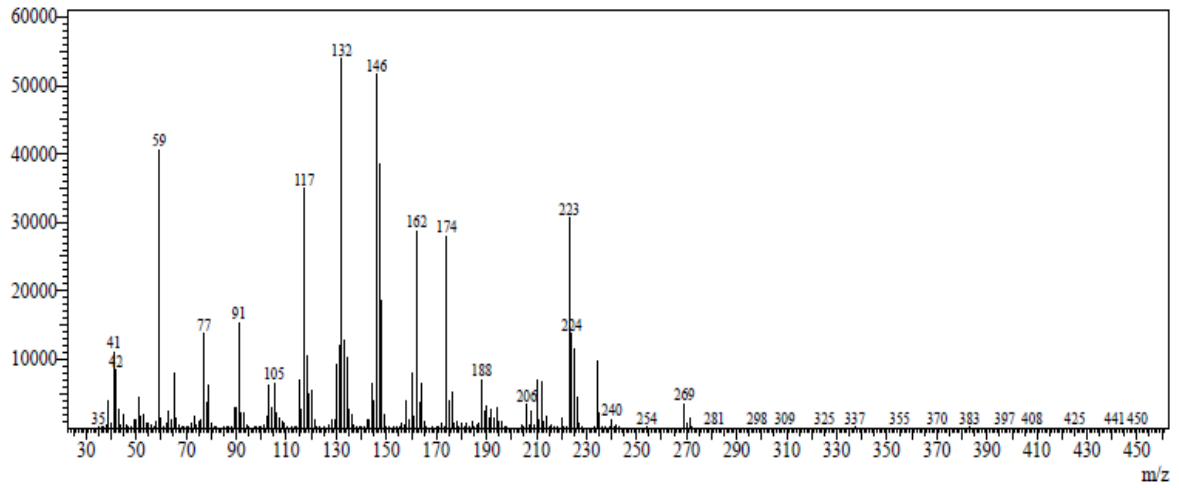


Figura B.1 – Espectro de massas acetocloro.

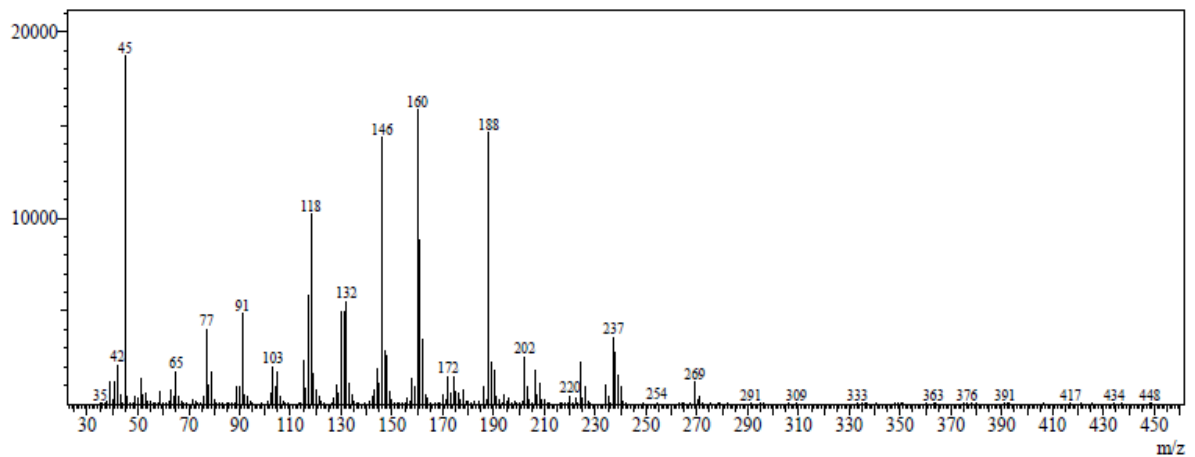


Figura B.2 – Espectro de massas alacloro.

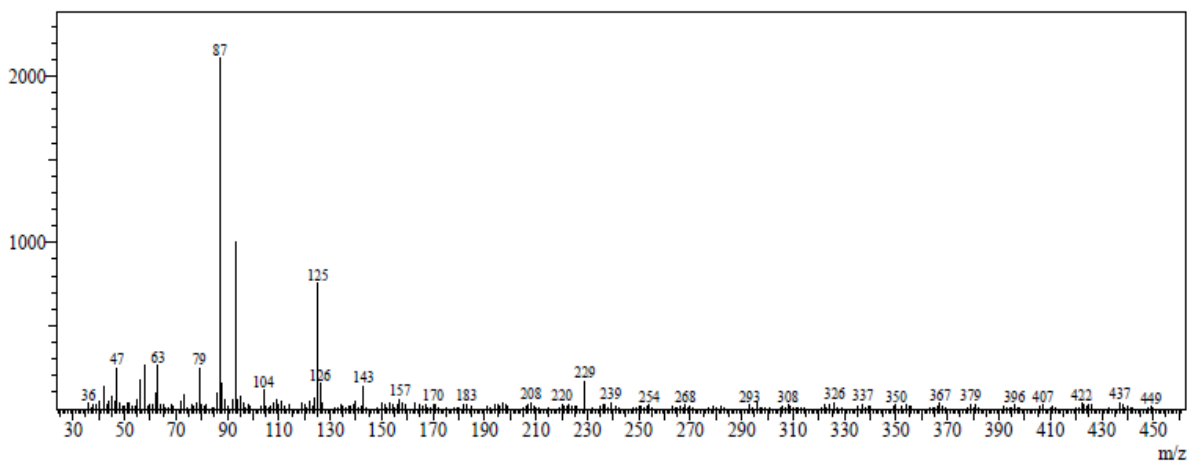


Figura B.3 – Espectro de massas dimetoato.

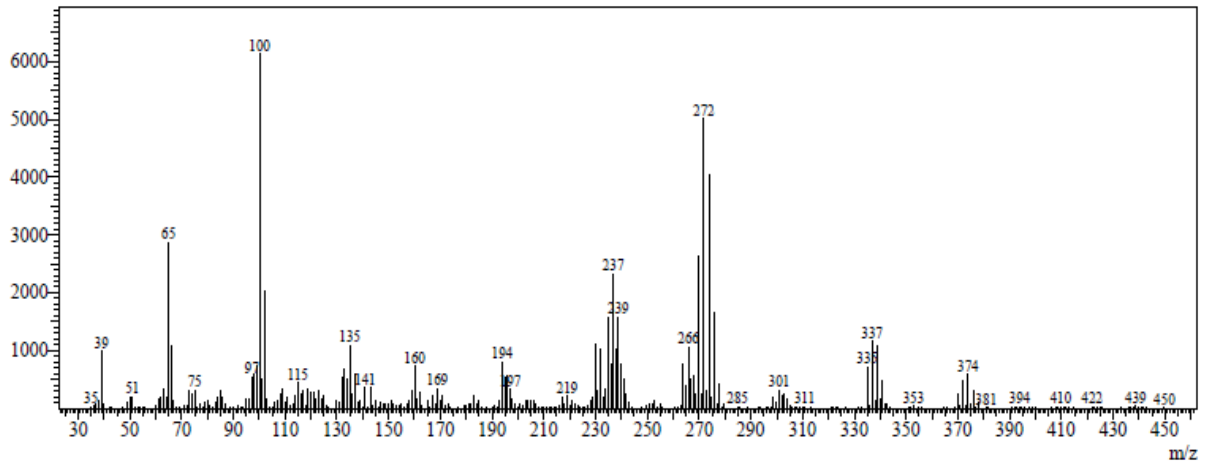


Figura B.4 – Espectro de massas heptacloro.

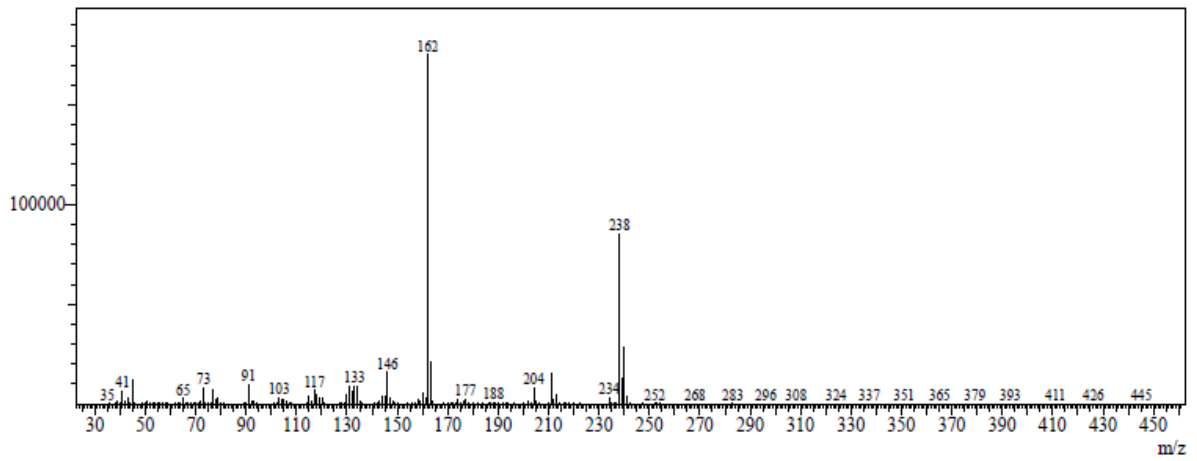


Figura B.5 – Espectro de massas metolachloro.

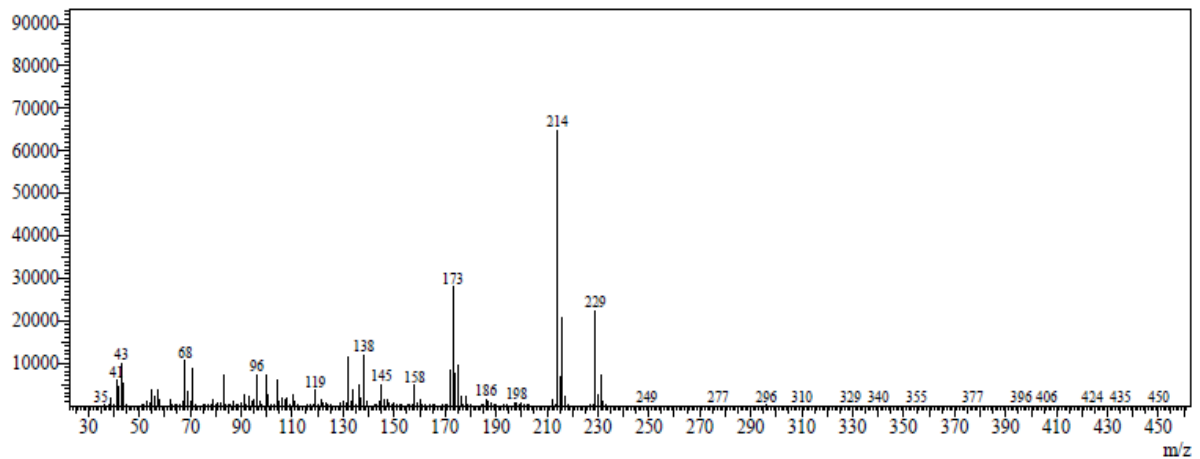


Figura B.6 – Espectro de massas terbutilazina.

ANEXO C - Espectros de massa referentes à identificação do tebuconazol e do epoxiconazol pelo Método 2 em hexano.

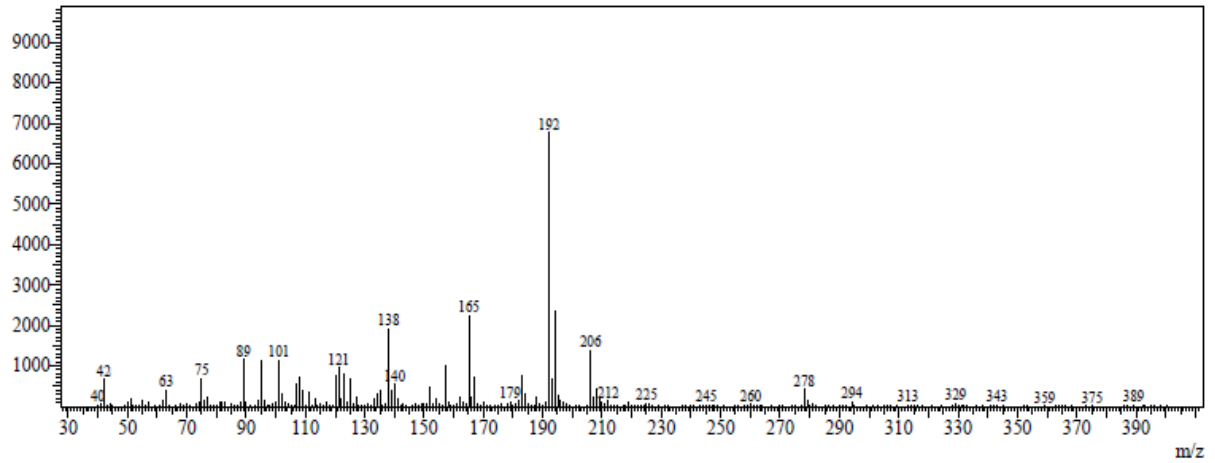


Figura C.1 – Espectro de massas epoxiconazol.

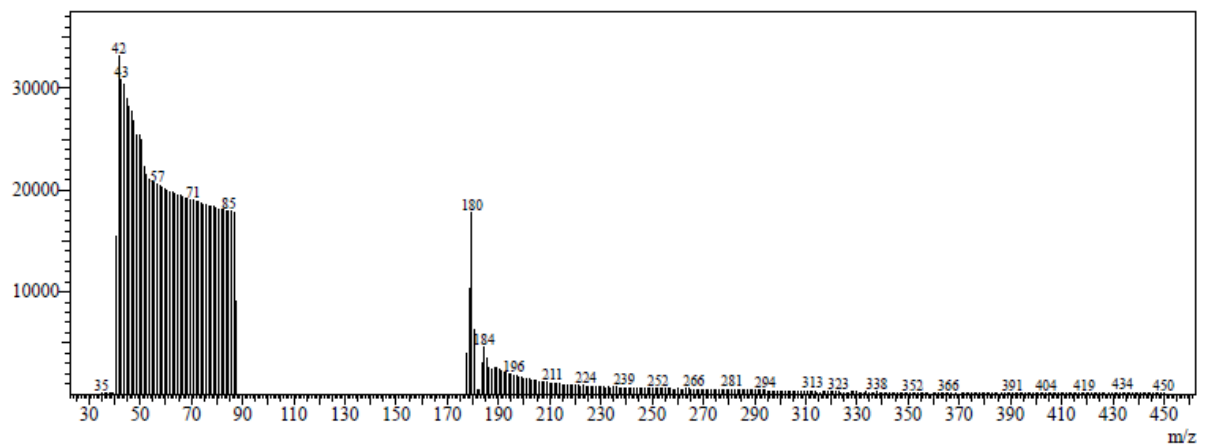


Figura C.2 – Espectro de massas tebuconazol.

ANEXO D – Espectro de massas do padrão interno (Trifenilmetano) pelo Método 4 em metanol.

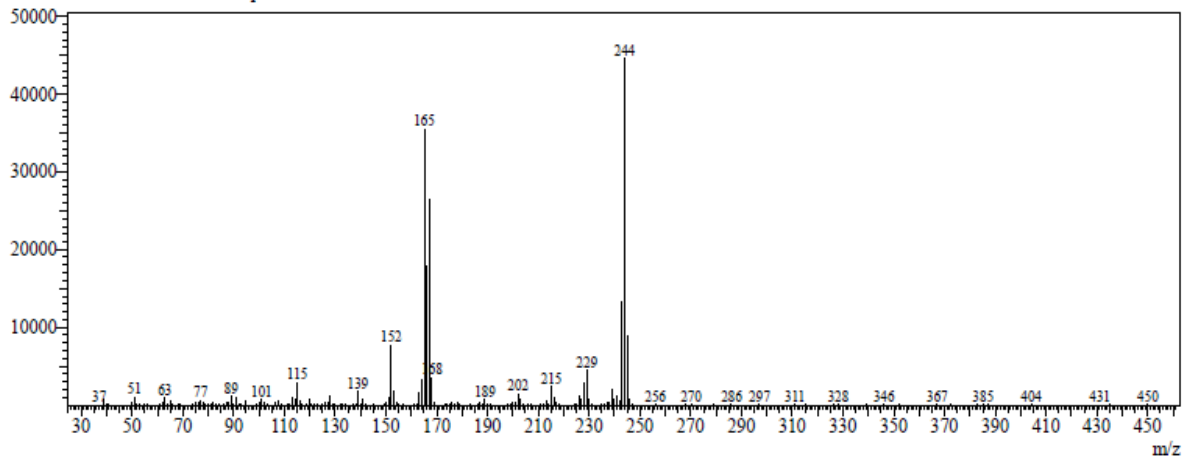


Figura D.1 – Espectro de massas trifenilmetano.

ANEXO E – Cálculos realizados para a preparação das gamas de concentrações dos 5 pesticidas e do padrão interno.

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de padrão interno

Tabela E.1 - Volume utilizado de PI para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 20 mL.

C. Solução (ppm)	V. Padrão interno (1020 ppm) mL
100	1,96

Tabela E.2 - Volume utilizado de PI para preparar uma solução de 10 ppm em um balão volumétrico de 20 mL.

C. Solução (ppm)	V. Padrão interno (100 ppm) mL
10	2,0

Tabela E.3 - Volume utilizado de PI para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 20 mL.

C. Solução (ppm)	V. Padrão interno (10 ppm) mL
1	2,0

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de dimetoato

Tabela E.10 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1060 ppm) mL
100	0,47

Tabela E.11 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 10 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) mL
10	0,5

Tabela E.12 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) mL
1	0,5

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de epoxiconazol

Tabela E.13 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1020 ppm) mL
100	0,49

Tabela E.14 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) mL
10	0,5

Tabela E.15 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) mL
1	0,5

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de heptacloro

Tabela E.16 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1020 ppm) mL
100	0,49

Tabela E.17 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 10 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) mL
10	0,5

Tabela E.18 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) mL
1	0,5

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de tebuconazol

Tabela E.22 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1060 ppm) mL
100	0,47

Tabela E.23 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 10 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) mL
10	0,5

Tabela E.24 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) mL
1	0,5

Cálculos realizados para a preparação das diferentes concentrações de terbutilazina

Tabela E.25 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1040 ppm) mL
100	0,48

Tabela E.26 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 10 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) mL
10	0,5

Tabela E.27 - Volume utilizado de Pesticida para preparar uma solução de 1 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) mL
1	0,5

ANEXO F – Cálculos realizados para a preparação das diferentes gamas de concentração para as misturas de pesticidas M1 e M3.

Para preparação da gama de 10 – 100 ppm:

Tabela F.1 - Volumes utilizados de pesticida e PI para a gama de 10 – 100 ppm.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1000 ppm) µL	V. Padrão interno (1000 ppm) µL
100	500	500
80	400	500
60	300	500
40	200	500
20	100	500
10	50	500

Para preparação da gama de 1 – 10 ppm:

Tabela F.2 - Volumes utilizados de pesticida e PI para a gama de 1 – 10 ppm.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (100 ppm) µL	V. Padrão interno (100 ppm) µL
10	500	500
8	400	500
6	300	500
4	200	500
2	100	500
1	50	500

Para preparação da gama de 0.1 – 1 ppm:

Tabela F.3 - Volumes utilizados de pesticida e PI para a gama de 0.1 – 1 ppm.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (10 ppm) µL	V. Padrão interno (10 ppm) µL
1	500	500
0,8	400	500
0,6	300	500
0,4	200	500
0,2	100	500
0,1	50	500

Para preparação da gama de 0.01 – 0.1 ppm:

Tabela F.4 - Volumes utilizados de pesticida e PI para a gama de 0.01 – 0.1 ppm.

C. Solução (ppm)	V. Pesticida (1 ppm) µL	V. Padrão interno (1 ppm) µL
0,1	500	500
0,08	400	500
0,06	300	500
0,04	200	500
0,02	100	500
0,01	50	500

ANEXO G – Dados e curvas de calibração obtidas para os pesticidas individuais da mistura M1, com e sem o método do padrão interno.

Tabela G.1 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo do dimetoato por GC-MS sem a extração por SPE e sem o método do padrão interno.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Área (TIC)
6,00	2135
8,00	11200
10,0	56243
20,0	201446
40,0	1876456
60,0	3552127
80,0	4468421
100,0	9101016

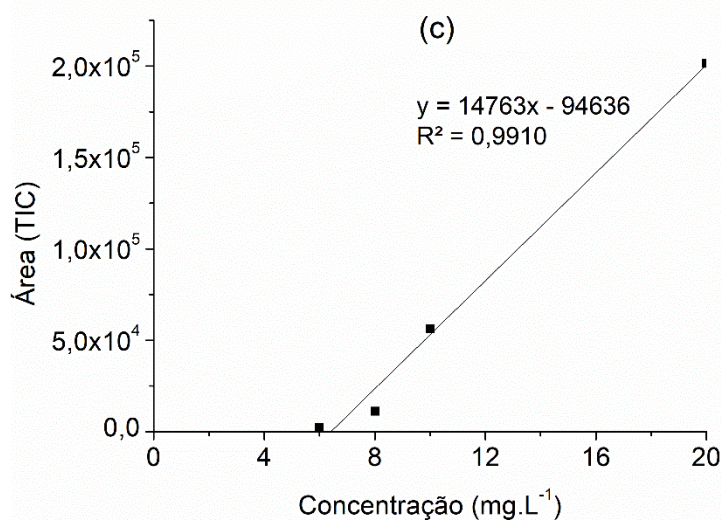
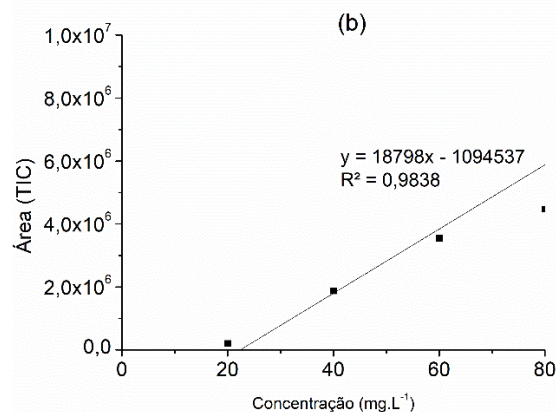
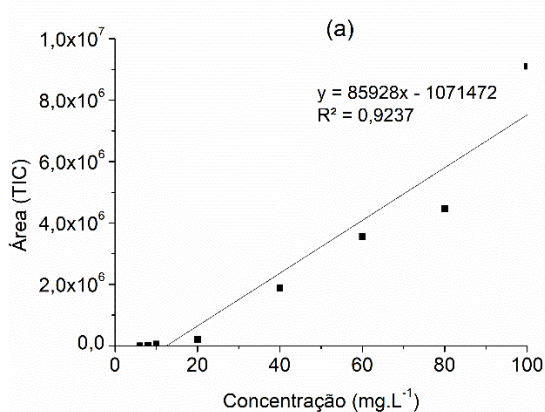


Figura G.1 – Curva de calibração para o dimetoato nas gamas de concentração (a) 6-100 ppm, (b) 20-80 ppm e (c) 6-20 ppm.

Tabela G.2 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo da terbutilazina por GC-MS sem a extração por SPE e sem o método do padrão interno.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Área (TIC)
0,20	893
0,40	4246
0,60	14305
0,80	25325
1,00	35467
2,00	91598
4,00	299466
6,00	371416
8,00	701455
10,0	768639
20,0	1766663
40,0	6931480
60,0	10352438
80,0	11231749
100,0	15409498

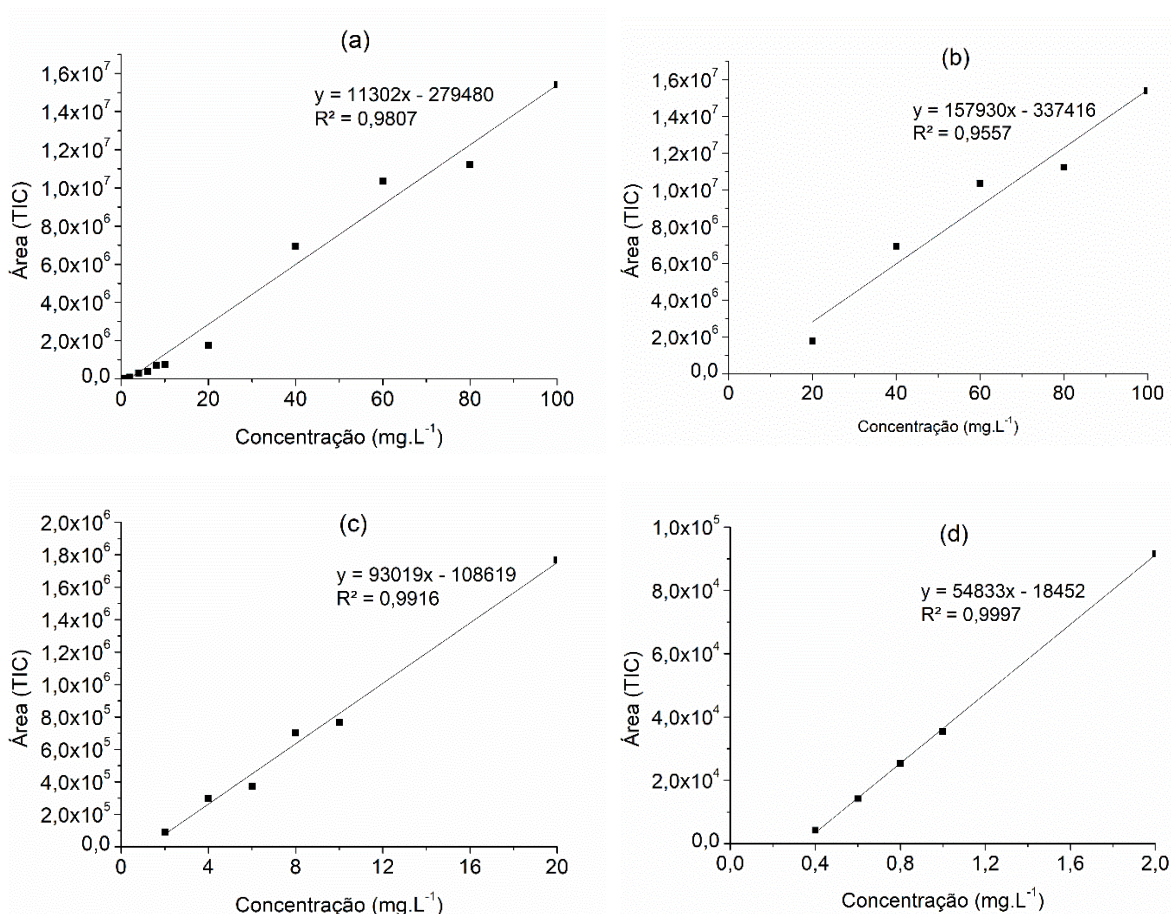


Figura G.2 - Curva de calibração para a terbutilazina nas gamas de concentração (a) 0,2-100 ppm, (b) 20-100 ppm, (c) 2-20 ppm e (d) 0,4 – 2 ppm.

Tabela G.3 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo do heptacloro por GC-MS sem a extração por SPE e sem o método do padrão interno.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Área (TIC)
0,01	667
0,02	614
0,04	621
0,06	793
0,08	949
0,1	998
0,2	3339
0,40	5303
0,60	10535
0,80	13957
1,00	14658
2,00	35728
4,00	86358
6,00	115990
8,00	158324
10,00	236251
20,00	543617
40,00	2088564
60,00	3116894
80,00	3937522
100,00	5397466

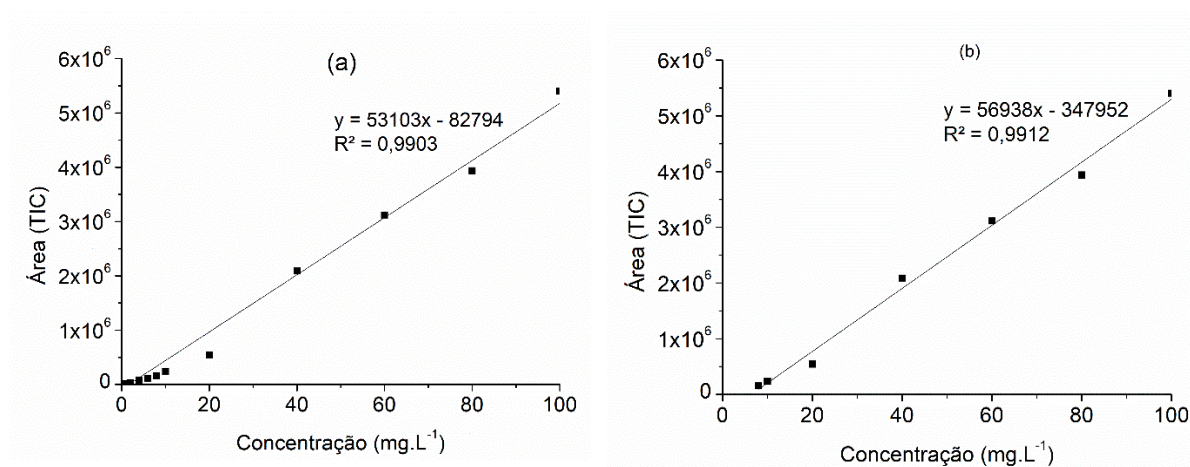


Figura G.3 - Curva de calibração para o heptacloro nas gamas de concentração (a) 0,01-100 ppm, (b) 8-100 ppm, e (c) 0,01-8 ppm.

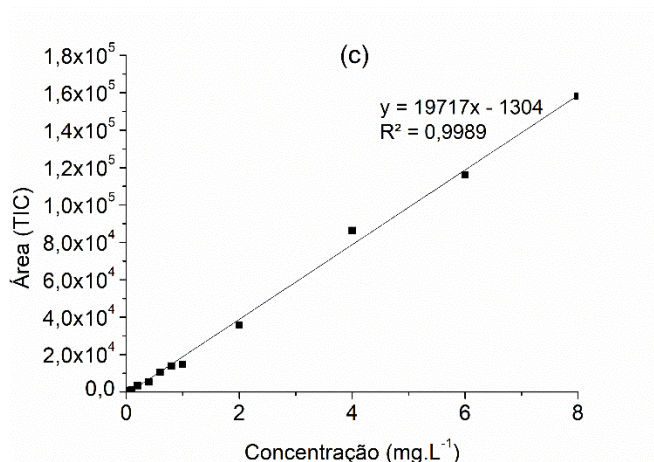


Figura G.3 (Continuação) - Curva de calibração para o heptacloro nas gamas de concentração (a) 0,01-100 ppm, (b) 8-100 ppm, e (c) 0,01-8 ppm.

Tabela G.4 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo do dimetoato por GC-MS sem a extração por SPE e com o método do padrão interno.

Concentração Pesticida (mg.L ⁻¹)	Área média Pesticida/Área média PI (TIC)
10,0	0,0024
20,0	0,0119
40,0	0,0727
60,0	0,1303
80,0	0,2416
100,0	0,4604

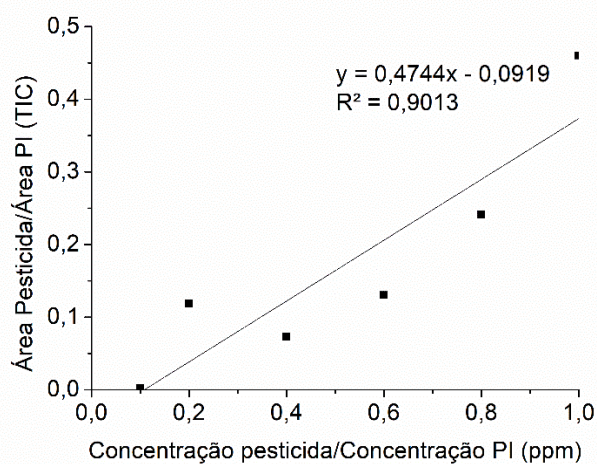


Figura G.4 - Curva de calibração para o dimetoato na gama de concentração de 10-100 ppm.

Tabela G.5 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo da terbutilazina por GC-MS sem a extração por SPE e com o método do padrão interno.

Concentração Pesticida (mg.L ⁻¹)	Área média Pesticida/Área média PI (TIC)
0,20	0,0046
0,40	0,0261
0,60	0,0768
0,80	0,1253
1,00	0,0153
2,00	0,0465
4,00	0,1306
6,00	0,2102
8,00	0,3116
10,0	0,0327
20,0	0,1043
40,0	0,2684
60,0	0,3797
80,0	0,6073
100,0	0,7796

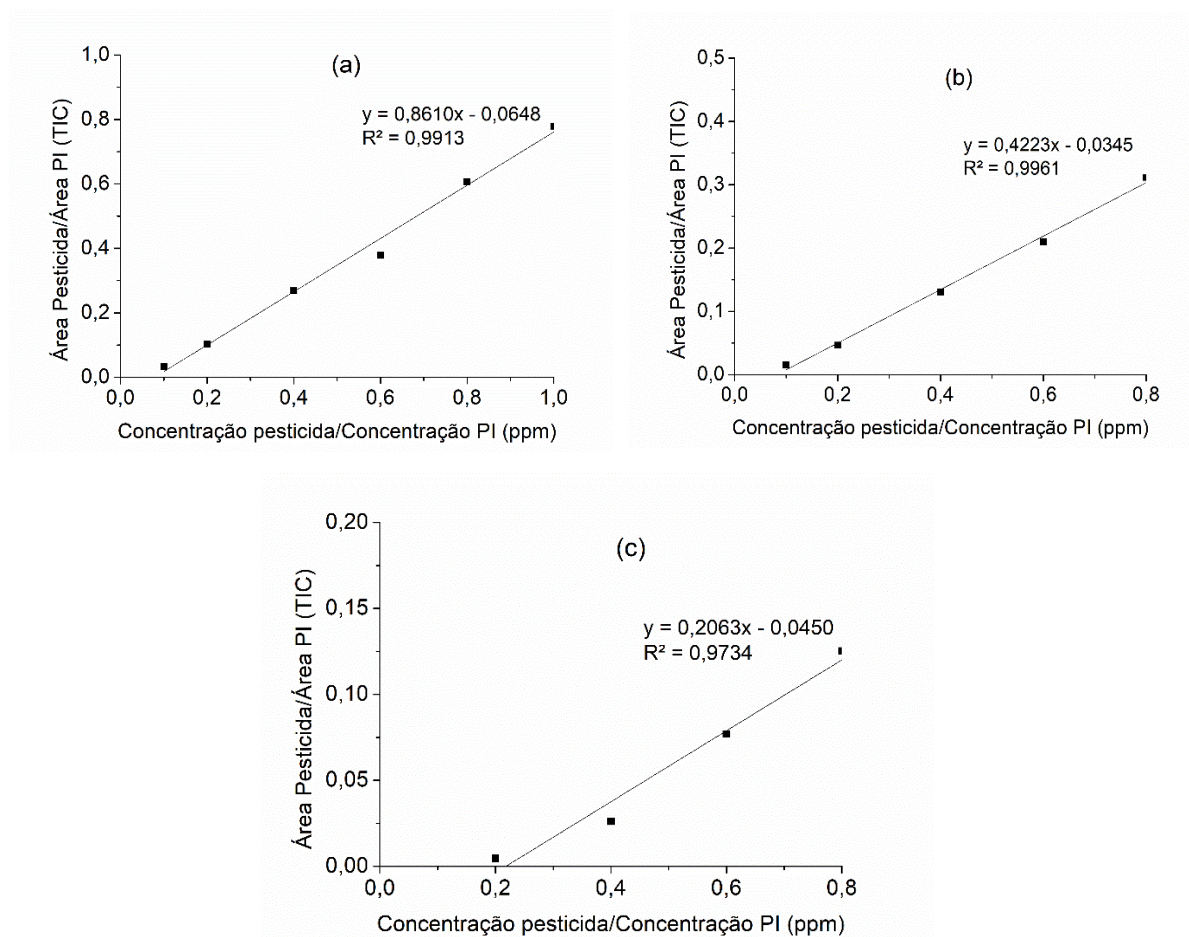


Figura G.5 - Curva de calibração para a terbutilazina nas gamas de concentração (a) 10-100 ppm, (b) 1-8 ppm, e (c) 0,2-0,8 ppm.

Tabela G.6 – Concentrações e áreas obtidas para o estudo do heptacloro por GC-MS sem a extração por SPE e com o método do padrão interno.

Concentração Pesticida (mg.L ⁻¹)	Área média Pesticida/Área média PI (TIC)
0,02	614
0,04	621
0,06	793
0,08	949
0,1	998
0,2	3339
0,40	5303
0,60	10535
0,80	13957
1,00	14658
2,00	35728
4,00	86358
6,00	115990
8,00	158324
10,00	236251
20,00	543617
40,00	2088564
60,00	3116894
80,00	3937522
100,00	5397466

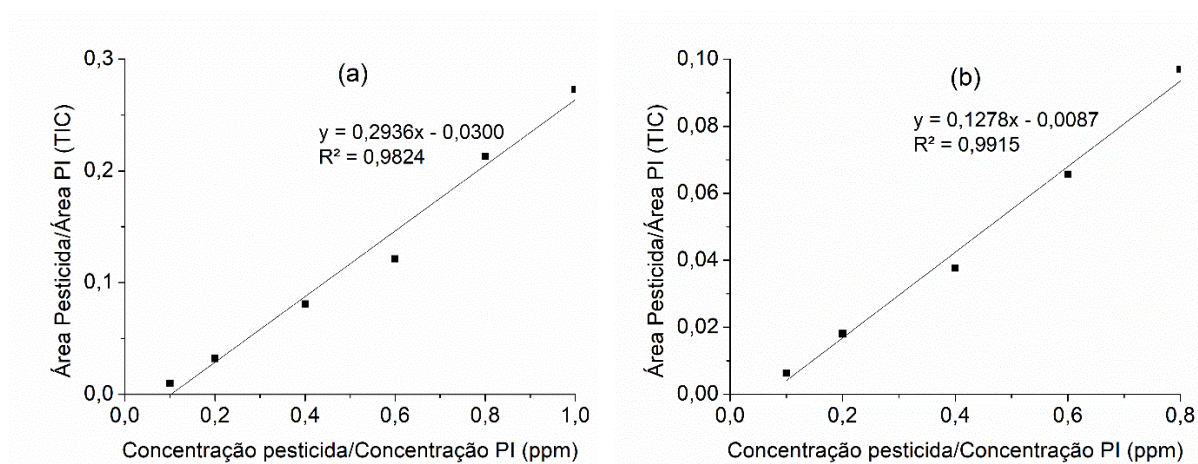


Figura G.6 - Curva de calibração para o heptacloro nas gamas de concentração (a) 10-100 ppm, (b) 1-8 ppm, (c) 0,1-0,8 ppm e (d) 0,02-0,08

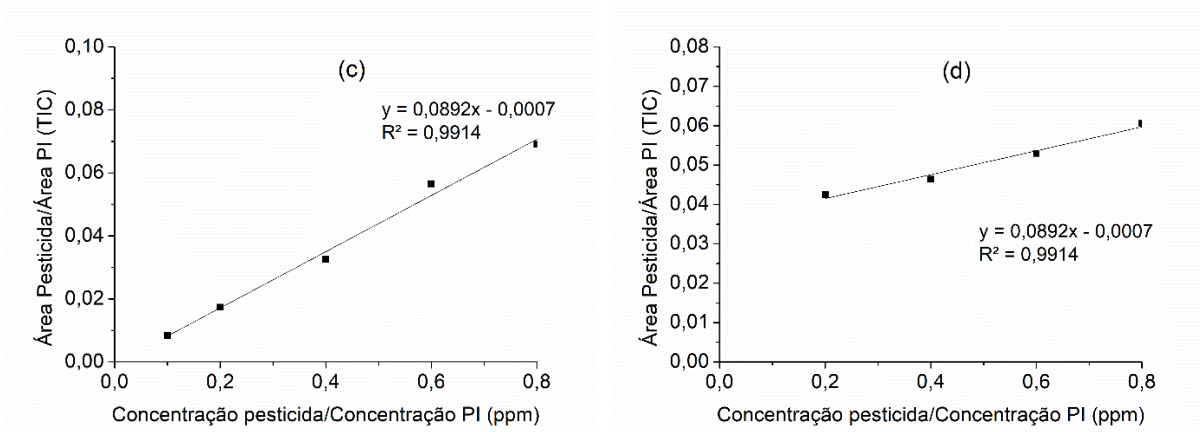


Figura G.6 (continuação) - Curva de calibração para o terbutilazina nas gamas de concentração (a) 0,01-100 ppm, (b) 8-100 ppm, (c) 0,1-0,8 ppm e (d) 0,02-0,08.

ANEXO H – Concentrações e áreas obtidas para cada pesticida para construção das curvas de calibração sem e com a utilização do PI.

Tabela H.1 - Áreas médias obtidas para cada pesticida e para o padrão interno separadamente.

Concentração pesticidas (ppm)	Área média Dimetoato (SIM)	Área média Terbutilazina (SIM)	Área média Heptacloro (SIM)	Área média Padrão interno (SIM)
100	9101016	15409498	5397466	19767153
80	4468421	11231749	3937522	18493744
60	3552127	10352438	3116894	26551153
40	1876456	6931480	2088564	25820599
20	201446	1766663	543617	16931712
10	56243	768639	236251	23502976

Tabela H.2 – Razões entre as áreas médias obtidas para cada pesticida e para o padrão interno.

Concentração pesticida/Concentração Padrão interno	Área Dimetoato/Área Padrão interno	Área Terbutilazina/Área Padrão interno	Área Heptacloro/Área Padrão interno
1	0,4604	0,7796	0,2731
0,8	0,2416	0,6073	0,2129
0,6	0,1303	0,3797	0,1214
0,4	0,0727	0,2684	0,0809
0,2	0,0119	0,1043	0,0321
0,1	0,0024	0,0327	0,0101

ANEXO I – Cromatogramas da análise do padrão 10 mg/L da mistura M1 para o estudo de reprodutibilidade e repetibilidade

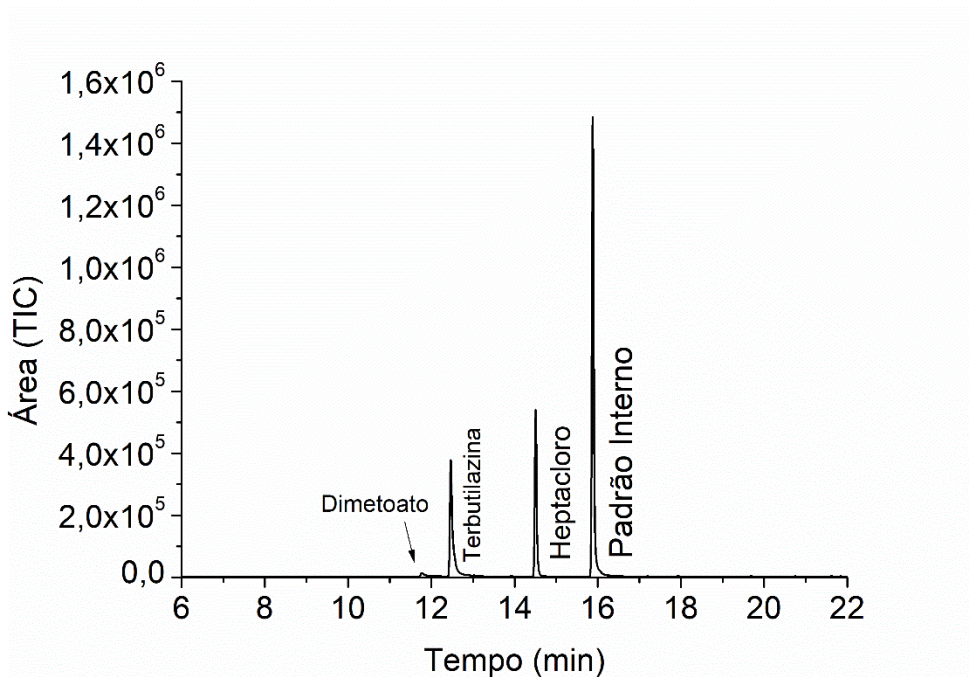


Figura I.1 – Cromatograma mistura M1 1ª repetição para estudo de repetibilidade.

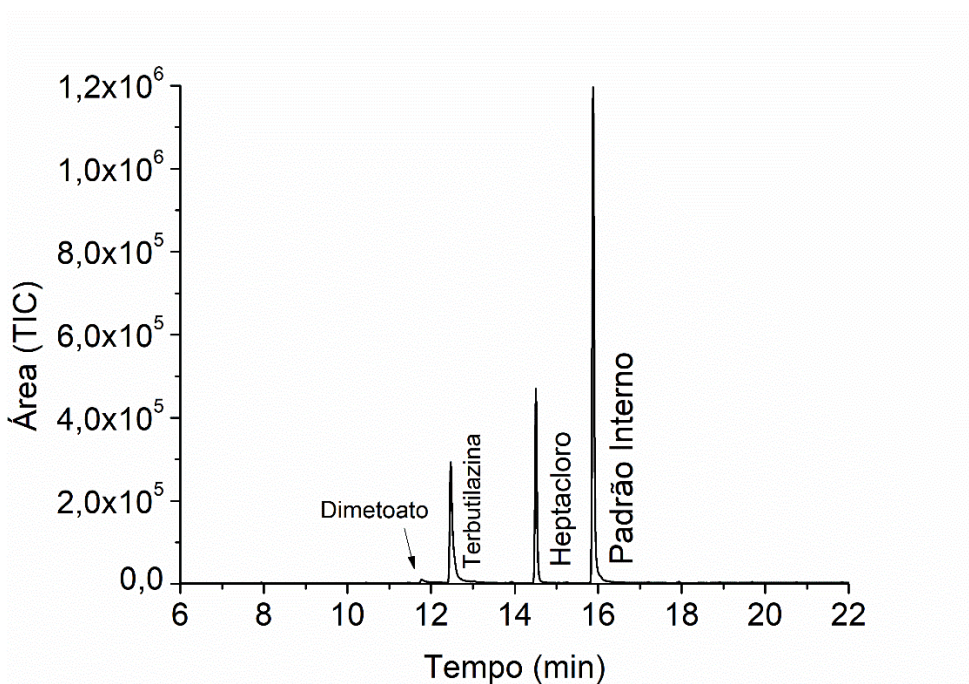


Figura I.2 – Cromatograma mistura M1 2ª repetição para estudo de repetibilidade.

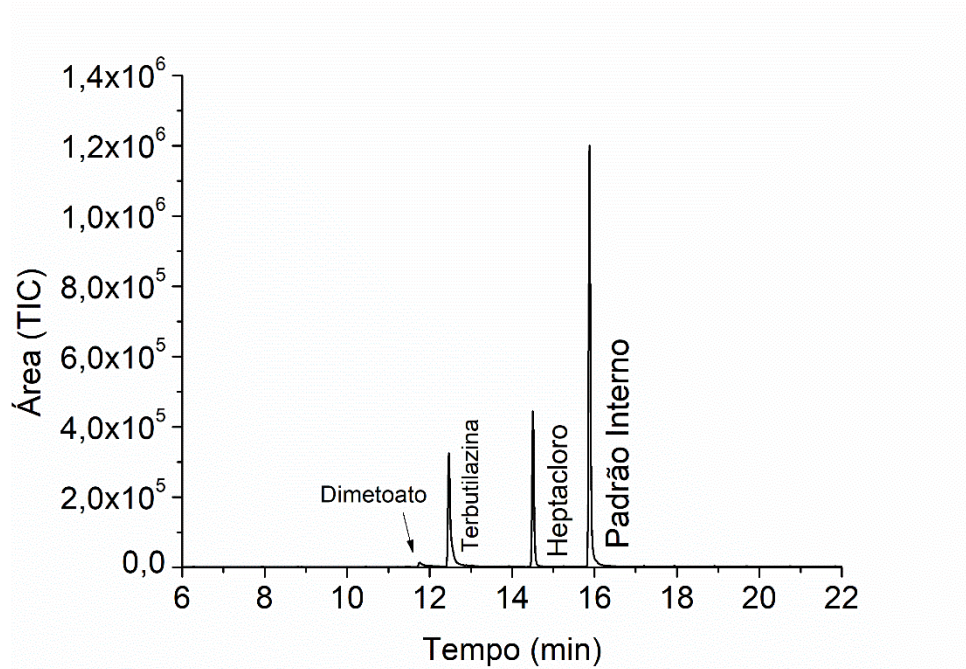


Figura I.3 – Cromatograma mistura M1 3ª repetição para estudo de repetibilidade.

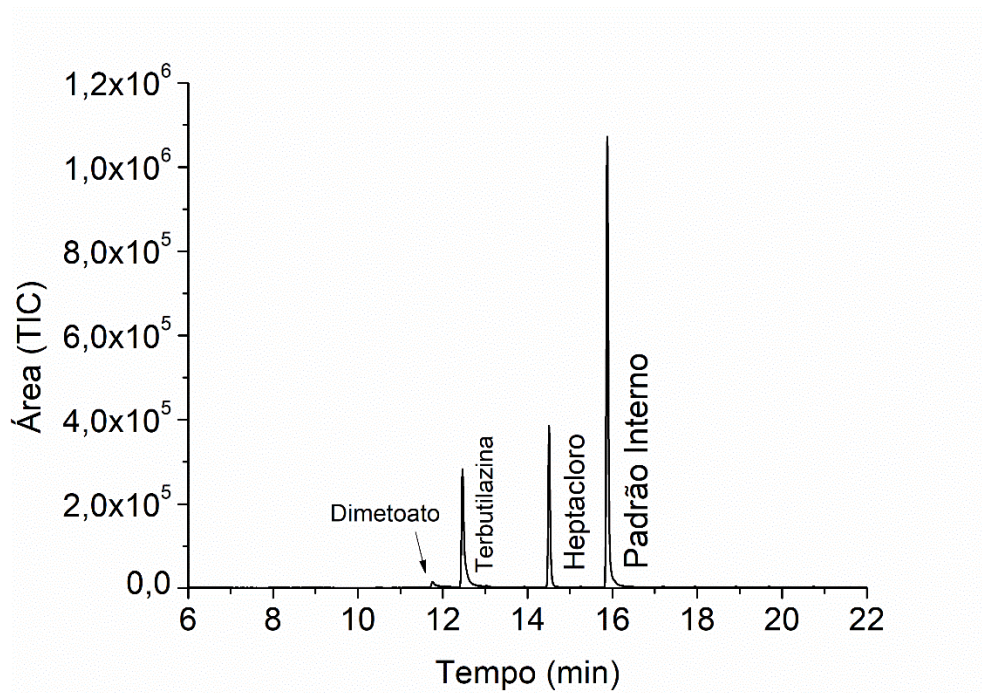


Figura I.4 – Cromatograma mistura M1 4ª repetição para estudo de repetibilidade.

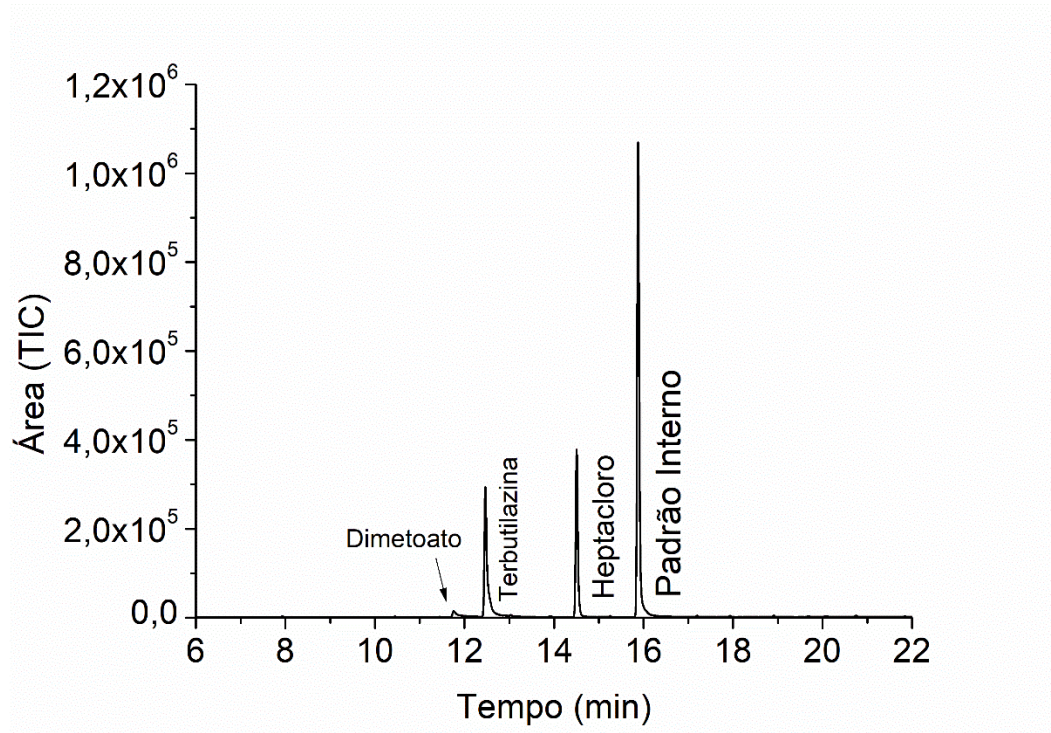


Figura I.5 – Cromatograma mistura M1 5ª repetição para estudo de repetibilidade.

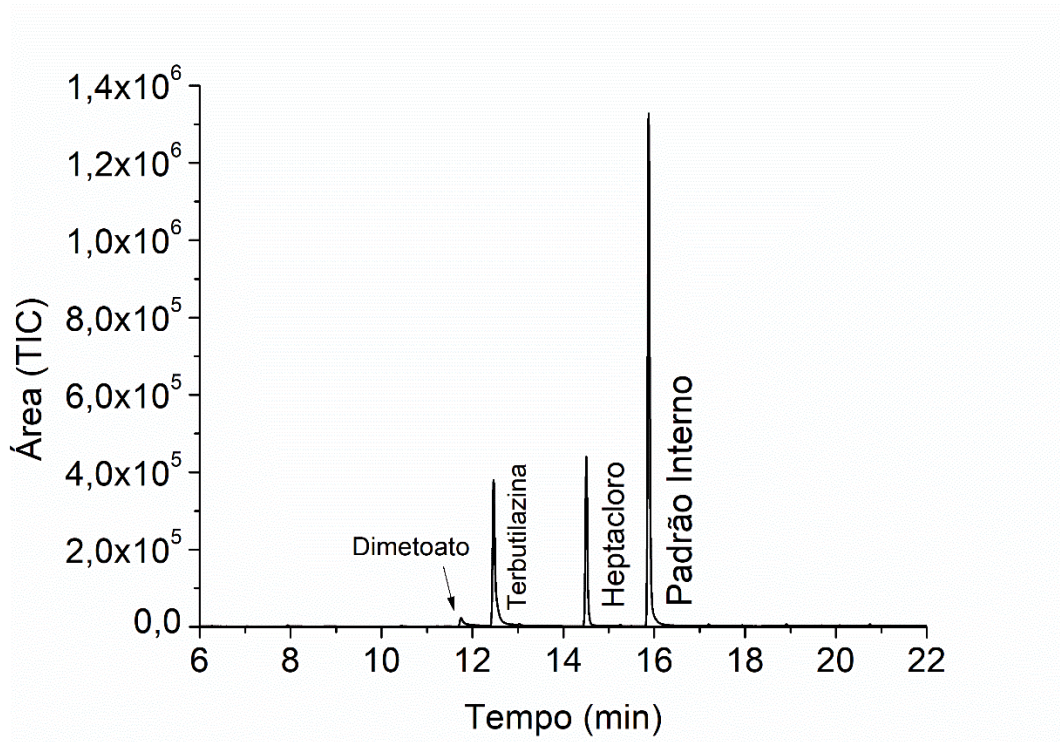


Figura I.6 – Cromatograma mistura M1 6ª repetição para estudo de repetibilidade.

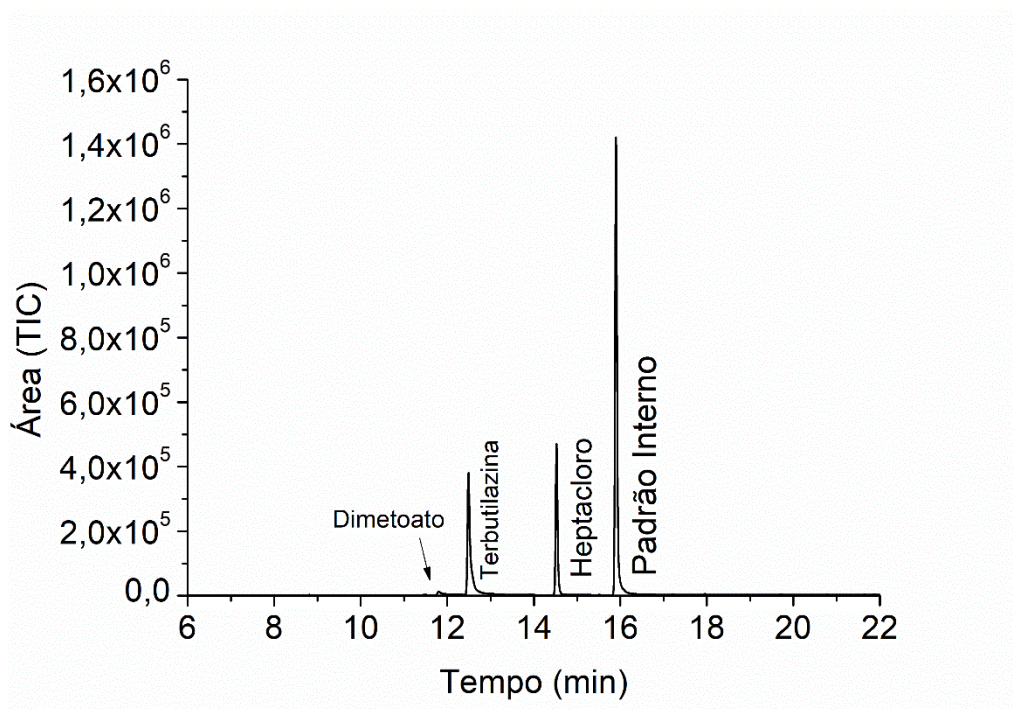


Figura I.7 – Cromatograma mistura M1 1ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

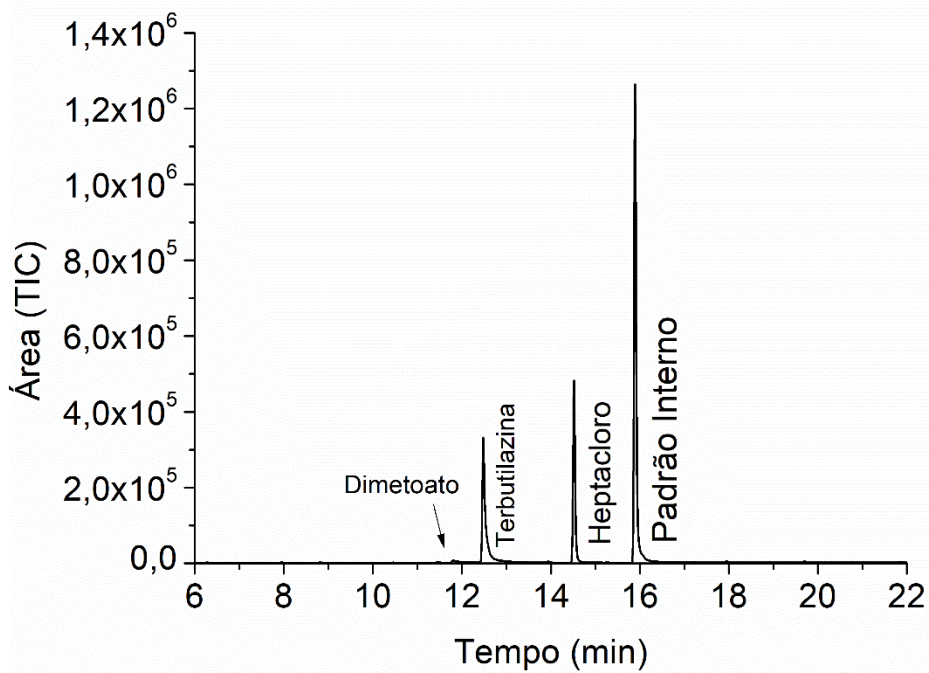


Figura I.8 – Cromatograma mistura M1 2ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

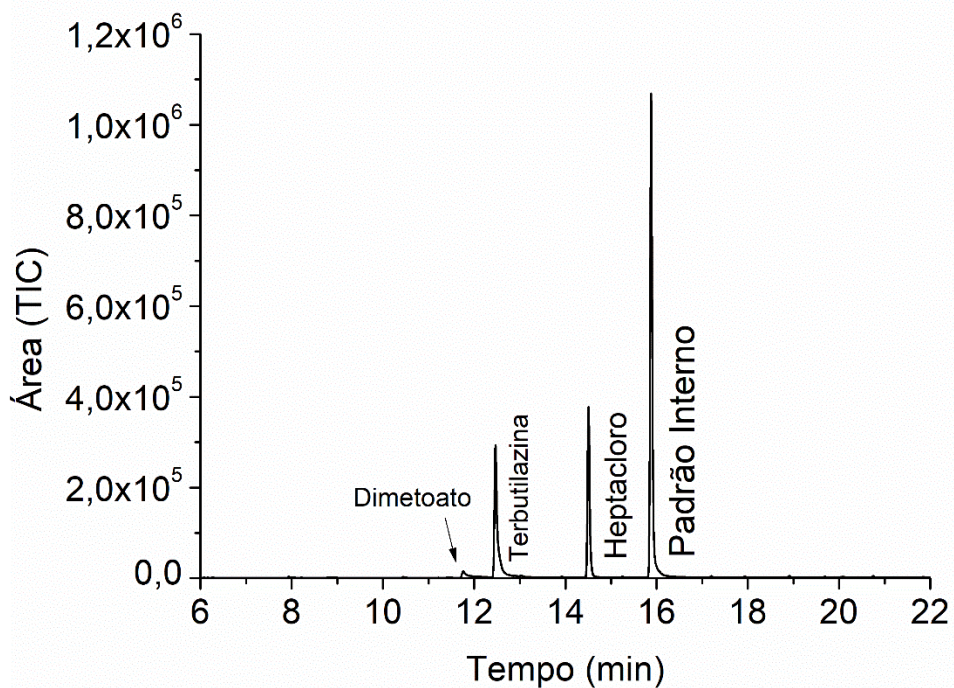


Figura I.9 – Cromatograma mistura M1 3ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

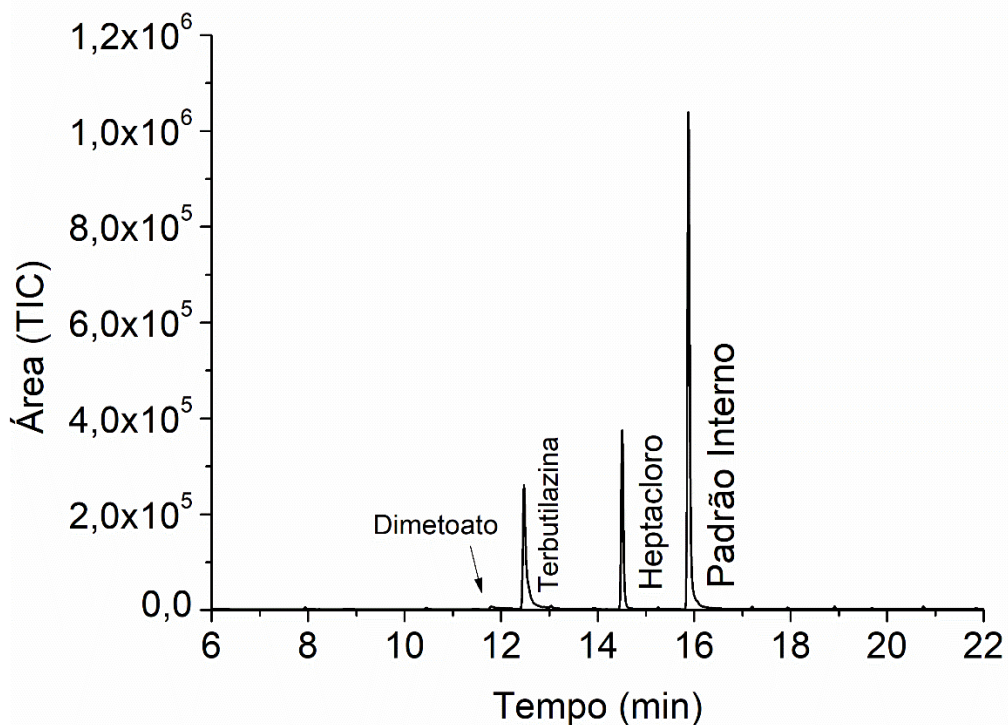


Figura I.10 – Cromatograma mistura M1 4ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

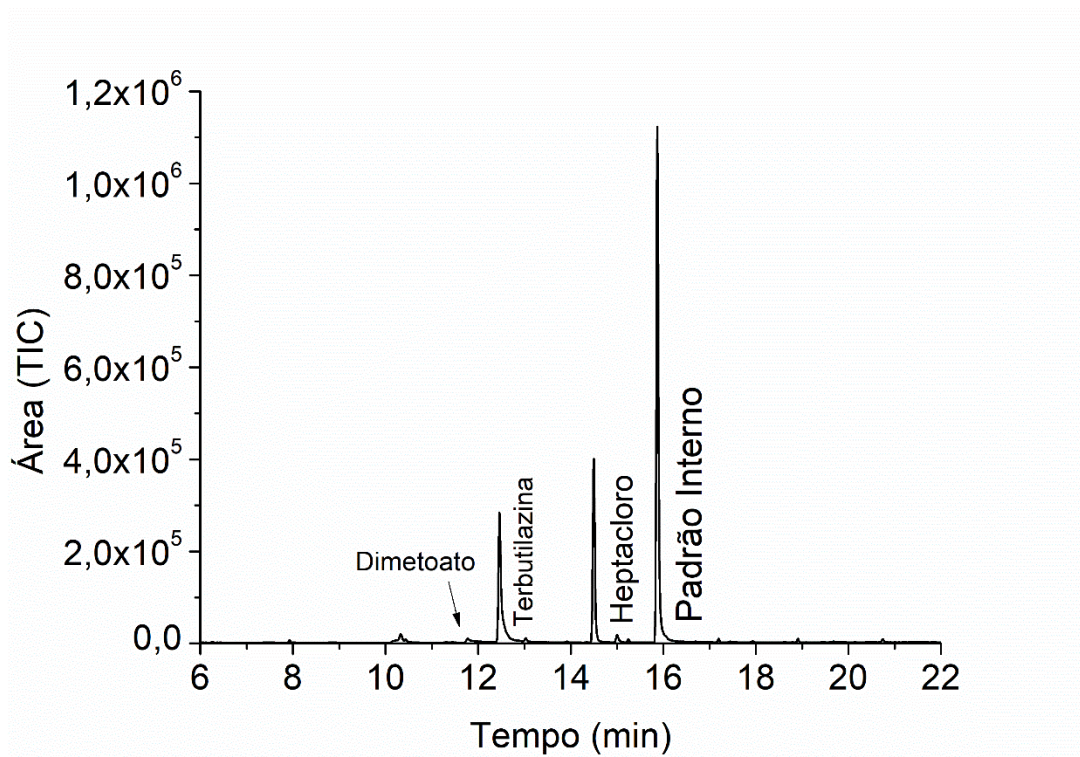


Figura I.11 – Cromatograma mistura M1 5ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

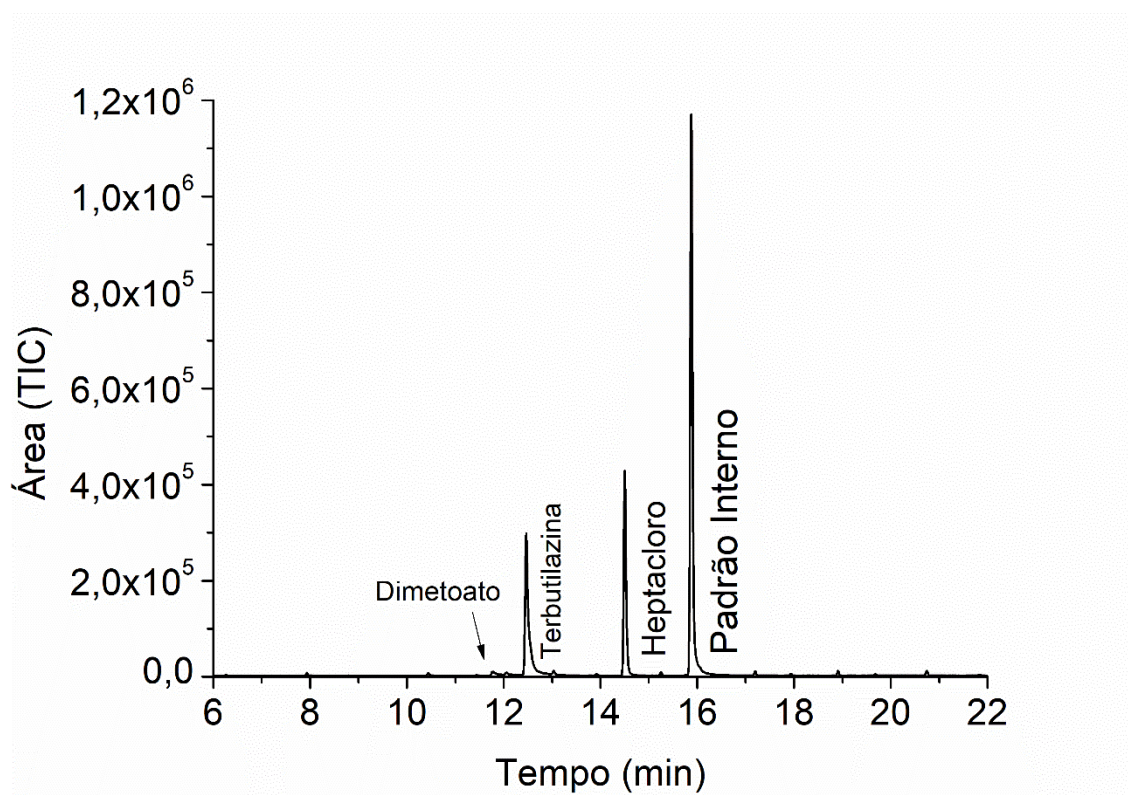


Figura I.12 – Cromatograma mistura M1 6ª repetição para estudo de reprodutibilidade.

ANEXO J – Cromatogramas referentes a extração de um padrão de heptacloro (10 mg/L) por SPE.

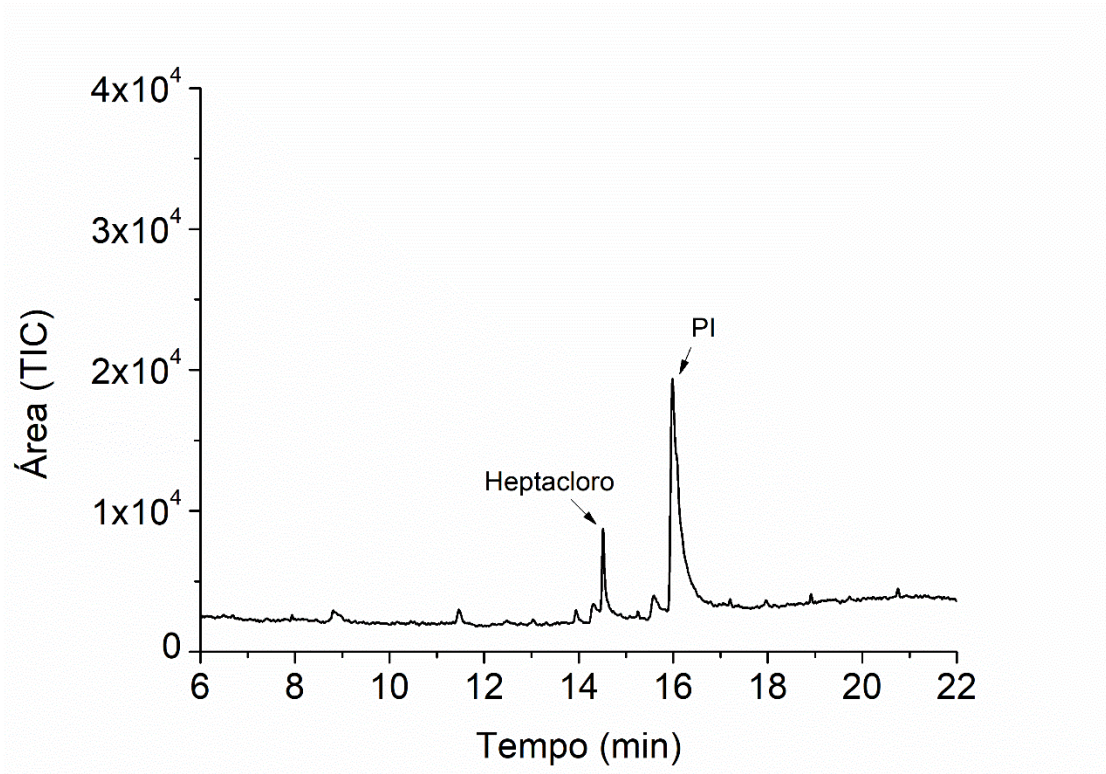


Figura J.1 – Cromatograma extração heptacloro (10 ppm) 1ª repetição.

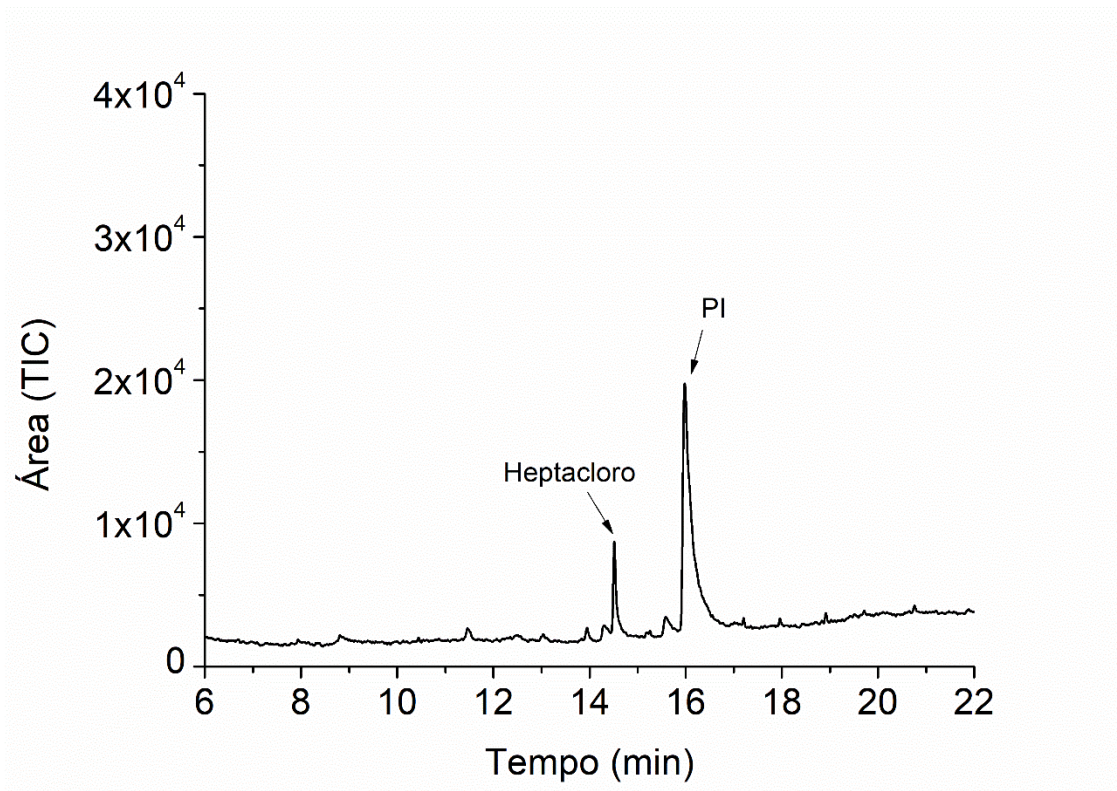


Figura J.2 – Cromatograma extração heptacloro (10 ppm) 2ª repetição.

ANEXO K – Cálculos realizados para preparação dos padrões para análise de recuperação SPE.

Tabela K.1 - Concentração das soluções mãe dos pesticidas e do padrão interno preparados em 10 mL de metanol.

Pesticida	Massa (mg)	Concentração (mg.L⁻¹)
Dimetoato	10,1	1010
Heptacloro	10,2	1020
Terbutilazina	10,5	1050
Trifenilmetano	10,8	1080

Tabela K.2 - Concentração das soluções mãe dos pesticidas e do padrão interno preparados em 10 mL de hexano.

Pesticida	Massa (mg)	Concentração (mg.L⁻¹)
Epoxiconazol	10,1	1010
Tebuconazol	10,1	1010
Trifenilmetano	10,4	1040

Tabela K.3 - Volume utilizado de para preparar uma solução de 100 ppm em um balão volumétrico de 5 mL.

C. Solução (ppm)	V. Padrão (1000 ppm) mL
100	0,5

Tabela K.4 - Volume utilizado de para preparar uma solução de 10 ppm em água ultrapura em um balão volumétrico de 10 mL.

C. Solução (ppm)	V. Padrão (100 ppm) mL
10	1

ANEXO L – Cromatogramas referentes aos padrões das misturas M1 e M3 após o ensaio por extração SPE.

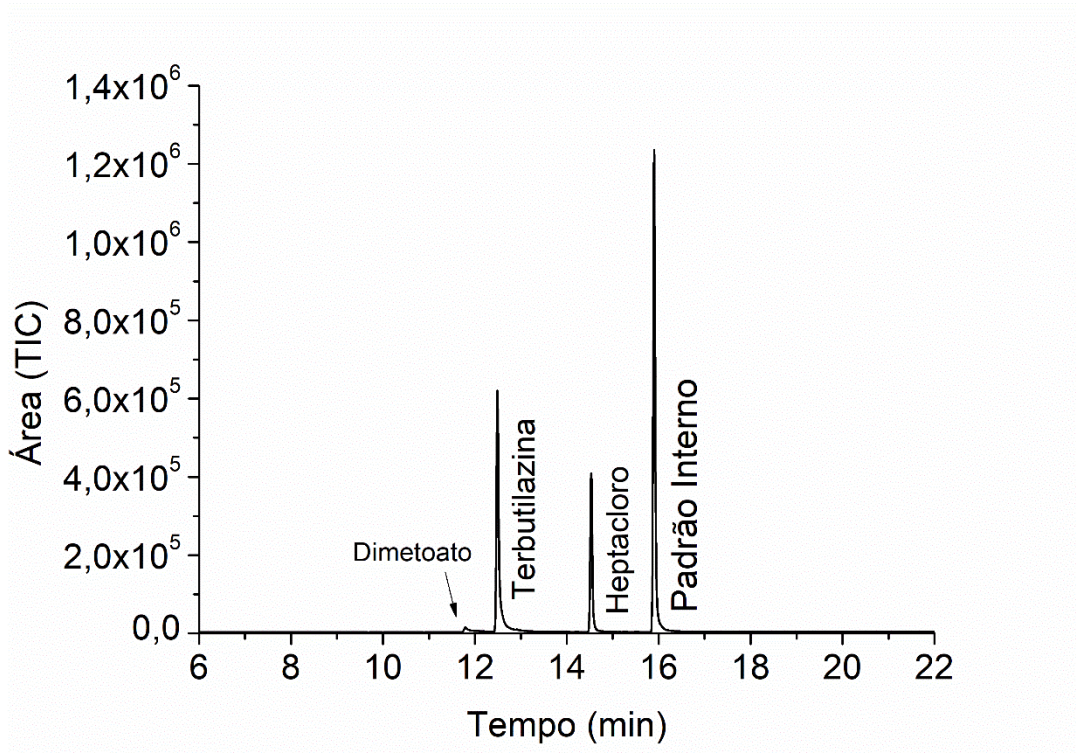


Figura L.1 - Cromatograma M1 padrão 1 (1ª eluição).

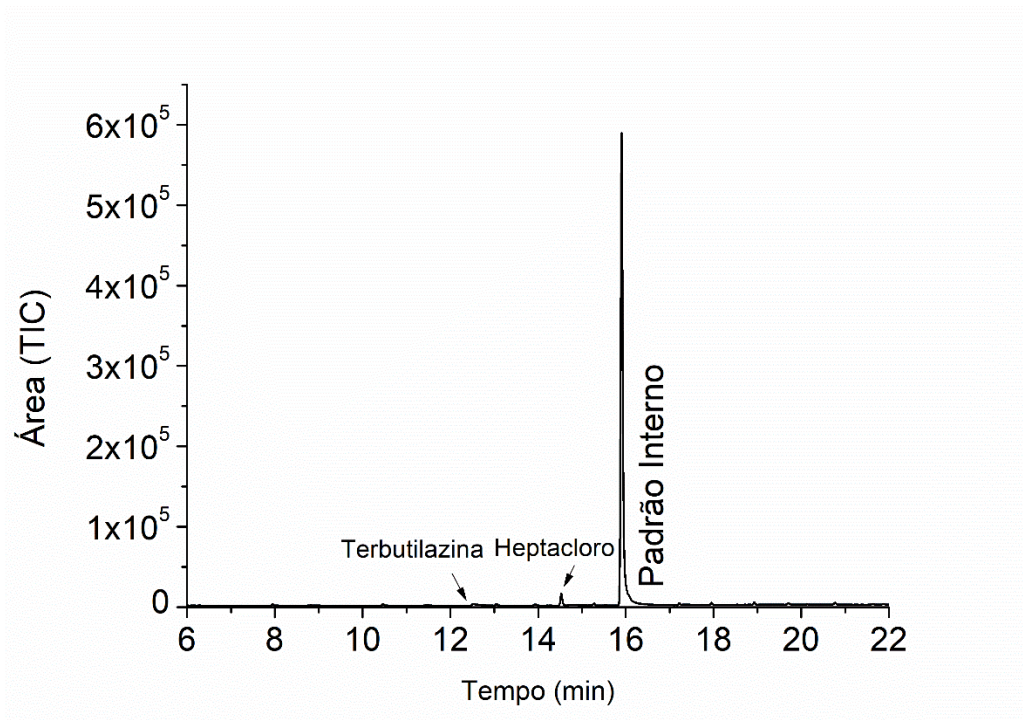


Figura L.2 - Cromatograma M1 padrão 1 (2ª eluição).

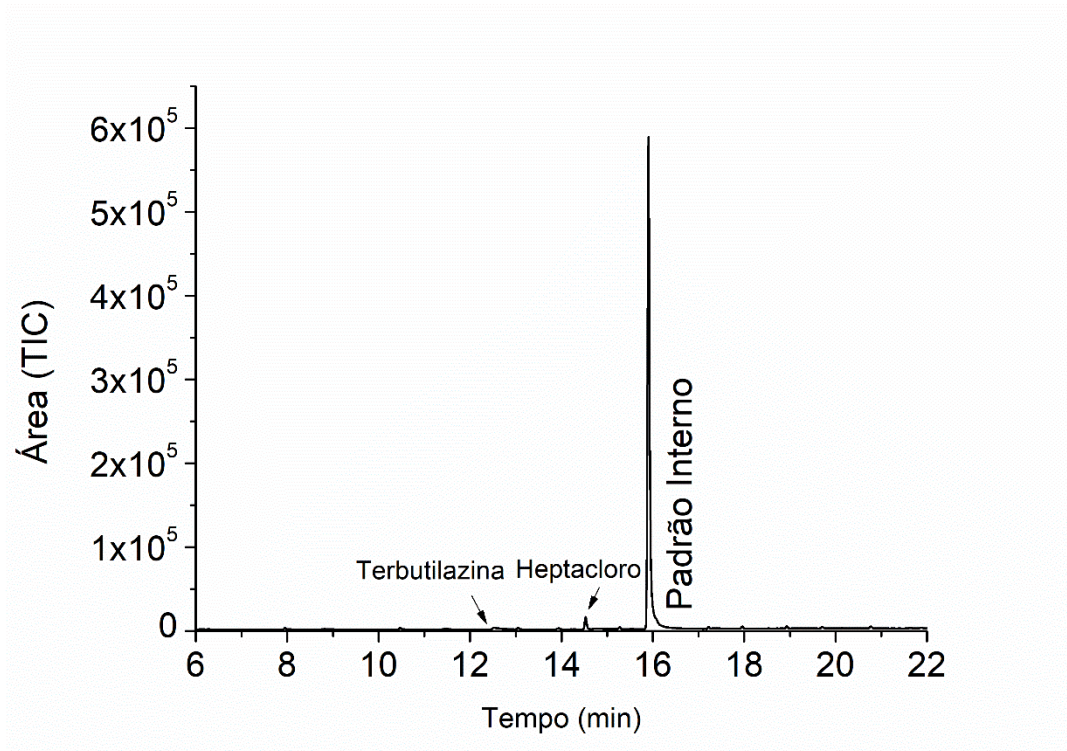


Figura L.3 - Cromatograma M1 padrão 2 (1ª eluição).

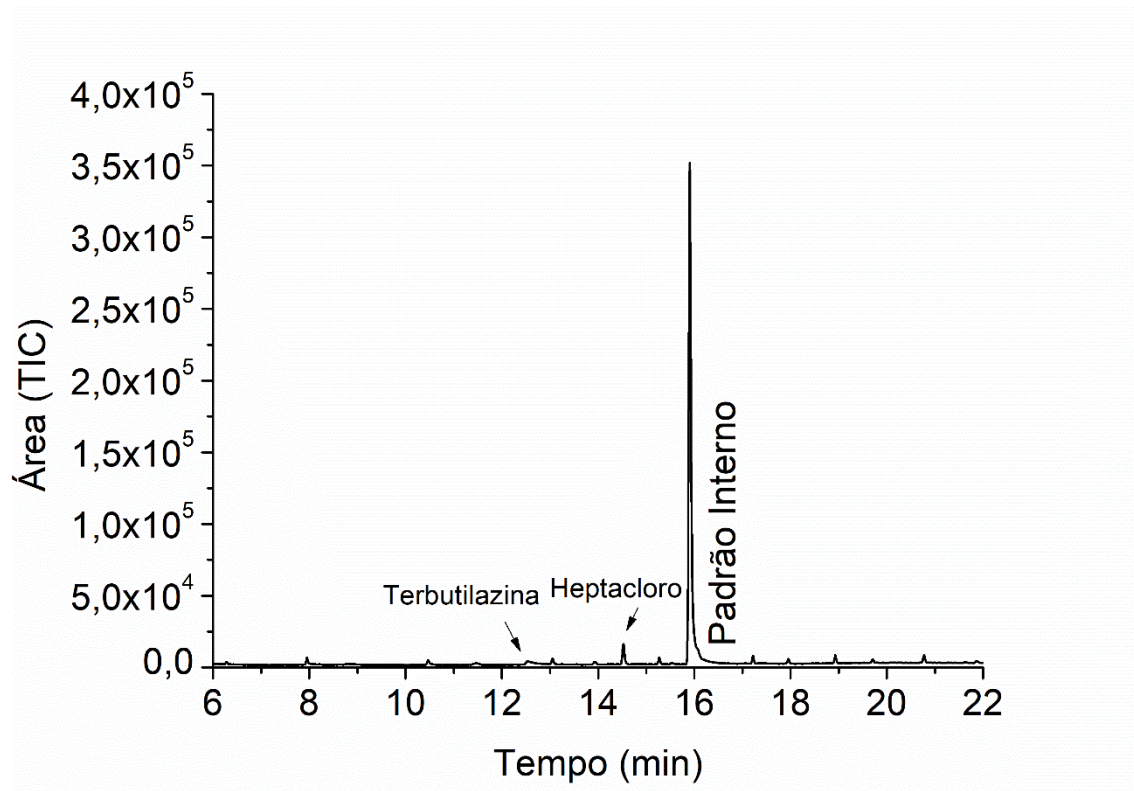


Figura L.4 - Cromatograma M1 padrão 2 (2ª eluição).

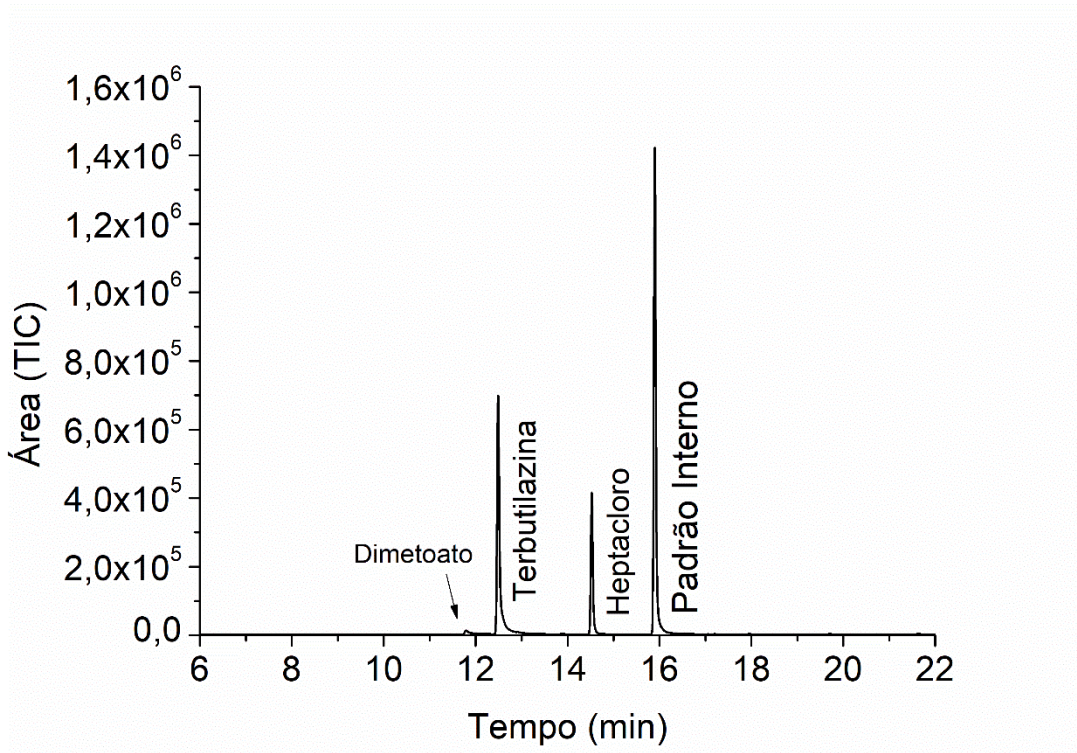


Figura L.5 - Cromatograma M1 padrão 3 (1ª eluição).

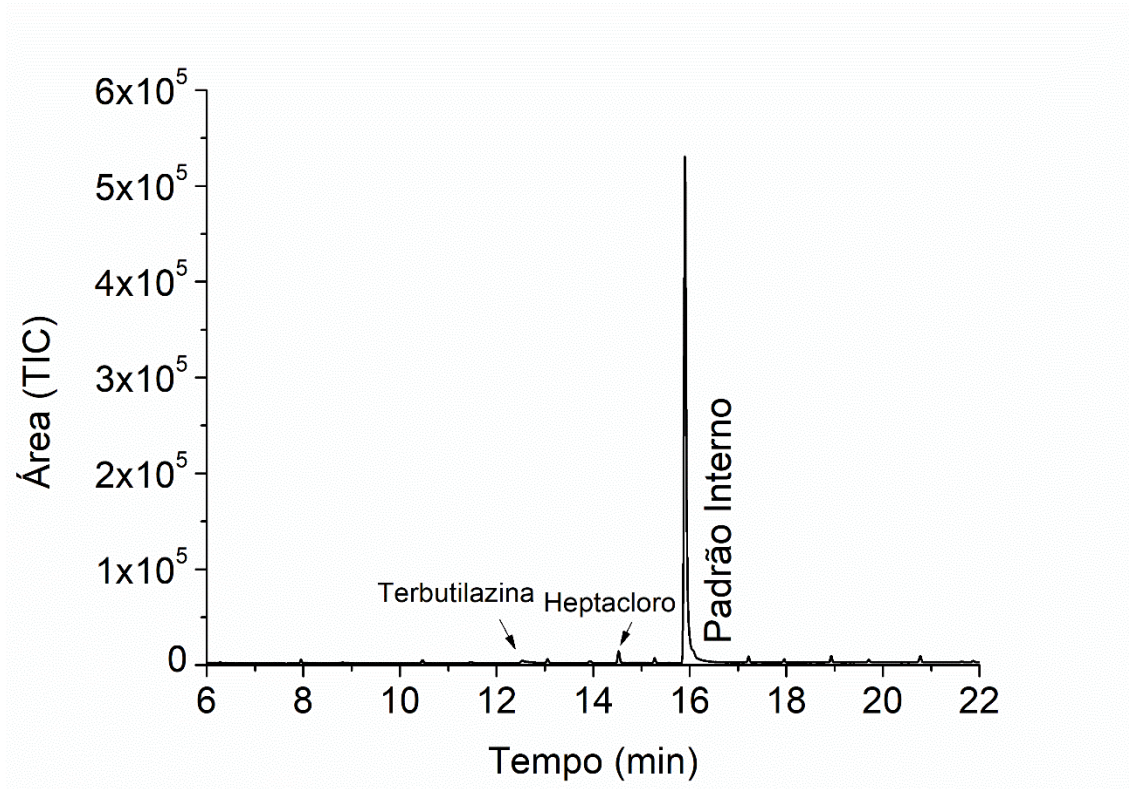


Figura L.6 - Cromatograma M1 padrão 3 (2ª eluição).

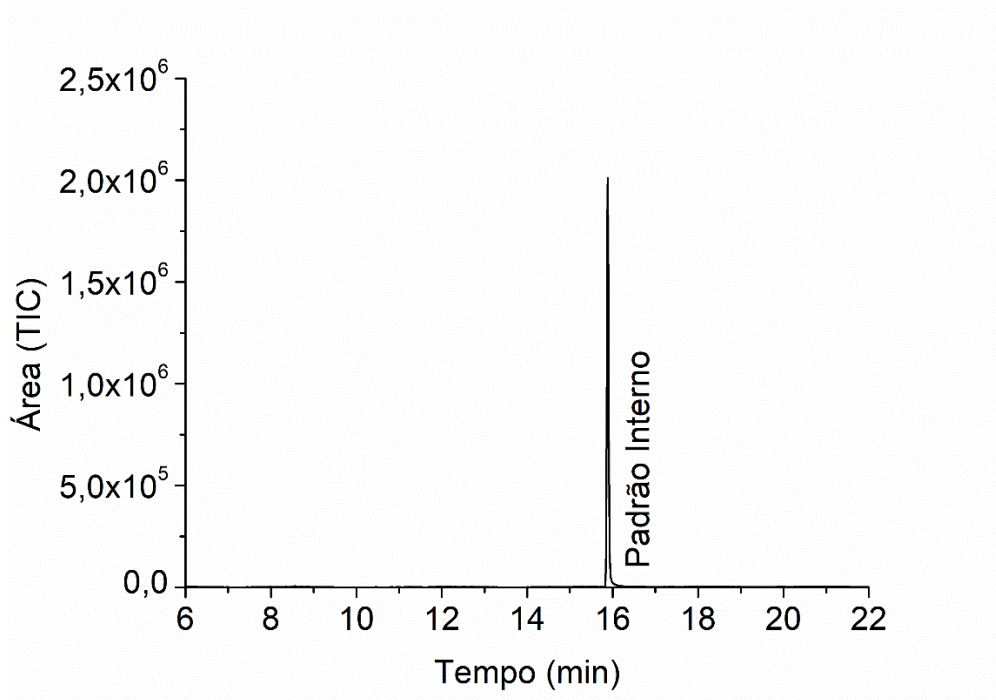


Figura L.7 - Cromatograma M3 padrão 1 (1ª eluição).

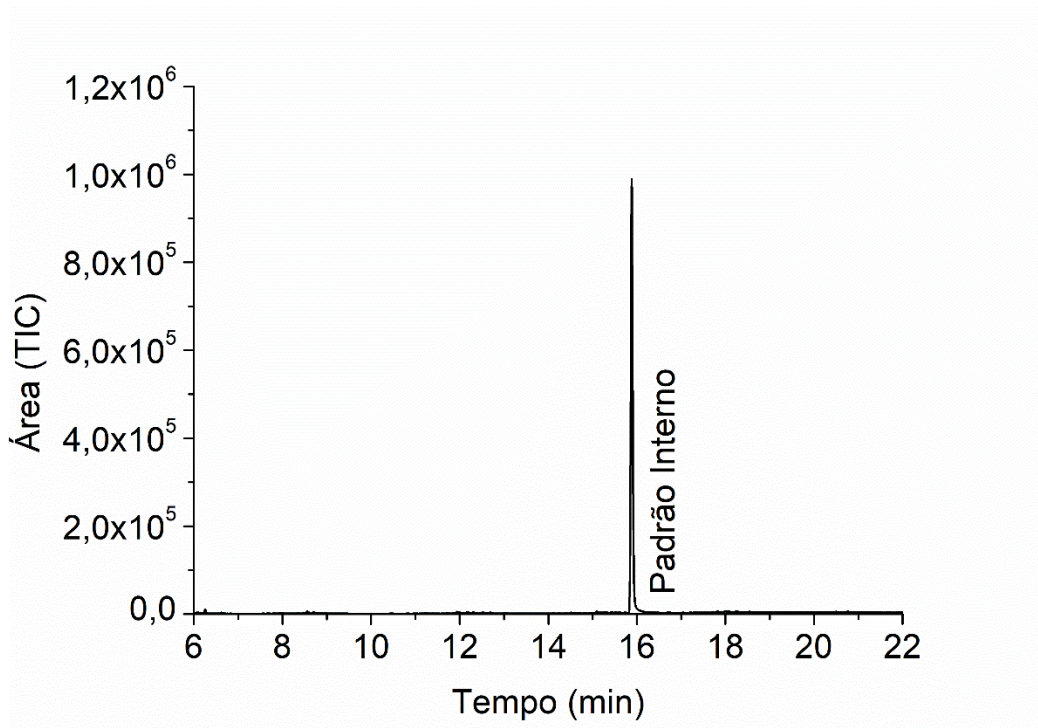


Figura L.8 - Cromatograma M3 padrão 1 (2ª eluição).

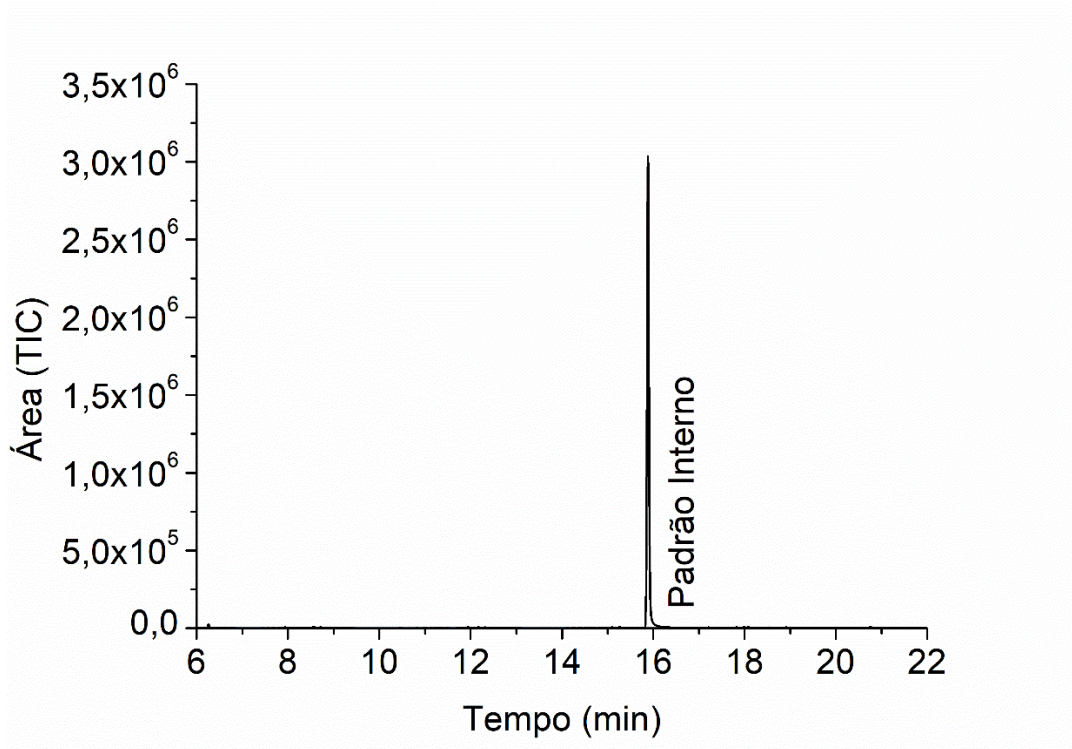


Figura L.9 - Cromatograma M3 padrão 2 (1ª eluição).

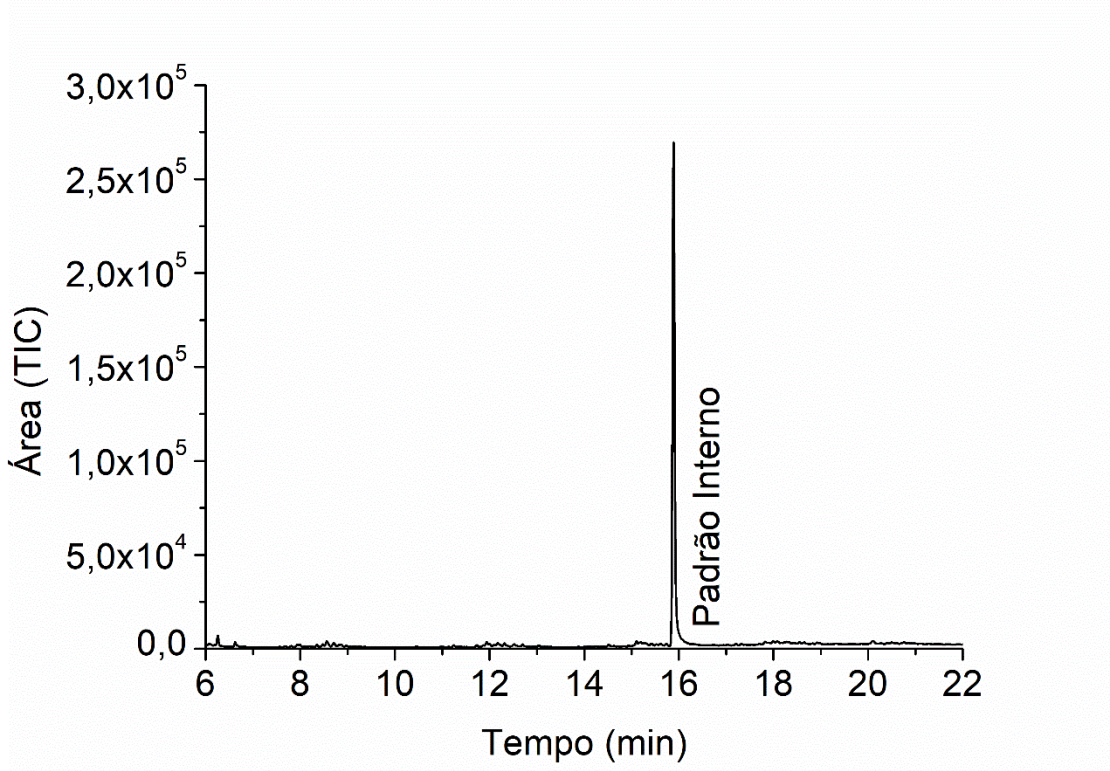


Figura L.10 - Cromatograma M3 padrão 2 (2ª eluição).

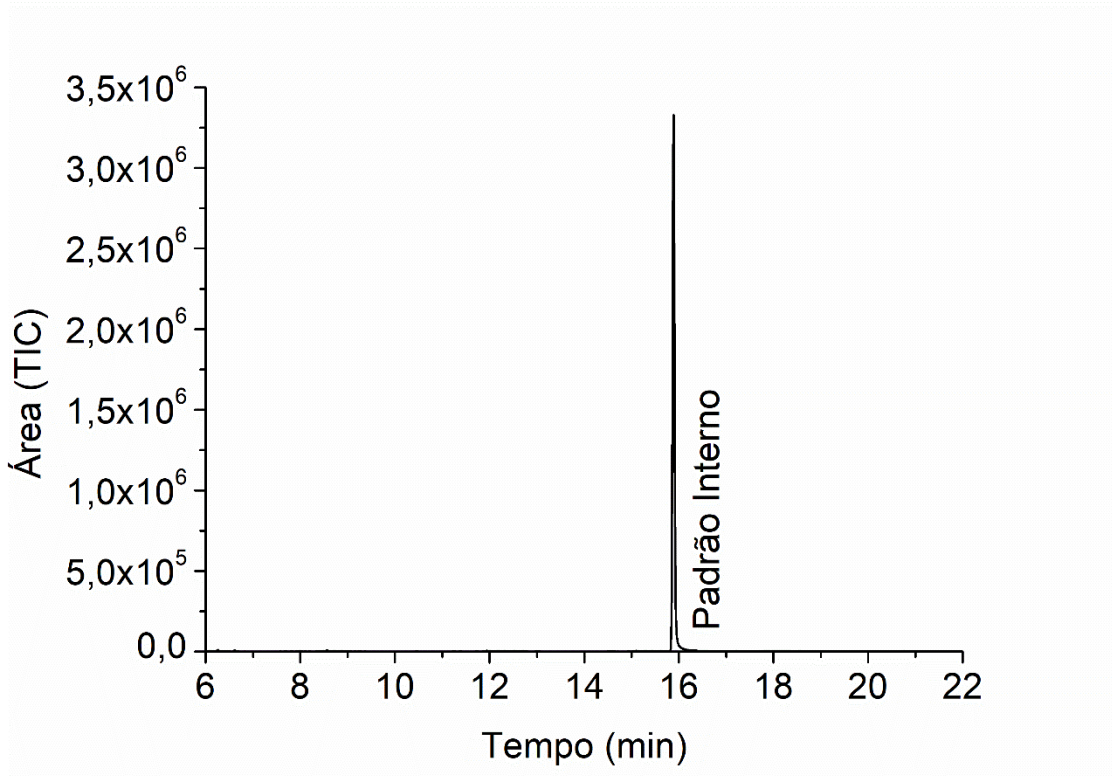


Figura L.11 - Cromatograma M3 padrão 3 (1ª eluição).

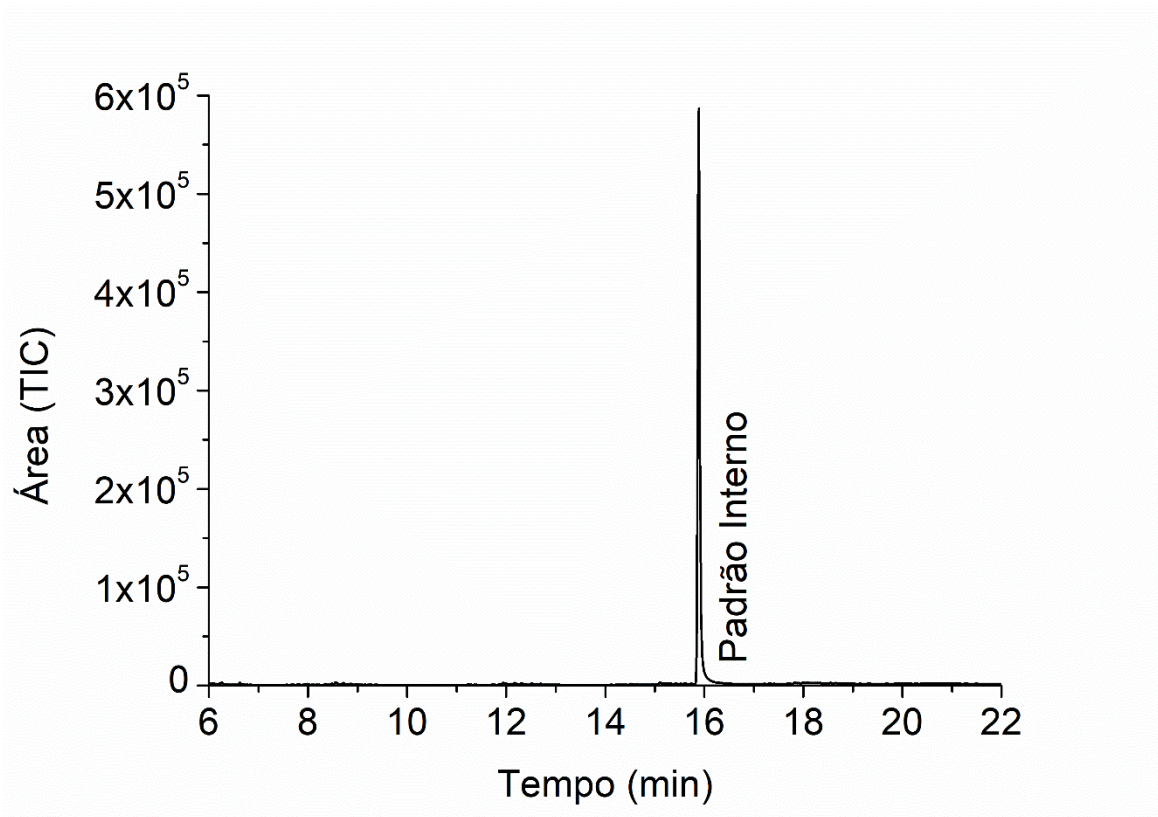


Figura L.12 - Cromatograma M3 padrão 3 (2ª eluição).

ANEXO M – Cromatogramas referentes ao estudo em duplicata do padrão 10 mg/L da mistura M1 em metanol.

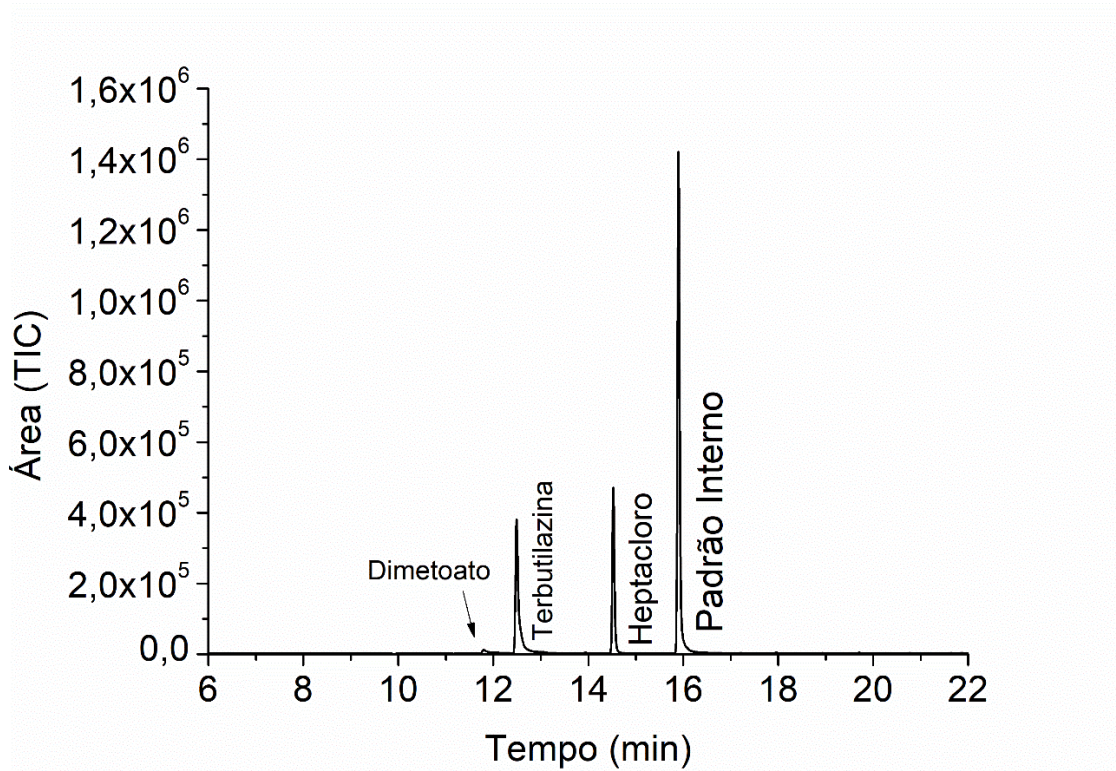


Figura M.1 - Cromatograma M1 10 mg/L (1ª repetição).

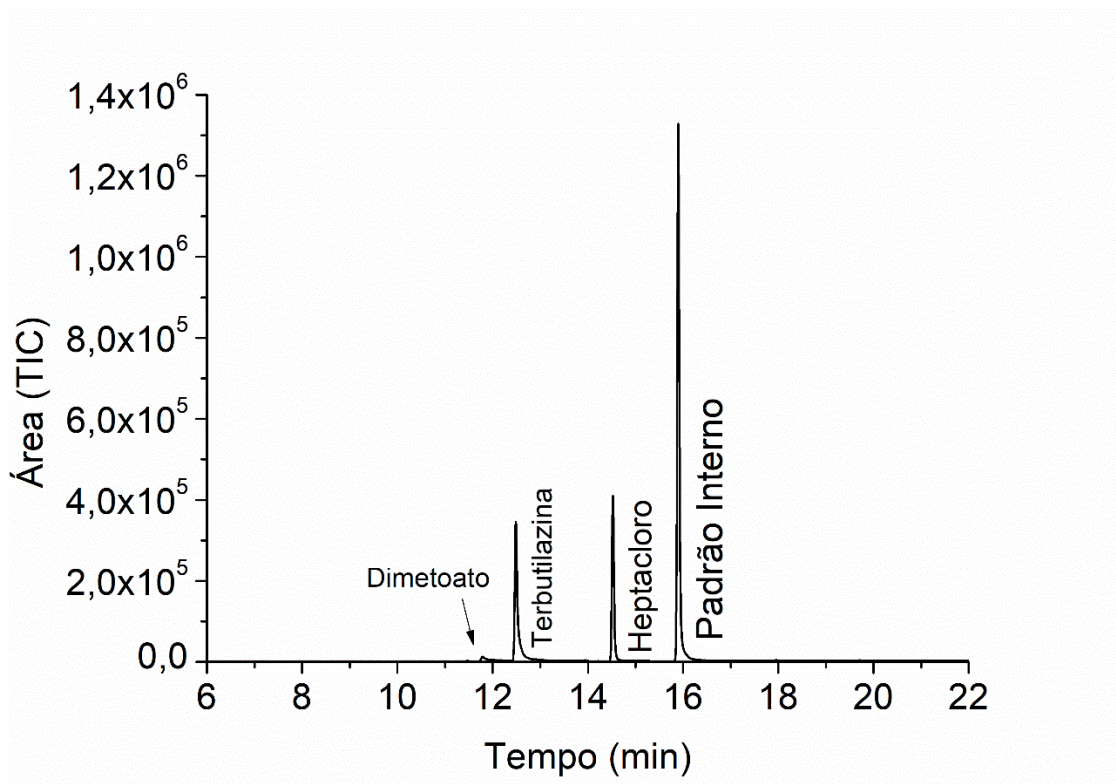


Figura M.2 - Cromatograma M1 10 mg/L (2ª repetição).