



FURG

Dissertação de Mestrado

**“Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água
Empregando Extração em Fase Sólida, GC-MS e UHPLC-
MS/MS”**

Sabrina Engelmann Schneider

PPGQTA

Santo Antônio da Patrulha, RS - Brasil

2013

**Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água Empregando Extração em
Fase Sólida, GC-MS e UHPLC-MS/MS.**

por

Sabrina Engelmann Schneider

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr Fábio Ferreira Gonçalves

PPGQTA

Santo Antônio da Patrulha, RS – Brasil.

2013

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água
Empregando Extração em Fase Sólida, GC-MS
e UHPLC-MS/MS.**

elaborada por

Sabrina Engelmann Schneider

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel L. Martins (UFSM - RS)

Prof. Dr^a. Márcia H. S. Kurz (FURG – RS)

Prof. Dr. Fábio F. Gonçalves (FURG - RS)

Santo Antônio da Patrulha, Novembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Marilda pelo amor e pelo incentivo aos estudos,
desde a infância.

Aos meus irmãos Jônatas e Gabriel pelo apoio e carinho. Em especial a minha irmã
Lisiane que sempre foi o exemplo que eu segui de determinação,
esforço e estudo e por suas palavras de incentivo.

A minha avó Anita (in memoriam) que sempre me incentivou a estudar.

Ao professor Fábio Ferreira Gonçalves, pela orientação, pelos momentos de
aprendizado e pelo contínuo estímulo, principalmente nos momentos de
inquietações e angústias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
oportunidade de concluir esse mestrado.

Aos professores do PPGQTA da FURG, pelos momentos de aprendizado.

Ao professor Renato Zanella por disponibilizar o laboratório – LARP (UFSM) e
acompanhar o desenvolvimento deste estudo e a toda equipe do LARP pela
paciência e receptividade.

Aos membros da Banca de Qualificação, professor Manoel L. Martins e Márcia H.
Kurz, pelas sugestões que enriqueceram esse trabalho.

Aos meus demais familiares e amigos, pela compreensão nas “sumidas” durante
estes dois anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE EQUAÇÕES	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Água no planeta.....	4
3.2 Águas superficiais e subterrâneas	6
3.3 Qualidade da água.....	7
3.4 Contaminantes emergentes	8
3.4.1 Agrotóxicos	9
3.4.2 Fármacos	10
3.5 Produção e uso de agrotóxicos.....	11
3.6 Exposição ambiental aos contaminantes	14
3.7 Legislação para a água.....	16
3.8 Contaminantes selecionados no estudo	20
3.8.1 Aldrin.....	21
3.8.2 Dieldrin.....	22

3.8.3	Atrazina.....	22
3.8.4	Carbofurano	23
3.8.5	Diuron	23
3.8.6	Epoxiconazol.....	24
3.8.7	Fipronil	25
3.8.8	Imazetapir	25
3.8.9	Propanil.....	26
3.8.10	Piraclostrobina	27
3.8.11	Tebuconazol	28
3.8.12	Atenolol.....	28
3.8.13	Cafeína	29
3.8.14	Diclofenaco	30
3.8.15	Fluoxetina	30
3.8.16	Prednisona.....	31
3.9	Técnicas de extração e pré-concentração de contaminantes em água	34
3.9.1	Extração em fase sólida (SPE).....	35
3.10	Métodos para determinação de resíduos de contaminantes emergentes em água.....	41
3.10.1	Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC – MS/MS).....	42
3.10.2	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	46
3.11	Validação.....	49
3.11.1	Curva analítica e linearidade.....	50
3.11.2	Sensibilidade.....	51
3.11.3	Limite de detecção e quantificação.....	51
3.11.4	Precisão.....	52
3.11.5	Exatidão.....	53

3.11.6	Seletividade e confirmação dos resultados.....	54
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	Compostos selecionados para o estudo	55
4.2	Instrumentação	56
4.3	Materiais, reagentes e solventes	57
4.4	Preparo das soluções analíticas	58
4.5	Amostra branco.....	59
4.6	Estudo da extração em fase sólida	60
4.7	Otimização das condições de detecção por UHPLC-MS/MS e GC-MS....	62
4.8	Estudo do efeito matriz	64
4.9	Aplicação do método	65
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	67
5.1	Otimização do sistema cromatográfico.....	67
5.1.1	UHPLC-MS/MS.....	67
5.1.2	GC-MS.....	71
5.2	Otimização do método SPE para análise de resíduos de fármacos e agrotóxicos em água.....	73
5.3	Limites de detecção e quantificação, curva analítica e linearidade.....	75
5.4	Exatidão e precisão.....	77
5.5	Avaliação do efeito matriz.....	82
5.6	Aplicabilidade do método.....	86
6.	CONCLUSÕES.....	88
	DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	90
	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	ANEXO 1.....	102
	ANEXO 2.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de água no planeta.....	5
Figura 2: Ilustração de um cartucho utilizado em SPE.....	35
Figura 3: Ilustração das etapas realizadas na SPE.....	36
Figura 4: Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.	44
Figura 5: Analisador do tipo armadilha de íons (Ion Trap).....	48
Figura 6: Cachoeira antes de chegar a Nascente.....	60
Figura 7: Nascente do Rio dos Sinos..	60
Figura 8: Sistema de extração em fase sólida em funcionamento, com utilização de um <i>manifold</i>	61
Figura 9: Ponto de coleta da amostra na zona rural.....	66
Figura 10: Ponto de coleta na zona urbana..	66
Figura 11: Coleta da amostra na lagoa..	67
Figura 12: Cromatograma UHPLC na concentração de 20 µg L ⁻¹ na matriz.....	70
Figura 13: Cromatograma UHPLC concentração 20 µg L ⁻¹ no solvente.....	70
Figura 14: Cromatograma GC-MS, 500 µg L ⁻¹ preparada no extrato da matriz.....	72
Figura 15: Percentual de efeito matriz (EM) para a técnica empregando SPE, UHPLC-MS/MS e GC-MS para determinação de fármacos e agrotóxicos em água.....	84
Figura 16: 1 - Curva analítica preparada no solvente e no extrato da matriz para o carbofurano com supressão do sinal. 2 - Curva analítica preparada no solvente e no extrato da matriz para a piraclostrobina com faixa de sinal dentro dos 20%.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de cultura e quantidade de agrotóxico.	12
Tabela 2: Relação de agrotóxicos autorizados e não autorizados, utilizados nas culturas e os índices de valores limite máximo permitido.....	13
Tabela 3: Tabela de padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde e constam na Portaria do MS 2914/11.....	17
Tabela 4: Relação de tipo de agrotóxico e organismo alvo.....	32
Tabela 5: Utilização da SPE para a extração de diferentes analitos	40
Tabela 6: Identificação das localidades de coletas das amostras para a aplicação do método.....	65
Tabela 7: Gradiente da fase móvel utilizado no UHPLC.....	68
Tabela 8: Fármacos e agrotóxicos com os tempos de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão.....	69
Tabela 9: Condições utilizadas no sistema cromatográfico GC-MS.....	71
Tabela 10: Compostos analisados no GC-MS, tempo de retenção e razão massa/carga.	71
Tabela 11: Resultados obtidos dos testes realizados na SPE..	74
Tabela 12: Coeficiente de correção e curva linear no solvente e na matriz.	76
Tabela 13: LOD e LOQ do instrumento e para o método e faixa linear.....	77
Tabela 14: Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %).....	79
Tabela 15: Repetibilidade do método apresentado pelos valores de RSD.....	82
Tabela 16: Avaliação do efeito matriz.....	83
Tabela 17: Resultados das amostras de água analisadas.....	86

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	50
Equação 2	53
Equação 3	54
Equação 4	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
2. ANA – Agência Nacional de Água
3. APCI - Ionização química à pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric pressure chemical ionization*.
4. C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
5. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
6. CV – coeficiente de variação
7. DDT – dicloro-difenil-tricloetano
8. DIC – Dissociação por colisão induzida, do inglês *dissociation induced-collision*.
9. EEC - Comunidade Econômica Europeia, do inglês *European Economic Community*.
10. EM - Efeito Matriz
11. EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
12. ESI - Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*
13. ETE - Estações de Tratamento de Esgoto
14. FE – Fase estacionária
15. FM – Fase móvel
16. GC – Cromatógrafo gasoso, do inglês *Gas Chromatography*
17. i.a.- ingrediente ativo
18. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
19. IT – íon trap
20. K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água
21. LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
22. LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
23. LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

24. m/z - Razão massa-por-carga
25. SRM – Monitoramento seletivo de reação, do inglês *Selective Reaction Monitoring*
26. MS – Espectrômetro de massa, do inglês *Mass Spectrometry*
27. MS – Ministério da Saúde
28. MS_1 –primeiro estágio de ionização
29. MS_2 – segundo estágio de ionização
30. OMS - Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*
31. POPs – poluentes orgânicos persistentes
32. PPCPs – Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*
33. PTFE – Politetrafluoretileno (teflon)
34. r - Coeficiente de correlação linear
35. r^2 – Coeficiente de determinação
36. R – Recuperação
37. RDC – Resolução Diretora Colegiada
38. RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
39. RSSS – resíduos sólidos dos serviços de saúde
40. STD – sólidos totais dissolvidos
41. SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
42. t_R - tempo de retenção
43. USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*
44. v/v - Volume por volume

RESUMO

Título: Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água Empregando Extração em Fase Sólida, GC-MS e UHPLC-MS/MS.

Autor: Sabrina Engelmann Schneider

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

A mudança climática, o aumento da população, o descarte inadequado de resíduos, os esgotos domésticos, hospitalares e industriais, o uso indiscriminado de pesticidas em muitas lavouras estão criando novos desafios na gestão dos recursos hídricos. As fontes de água são limitadas e a recuperação e a reutilização é cada vez mais uma prioridade.

Desta forma, é necessário o uso de técnicas de extração e pré-concentração para a determinação desses contaminantes que se encontram em baixas concentrações. Por isso, técnicas de preparo de amostras como Extração em Fase Sólida (SPE) vem sendo amplamente aplicada para a extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas com uma utilização de baixo volume de solventes e amostras.

As técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para a determinação de compostos orgânicos fazendo parte de um importante grupo de métodos de separação, que permitem isolar, identificar e quantificar substâncias de amostras complexas.

Neste trabalho foi utilizado SPE para a extração e concentração dos analitos de interesse e o método cromatográfico que foi utilizado para identificar e quantificar os resíduos em água foi a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) do tipo armadilha de íons e por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (UHPLC-MS/MS).

A extração e pré-concentração dos analitos foram otimizadas utilizando como solventes de eluição acetonitrila e metanol em cartucho C18 e posterior determinação via UHPLC-MS/MS E GC-MS.

A determinação dos contaminantes por UHPLC-MS/MS com ionização por eletronebulização e GC-MS com detector do tipo armadilha de íons (ITD) proporcionou uma análise quantitativa dos compostos em estudo através do modo de operação SRM que possibilitou uma alta sensibilidade, seletividade e detectabilidade.

Os compostos apresentaram LOQ entre 0,025 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOD entre 0,01 e 0,17 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de recuperação para os variados níveis de fortificação variaram entre 70 a 120%, com exceção de dois dos compostos: atenolol e imazetapir, que mostraram recuperações abaixo dos valores de referência. Os RSDs variaram entre 0,6 e 20%, estando de acordo com os valores recomendados pela literatura.

Neste trabalho ficou comprovada a aplicabilidade do método SPE aliado ao UHPLC-MS/MS e ao GC-MS para análise de contaminantes em amostras de água.

ABSTRACT

Title: Determination of Pesticides and Pharmaceuticals in Water Using Solid Phase Extraction and GC-MS and UHPLC-MS/MS.

Author: Sabrina Engelmann Schneider

Advisor: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

The climate changes, population growth, the improper disposal of waste, domestic sewage, hospital and industrial, the indiscriminate use of pesticides in many crops are creating new challenges in the management of water resources. Water sources are limited and the recovery and reuse is becoming a priority.

Thus, it is necessary to use preconcentration techniques for determining those contaminants that are found in low concentrations. Therefore, sample preparation techniques such as solid phase extraction (SPE) have been widely applied for the extraction of organic compounds from aqueous matrix using a low volume of use of solvents and samples.

Therefore, chromatographic techniques have been used for the determination of organic compounds forming part of an important group of separation methods that allows isolate, identify and quantify substances from complex samples.

In this paper SPE was used for the extraction of the analytes and the chromatographic method that was used to identify and quantify the waste water was Gas Chromatography coupled to mass spectrometry type ion trap and Ultra High Pressure Liquid Chromatography coupled mass spectrometry.

The extraction and pre - concentration of analytes were optimized using as eluting solvents acetonitrile and methanol on a C18 cartridge and later determined via UHPLC-MS/MS Quadrupole and GC -MS.

The determination of contaminants by UHPLC-MS/MS electrospray ionization and GC - MS detector type ion trap (ITD) provided a quantitative analysis of the compounds under study through the SRM mode of operation that allowed a high sensitivity , selectivity and detectability .

The compounds showed LOQ between 0.025 and 0.5 mg L⁻¹ and LOD between 0.01 and 0.17 mg L⁻¹. The recovery values for the various fortification levels ranged from 70-120 %, except for two compounds: atenolol and imazethapyr, which showed recoveries below the reference values. The RSDs ranged from 0.6 to 20 %, which is consistent with the values recommended in the literature.

In this work it was proved the applicability of the method combined with UHPLC-MS/MS SPE and GC - MS analysis of contaminants in water samples.

1. INTRODUÇÃO

A degradação dos recursos naturais do planeta está cada vez mais visível. Estoques de água diminuem e são crescentemente contaminados por fármacos, agrotóxicos e resíduos industriais. Cada dia que passa a população faz uso de mais antidepressivos, antiinflamatórios, antibióticos e anticoncepcionais e nas lavouras o uso de agrotóxicos de todos os tipos. A tendência desse consumo é aumentar, tornando-se de grande relevância trabalhos que analise essas águas e os efeitos desses contaminantes na espécie aquática e até mesmo sobre os consumidores de águas contaminadas.

Esses contaminantes emergentes são geralmente solúveis em água e muitos deles passam por estações de tratamento concebido para se livrar dos tradicionais poluentes. Eles foram ocultos no ambiente durante muito tempo. Somente na última década os métodos analíticos avançaram o suficiente para detectá-los a níveis baixos, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , normalmente encontrados no meio ambiente.

A poluição do meio ambiente não está só associada aos produtos agroquímicos, mas também aos resíduos domésticos, ganhando destaque os produtos farmacológicos.

Nos anos 90 os primeiros pesquisadores identificaram vestígios de fármacos em águas superficiais e subterrâneas. Desde então, estudos na Europa e Estados Unidos encontraram vestígios de cerca de 100 fármacos em águas superficiais, subterrâneas, esgotos, efluentes de estação de tratamento, e, o mais preocupante, na água da torneira.

Os fármacos causam graves impactos no meio ambiente. Segundo Mulroy (2001), 50 a 90% de uma dosagem do fármaco é excretado inalterado e persiste no meio ambiente.

O presente trabalho apresenta um método de pesquisa para determinar a existência de alguns contaminantes na água de uma lagoa que recebe água da ETE de um município próximo, esgotos e águas oriundas das lavouras da região e na

água do Rio dos Sinos, que recebe descarte de resíduos municipais, dejetos de lavouras, esgotos, entre outros. E acompanhar os níveis de contaminação desde a nascente do rio até os grandes centros urbanos. Por isso, serão analisados os níveis de contaminação por alguns compostos orgânicos sintéticos como o aldrin, dieldrin, atrazina, carbofurano, diuron, epoxiclonazol, fipronill, imazetapir, propanil, piraclostrobina, tebuconazol, agrotóxicos usados principalmente na lavoura arrozeira e fármacos utilizados pela comunidade local como o prednisona, cafeína, diclofenaco, atenolol e a fluoxetina.

Esses contaminantes emergentes se apresentam em amostras de água numa baixa concentração, sendo necessário o uso de técnicas de pré-concentração para a determinação desses compostos. A técnicas de preparo de amostras utilizada é a Extração em Fase Sólida (SPE, do Inglês *Solid Phase Extraction*).

Na área de análise de contaminantes, técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para a determinação de compostos orgânicos, fazendo parte de um importante grupo de métodos de separação, que permite isolar, identificar e quantificar substâncias, mesmo em misturas complexas. O método cromatográfico que será utilizado para identificar e quantificar os resíduos em amostras de água será a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa, GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometer*) e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série UHPLC-MS/MS (do inglês, *Ultra High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometer*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

✓ Desenvolver e validar método analítico para avaliar a presença de agrotóxicos e fármacos em amostras de água.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Selecionar os analitos que serão analisados nas amostras de água;
- ✓ Identificar os compostos selecionados e os riscos para o meio ambiente.
- ✓ Validar o método empregando SPE e análise por GC-MS e UHPLC-MS/MS para determinação dos contaminantes emergentes em água;
- ✓ Demonstrar a aplicabilidade do método validado na determinação de agrotóxicos e fármacos em água de lagoa e de rio.
- ✓ Estudar e verificar a existência de contaminantes orgânicos sintéticos oriundos de agrotóxicos e fármacos em amostras de água.
- ✓ Utilizar para preparo de amostra a técnica de extração em fase sólida (SPE) e posterior análise dos compostos por GC-MS e UHPLC-MS/MS.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Água no planeta

O termo “água” refere-se, regra geral, ao elemento natural, desvinculado de qualquer uso ou utilização. Por sua vez, o termo “recurso hídrico” é a consideração da água como bem econômico passível de utilização com tal fim. Entretanto, deve-se ressaltar que toda a água da Terra não é, necessariamente, um recurso hídrico, na medida em que seu uso ou utilização nem sempre tem viabilidade econômica (REBOUÇAS, 2006).

A superfície Terrestre é coberta por aproximadamente 71% de água e o restante por superfície de terra. Nessa porcentagem de água, 97% pertencem aos oceanos, 2% as geleiras e 1% aos rios, lagos e fontes subterrâneas (ANA, 2007). A classificação mundial das águas, feita com base nas suas características naturais, designa como “água doce” aquela que apresenta teor de sólidos totais dissolvidos (STD) inferior a 1.000 mg L^{-1} . As águas com STD entre 1.000 e 10.000 mg L^{-1} são classificadas como “salobras” e aquelas com mais de 10 mil mg/L são consideradas salgadas (REBOUÇAS, 2006).

A legislação ambiental em vigor, Resolução Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357/2005, classifica as águas do território brasileiro, de acordo com a sua salinidade, em “água doce” (salinidade inferior ou igual a 0,5%), “salobra” (salinidade entre 0,5 e 30%) e “salina” (salinidade superior a 30%) (CONAMA, 2005).

Nessa classificação, os oceanos possuem água salgada e apenas os rios, lagos, represas e outras fontes possuem águas captadas para consumo humano. Desta forma, é um dos fatores que possibilita a vida no Planeta Terra. E ainda a água é um dos principais componentes da biosfera.

Na Biosfera, existem diversos ecossistemas, ou seja, diversos ambientes na Terra que são habitados por seres vivos das mais variadas formas e tamanhos. Às vezes, é esquecido que todos esses seres vivos têm em comum a água presente na sua composição (CERQUEIRA, 2012).

O Brasil possui uma localização privilegiada no conjunto de países de dimensões continentais, do qual fazem parte o Canadá, Estados Unidos da América, China e Austrália, por ter um clima tropical dominante (REBOUÇAS, 2006). Em apenas cerca de 10 % da área do Brasil tem-se condição climática semi-árida e 7% situam-se abaixo do Trópico de Capricórnio. Com isso, mais de 90% do território brasileiro recebe abundante quantidade de chuvas (entre mil e três mil mm ano⁻¹). As condições de clima semi-árido ficam restritas ao sertão da Região Nordeste, cuja pluviometria é muito irregular e fica entre 500 e 800 mm ano⁻¹.

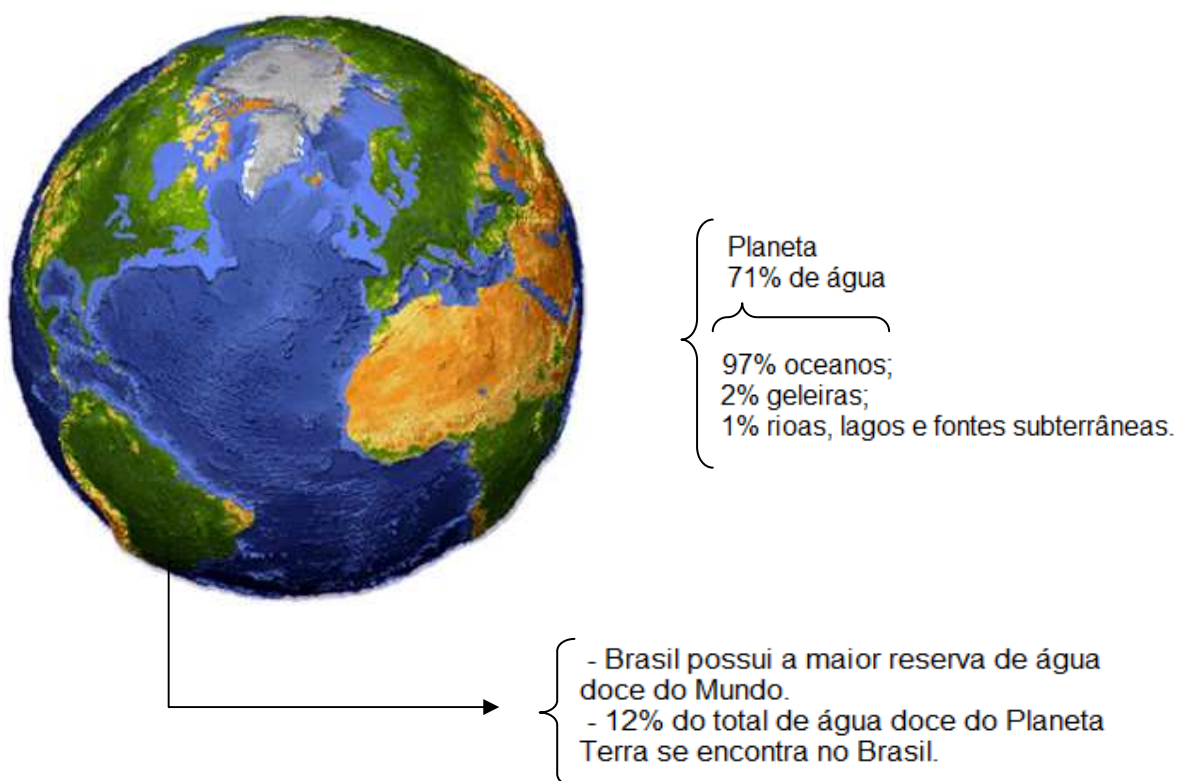


Figura 1: Distribuição de água no planeta (Imagem: <http://www.guiageo-mapas.com/globos.htm>).

3.2 Águas superficiais e subterrâneas

A maior parte da água doce disponível no planeta Terra encontra-se no subsolo, sendo que metade dessa água encontra-se a profundidades que excedem um quilômetro (BAIRD, 2002). A denominação “águas subterrâneas” para as águas de subsolo (REBOUÇAS, 2006) foi utilizada a partir da década de 1960.

As condições de ocorrência das águas subterrâneas numa região resultam ser muito variada, à medida que dependem da interação de fatores climáticos, muito irregulares no espaço e no tempo, e de fatores geológicos, cuja variabilidade também é muito grande e depende da escala da área de estudo (REBOUÇAS, 2006).

Abaixo da superfície da Terra ocorrem vários tipos de águas, como a água do solo, da camada não-saturada do subsolo, da camada saturada. Uma fração de água que infiltra na superfície das terras vai constituir a umidade do solo, a qual é suporte fundamental da biomassa vegetal e interface atmosfera/litosfera (REBOUÇAS, 2006). O excedente de água infiltrada percola em profundidade, alimentando a umidade do subsolo não-saturado. O solo e subsolo não-saturados são sede dos processos de filtração e biogeoquímicos que proporcionam a autodepuração da parcela da água que alimenta a zona saturada. Por sua vez, a água subterrânea da zona saturada circula lentamente no subsolo, uma parcela desse fluxo deságua na superfície de terrenos, formando as fontes, olhos de águas, abastecendo poços e outras obras de captação. Outra parcela do fluxo de água da zona saturada deságua em rios, tornando-os permanentes durante os períodos de precipitação atmosférica (REBOUÇAS, 2006).

As águas do subsolo têm sido consideradas como uma forma pura de água. Devido a sua filtração através do solo e ao longo tempo de permanência no subsolo, ela contém uma quantidade muito menor de matéria orgânica natural e menos microrganismos causadores de doenças que as águas dos rios e lagos (BAIRD,

2002). No entanto, nas últimas décadas, as atividades antrópicas têm comprometido significativamente alguns aquíferos. Entre as principais fontes de poluição das águas subterrâneas pode-se citar o uso de insumos agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes (ANA, 2007).

3.3 Qualidade da água

A água contém variados componentes que lhe são conferidos pelos ambientes de origem (REBOUÇAS, 2006) e a determinação de sua qualidade é representada por um conjunto de características, estimáveis, de naturezas químicas, físicas e biológicas. Sendo um recurso indispensável, foram institucionalizadas restrições legais de uso para a sua proteção. Desta forma, as características físicas e químicas da água devem ser mantidas dentro de certos limites, os quais são representados por padrões, valores orientadores da qualidade de água, dos sedimentos e da biota (Resoluções Conama nº 357/2005, Conama nº 274, Conama nº 344/2004, e Portaria N°518, do Ministério da Saúde) (INEA, 2012).

Os ecossistemas aquáticos, ao longo do tempo, incorporam substâncias provenientes de causas naturais, sem a contribuição humana, em concentrações raramente elevadas que, no entanto, podem afetar o comportamento químico da água e seus usos mais relevantes.

Entretanto, as mudanças climáticas, o aumento da população e a ação antrópica têm modificado as características dos corpos d'água. Variadas substâncias que são lançadas em decorrência da ocupação e do uso do solo resultam em sérios problemas de qualidade de água, que demandam investigações e investimentos para sua recuperação (INEA, 2012).

Embora as preocupações estejam voltadas para a poluição das águas superficiais de rios e lagos, a contaminação das águas subterrâneas por produtos

químicos não era reconhecida como um problema sério até os anos 80, muito embora já viesse ocorrendo há cerca de meio século (BAIRD, 2002). Essa ocorrência tem-se agravado principalmente pelo aumento do uso de produtos como agrotóxicos e o descarte inadequado desses produtos que por meio de lixiviação são transportados até os corpos d'água.

3.4 Contaminantes emergentes

O termo contaminante emergente surgiu para determinar compostos recentemente desenvolvidos (LAPWORTH *et al.*, 2012) ou que já estavam presentes no meio ambiente por um longo tempo e só agora estão sendo relatados e, portanto, eles geralmente não são incluídos na legislação (MORAZ *et al.*, 2007). Os contaminantes emergentes são um grupo grande e relativamente novo de compostos não regulados, cujos efeitos são relativamente desconhecidos (MURRAY, 2010).

Esses contaminantes incluem uma variedade de compostos, tais como produtos farmacêuticos, e produtos de cuidados pessoais (PPCPs), de regulação endócrina, produtos químicos, poluentes orgânicos persistentes (POPs), os nanomateriais, entre outros (YAO *et al.*, 2011).

Esses compostos entram no ambiente a partir de um número de fontes e vias: águas residuais, efluentes de estações de tratamento municipais (HEBERER *et al.*, 2004; KOLPIN *et al.*, 2002), fossas sépticas (VERSTRAETEN *et al.*, 2005; SWARTZ *et al.*, 2006), efluentes hospitalares (KÜMMERER, 2009), pecuária, incluindo lagoas de resíduos e aplicação de estrume ao solo (WATANABE *et al.*, 2010), chorume resíduos domésticos e industriais.

3.4.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são comercialmente encontrados como defensivos agrícolas ou agroquímicos, ou ainda, como produtos fitossanitários e fitofarmacêuticos. São enunciados segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) como substâncias destinadas a barrar a ação de insetos, ácaros, fungos, bactérias, ervas daninhas, roedores, entre outros. Os agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar (SPADOTTO, 2004). São utilizadas nas florestas nativas e plantadas, nos ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e nas pastagens para a pecuária, sendo também empregados nas campanhas sanitárias para o combate a vetores de doenças (PERES, 2003).

O uso de agrotóxicos nas lavouras e no controle de pragas é muito antigo. O registro mais antigo de seu uso vem da civilização do sul da Mesopotâmia, os sumérios, que em 2.500 ac. utilizavam enxofre para eliminar insetos. Após esse fato, os romanos misturaram óleo ao enxofre, transformando-o em um repelente. No ano de 79 dc. o arsênio também foi usado como inseticida e no século XIV o mercúrio teve sua presença marcada no controle de pragas (BARBOSA, 2004).

Com o avanço da tecnologia e práticas agrícolas no século XIX, a presença de insetos, fungos, bolores, roedores nas plantações aumentaram. Desde então, os estudos e o uso de uma grande variedade de defensivos agrícolas tem tomado conta das lavouras. Nesta época surgem novos estudos no controle de pragas e compostos inorgânicos passam a serem utilizados. O cobre, zinco, mercúrio, ácido cianídrico ganham destaques no uso em parreirais e plantações de frutas cítricas.

Ainda nessa época, durante a segunda guerra mundial, foram desenvolvidos novos agrotóxicos com o objetivo de proteger os soldados das doenças transmitidas

por pragas que habitavam os locais onde viraram campos de batalhas. Anos depois desse ocorrido os efeitos nocivos começam a surgir, trazendo gravíssimas consequências para a saúde pública.

Mais tarde, os agrotóxicos ganham força nas lavouras de todo o Mundo e são abusivamente usados nas lavouras para aumentar a produtividade, os lucros e a garantir um produto com ótima aparência.

3.4.2 Fármacos

O termo "fármacos" abrange uma classe complexa de compostos amplamente utilizados. Milhares de medicamentos com princípios ativos de diferentes moléculas são usados diariamente pela população com finalidades variadas. Algumas pessoas utilizam para prevenir e tratar diversas patologias e com isso consomem anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, analgésicos, antidepressivos, entre outros.

Nos últimos anos tem surgido preocupações sobre a presença e os possíveis efeitos nocivos de princípios ativos de produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs) no ambiente (GARCIA *et al.*, 2013). Vários estudos têm demonstrado efeitos adversos de longa data, de baixa dose de exposições, tanto aquática e da vida selvagem terrestre, a toxicidade em humanos relacionada aos níveis de produtos farmacêuticos no abastecimento de água ainda é pouco conhecido (GARCIA *et al.*, 2013).

Estes compostos são introduzidos no meio ambiente, principalmente através de águas residuais de efluentes de estações de tratamento de efluentes municipais, hospitalares e atividades agropecuárias (GARCIA *et al.*, 2013). Esses efluentes são descarregados nos rios, lagos e acabam sendo espalhados também sobre o solo.

Desta forma, estes compostos podem contaminar todos os compartimentos ambientais.

3.5 Produção e uso de agrotóxicos

O uso de compostos orgânicos para o controle de pragas é muito antigo. Existem registros do ano de 400 a.C., no Irã, usava-se pó da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium* para o controle de piolhos (BARBOSA, 2004). Mais tarde, em 1849, descobriu-se que o pó da planta continha piretrinas, constituintes químicos responsáveis pela atividade inseticida dessa planta (BARBOSA, 2004).

Foi durante a Segunda Guerra Mundial que os agrotóxicos ganharam força. Na tentativa de controlar as pragas e proteger os soldados delas, foram criados variados pesticidas sintéticos (BARBOSA, 2004).

Desde então, o uso de agrotóxicos foi crescendo e a descoberta de novos compostos também.

O crescimento demográfico Mundial, estimado em 6,9 bilhões de habitantes (ONU, 2012), aumenta a preocupação com a produção de alimentos para atender a esse crescimento. A solução mais viável para a agricultura foi aumentar a produtividade por hectare (BARBOSA, 2004). Nessa perspectiva, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias agrícolas, o uso de fertilizantes, produtos transgênicos e o aumento no uso de agrotóxicos.

A introdução de agrotóxicos organossintéticos no Brasil teve início em 1943, quando chegaram as primeiras amostras do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Desde então, o consumo de agrotóxicos no Brasil foi crescendo, chegando à cerca de 307 mil toneladas de produtos comerciais em 1998, formulados com cerca

de 250 ingredientes ativos. Expresso em quantidade de ingrediente ativo (i.a.), o consumo passou de 16 mil toneladas em 1964 para mais de 128 mil toneladas em 1998; enquanto a área ocupada com lavouras agrícolas no Brasil, em 1960, foi de 28 milhões de hectares (ha) e de aproximadamente 50 milhões ha em 1998. Portanto, as áreas com culturas agrícolas aumentaram 78% enquanto o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700% neste período (SPADOTTO *et al.*, 2004).

O consumo de agrotóxicos, no Brasil, varia com o tipo de cultura e a região onde são cultivadas. As regiões que mais utilizam defensivos agrícolas são Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Em termos de quantidade total de ingredientes ativos, as culturas agrícolas brasileiras nas quais mais se utilizam agrotóxicos no ano de 1998 eram: soja, milho, citros, cana-de-açúcar, conforme pode ser observado na Tabela 1. Já a Tabela 2 apresenta uma relação de variadas culturas que receberam agrotóxicos em 2011 (ANVISA, 2011).

Tabela 1: Relação de cultura e quantidade de agrotóxico.

Cultura Agrícola	Quantidade (ton)	Participação (%)
Soja	42.015	32,6
Milho	15.253	11,8
Citros	12.672	9,8
Cana-de-açúcar	9.817	7,6
Café	8.780	6,8
Batata	5.122	4
Algodão	4.851	3,8
Arroz Irrigado	4.241	3,3
Feijão	4.199	3,3
Tomate	3.359	2,6
Total	128.712	

Fonte dos dados: SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola).

Tabela 2: Relação de agrotóxicos autorizados e não autorizados, utilizados nas culturas e os índices de valores limite máximo permitido.

Produto	Nº de amostras analisadas	Não Autorizado para Cultura (NA)		Acima do Limite Máximo (>LMR)		>LMR e NA		Total de Insatisfatório	
		Nº	1 %	Nº	2 %	Nº	3 %	Nº	(1+2+3) %
Pimentão	165	107	64.80%	5	3.00%	20	12.10%	132	80.00%
Uva	165	58	35.20%	14	8.50%	21	12.70%	93	56.40%
Pepino	146	75	51.40%	3	2.10%	2	1.40%	80	54.80%
Morango	128	49	38.30%	11	8.60%	5	3.90%	65	50.80%
Couve	129	42	32.60%	8	6.20%	7	5.40%	57	44.20%
Abacaxi	145	41	28.30%	15	10.30%	8	5.50%	64	44.10%
Mamão	170	36	21.20%	22	12.90%	8	4.70%	66	38.80%
Alface	138	52	37.70%	0	0.00%	1	0.70%	53	38.40%
Tomate	144	45	31.30%	0	0.00%	2	1.40%	47	32.60%
Beterraba	172	55	32.00%	0	0.00%	0	0.00%	55	32.60%
Arroz	162	43	26.50%	0	0.00%	1	0.00%	44	27.20%
Cenoura	165	41	24.80%	0	0.00%	0	0.00%	41	24.80%
Repolho	166	34	20.50%	0	0.00%	0	0.00%	34	20.50%
Cebola	160	26	16.30%	0	0.00%	0	0.00%	26	16.30%
Laranja	146	14	9.60%	1	0.70%	0	0.00%	15	10.30%
Manga	160	12	7.50%	1	0.60%	0	0.00%	13	8.10%
Maçã	170	6	3.50%	3	1.80%	0	0.00%	9	5.30%
Banana	170	3	1.80%	3	1.80%	0	0.00%	6	3.50%
Feijão	164	3	1.80%	2	1.20%	0	0.00%	5	3.00%
Batata	165	2	1.20%	0	0.00%	0	0.00%	2	1.20%

Fonte dos dados ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011).

A Tabela 2 apresenta o uso de agrotóxicos não autorizados (NA) para algumas culturas e o uso de aditivos acima do limite máximo permitido e faz uma relação entre esses dados. Está organizada em ordem decrescente, com isso observa-se que as culturas que ocupam as primeiras posições na tabela são as que mais recebem agrotóxicos e os não autorizados.

Essas informações salientam a importância do monitoramento no uso desses aditivos como também o monitoramento da contaminação dos recursos hídricos e do solo das regiões de cultivo.

3.6 Exposição ambiental aos contaminantes

Os contaminantes emergentes são classificados em grupos em função de sua estrutura, propriedade química, ação de seus mecanismos tóxicos e nas características e condições ambientais em que se encontram. Foram sintetizados para controlar ou eliminar insetos, microorganismos, animais, plantas, tratar doenças ou infecções, mas determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode então atingir não só os organismos que se esperam controlar, como também outros seres do ambiente (SPADOTTO, 2004).

As condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos do solo, propriedades físicas e composição química do solo, presença ou ausência de plantas, localização da área na topografia e práticas de manejo do solo podem também afetar o destino de agrotóxicos e outros contaminantes no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água que se move na superfície e no perfil do solo têm um grande impacto no movimento dos agrotóxicos (SPADOTTO, 2004).

A grande utilização de agrotóxicos no processo de produção agropecuária, entre outras aplicações, tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, seja pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõem, seja pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos etc.) (PERES, 2003).

Outro fator que contribui para a contaminação são os processos de transporte entre compartimentos ambientais (SPADOTTO, 2004). A lixiviação e o escoamento

superficial são os destaques para esses processos. O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais, com os contaminantes sendo transportados adsorvidos às partículas do solo erodido ou em solução na água de escoamento. A lixiviação desses contaminantes através do solo tende a resultar em contaminação das águas subterrâneas e neste caso, as substâncias químicas são carregadas juntamente com a água que alimenta os aquíferos (SPADOTTO, 2004).

A contaminação dos recursos hídricos é de grande preocupação, pois se uma região agrícola, onde se utiliza uma grande quantidade ou variedade de agrotóxicos, estiver localizada próxima a um manancial hídrico que abasteça uma cidade, a qualidade da água ali consumida estará seriamente sob o risco de uma contaminação, embora a mesma possa estar localizada bem distante da região agrícola. Assim, não só a população residente próxima à área agrícola estaria exposta aos agrotóxicos, mas também toda a população da cidade abastecida pela água contaminada (PERES, 2003).

Um outro impacto causado por alguns agrotóxicos em mananciais d'água diz respeito à modificação da biota (SPADOTTO, 2004; PERES, 2003) com a seleção das espécies mais resistentes e à contaminação de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos (e marinhos). A acumulação desses produtos, nos animais, que habitam as águas contaminadas podem se constituir uma ameaça para a saúde humana através da biomagnificação (VALARINI *et al.*, 2003), que é o aumento na concentração de um contaminante a cada nível da cadeia alimentar. A contaminação em peixes, crustáceos e moluscos, representa uma importante fonte de contaminação humana (PERES, 2003) e pode também acumular nos organismos expostos. Os agrotóxicos podem ser agentes mutagênicos (são agentes físicos, químicos ou biológicos com exposição às células, podem causar mutação; ocasionando um dano na molécula de DNA, caso não seja reparado no momento da replicação celular é passado para as gerações seguintes), teratogênicos (são malformações e anomalias ligadas a uma perturbação do desenvolvimento embrionário ou fetal), carcinogênicos (são agentes físicos ou biológicos que

provoquem, agravem ou sensibilizem o organismo para o surgimento de um câncer), e afetar a reprodução de mamíferos (SPADOTTO, 2004).

3.7 Legislação para a água

De acordo com a Lei Federal no 7.802, em seu Artigo 2, Inciso I, que trata sobre esse grupo de substâncias/agentes no país: Agrotóxicos e afins são os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1988).

A vasta utilização de agrotóxicos no processo de produção agropecuária tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente (PERES, 2003). Com isso a Portaria Ministério da Saúde (MS) Nº 2914 de 2011, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011).

Essa portaria estabelece conjuntos de padrões de qualidade para a água para consumo humano. Dentre eles, padrões microbiológicos, turbidez, odor, pH e padrões de potabilidade para substâncias químicas que apresentam riscos para a saúde, essas substâncias são apresentadas com valores máximos permitidos (VMP), Tabela 3.

Tabela 3: Tabela de padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde e constam na Portaria do ministério da Saúde 2914/11.

Parâmetro	CAS	Unidades	VMP
INORGÂNICAS			
Antimônio	7440-36-0	mg L ⁻¹	0,005
Arsênio	7440-38-2	mg L ⁻¹	0,01
Bário	7440-39-3	mg L ⁻¹	0,7
Cádmio	7440-43-9	mg L ⁻¹	0,005
Chumbo	7439-92-1	mg L ⁻¹	0,01
Cianeto	57-12-5	mg L ⁻¹	0,07
Cobre	7440-50-8	mg/L	2
Cromo	7440-47-3	mg L ⁻¹	0,05
Fluoreto	7782-41-4	mg L ⁻¹	1,5
Mercúrio	7439-97-6	mg L ⁻¹	0,001
Níquel	7440-02-0	mg L ⁻¹	0,07
Nitrato (como N)	14797-55-8	mg L ⁻¹	10
Nitrito (como N)	14797-65-0	mg L ⁻¹	1
Selênio	7782-49-2	mg L ⁻¹	0,01
Urânio	7440-61-1	mg L ⁻¹	0,03
ORGÂNICA			
Acrilamida	79-06-1	µg L ⁻¹	0,5
Benzeno	71-43-2	µg L ⁻¹	5
Benzeno[a]pireno	50-32-8	µg L ⁻¹	0,7
Cloreto de Vinila	75-01-4	µg L ⁻¹	2
1,2 Dicloroetano	107-06-2	µg L ⁻¹	10
1,1 Dicloroetano	75-35-4	µg L ⁻¹	30
1,2 Dicloroetano (cis + trans)	156-59-2	(cis) µg L ⁻¹	50
	156-60-5 (trans)	µg L ⁻¹	10
Diclorometano	75-09-2	µg L ⁻¹	20
Di(2-etilhexil) ftalato	117-81-7	µg L ⁻¹	8
Estireno	100-42-5	µg L ⁻¹	20
Pentaclorofenol	87-86-5	µg L ⁻¹	9
Tetracloroeto de Carboco	56-23-5	µg L ⁻¹	4
Tetracloroetano	127-18-4	µg L ⁻¹	40
Triclorobenzenos	1,2,4-TCB(120-82-1)	µg L ⁻¹	20
	1,3,5-TCB (108-70-3)		
	1,2,3-TCB (87-61-6)		
Tricloroetano	79-01-6	µg L ⁻¹	20

AGROTÓXICOS

2,4 D + 2, 4, 5 T	94-75-7 (2,4 D)	$\mu\text{g L}^{-1}$	30
	93-76-5 (2,4,5 T)		
Alaclor	15972-60-8	$\mu\text{g L}^{-1}$	20
Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfóxido	116-06-3 (aldicarbe)		
	1646-88-4 (aldicarbesulfona)	$\mu\text{g L}^{-1}$	10
	1646-87-3 (albicarbe sulfóxido)		
Aldrin + Dieldrin	309-00-2 (aldrin)	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,03
Atrazina	1912-24-9	$\mu\text{g L}^{-1}$	2
Carbendazim + benomil	10605-21-7 (carbendazim)	$\mu\text{g L}^{-1}$	120
	17804-35-2 (benomil)		
Carbofurano	1563-66-2	$\mu\text{g L}^{-1}$	7
Clordano	5103-74-2	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,2
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	2921-88-2 (clorpirifós)	$\mu\text{g L}^{-1}$	30
	5598-15-2 (clorpirifós-oxon)		
	60-57-1 (dieldrin)		
	p, p'-DDT (50-29-3)		
	p,p'-DDD (72-54-8)	$\mu\text{g L}^{-1}$	1
DDT+DDD+DDE	p,p'-DDE (72-55-9)		
Diuron	330-54-1	$\mu\text{g L}^{-1}$	90
	115-29-7; I		
Endossulfan (α β e sais)	(959-98-8); II	$\mu\text{g L}^{-1}$	20
	(33213-65-9); sulfato (1031-07-8)		
Endrin	72-20-8	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,6
Glifosato + AMPA	1071-83-6 (glifosato)		
	1066-51-9 (AMPA)	$\mu\text{g L}^{-1}$	500
Lindano (gama HCH)	58-89-9	$\mu\text{g L}^{-1}$	2
Mancozebe		$\mu\text{g L}^{-1}$	180
Metamidofós	10265-92-6	$\mu\text{g L}^{-1}$	12
Metolacoloro	51218-45-2	$\mu\text{g L}^{-1}$	10
Molinato	2212-67-1	$\mu\text{g L}^{-1}$	6
Parationa Metílica	298-00-0	$\mu\text{g L}^{-1}$	9
Pendimentalina	40487-42-1	$\mu\text{g L}^{-1}$	20
Permetrina	52645-53-1	$\mu\text{g L}^{-1}$	20
Profenofós	41198-08-7	$\mu\text{g L}^{-1}$	60
Simazina	122-34-9	$\mu\text{g L}^{-1}$	2
Tebuconazol	107534-96-3	$\mu\text{g L}^{-1}$	180
Terbufós	13071-79-9	$\mu\text{g L}^{-1}$	1,2
Trifluralina	1582-09-8	$\mu\text{g L}^{-1}$	20

DESINFETANTES E PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA DESINFECÇÃO			
Ácidos haloacéticos total		mg L ⁻¹	0,08
Bromato	15541-45-4	mg L ⁻¹	0,01
Clorito	7758-19-2	mg L ⁻¹	1
Cloro residual livre	7782-50-5	mg L ⁻¹	5
Cloraminas Total	0599-903	mg L ⁻¹	4
2, 4, 6 Triclorofenol	88-06-2	mg L ⁻¹	0,2
Trihalometanos Total		mg L ⁻¹	0,1

Dos compostos que fazem parte deste estudo na tabela 3 constam apenas o aldrin, dieldrin, diuron, carbofurano e tebuconazol. Para o aldrin e dieldrin os valores considerados para os limites permitidos são o somatório dos dois. No entanto, esta portaria não contempla a maioria dos agrotóxicos que estão sendo usados atualmente e não engloba os fármacos residuais. Esses compostos, ainda não são considerados, pela atual legislação, como sendo poluentes e não existe legislação no Brasil que trate sobre os fármacos e estudos dos possíveis efeitos ainda não foram avaliados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CRESTANA *et al.*, 2011).

Em termos de legislação mundial, a mais rígida foi estabelecida pela Comunidade Econômica Européia (EEC, *do inglês European Economic Community*), onde consta que a concentração máxima permitida para cada agrotóxicos é de 0,1 µg L⁻¹ (EEC DRINKING WATER DIRECTIVE, 1980). Já a Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos (Usepa – *do inglês United States Environmental Protection Agency*) estabelece os níveis máximos para cada agrotóxico em água para consumo humano baseados nos estudos epidemiológicos e toxicológicos (VEIGA, 2006). Pegar direto a referencia da comunidade européia.

De acordo com a Legislação Brasileira, os serviços de saúde são os responsáveis pelo correto gerenciamento de todos os resíduos sólidos dos serviços de saúde (RSSS) por eles gerados (CRESTANA *et al.*, 2011). O gerenciamento eficiente de RSSS é um assunto que necessita de uma legislação e diretrizes mais específicas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da

Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 306, de 7 de dezembro de 2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde e, pela Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005, apresenta algumas diretrizes para o tratamento e à disposição final dos resíduos dos serviços de saúde (EICKHOFF *et. al.*, 2009).

O Ministério da Saúde publicou, em 2006, um Manual de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde, o qual mostra a necessidade da adoção de um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Mas esse manual não aponta soluções para a destinação final de medicamentos. E a lei não engloba a população em geral, somente os estabelecimentos de saúde.

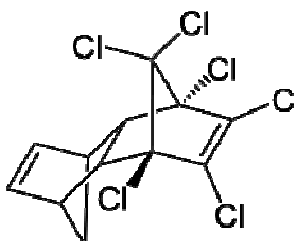
3.8 Contaminantes selecionados no estudo

Os contaminantes para este estudo foram selecionados através de uma pesquisa. Os agrotóxicos usados nas lavouras foram pesquisados com os agricultores, nas agropecuárias e na EMATER/RS (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural). Os fármacos mais utilizados pela população foram pesquisados nas farmácias, ambos no município de Santo Antônio da Patrulha.

OS contaminantes emergentes escolhidos para este estudo são Aldrin, Dieldrin, escolhidos por serem orgânicos persistentes e proibido seu uso no Brasil desde 1992 (ANVISA, 2011); Atrazina, Carbofurano, Diuron, Epoxiconazol, Fipronil, Imazetapir, Propanil, Piraclostrobina, Tebuconazol escolhidos por serem utilizados nos cultivos locais; Atenolol, Cafeína, Diclofenaco, Fluoxetina, e Prednisona são alguns dos fármacos utilizados pela população local.

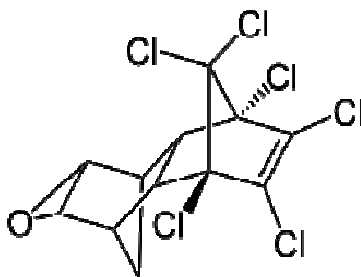
As especificações dos compostos a seguir foram obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003) e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

3.8.1 Aldrin



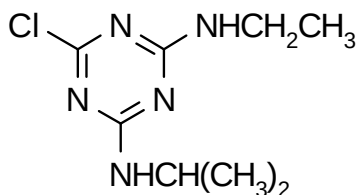
- Grupo Químico: Organoclorados
- Nome Químico (IUPAC): Hexacloro-herxaidro-exoendo-dimetano naftaleno
- Classe: Inseticida
- Fórmula molecular: $C_{12}H_8Cl_6$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 309 – 00 – 2
- Massa molar: $364,91 \text{ g mol}^{-1}$
- Log K_{ow} : 6,5
- Classe toxicológica: Classe II, altamente tóxico.
- Nomes comerciais: Agrichem[®], Aldersten EC 30[®], Aldocit[®], Aldrec[®], Aldrex[®], Aldrex 2[®], Aldrex 30[®], Aldrex 40[®], Aldrex 5[®], Aldrimul[®], Aldrin[®], Aldrin 1,25% Dust[®], Aldrin 30[®], Aldrin 40 EC/WP[®], Aldrin 50 WP[®], Aldrin dispersível[®], Aldrin técnico[®], Aldrine[®], Aldrine reis[®], Aldrine-Sandoz[®], Aldrite[®], Aldrosol[®], Algran[®], Alttox[®], Bangald[®], Compound 118[®], Drinox[®], Farmon Aldrin 30[®], Geigy 95[®], HHDN[®], Hortag Aldrin Dust[®], Kortofin[®], Murphy Aldrin Dust[®], Octalene[®], SD 2794[®], Seedrin[®], Socida[®], Solodrine[®], entre outros.

3.8.2 Dieldrin



- Grupo Químico: Organoclorados
- Nome Químico (IUPAC): 1,2,3,4,10,10-h exacloro-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-6,7-epoxi-1,4:5,8-dimetano-naftaleno
- Classe: Insetisida
- Fórmula molecular: $C_{12}H_8Cl_6O$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 60 – 57 - 1
- Massa molar: $380,909 \text{ g mol}^{-1}$
- Log K_{ow} : 5,37
- Classe toxicológica: Classe II, altamente tóxico.
- Nomes comerciais: Metabólito do Aldrin.

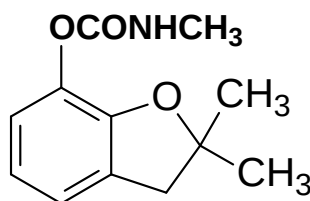
3.8.3 Atrazina



- Grupo Químico: Triazina
- Nome Químico (IUPAC): 6-cloro- N^2 -etil- N^4 -isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- Classe: Herbicida
- Fórmula molecular: $C_8H_{14}ClN_5$

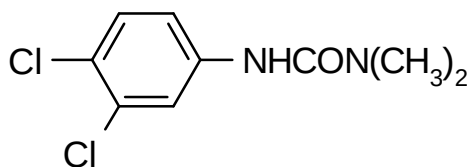
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 1912–24–9.
- Massa molar: 215,7 g mol⁻¹
- Log Kow: 2,5
- Classe toxicológica: Classe III, pouco perigoso.
- Nomes comerciais: Nortox[®], Atanor 50[®].

3.8.4 Carbofurano



- Grupo químico: Metilcarbamato de benzofuranila
- Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-metilcarbamato
- Classe: inseticida, nematicida
- Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO₃
- Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 1563-66-2
- Massa molar: 221,3 g mol⁻¹
- Log K_{ow}: 1,52
- Classe toxicológica: I, extremamente tóxico.
- Nomes comerciais: Carboran[®], Fersol[®], Diafuran[®], Furacarb[®], Ralzer[®], Furadan[®].

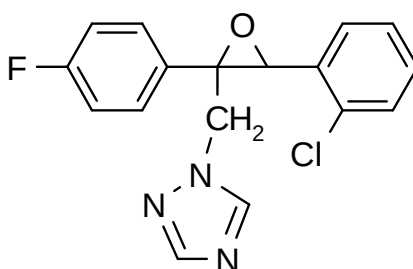
3.8.5 Diuron



- Grupo Químico: Uréia

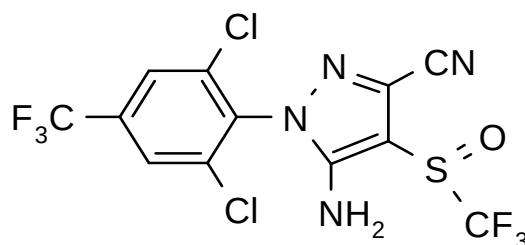
- Nome Químico (IUPAC): 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
- Classe: Herbicida
- Fórmula molecular: $C_9H_{10}Cl_2N_2O$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS):
- Massa molar: $233,1 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 2,85
- Classe toxicológica: Classe III, pouco perigoso.
- Nomes comerciais: Baron[®], Cañex[®], Cention[®], Crisuron[®], Monex[®], Sanduron[®], Toberbare[®], Vidiu[®]. Misturas: Amok[®], Anuron[®], Cottonex D[®], entre outros.

3.8.6 Epoxiconazol



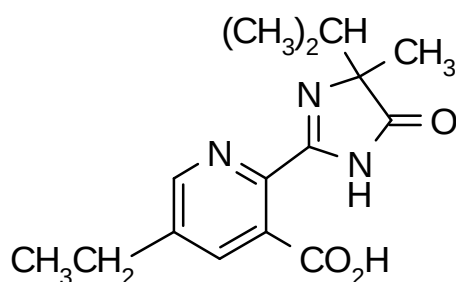
- Grupo Químico: Triazol
- Nome Químico (IUPAC): (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazol
- Classe: Fungicida
- Fórmula molecular: $C_{17}H_{13}ClFN_3O$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 106325-08-0
- Massa molar: $329,8 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 3,44
- Classe toxicológica: Classe III.
- Nomes comerciais: Swing[®]. Misturas: Duett[®], Eclipse[®], Juwel[®], Landmark[®], Mantra[®], entre outros.

3.8.7 Fipronil



- Grupo Químico: Fenil pirazol
- Nome Químico (IUPAC): (RS)-5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)-1H-pirazol-3 carbonitrila
- Classe: Inseticida, cupinicida.
- Fórmula molecular: $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 120068-37-3
- Massa molar: $437,2 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 4,0
- Classe toxicológica: Classe II, moderadamente perigoso.
- Nomes comerciais: Blitz[®], Chipco Choice[®], Cosmos[®], Frontlinev[®], Goliath[®], Icon[®], KB Guepes[®], Metis[®], Termidor[®], Texas[®], entre outros.

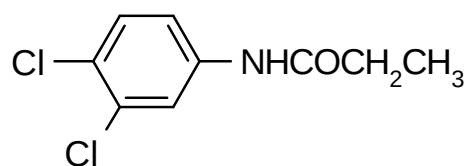
3.8.8 Imazetapir



- Grupo Químico: Imidazolinona
- Nome Químico (IUPAC): (rs) 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) ácido nicotínico

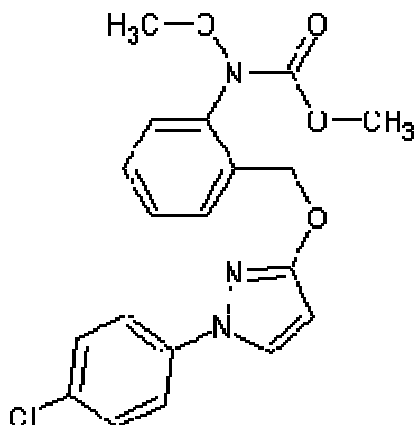
- Classe: Herbicida
- Fórmula molecular: $C_{15}H_{19}N_3O_3$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 81335-77-5
- Massa molar: $289,3 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 1,04
- Classe toxicológica: Classe III.
- Nomes comerciais: Wayup[®]. Misturas: Clean Sweep[®], Elite[®], Lightning[®], Odyssey[®], Pursuit Plus[®], Steel[®], entre outros.

3.8.9 Propanil



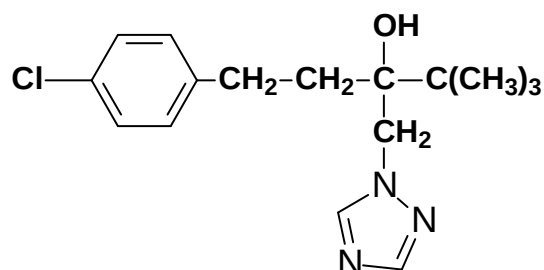
- Grupo Químico: Anilida
- Nome Químico (IUPAC): 3,4-dicloropropionanilida
- Classe: Herbicida
- Fórmula molecular: $C_9H_9Cl_2NO$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 709-98-8
- Massa molar: $218,1 \text{ g mol}^{-1}$
- Log K_{ow}: 3,3
- Classe toxicológica: Classe III.
- Nomes comerciais: Strel[®], Agropur[®], Herbax[®], Propanac[®], Propanex[®], Propanilo[®], Propax[®], Sorpur[®], Supernox[®], entre outros.

3.8.10 Piraclostrobina



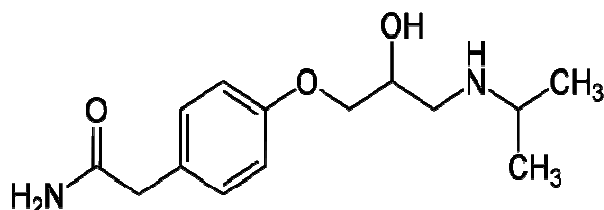
- Grupo Químico: Estrobilurina
- Nome Químico (IUPAC): methyl *N*-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl]oxymethyl]phenyl}(N-methoxy)carbamate
- Classe: Fungicida
- Fórmula molecular: C₁₉H₁₈ClN₃O₄
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 175013-18-0
- Massa molar: 387,7 g mol⁻¹
- Log Kow: 3,99
- Classe toxicológica: Classe II.
- Nome comercial: Opera[®].

3.8.11 Tebuconazol



- Grupo químico: triazol
- Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-3-pentanol
- Classe: fungicida
- Fórmula molecular: $C_{16}H_{22}ClN_3O$
- Número no CAS: 107534-96-3
- Massa molar: $307,8 \text{ g mol}^{-1}$
- Log K_{ow} : 3,7
- Classe toxicológica: IV, pouco tóxico
- Nomes comerciais: Elite[®], Folicur[®], Icarus[®].

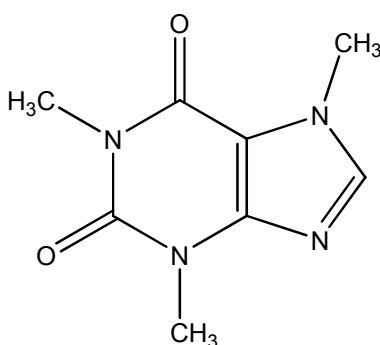
3.8.12 Atenolol



- Nome Químico (IUPAC): (RS)-2-[4-[2-hidroxi-3-(1-metiletilamino) propoxi] fenil] etanamida
- Classe: β -bloqueador.
- Fórmula molecular: $C_{14}H_{22}N_2O_3$

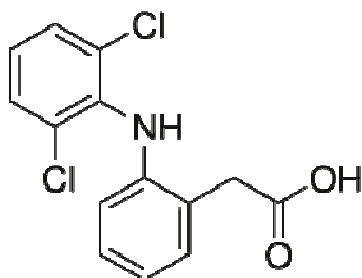
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 60966-51-0
- Massa molar: $266,34 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 0,23
- Nomes comerciais: Angipress[®], Atenolol[®], Angiless[®], Ablok[®], Atenolab[®], entre outros.

3.8.13 Cafeína



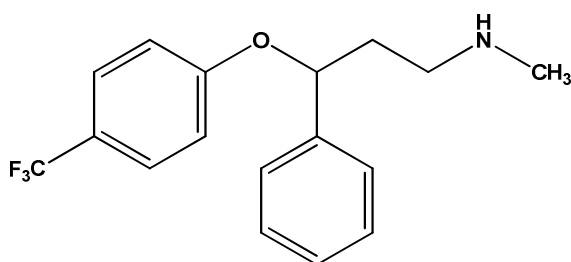
- Nome Químico (IUPAC): 1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona
- Classe: Alcalóide.
- Fórmula molecular: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 58-08-2
- Massa molar: $194,19 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 0,07
- Classe toxicológica: aguda.
- Nomes comerciais: presente em analgésicos, chocolate, cafés, chás, refrigerantes, alimentos, entre outros.

3.8.14 Diclofenaco



- Nome Químico (IUPAC): (2 - [2 - (2,6-diclorofenil)] ácido aminofenílico etanóico)
- Classe: Antiinflamatório.
- Fórmula molecular: $C_{14}H_{11}NCl_2O_2$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 15307-86-5
- Massa molar: $296,148 \text{ g mol}^{-1}$
- Log Kow: 4,51
- Classe toxicológica: aguda.
- Nomes comerciais: Voltaren®.

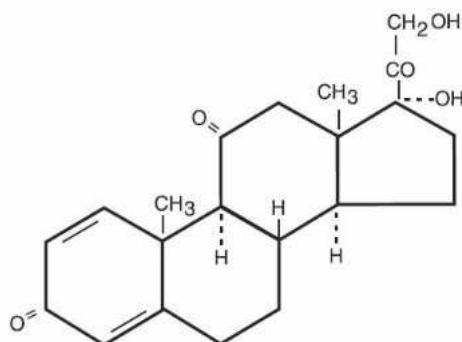
3.8.15 Fluoxetina



- Nome Químico (IUPAC): N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenoxi] propan-1-amina
- Classe: Antidepressivo
- Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}F_3NO$
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 54910-89-3
- Massa molar: $309,33 \text{ g/mol}$

- Log Kow: 3,82
- Classe toxicológica: aguda.
- Nomes comerciais: Prozac[®], Daforin[®], Sarafem[®].

3.8.16 Prednisona



- Nome Químico (IUPAC): 17-hydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl - 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - decahydro 3 Hcyclopenta [a] phenan threne - 3,11 (6H)-dione
- Classe: Corticóide
- Fórmula molecular: C₂₁H₂₈O₅
- Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 53-03-2
- Massa molar: 360,444 g mol⁻¹
- Classe toxicológica: aguda.
- Nomes comerciais: Meticorten[®], Predicorten[®].

Os agrotóxicos são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira (BAIRD, 2002). As diferentes classes de agrotóxicos estão agrupados na Tabela 4.

Tabela 4: Relação de tipo de agrotóxico e organismo alvo.

Tipo de Agrotóxico	Organismo alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Microorganismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematóides
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores

Os fungicidas são usados para controlar o crescimento de alguns tipos de fungos. O seu uso cresceu no controle de ervas daninhas em substituição às atividades diretas do cultivo da terra para essa finalidade (MANAHAN, 2013).

Os herbicidas são utilizados para matar ervas daninhas sem causarem prejuízo à vegetação desejável (BAIRD, 2002). Entre os diversos herbicidas existentes, os mais importantes contêm três átomos de nitrogênio heterocíclico em estrutura anelares, portanto, são chamados de triazinas (MANAHAN, 2013). As triazinas têm a função de inibirem a fotossíntese, a seletividade é dada pela incapacidade de as plantas-alvo metabolizarem e destoxificarem o composto (MANAHAN, 2013). Como é aplicado em várias culturas, torna-se um poluente aquático comumente encontrado nas regiões onde é utilizado.

Os agrotóxicos são produzidos com a finalidade de eliminar os insetos que se encontram nas lavouras. Seu uso mais antigo de que se tem registro é a queima de enxofre para fumigar os lares gregos cerca do ano 1000 a.C. (BAIRD, 2002). Durante a Segunda Guerra Mundial, foram desenvolvidos muitos inseticidas orgânicos (BAIRD, 2002), vindo a substituir os inorgânicos até então utilizados.

Muitos inseticidas organoclorados foram utilizados nas últimas décadas, mas hoje estão proibidos devido a seus níveis de toxicidade e, sobretudo sua acumulação e persistência em cadeias alimentares (MANAHAN, 2013).

Os contaminantes emergentes oriundos de fármacos presentes em mananciais, de modo geral, indicam a contaminação por águas residuária não tratadas por completo (MANAHAN, 2013). Os fármacos possuem uma variada categoria de substâncias com ingredientes ativos que incluem os antibióticos, analgésicos, antiinflamatórios, contraceptivos, β –bloqueadores, antidepressivos, entre outros.

Os contaminantes emergentes na análise de água são espécies que foram reconhecidas como contaminantes importantes recentemente e cujos efeitos de longo prazo não são muito conhecidos (MANAHAN, 2013).

Segundo Dezotti (2003), um ponto crítico neste tema é saber se existe um nível elevado dessas substâncias no meio ambiente, que seja suficiente para exercer efeitos adversos em seres vivos e a ocorrência desses fármacos residuais

em águas superficiais e de subsolo demonstra uma necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos desses fármacos frente ao meio ambiente.

Entre os impactos ambientais mais relevantes associados a esses contaminantes está a genotoxicidade, ou seja, a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos (GIL *et al.*, 2005).

3.9 Técnicas de extração e pré-concentração de contaminantes em água

O preparo de amostra é uma etapa importante na maioria das análises químicas, sobretudo nas análises de resíduos, nas quais os analitos se encontram em concentrações muito baixas, em nível de traços, $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} .

Com isso, a análise de resíduos de agrotóxicos em água é difícil, os analitos apresentam propriedades físico-químicas distintas e no caso de uma matriz complexa, na qual os compostos ocorrem em concentrações muito baixas e geralmente estão presentes altas concentrações de interferentes (LANÇAS, 2004a). O principal objetivo do preparo de amostra é promover a extração e, muitas vezes, a concentração dos analitos e a remoção dos interferentes, quando possível. Uma etapa muito importante, onerosa e demorada no processo analítico e pode introduzir erros, principalmente devido à perda do analito e a contaminação (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2009).

A técnica de preparo da amostra deve visar obtenção de resultados confiáveis e exatos, consumir quantidades mínimas de reagentes e solventes (JARDIM *et al.*, 2010).

3.9.1 Extração em fase sólida (SPE)

A Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) é uma técnica de separação líquido-sólido empregada com a finalidade de isolar os analitos de interesse contidos em uma matriz. Podendo, posteriormente, ser analisado em um método instrumental, como a cromatografia.

O desenvolvimento do SPE envolve a escolha das condições experimentais como seleção da fase sólida, do solvente da amostra e do solvente de eluição (LANÇAS, 2004a).

A técnica consiste basicamente no uso de um cartucho parecido com uma seringa (Figura 2), que é preenchido por um adsorvente. De acordo com LANÇAS (2004), dentro do cartucho o material de empacotamento fica retido entre dois discos (frits) de polietileno, sendo que a parte inferior do cartucho é afunilada e apresenta uma extensão que se encaixa em um dispositivo para efetuar o vácuo.

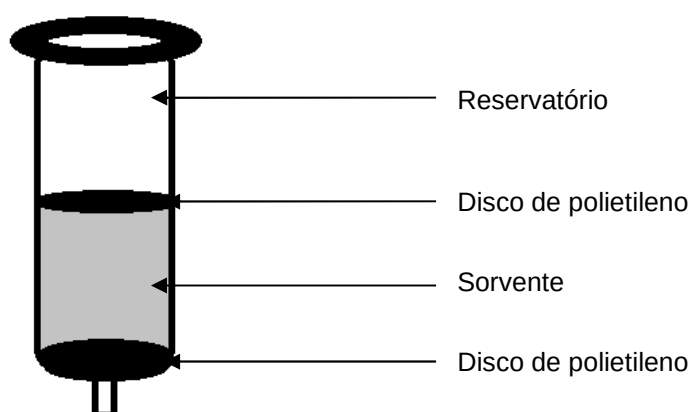


Figura 2: Ilustração de um cartucho utilizado em SPE.

A extração em fase sólida é a técnica mais utilizada atualmente na extração e pré-concentração de amostras ambientais de resíduos de contaminantes emergentes

e agrotóxicos, entre outros (PRIMEL *et al.*, 2005; RISSATO *et al.*, 2004; VEIGA *et al.*, 2006).

A Figura 3 apresenta a sequência das etapas da extração em fase sólida que incluem:

- (A) Condicionamento do sorvente,
- (B) Percolação da amostra,
- (C) Lavagem ou clean up,
- (D) Eluição dos analitos com solvente apropriado (LANÇAS, 2004a).

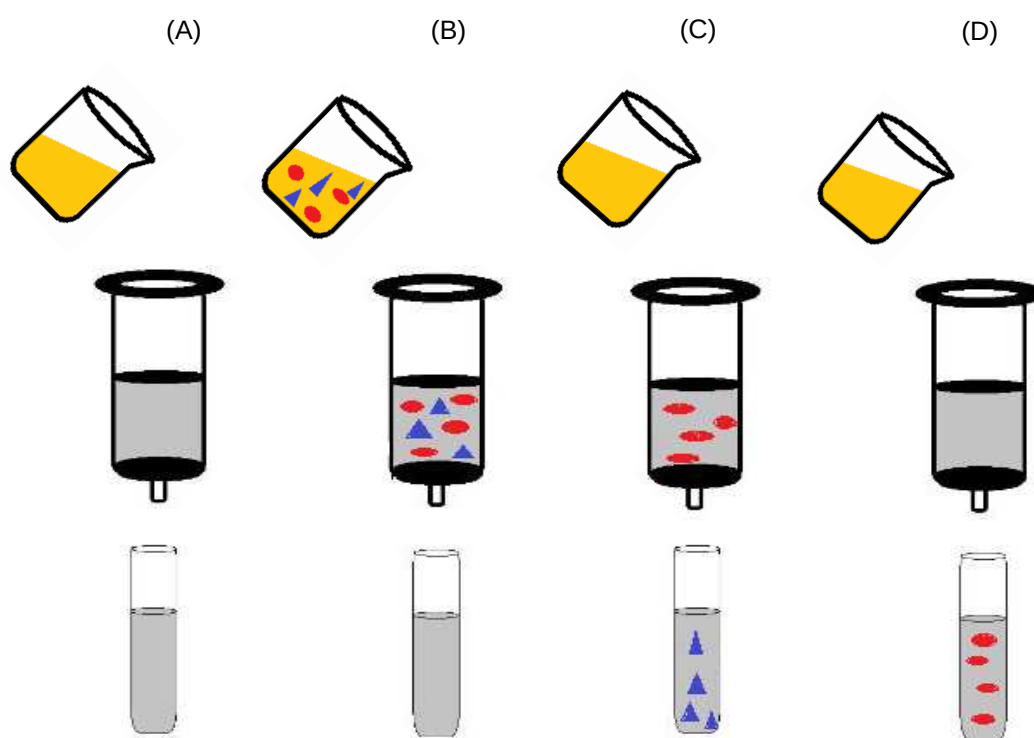


Figura 3: Ilustração das etapas realizadas na SPE.

A ativação do sorvente é por meio do condicionamento utilizando solventes apropriados para o material a ser ativado (C18, C8, CN, Sílica, entre outros) (LANÇAS, 2004a).

A percolação da amostra tem como finalidade a concentração dos analitos que é realizada passando a amostra através de um cartucho, auxiliado por vácuo. Nesta etapa os analitos ficam retidos no cartucho, deixando passar o restante da amostra com os interferentes (LANÇAS, 2004a).

De acordo com Lanças (2004a), a velocidade de percolação da amostra é importante e pode ser ajustada controlando o vácuo ou a pressão aplicada durante esta etapa. A etapa posterior, a limpeza ou clean up é fundamental para eliminar interferentes oriundos da matriz, os quais podem alterar os resultados no método analítico. Essa limpeza é realizada com solvente apropriado, que não possua força para carregar o analito. Para a extração de compostos orgânicos, agrotóxicos em amostras aquosas, usa-se principalmente água ultra-pura (CALDAS *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2007).

A etapa de eluição é realizada com um solvente capaz de remover os analitos do sorvente. Nessa etapa o ideal é a utilização de pequenos volumes de solvente para se obter um maior valor de pré-concentração. E assim, o volume eluído já pode ser analisado nos instrumentos adequados. O uso do SPE é muito comum na análise de amostras ambientais, na qual geralmente os contaminantes encontram-se muito diluídos (LANÇAS, 2004a).

As fases sólidas de separação utilizadas na SPE são similares aos empregados na cromatografia líquida, desta forma os mecanismos de separação também são similares, como: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho (LANÇAS, 2004a).

Os responsáveis pela retenção na SPE são os adsorventes contidos nos cartuchos. Materiais como sílica gel, alumina, silicato de magnésio (Florisil), carvão ativado, polímeros (estireno-divinil benzeno como XAD-2 e PRP-1) e fases baseadas

em sílica quimicamente ligadas, são amplamente empregadas na extração de fase sólida (LANÇAS, 2004a).

Os adsorventes mais usados na adsorção, são a sílica, a alumina e o silicato de magnésio - florisil®. A sílica é utilizada para aplicações gerais, enquanto florisil® é muito empregada em análise de pesticidas, no entanto este é o mais polar e assim poderá provocar adsorção irreversível do analito de interesse em sua superfície. A sílica gel possui uma superfície ligeiramente ácida que permite a retenção de compostos básicos, enquanto que a superfície básica da alumina é apropriada para a adsorção de compostos de caráter ácido (CARDOSO, 2011).

A SPE, utilizando materiais preparados para apresentarem o mecanismo de partição surgiu para evitar problemas de adsorção irreversível que ocorria na utilização de adsorventes polares em análise de compostos altamente polares. Quase todas as fases que utilizam esse mecanismo são preparadas a partir da sílica utilizada em processos de adsorção, onde geralmente a sílica reage com um derivado clorado do grupo siloxano, ligando o grupo alquílico (R) do reagente à estrutura básica da sílica. Na partição este mecanismo pode ocorrer de duas formas: fase reversa e fase normal. Na fase reversa, o sorvente é menos polar que o solvente de eluição; e na fase normal, o solvente é menos polar que o sorvente (LANÇAS, 2004a; CARDOSO, 2011)

A troca iônica é geralmente empregada para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em soluções aquosas. Os compostos básicos são usualmente retidos por intermédio de uma fase sólida, consistindo de um trocador forte de cátions (SCX) do tipo SO_3 aprisionado a estrutura básica da sílica, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions (SAX) do tipo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Dessa forma ocorrerá uma forte atração entre o analito e o trocador de íons de carga oposta. Os principais fatores que influenciam a separação por troca iônica são: pH, seletividade do contra-íon, força iônica, solvente e fluxo (LANÇAS, 2004a).

O mecanismo de separação que utiliza a exclusão por tamanho tem sido aplicado para eliminar compostos indesejáveis da amostra por intermédio de um mecanismo físico de separação, similar a uma filtração. A fase sólida é formada por um polímero (formado de unidades de glicose e epiclorigirina), cujo tamanho de poros é bem controlado, de forma a permitir a entrada de moléculas pequenas do analito e excluir as maiores indesejáveis, como por exemplo, proteínas (LANÇAS, 2004a).

De acordo com alguns estudos utilizando SPE, foi testada a eficiência de diferentes adsorventes OASIS HLB, Strata-X, Chromabond HR-X, Bakerbond Speedisk para determinação de fármacos em água do mar (WILLE *et al.*, 2010). O adsorvente Chromabond HR-X foi escolhido, pois obteve recuperações maiores que 70%.

Em outro estudo comparativo Lacey e colaboradores em 2008 testaram os adsorventes Strata-X, Supelco C8, Supelco C18, Oasis HLB, Varian Focus, LiChrolut-EN para determinação de 20 fármacos em água residual e efluentes de tratamento de esgoto. O adsorvente escolhido foi o Strata – X (CARDOSO, 2011).

De acordo com Cardoso, 2011, alguns trabalhos utilizando sorvente C18 para determinação de fármacos em diferentes matrizes aquosas podem ser encontrados na literatura. Stumpf e colaboradores em 1999 utilizaram cartuchos C18 para determinação de resíduos de fármacos polares (ácido acetil salicílico; diclofenaco, ácido clofibríco, ibuprofeno, indometacina, entre outros) em esgoto e água natural (STUMPF *et. al.* 1999).

Para os agrotóxicos os sorventes mais utilizados na extração em fase sólida aplicada em matrizes aquosas são: C18, usado na extração de herbicidas, inseticidas organoclorados e em métodos envolvendo compostos com diferentes classes químicas. Os poliméricos Oasis HLB, que têm sido usados para diversas classes de agrotóxicos, como os herbicidas entre eles o grupo das sulfoniluréias (CALDAS, 2009).

A Tabela 5 apresenta a técnica de extração em fase sólida com variados adsorventes, utilizados para a extração de diferentes analitos em matrizes aquosas.

Tabela 5: Utilização da SPE para a extração de diferentes analitos.

Composto	Tipo de Adsorvente	Matriz Estudada	Técnica de Determinação	Referências
Aldrin e Dieldrin	C18	Algas Efluentes de ETEs e águas superficiais	HPLC-UV	Rodriguez <i>et. al.</i> , 2007.
Diclofenaco	C18	Águas superficiais	LC-MS/MS	CHEN <i>et al.</i> , 2008
Atrazina	Strata-X	Águas superficiais	LC-MS/MS	Donato <i>et. al.</i> , 2012.
Tebuconazol	Strata-X C18, XAD-2 e outros	Águas superficiais	LC-MS/MS	Donato <i>et. al.</i> , 2012.
Carbofurano		Águas superficiais	GC-MS	Momplaisir <i>et. al.</i> , 2010.
Fipronil	C18	Águas superficiais	GC-ECD	Grützmacher <i>et. al.</i> , 2008.
Cafeína	Strata-X, C8 e C18	superficiais e de Efluentes Águas	LC-MS/MS	Lacey <i>et. al.</i> , 2008.
Piraclostrobina	Strata-X	Águas superficiais	LC-MS/MS	Donato <i>et. al.</i> , 2012.
Propanil	C18 C18 e	superficiais	HPLC-UV	Ávila <i>et. al.</i> , 2007
Atenolol	Strata-X C18 e	Urina	HPLC-UV	Ilha <i>et. al.</i> 2002.
Prednisona	Strata-X	Urina Águas	HPLC-UV	Ilha <i>et. al.</i> 2002
Diuron	C18 C18 e	superficiais	HPLC-UV	Green <i>et. al.</i> , 2000.
Fluoxetina	Strata-X	Urina Águas	HPLC-UV	Ilha <i>et. al.</i> 2002.
Epoxiclonazol	Strata-X C18 e	superficiais Águas	LC-MS/MS	Donato <i>et. al.</i> , 2012.
Imazetapir	PMTDS	superficiais	HPLC-DAD	Faria <i>et. al.</i> , 2007.

3.10 Métodos para determinação de resíduos de contaminantes emergentes em água

Os métodos para análises químicas são em geral seletivos e poucos são realmente específicos para uma única substância química. Conseqüentemente, a separação do analito de interferentes potenciais é, na maioria dos casos, uma etapa crucial de um procedimento analítico. Até meados do século XX, as separações analíticas eram realizadas utilizando métodos clássicos como a precipitação, destilação e extração. Hoje as separações analíticas são mais comumente feitas por cromatografia e eletroforese, principalmente em amostras complexas e que contenham muitos componentes (SKOOG, 2002).

A cromatografia é um método de separação eficaz que encontra aplicações em todos os ramos da ciência e os analitos de interesse na amostra podem ser particionados entre duas fases, uma fase móvel que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel (FM) é forçada a passar através de uma fase estacionária (FE) fixas, colocada em uma coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra distribuam-se entre as fases móvel e estacionária (SKOOG, 2002).

Na cromatografia os métodos fundamentais baseiam-se nos tipos de fases móveis e estacionárias e nos tipos de equilíbrios envolvidos na transferência dos solutos entre as fases. Há três classificações gerais para a cromatografia: cromatografia gasosa, cromatografia líquida e a cromatografia com fluido supercrítico (SKOOG, 2002).

Neste trabalho foram utilizadas a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência UHPLC acoplado ao Espectrômetro de Massa (MS).

3.10.1 Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC – MS/MS)

A Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência (UHPLC) tem sido desenvolvida como uma técnica de separação poderosa e inovadora com base na utilização de colunas contendo fases estacionárias com tamanho de partículas ($<2\ \mu\text{m}$) menor do que HPLC convencional. Isto tem levado a maior resolução e sensibilidade, e menor tempo de análise (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001). A UHPLC em combinação com MS tem se mostrado como uma excelente ferramenta analítica para determinações ambientais multiresiduais de compostos como fármacos e medicamentos, toxinas e pesticidas em água (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001).

A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência e possui como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que possuem dimensões menores (comprimento: 5-10 cm e diâmetro: 1-2 mm) e a fase estacionária recheada com partículas $\leq 2\ \mu\text{m}$. A FM possui altas velocidades que juntamente com a FE aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuindo o tempo de análise. Desta forma aumentando a pressão cromatográfica, com isso, é necessário equipamentos capazes de operarem em altas pressões (JARDIM *et al.*, 2010).

De acordo com Jardim e colaboradores, 2010, desde a introdução do primeiro equipamento de UHPLC pela Waters Corporation em 2004, denominado de *ACQUITY UPLC® System*, que permitiu que a técnica fosse empregada além do meio acadêmico, e avaliada por diversos usuários, até os dias atuais, a UHPLC vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da HPLC, em decorrência de suas principais vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detectabilidade, economia de FE e FM, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC,

grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos.

A espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (EM-EM) ou MS/MS (do inglês, Mass Spectrometry / Mass Spectrometry) tem sido amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (CHIARADIA *et al.* 2008). Os analisadores de massas podem ser: quadrupolo, íon trap. Os analisadores de massas EM-EM podem ser: triplo quadrupolo e quadrupolo-ATV.

O modo de operação e o analisador de massas empregado neste trabalho são Monitoramento Seletivo de Reações MSR (SRM do inglês, Selected Reaction Monitoring) este tipo de varredura é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no triplo quadrupolo no primeiro estágio aos seus correspondentes íons produtos que atravessam o segundo estágio (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série (Figura 4), sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte ou DIC (do inglês, dissociation induced- collision), e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando DIC é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.), dependendo da natureza

do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando DIC é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada. Além de informações estruturais, DIC pode melhorar a detectabilidade do método quando usada para gerar um íon característico de uma molécula e assim realizar sua detecção a partir deste íon fragmento quando a molécula do analito de interesse se encontra em presença de outras moléculas de mesma massa molar nominal, uma vez que reduz o ruído e aumenta a detectabilidade. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA *et al.*, 2008).

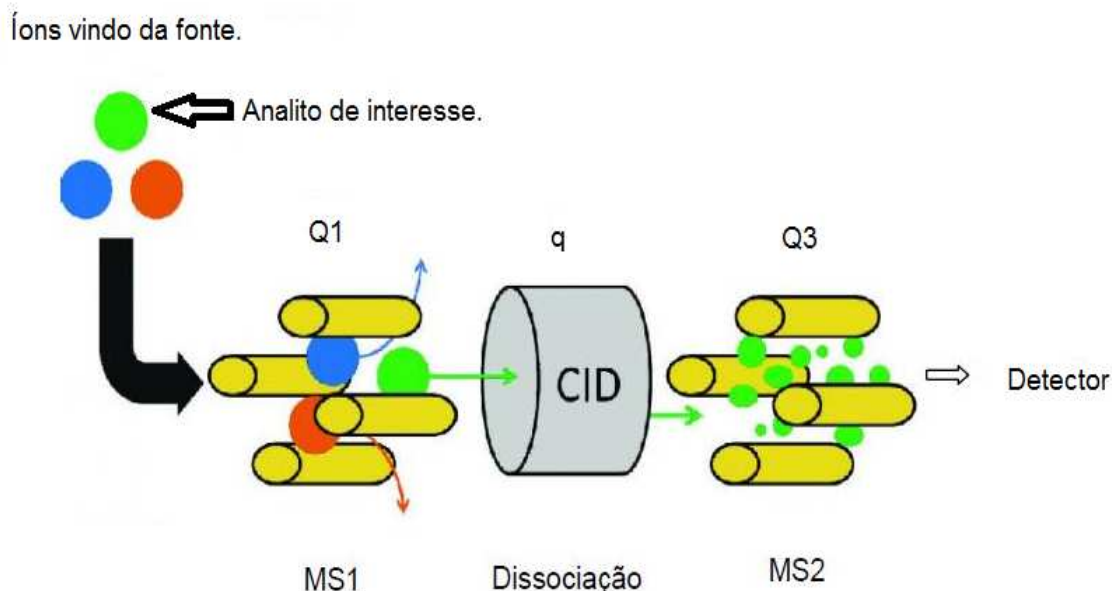


Figura 4: Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo. Adaptado de Broadinstitute, in Rizzetti, 2013.

Segundo Chiaradia e colaboradores 2008, na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema de cromatografia líquida com espectrometria de massas foram desenvolvidas interfaces, nas quais, é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura ou pouco voláteis, chamadas fontes de ionização. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são ionização por eletronebulização ou ESI (do inglês, Electrospray Ionization), Ionização Química à Pressão Atmosférica ou APCI (do inglês, Atmospheric Pressure Chemical Ionization). De acordo com Lanças, 2009, a fonte ESI é empregada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular, a fonte APCI é empregada na análise de moléculas menores e menor polaridade. A fonte de ionização por eletronebulização foi a fonte utilizada neste trabalho.

Na ionização por eletronebulização, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido na FM passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantida sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas, denominadas “*spray*” que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco, geralmente N₂, na região do “*spray*”. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida. Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A fonte de ionização ESI proporciona que os analitos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação, isto acontece por que a ionização ocorrer diretamente na solução. O modo de obtenção de íons proporcionado por esta fonte

favorece a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares (CHIARADIA *et al.*, 2008).

3.10.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Segundo Chiaradia e colaboradores, 2008, a combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas.

Quando são utilizadas colunas capilares em GC é possível conectar a saída da coluna diretamente à fonte do espectrômetro, uma vez que, em condições normais de operação, o sistema de bombeamento do espectrômetro de massas é capaz de captar todo o eluente da coluna (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O monitoramento Ion seletivo (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*) permite que o espectrômetro de massa faça a detecção específica compostos com uma sensibilidade muito elevada. No modo SIM, o aparelho é configurado para coletar dados em massas de interesse. Desta forma, o espectrômetro de massa coleta apenas os dados das massas de interesse, ele responde só para aqueles compostos que possuem os fragmentos de massa selecionada. Mais recentemente, o modo SIM foi substituído nos equipamentos de GC-MS por sistemas que operam com a varredura completa (*full scan*, FS) à baixa concentração e/ou com a espectrometria de massas em série (MS/MS) entre outros (PRESTES *et al.*, 2013).

Os métodos de ionização mais empregados em CG-MS são ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e a ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*). A IC é a técnica que foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas

à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente. Esta mistura (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudomoleculares do analito $[M+H]^+$. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observada fragmentação.

Na EI o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron (M^+) (CHIARADIA, COLLINS E JARDIM, 2008). O método de ionização utilizado neste trabalho foi por impacto de elétrons (EI) e o analisador de massa tipo armadilha de íons (*Ion Trap*). A Figura 5 representa um analisador do tipo armadilha de íons.

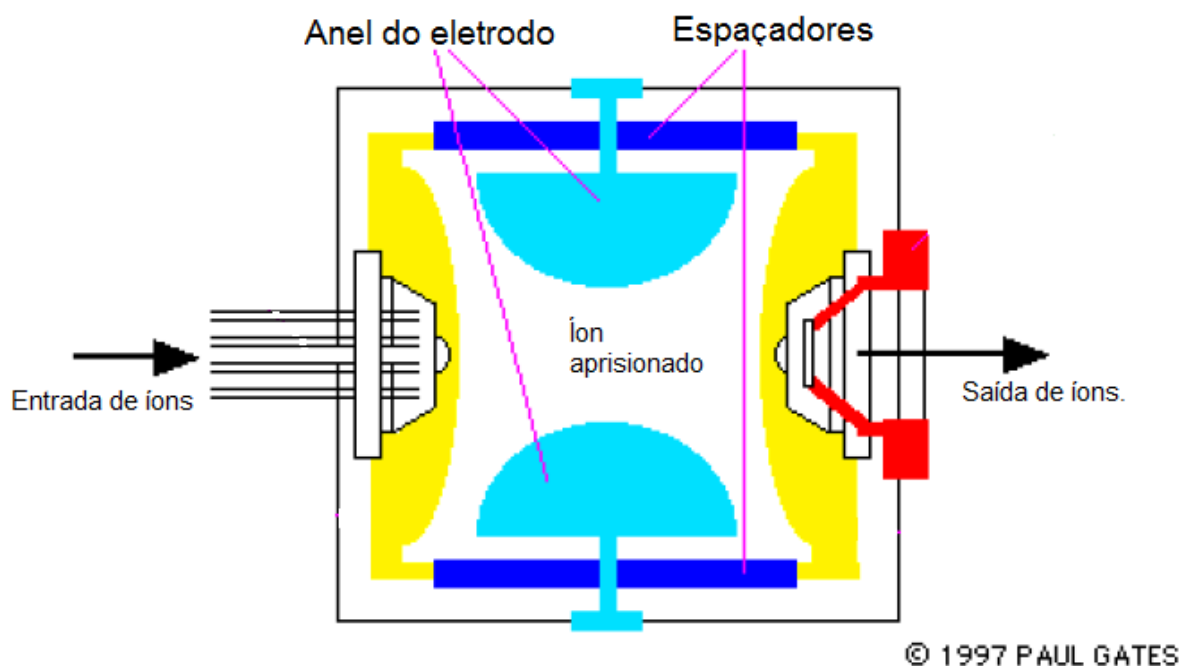


Figura 5: Analisador do tipo armadilha de íons (Ion Trap). Fonte: <http://www2.iq.usp.br>.

O analisador de massa do tipo Ion-trap é um quadrupolo tridimensional que “captura” os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são libertados do *trap* (CHIARADIA *et al.*, 2008). Os analisadores do tipo IT operam por princípios físicos semelhantes aos do quadrupolares. Contudo, neste caso os íons não mais descrevem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, e sim são aprisionados nele (por isso no nome armadilha de íons). Outra diferença trata-se da arquitetura dos eletródos, que agora são 3, sendo que o central tem um formato circular, e os dois das extremidades tem geometria hiperbólica. Este campo elétrico mantém os íons em uma órbita estável em seu interior, contudo os íons são ejetados para fora do analisador pela aplicação de uma rampa crescente de rádio frequência, que conseqüentemente, desestabiliza os íons ejetando-os em direção ao detector, de forma crescente de acordo com seus valores de m/z (SOUZA, 2008).

3.11 Validação

Para garantir que um novo método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra analisada, esse deve ser submetido a uma avaliação denominada validação, visando diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (LANÇAS 2004b; RIBANI *et al*, 2004). A validação tem o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido (INMETRO, 2011).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. O processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, com a validação, que os métodos de ensaio que utilizam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2011).

Para auxiliar o processo de validação, no Brasil, há duas agências credenciadoras que verificam a competência de laboratórios de ensaios, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA). Estes dois órgãos disponibilizam guias de procedimento de validação de métodos analíticos, assim dispõem a Resolução da ANVISA RE nº 899, de 2003 e o documento do INMETRO de julho de 2011. Os parâmetros que podem ser avaliados são: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação e seletividade.

3.11.1 Curva analítica e linearidade

De acordo com Zanella e colaboradores, 2003, a calibração é um estágio muito importante na análise química e sem um bom procedimento de calibração, a exatidão e a precisão podem ficar comprometidas.

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta (INMETRO, 2011).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação 1 da reta que relaciona as duas variáveis é (INMETRO, 2011):

Equação 1

$$y = a + bx$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y ;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

A linearidade avaliada é a capacidade de uma metodologia analítica de gerar resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa especificada (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerado adequada a reta como modelo matemático. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*, 2004).

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2011).

3.11.2 Sensibilidade

A sensibilidade pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade (CALDAS, 2009).

De acordo com Lanças, 2004b, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica da detecção empregada (INMETRO, 2011).

3.11.3 Limite de detecção e quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o

menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2011).

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) referem-se a menor concentração de um analito contido em uma amostra que possa ser detectado e quantificado, em condições aceitáveis de exatidão e precisão, e podem ser expressos em percentual ou em unidade de concentração (ANVISA, 2003).

De acordo com Ribani e colaboradores, 2004, o LOD e o LOQ podem ser estimados por diferentes meios, um deles é pelo método de relação sinal/ruído, outro é pelo desvio padrão e também processos estatísticos.

A razão sinal/ruído com valor 3 e 10 é geralmente considerada aceitável para estimar o LOD e o LOQ. O método relação sinal/ruído é o mais utilizado para técnicas analíticas em geral, sendo que pode ser aplicado apenas para procedimentos analíticos que apresentam o sinal do ruído da linha de base (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004b).

3.11.4 Precisão

A precisão de um método analítico é uma medida que determina o quão próximo os resultados estão uns dos outros, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra, e é geralmente expressa como desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), variância ou coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %) de diversas medidas (ANVISA, 2003; INMETRO 2011). Sendo aceitáveis valores menores ou iguais a 20% para análise de resíduos (RIBANI, 2004).

A precisão pode ser calculada utilizando a equação 2 (INMETRO, 2011):

Equação 2

$$RSD = \frac{S}{X_m} \times 100$$

Onde:

S = Estimativa do desvio padrão;

X_m = Média aritmética das replicatas.

Este parâmetro é importante, pois possibilita determinar se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise.

3.11.5 Exatidão

A exatidão/recuperação de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor esperado (INMETRO, 2011).

A exatidão de um método deve ser avaliada depois de estabelecer a linearidade, o intervalo linear e a especificidade do mesmo. Para isso, deve ser verificada a partir de nove determinações (no mínimo), que contemplem o intervalo linear do procedimento. Sendo assim, três concentrações, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método, com três réplicas cada. A exatidão é representada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003).

A exatidão/recuperação pode ser calculada de acordo com a equação 3. (INMETRO, 2011):

Equação 3

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Em que:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

O intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos geralmente está entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANCO, 2011).

3.11.6 Seletividade e confirmação dos resultados

A seletividade de um método analítico é uma dos parâmetros que garantem a credibilidade das medidas na presença de interferentes.

Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Onde não está claro o que é ou não interferência, a seletividade do método pode ser investigada pelo estudo de sua habilidade em medir o analito comparando com outras técnicas/métodos independentes (RIBANI, 2004; INMETRO, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação do método para determinar resíduos de agrotóxicos e fármacos em águas superficiais e de abastecimento público empregando a SPE para extração e pré-concentração das amostras, e UHPLC-MS/MS e GC-MS para a determinação dos compostos.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos e Contaminantes Orgânicos (LARCO), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) campus Santo Antônio da Patrulha e no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.1 Compostos selecionados para o estudo

Para este estudo foram selecionados cinco fármacos, que foram: diclofenaco (antiinflamatório), atenolol (β -bloqueador), cafeína (alcalóide), prednisona (corticóide) e fluoxetina (antidepressivo). E onze agrotóxicos que foram: os fungicidas epoxiconazol, piraclostrobina e tebuconazol; os herbicidas atrazina, diuron, imazetapir e propanil e os inseticidas Aldrin, dieldrin, carbofurano e fipronil. A escolha dos fármacos baseou-se em uma pesquisa feita nas redes de farmácias do município sendo estes os fármacos que compõem a lista dos mais vendidos nas drogarias e os agrotóxicos os mais utilizados nas lavouras pelos agricultores do município de Santo Antônio da Patrulha-RS. Com exceção do Aldrin e do Dieldrin

que estão proibidos e fazem parte de um grupo de compostos orgânicos persistentes que foram muito utilizados nas lavouras desta região.

4.2 Instrumentação

- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- Bomba de vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex;
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3[®] Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Sistema *manifold* para SPE Phenomenex (Torrance, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- Ultra-som Quimis[®] modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- pHmetro modelo pH21 Hanna – eletrodo de vidro combinado com BNC (São Paulo, Brasil);
- Sistema UHPLC-MS/MS equipado com:
 - Cromatógrafo líquido Waters (EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm – 2,1 x 50 mm Waters (EUA);
 - Detector MS do tipo Triplo Quadrupolo, modelo Xevo TQ (EUA);
 - Interface/Fonte de ionização por eletronebulização (EUA);
 - Gerador de nitrogênio Atlas (EUA);
 - Sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.1 (Waters, EUA).
- Sistema GC-MS:

- Cromatógrafo a gás Varian 1200-MS;
- Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
- Coluna capilar VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), com 30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m de espessura de filme;
- Cromatógrafo a gás GC - 431 (Varian, EUA);
- Detector de massas 210 MS do tipo armadilha de íons (ITD, do inglês *Ion Trap Detector*) (Varian, EUA);
- Injetor 1177;
- Sistema de aquisição de dados através do *software MS Workstation 6.9.2* (Varian, EUA).

4.3 Materiais, reagentes e solventes

- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q₃[®] Millipore (resistividade 18,2 M Ω cm);
- Metanol e acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- Gás Hélio 99,99 % (White Martins, Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Cartuchos para SPE Strata[®] X, Chromabond C18 eC (Macherey-Nagel, Alemanha);
- Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- Membrana filtrante de nylon 0,45 μ m de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil) utilizadas para filtração da fase móvel;

- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro, Sartorius (Biolab products, Goettingen, Alemanha) utilizadas para filtração das amostras de águas;
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc...).
- Ácido fórmico p.a. 98 - 100% (Merck, Brasil);
- Padrões sólidos dos agrotóxicos e fármacos: Epoxiconazol (Dr. Ehrenstorfer , 98,5%), Piraclostrobina (Sigma Aldrich, 99,9%), Tebuconazol (Sigma Aldrich, 99,6%), Atrazina (Sigma Aldrich, 97,4%), Diuron (Sigma Aldrich, 99,5%), Imazetapir (Sigma Aldrich, 99,9%), Propanil (Sigma Aldrich, 99,7%), Carbofurano (Sigma Aldrich, 99,9%), Fipronil (Sigma Aldrich, 97,6%), Aldrin (Sigma Aldrich, 98,9%), Dieldrin (Supelco, 99,2%), Atenolol (Fiocruz, USP, cat. 04440), Cafeína (Fiocruz, USP, lote 2015), Diclofenaco (Fiocruz, USP, cat. 18880), Fluoxetina (Fiocruz, USP, cat. 2798c), Prednisona (Fiocruz, USP, cat. 55900).

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L^{-1} de cada composto foram preparadas em metanol grau HPLC partindo da dissolução do padrão sólido, armazenado em frasco âmbar e estocado a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer.

A partir dos padrões foi preparada uma solução estoque, contendo todos os compostos, na concentração de 10 mg L^{-1} .

Esta solução foi utilizada para preparar as diluições as quais foram usadas para otimizar a metodologia.

4.5 Amostra branco

A amostra de água utilizada para a validação do método foi coletada na Nascente do Rio dos Sinos, Figura 6. Aproximando-se mais das amostras reais do experimento e apresentando resposta semelhante no equipamento.

Esta amostra de água coletada na nascente do rio conforme Figura 6 foi analisada inicialmente (em branco, sem a adição dos compostos) para verificação da possível presença de algum composto em estudo.

A amostra foi coletada na cachoeira antes de chegar na nascente Figura 7, por causa da dificuldade de acesso ao local.

Foram coletados 20 litros de água, armazenados em bombonas escuras em geladeira. As extrações foram realizadas com um volume de 200 mL de amostra.



Figura 6: Cachoeira antes de chegar a Nascente (Imagem: arquivo pessoal).

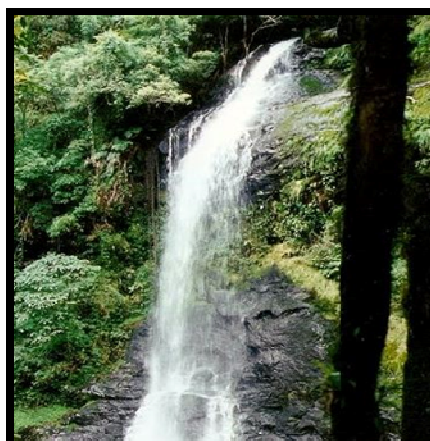


Figura 7: Nascente do Rio dos Sinos (Imagem: arquivo pessoal).

4.6 Estudo da extração em fase sólida

Através de um planejamento prévio, foram selecionadas e avaliadas condições dos solventes de eluição, escolha do sorvente para a extração dos analitos e ajustes de pH da amostra.

No sistema de extração em fase sólida (SPE) é utilizado um *manifold*. Este sistema é composto por uma caixa de vácuo com espaço para trabalhar com 12

cartuchos para SPE simultaneamente (Figura 8). O *manifold* é conveniente quando é necessário pré-concentrar um número considerável de amostras.

As amostras foram colocadas em balões volumétricos de 200 mL foram transferidas para cartuchos de SPE contendo 500 mg de fase estacionária, acomodados em tubos do tipo seringa com capacidade de 3 mL, com tamanho médio das partículas de 33 μm , através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorreu a uma vazão na ordem de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ por sucção em função do vácuo aplicado ao sistema, controlado para cada cartucho através de uma válvula.

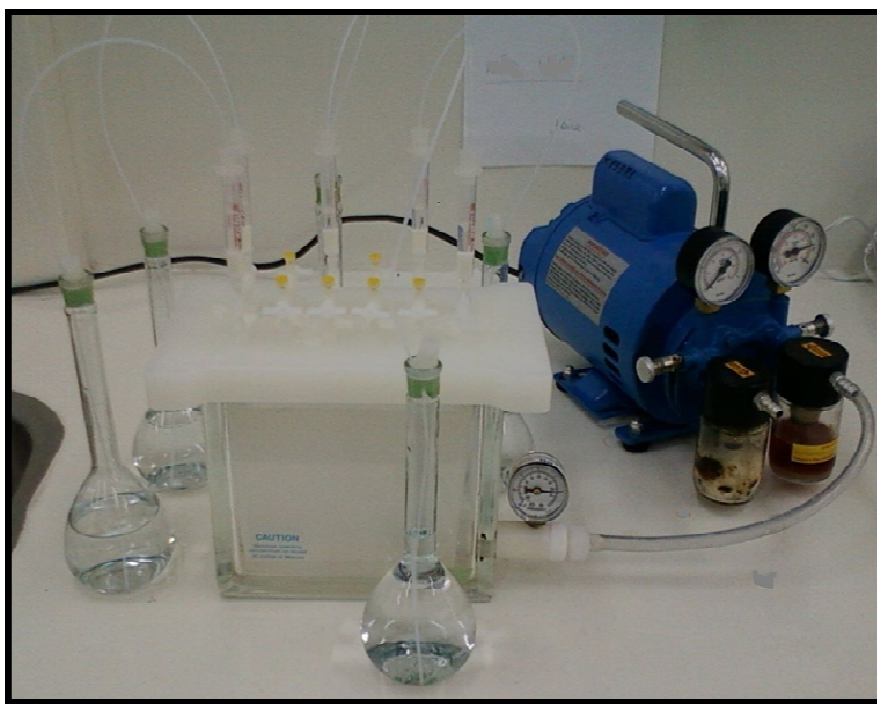


Figura 8: Sistema de extração em fase sólida em funcionamento, com utilização de um *manifold* (Imagem do arquivo pessoal).

Os cartuchos de extração em fase sólida são comercializados em variados volumes. Esses cartuchos são empacotados com diferentes quantidades e tipos de adsorventes.

Na escolha do sorvente deve ser considerada a informação a respeito dos analitos de interesse, a natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas, o volume de amostra a ser extraída e a massa do composto de interesse presente na amostra (LANÇAS, 2004a).

A pré-concentração dos analitos foi avaliada em 2 diferentes adsorventes sendo eles:

- Chromabond C18, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 45 μm e tamanho médio dos poros de 60 Å, em tubos de 3 mL,
- Strata-X, contendo 500 mg do sorvente, tamanho médio das partículas de 33 μm , tamanho médios dos poros 85 Å, em tubos de 3 mL.

Os solventes testados para eluição dos compostos foram metanol, acetonitrila e uma mistura de metanol e acetonitrila 1:1. Os volumes testados foram 1 mL e 2 mL e com ajuste de pH 3 e sem ajuste. As fortificações foram realizadas para uma concentração no extrato de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos analisados no UHPLC e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos analisados no GC.

4.7 Otimização das condições de detecção por UHPLC-MS/MS e GC-MS

A otimização do sistema cromatográfico foi realizada utilizando a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS).

As condições empregadas em ambos espectrômetros de massas foram previamente definidos pelo laboratório.

A otimização para o UHPLC-MS/MS iniciou com a seleção dos compostos através do *Quanpedia*[®], o qual é um banco de dados contendo os compostos e os dados referentes a eles, como íon precursor e produto, energia de colisão e energia do cone.

Após a organização dos dados através do *Quanpedia*, foi injetada uma solução de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ contendo os fármacos e agrotóxicos estudados, a fim de averiguar a intensidade do sinal e o tempo de retenção dos analitos.

Os solventes para a fase móvel (FM) foram o solvente A e o solvente B. A solução do solvente A foi preparado com 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico e a solução do solvente B, foi preparada com metanol e 0,1% de ácido fórmico. A curva analítica para o UHPLC-MS/MS foi preparada com soluções contendo todos os compostos do estudo em metanol nos seguintes níveis 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0, e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na otimização para o GC-MS foi utilizada o banco de dados para o composto Aldrin. Para o Dieldrin, foi injetada uma solução com o padrão na concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, para verificar o tempo de retenção e a intensidade do sinal. A temperatura do forno e temperatura da fonte foram definidas.

O gás hélio foi usado como gás de arraste no sistema e a coluna utilizada foi a capilar VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), com 30 m x 0,25 mm; 0,25 μm de espessura de filme.

A curva analítica para o GC-MS foi preparada com soluções contendo os compostos do estudo em metanol nos seguintes níveis 50; 100, 200, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.8 Estudo do efeito matriz

A avaliação do efeito matriz é importante devido a co-eluição de componentes que se encontram na matriz (RIZZETI, 2013), principalmente em amostras complexas (LANÇAS, 2004b) como a água. Esse efeito é conhecido por um aumento ou uma supressão do sinal do analito (LEHOTAY *et al.*, 2010).

Existem várias formas de calcular o efeito matriz, uma delas é pela curva analítica preparada pela fortificação com os padrões no extrato da matriz (ERNEY, 1997; PINHO, 2010). A outra forma é pelas áreas obtidas numa determinada concentração preparada no extrato da matriz e no solvente (PIZZUTI *et al.*, 2009).

Neste trabalho para avaliação do efeito matriz utilizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas no solvente e a preparada no extrato da matriz. Para realização do cálculo foi utilizado a Equação 4 (PIZZUTTI *et al.*, 2009).

O efeito matriz foi calculado para cada composto na concentração de 20 µg L⁻¹ para o UHPLC-MS e 500 µg L⁻¹ para o GC-MS.

Equação 4

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100$$

Onde:

X₁ = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado preparado no extrato da matriz, em uma determinada concentração;

X₂ = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada em solvente, em uma determinada concentração.

4.9 Aplicação do método

As amostras para a aplicação do método foram coletadas no curso do rio na zona rural e urbana, conforme Figura 9 e 10, a outra amostra foi coletada na lagoa localizada no Município de Santo Antônio da Patrulha de acordo com a Figura 11.

Na Lagoa foram marcados cinco pontos de coleta em seu entorno. Como a Lagoa é um sistema de água fechado, esses pontos foram marcados para se obter uma amostra mais próxima do real da localidade. Depois de coletados nos cinco pontos, as amostras foram misturadas em proporções iguais. Uma amostra do ponto do camping foi realizada a extração separadamente para identificar os níveis de contaminação na área de lazer da região.

As localidades e suas amostras foram identificadas conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Identificação das localidades de coletas das amostras para a aplicação do método.

Localidades		Identificação
Lagoa	Camping	A1
	Cinco pontos	A2
Rio	Zona Rural	A3
	Zona Urbana	A4



Figura 9: Ponto de coleta da amostra na zona rural. (Imagem: <http://goo.gl/maps/fuB5w>. Longitude: -29.771693; Latitude: -50.517154)



Figura 10: Ponto de coleta na zona urbana. (Imagem: <http://goo.gl/maps/OGioc>. Longitude: -29.759083; Latitude: -51.15043)



Figura 11: Coleta da amostra na lagoa. (Imagem: <http://goo.gl/maps/LMwjz>. Longitude: -29.920721; Latitude: -50.374031)

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Otimização do sistema cromatográfico

5.1.1 UHPLC- MS/MS

Para otimização das condições cromatográficas foram utilizados dois solventes para a fase móvel, o solvente A e o solvente B. A solução do solvente A foi preparado com 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico e a solução do solvente B, foi preparada com metanol e 0,1% de ácido fórmico. A escolha do aditivo ácido fórmico na fase móvel gera melhor intensidade e resposta reprodutível. A eluição foi modo de gradiente (Tabela 7) com um fluxo programado

resultando num tempo de execução 10 min., temperatura da coluna 40 °C, volume de injeção foi de 10 uL e uma vazão de 0,225 mL min⁻¹.

Tabela 7: Gradiente da fase móvel utilizado no UHPLC.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
Inicial	95	5,0
0,25	95	5,0
7,75	0,0	100
8,50	0,0	100
8,51	95	5,0
10,00	95	5,0

Os parâmetros empregados para o espectrômetro de massas foram:

- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Temperatura da Fonte: 150 °C;
- Capilar: 2,0 kV
- Vazão do gás: 600 L h⁻¹;
- Vazão do cone: 80 L h⁻¹;
- Vazão gás colisão (argônio): 0,15 mL min⁻¹.

Os dados obtidos pelo *Quanpedia*[®] foram confirmados através da infusão da solução contendo uma mistura de fármacos e agrotóxicos a uma concentração de 20 µg L⁻¹ conforme resultados da Tabela 8 que consta a energia de colisão e m/z. A m/z está representada com uma casa decimal, pois no software as massas são programadas com uma casa decimal pelo centro do sinal, mas o equipamento é de

resolução unitária, portanto as mesmas devem ser interpretadas como números inteiros.

Tabela 8: Fármacos e agrotóxicos com os tempos de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão.

Composto	t_R (min)	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Quantificação		
		Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (ev)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (ev)
Atenolol	1,90	267,0	145,0	25	267,0	190,0	25
Cafeína	2,70	195,3	110,0	20	195,3	138,0	20
Imazetapir	4,41	290,2	159,1	38	290,2	245,2	18
Carbofurano	4,71	222,1	123,0	16	222,1	165,1	16
Prednisona	4,90	403,3	327,2	14	403,3	357,2	09
Atrazina	5,25	216,1	96,1	23	216,1	174,1	18
Diuron	5,39	233,0	46,3	14	233,0	72,1	18
Fluoxetina	5,58	310,4	43,4	10	310,4	148,8	09
Propanil	5,80	217,9	127,0	22	217,9	161,9	16
Epoxiconazol	6,26	330,0	101,0	50	330,0	121,0	22
Fipronil	6,45	435,3	250,1	26	435,3	330,2	16
Diclofenaco	6,52	293,6	250,2	10	293,6	214,0	25
Tebuconazol	6,60	308,0	70,1	22	308,0	125,0	40
Piraclostrobina	6,80	388,1	163,0	25	388,1	193,9	12

Nas Figuras 12 e 13 podem ser visualizados os cromatogramas obtidos para os compostos quantificados, preparados no extrato da matriz e no solvente, na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e no Anexo 1.

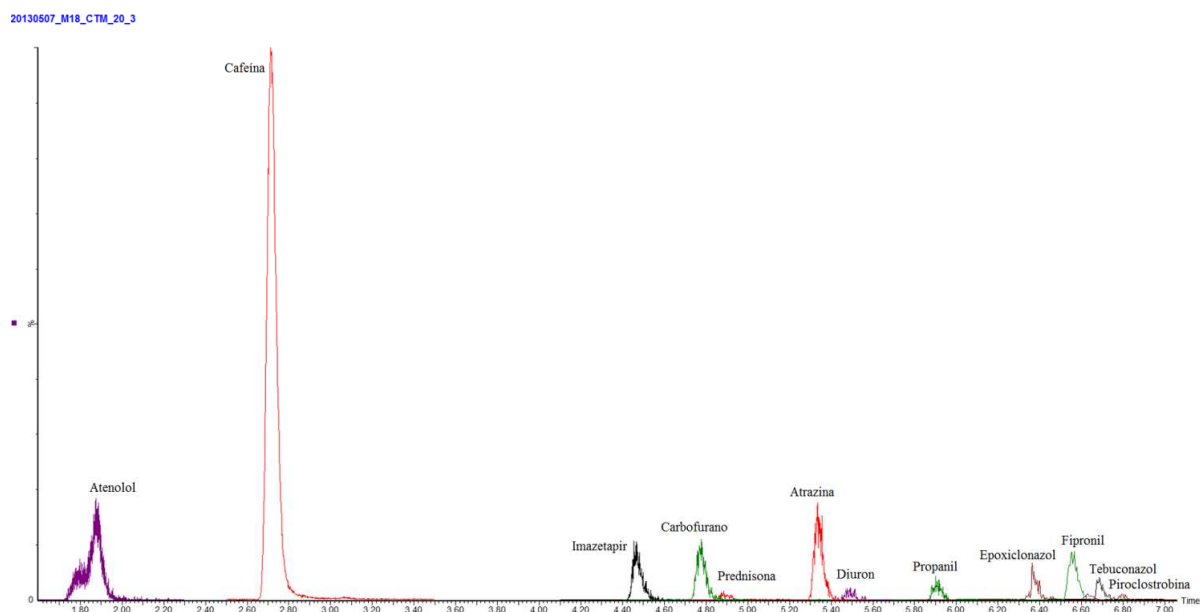


Figura 12: Cromatograma UHPLC na concentração de 20 µg L⁻¹ na matriz.

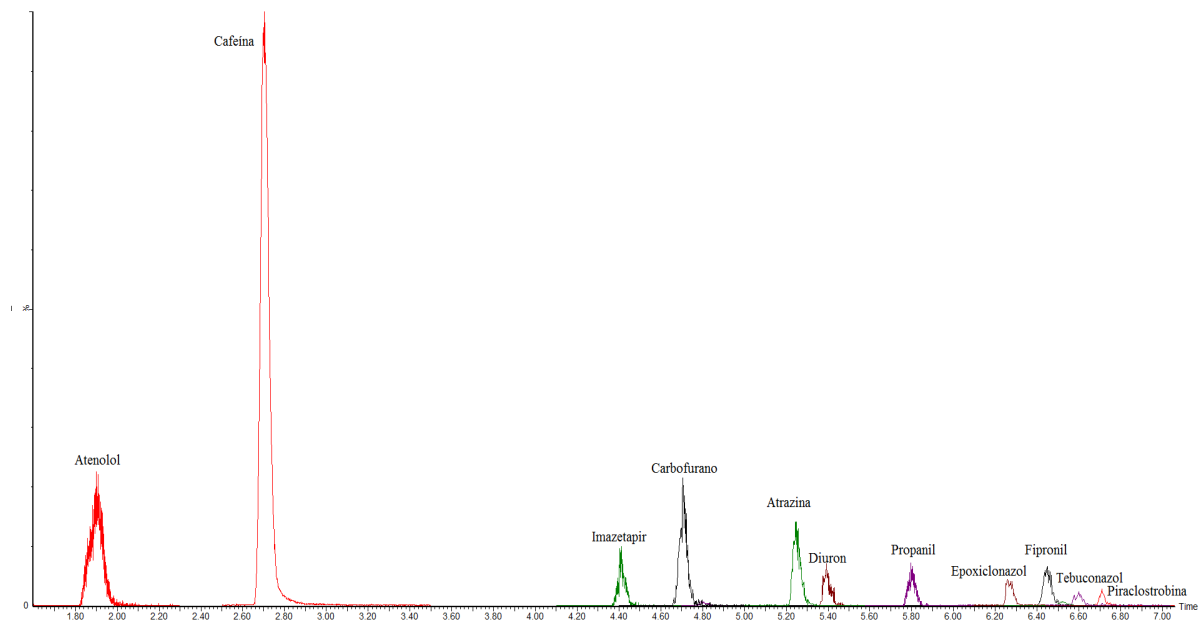


Figura 13: Cromatograma UHPLC concentração 20 µg L⁻¹ no solvente.

5.1.2 GC-MS

Para otimização das condições cromatográficas foi utilizado Gás hélio analítico 99,9997% usado como gás de arraste no sistema GC-MS (Air Products, Brasil). As Tabelas 9 e 10 apresentam as condições utilizadas no sistema cromatográfico.

Tabela 9: Condições utilizadas no sistema cromatográfico GC-MS.

Parâmetros	GC-MS
Coluna analítica	VF-5-MS
Tempo de <i>delay</i>	<i>Full scan</i> : 7 min
Temperatura do injetor	280 °C
Programação de temperatura do forno da coluna	80 °C (1 min) / 20 °C min ⁻¹ / 280 °C (1 min)
Tempo total da corrida	12 min
Volume de injeção	2 µL (<i>splitless</i>)
Temperatura da linha de transferência	250 °C
Temperatura do manifold	80 °C
Temperatura do trap	200 °C
Fonte de ionização	EI (70 eV)

Tabela 10: Compostos analisados no GC-MS, tempo de retenção e razão massa/carga.

Composto	t _R (min)	Menor massa (m/z)	Maior massa (m/z)
Aldrin	9,4	263	293
Dieldrin	10,5	263	277

Na Figura 14 pode ser visualizado o cromatograma obtido para os compostos quantificados, preparados no extrato da matriz, na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

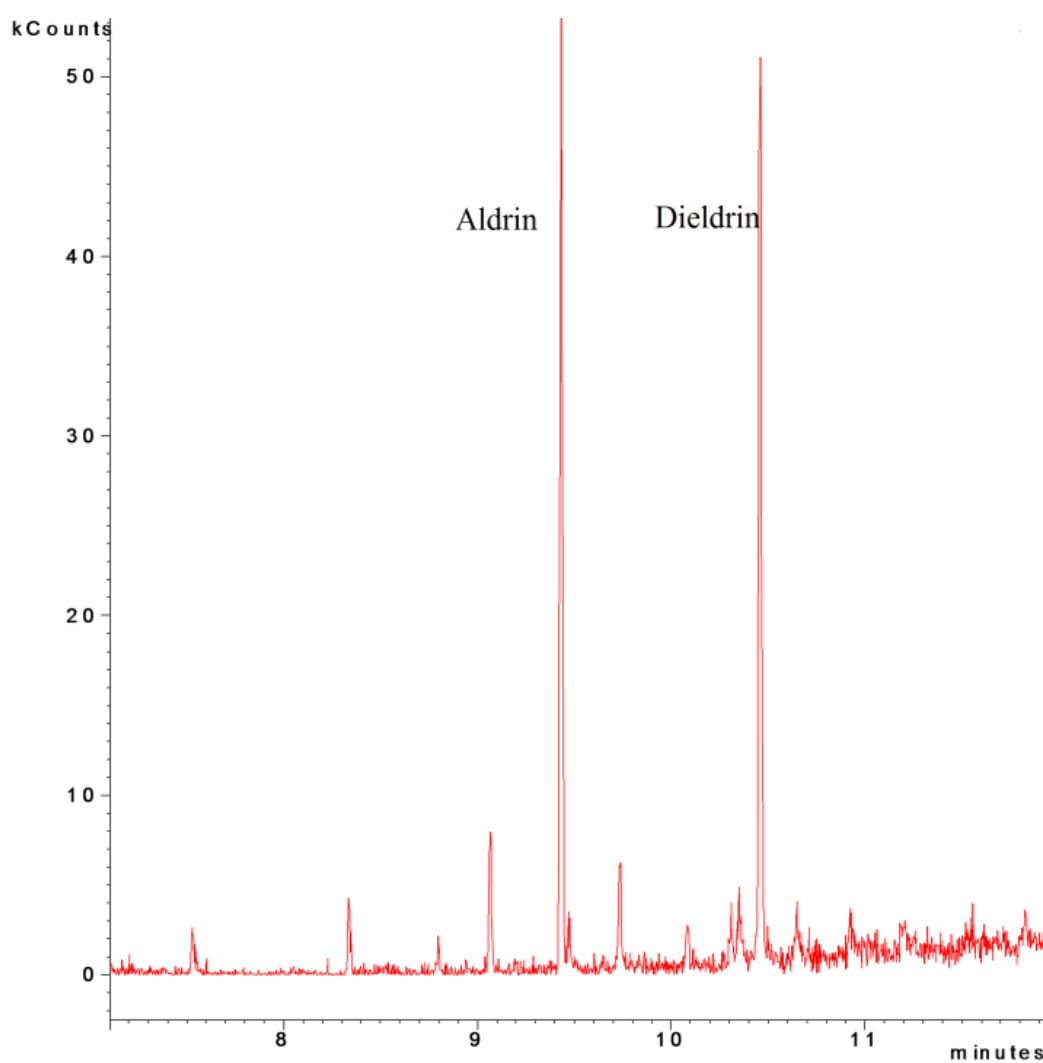


Figura 14: Cromatograma GC-MS, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

5.2 Otimização do método SPE para análise de resíduos de fármacos e agrotóxicos em água

O procedimento de extração dos compostos em água foi otimizado condicionando os cartuchos C18 com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura e um volume de amostra de 200 mL.

A amostra foi percolada através do cartucho com uma vazão de 3 mL min⁻¹ e realizada a etapa de *clean up*, com água ultra pura, ao final da percolação. Na etapa de eluição, foram utilizados para os compostos que foram analisados no UHPLC, uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1) com volume final de 2 mL e diluído na proporção de 1:4 (v:v). Para os compostos que foram analisados no GC-MS, foi utilizado acetonitrila com volume final de 2 mL. A Tabela 11 apresenta os resultados dos testes citados no item 4.6.

O adsorvente, octadecil - C18, apresentou melhor resultado (Tabela 10) que o polímero Strata-X. O cartucho com sorvente C18 oferece forte retenção hidrofóbica com interações polares de grupos silanóis ativos, oferecendo possíveis lugares para as interações apolares. O cartucho Strata-X, contendo N-vinilpirrolidona, oferece vários modos de retenção como ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. Desta forma, o Strata-X aumenta a capacidade de reter uma variedade de compostos polares e apolares (DONATO *et al.*, 2012), podendo ficar retido as impurezas que deveriam ser eliminadas.

A utilização de meio ácido não apresentou bom resultado, isto provavelmente acontece porque a maioria dos compostos selecionados tem caráter básico, com exceção para os compostos imazetapir, atenolol e fluoxetina que apresentaram recuperações melhores em meio ácido e em cartucho Strata-X. Desta forma, foram selecionados cartucho com sorvente C18 sem acidificar para validação do método, conforme a Tabela 11 encontra-se destacados os melhores resultados com o respectivo sorvente, solvente de eluição, volume de eluição e sem ajuste de pH.

Tabela 11: Resultados obtidos dos testes realizados na SPE.

Cartucho	pH	Eluição 1 mL	Aldrin	Dieldrin	Atenolol	Diclofenaco	Fluoxetina	Prednisone	Atrazina	Propanil	Carbofuran	Diuron	Imazetapir	Tebuconazol	Epoxiconazol	Piraclostrobina	Fipronil
C18	pH 3	MeOH	5%	12%	53%	57%	5%	56%	41%	49%	55%	69%	62%	29%	75%	69%	37%
C18	—	MeOH	11%	27%	67%	71%	15%	20%	75%	45%	64%	72%	28%	4%	54%	29%	11%
C18	pH 3	ACN	8%	46%	10%	19%	3%	56%	51%	35%	12%	79%	22%	32%	22%	51%	45%
C18	—	ACN	0%	52%	17%	0%	29%	41%	64%	52%	15%	48%	1%	3%	45%	22%	29%
C18	pH 3	ACN/MeOH (1:1)	11%	59%	20%	13%	4%	62%	67%	65%	45%	49%	35%	27%	19%	55%	41%
C18	—	ACN/MeOH (1:1)	23%	64%	91%	67%	8%	57%	69%	59%	69%	59%	53%	31%	20%	69%	55%
STRATA-X	pH 3	MeOH	0%	35%	34%	6%	21%	61%	58%	38%	34%	47%	51%	55%	21%	0%	37%
STRATA-X	—	MeOH	0%	15%	63%	28%	5%	49%	49%	13%	19%	20%	1%	36%	11%	2%	17%
STRATA-X	pH 3	ACN	0%	27%	16%	5%	53%	65%	47%	32%	42%	48%	21%	26%	14%	64%	51%
STRATA-X	—	ACN	0%	11%	57%	3%	0%	71%	36%	8%	12%	31%	10%	69%	58%	19%	11%
STRATA-X	pH 3	ACN/MeOH (1:1)	0%	0%	12%	30%	49%	35%	57%	33%	52%	17%	5%	23%	16%	7%	20%
STRATA-X	—	ACN/MeOH (1:1)	0%	0%	78%	5%	18%	53%	39%	15%	19%	12%	4%	12%	32%	33%	6%
Cartucho	pH	Eluição 2 mL	Aldrin	Dieldrin	Atenolol	Diclofenaco	Fluoxetina	Prednisone	Atrazina	Propanil	Carbofuran	Diuron	Imazetapir	Tebuconazol	Epoxiconazol	Piraclostrobina	Fipronil
C18	pH 3	MeOH	49%	68%	76%	107%	20%	106%	111%	56%	80%	119%	126%	75%	104%	119%	55%
C18	—	MeOH	45%	72%	68%	82%	36%	103%	101%	62%	64%	116%	43%	120%	174%	109%	33%
C18	pH 3	ACN	19%	98%	29%	35%	58%	99%	60%	41%	25%	144%	4%	65%	167%	77%	14%
C18	—	ACN	75%	116%	64%	26%	57%	43%	84%	67%	29%	80%	6%	107%	20%	20%	17%
C18	pH 3	ACN/MeOH (1:1)	31%	65%	20%	125%	41%	82%	113%	62%	73%	103%	86%	117%	159%	72%	48%
C18	—	ACN/MeOH (1:1)	38%	67%	107%	105%	43%	121%	105%	68%	115%	96%	118%	101%	119%	110%	66%
STRATA-X	pH 3	MeOH	0%	31%	34%	6%	116%	128%	87%	38%	55%	93%	69%	55%	26%	1%	59%
STRATA-X	—	MeOH	0%	25%	63%	28%	65%	77%	53%	13%	20%	29%	3%	66%	7%	2%	19%
STRATA-X	pH 3	ACN/MeOH (1:1)	8%	35%	12%	130%	109%	115%	69%	93%	52%	173%	59%	33%	16%	146%	50%
STRATA-X	—	ACN/MeOH (1:1)	13%	57%	78%	5%	48%	92%	61%	26%	19%	32%	47%	162%	93%	33%	6%
STRATA-X	pH 3	ACN	11%	79%	61%	2%	147%	43%	30%	9%	7%	13%	13%	49%	29%	6%	3%
STRATA-X	—	ACN	6%	53%	91%	17%	107%	56%	38%	12%	8%	30%	3%	43%	38%	18%	13%

5.3 Limites de detecção e quantificação, curva analítica e linearidade

Os limites de detecção e limites de quantificação foram determinadas a partir de amostras de água potável, como a quantidade mínima detectável de analito com uma relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente. Ao utilizar SPE, o fator de pré-concentração foi de 100 vezes para o GC e 20 vezes para o UHPLC. Os valores de LOQs do método variaram no intervalo de 0,025 até 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ no UHPLC e para o GC ficou em 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os LODs do método variaram entre 0,01 e 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o UHPLC e 0,17 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o GC.

Para avaliação da faixa linear e linearidade, curvas analíticas utilizando o método de superposição da matriz foram feitas. As curvas foram geradas utilizando análise de regressão linear apresentaram valores de $R^2 > 0,9$, conforme Tabela 12. A faixa linear variou 0,5-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o atenolol e cafeína, 1,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil e imazetapir, 2,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a atrazina, carbofurano, propanil e epoxiclonazol, 5,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diclofenaco, diuron, piraclostrobina e tebuconazol, 50-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o aldrin e dieldrin, conforme a Tabela 13.

Tabela 12: Coeficiente de correção e curva linear no solvente e na matriz.

Composto	Curva analítica no solvente	Curva analítica na matriz
Atenolol	$y = 1245,1x + 358,52$ $R^2 = 0,9901$	$y = 1111,9x - 682,63$ $R^2 = 0,984$
Diclofenaco	$y = 39,332x + 10,225$ $R^2 = 0,9903$	$y = 42,959x - 24,376$ $R^2 = 0,9868$
Prednisona	$y = 43,616x - 11,824$ $R^2 = 0,997$	$y = 53,104x - 40,387$ $R^2 = 0,9917$
Cafeína	$y = 961,47x + 33,957$ $R^2 = 0,9992$	$y = 976,41x + 814,99$ $R^2 = 0,9918$
Aldrin + Dieldrin	$y = 159,12x + 6359,8$ $R^2 = 0,957$	$y = 29,122x + 7471,4$ $R^2 = 0,9166$
Atrazina	$y = 396,86x - 294,81$ $R^2 = 0,9974$	$y = 261,86x - 256,24$ $R^2 = 0,9845$
Carbofurano	$y = 166,57x + 219,39$ $R^2 = 0,9986$	$y = 143,28x - 188,89$ $R^2 = 0,9728$
Diuron	$y = 17,368x - 30,93$ $R^2 = 0,9335$	$y = 4,8833x - 2,3347$ $R^2 = 0,9935$
Epoxiclonazole	$y = 182,74x + 168,47$ $R^2 = 0,9993$	$y = 152,39x - 96,15$ $R^2 = 0,9882$
Fipronil	$y = 79,592x + 39,77$ $R^2 = 0,9984$	$y = 118,56x + 22,292$ $R^2 = 0,9984$
Imazetapir	$y = 425,22x + 31,501$ $R^2 = 0,9943$	$y = 397,13x - 243,28$ $R^2 = 0,9773$
Piraclostrobina	$y = 22,853x - 26,363$ $R^2 = 0,9782$	$y = 26,45x - 54,09$ $R^2 = 0,9837$
Propanil	$y = 111,36x - 72,662$ $R^2 = 0,9935$	$y = 92,298x - 116,57$ $R^2 = 0,991$
Tebuconazole	$y = 117,79x - 53,042$ $R^2 = 0,9961$	$y = 75,832x - 83,99$ $R^2 = 0,9436$

Tabela 13: LOD e LOQ do instrumento e para o método e faixa linear.

Composto	Instrumento ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Método ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Faixa Linear
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Atenolol	0,1	0,5	0,03	0,05	1 – 20
Diclofenaco	0,1	0,5	0,01	0,025	0,5 - 20
Prednisona	0,1	0,5	0,03	0,1	2,0 - 20
Cafeína	0,1	0,5	0,01	0,025	0,5 - 20
Aldrin + Dieldrin	10	50	0,17	0,5	50 - 750
Atrazina	0,1	0,5	0,03	0,1	2,0 - 20
Carbofurano	0,1	0,5	0,03	0,1	2,0 - 20
Diuron	0,1	0,5	0,08	0,25	5,0 - 20
Epoxiconazole	0,1	0,5	0,03	0,1	2,0 - 20
Fipronil	0,1	0,5	0,02	0,05	1,0 - 20
Imazetapir	0,1	0,5	0,01	0,025	0,5 - 20
Piraclostrobina	0,1	0,5	0,08	0,25	5,0 - 20
Propanil	0,1	0,5	0,03	0,1	2,0 - 20
Tebuconazole	0,1	0,5	0,08	0,25	5,0 - 20

5.4 Exatidão e precisão

Para avaliar a exatidão e a precisão do método foram fortificados os extratos da matriz e no solvente nas concentrações de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o UHPLC-MS/MS e nos níveis de 50 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o GC-MS.

Para realizar as fortificações no extrato da matriz, realizou-se toda o procedimento de SPE no branco da matriz e foi eluído com o solvente otimizado, o material eluído foi fortificado nos níveis pré-estipulados, depois esse extrato fortificado foi diluído 1:4 em água ultrapura obtendo os níveis de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para

injetar no UHPLC. Para injetar no GC-MS, fortificou-se o extrato da matriz nas concentrações desejadas e injetou-as.

Esses níveis foram utilizados para o cálculo da recuperação (R%) e o desvio padrão relativo (RSD). Cada nível de curva foi preparado em triplicata e os extratos foram injetados no sistema cromatográfico em triplicata ($n=9$).

Para o procedimento de recuperação, foram fortificadas as matrizes em seis níveis, que após a etapa de diluição para o UHPLC, apresentaram níveis de pré-concentração de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o GC o procedimento de recuperação procedeu-se da mesma forma sem a etapa de diluição, obtendo um extrato pré-concentrado 100x nos níveis de 50 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O método apresentou recuperações percentuais entre 70 e 120% conforme esquematizado na Tabela 14 e no Anexo 2. Esses valores estão dentro dos limites recomendados pela literatura, alguns compostos para certos níveis não apresentaram uma boa recuperação, que pode ser por causa do sorvente utilizado, ou solvente de eluição.

Tabela 14: Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %).

Composto	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
Atenolol	0,5	-	-
	1	113,65	6,32
	2	34,96	5,14
	5	14,51	0,67
	10	8,99	3,02
	20	4,77	5,85
Diclofenaco	0,5	-	-
	1	-	-
	2	-	-
	5	110,56	6,42
	10	121,08	1,97
	20	119,39	5,29
Prednisona	0,5	-	-
	1	-	-
	2	105,7	13,94
	5	80,1	17,71
	10	94,2	3,58
	20	92,7	3,07
Cafeína	0,5	116,08	4,66
	1	117,93	1,51
	2	93,24	1,51
	5	87,57	1,28
	10	89,77	0,97
	20	78,8	8,62
Aldrin + Dieldrin	50	114,27	4,26
	100	117,83	3,04
	200	82,86	1,94
	500	117,83	1,96
	750	-	-
	1000	-	-
Atrazina	0,5	-	-
	1	-	-
	2	114,48	20,79
	5	108,69	9,87
	10	119,45	9,11
	20	124,49	6,85

Carbofurano	0,5	-	-
	1	-	-
	2	75,74	18,80
	5	89,13	11,04
	10	68,69	12,28
	20	66,35	10,82
Diuron	0,5	-	-
	1	-	-
	2	-	-
	5	88,97	20,16
	10	98,82	20
	20	125,84	15,45
Epoxiclonazole	0,5	-	-
	1	-	-
	2	118,82	19,79
	5	113,44	18,04
	10	132,44	7,58
	20	126,07	3,80
Fipronil	0,5	-	-
	1	117,66	3,24
	2	116,21	19,41
	5	82,37	12,93
	10	72,42	17,31
	20	92,93	12,99
Imazetapir	0,5	-	-
	1	64,37	9,71
	2	41,62	13,78
	5	14,6	8,60
	10	11,81	7,00
	20	8,19	4,20
Piraclostrobina	0,5	-	-
	1	-	-
	2	-	-
	5	78,01	14,23
	10	115,31	11,76
	20	72,67	7,84
Propanil	0,5	-	-
	1	-	-
	2	116,83	19,54

	5	97,78	15,77
	10	111,86	3,88
	20	112,94	5,6
Tebuconazole	0,5	-	-
	1	-	-
	2	-	-
	5	114,41	19,60
	10	116,21	19,28
	20	119,29	9,16

As soluções analíticas foram preparadas no solvente e no extrato da matriz, o que proporcionou a avaliação do efeito matriz, que em alguns casos foi verificada o aumento da intensidade do sinal quando a solução foi preparada no extrato da matriz. As soluções no solvente e na matriz foram preparadas em seis níveis de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos analisados no UHPLC e entre 50 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os analisados no GC. As curvas, tanto no solvente quanto na matriz, apresentaram valores de r entre 0,9 e 0,99 para os níveis, variando entre 0,5-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Atenolol, 5,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diclofenaco, 0,5-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína, 50-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o aldrin e dieldrin, 2,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a atrazina, 2,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o carbofurano, 5,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron, 2,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o epoxiclonazole, 1,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil, 1,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o imazetapir, 5,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a piraclostrobina, 2,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o propanil e de 5,0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tebuconazole.

Os compostos atenolol, fluoxetina e imazetapir mostraram resultados inferiores a 60% de recuperação. A fluoxetina não apresentou bom resultado com o cartucho C18, de acordo com a tabela 1 o melhor cartucho para este composto seria o Strata X. O atenolol e o imazetapir mostraram valores de recuperação muito abaixo dos valores considerados para a validação, pode ser pelo efeito matriz, originando picos não definidos no cromatograma, ou pela falta de acidificação da amostra.

A precisão em termos de repetibilidade (RSD) do método foi avaliada utilizando uma fortificação de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz. Foram

preparadas três soluções da concentração mencionada e injetada em triplicata. Para os compostos Aldrin e Dieldrin, foi utilizado fortificação feita na matriz de $350 \mu\text{g L}^{-1}$. Foram preparadas três soluções dessa concentração e cada uma injetada em triplicata.

Os dados obtidos na Tabela 15 mostram que os valores de RSD foram inferior a 20%, desta forma demonstrando a repetibilidade do método como visto na literatura (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2011).

Tabela 15: Repetibilidade do método apresentado pelos valores de RSD.

Composto	RSD (%)
Atenolol	8,6
Diclofenaco	6,9
Prednisona	12,9
Cafeína	1,5
Aldrin + Dieldrin	2,0
Atrazina	15,0
Carbofurano	19,2
Diuron	12,6
Epoxiconazole	15,9
Fipronil	14,8
Imazetapir	12,7
Piraclostrobina	16,2
Propanil	13,4
Tebuconazole	19,9

5.5 Avaliação do efeito da matriz

O efeito matriz foi calculado para cada composto na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Aldrin e Dieldrin, comparando as médias das áreas no solvente e na matriz. A comparação das áreas possibilitou estimar a diferença de sensibilidade dos compostos quando na presença de componentes co-extrativos na matriz conforme a Tabela 16.

Tabela 16: Avaliação do efeito matriz.

Composto	Efeito Matriz (%)
Atenolol	- 7,46
Diclofenaco	12,97
Prednisona	24,78
Cafeína	09,77
Aldrin + Dieldrin	- 75,42
Atrazina	- 32,72
Carbofurano	- 20,44
Diuron	- 73,32
Epoxiconazole	- 21,57
Fipronil	48,65
Imazetapir	- 2,55
Piraclostrobina	10,11
Propanil	- 19,32
Tebuconazole	- 33,81

Através da Figura 15 pode-se observar melhor os valores do efeito matriz contidos na Tabela 16.

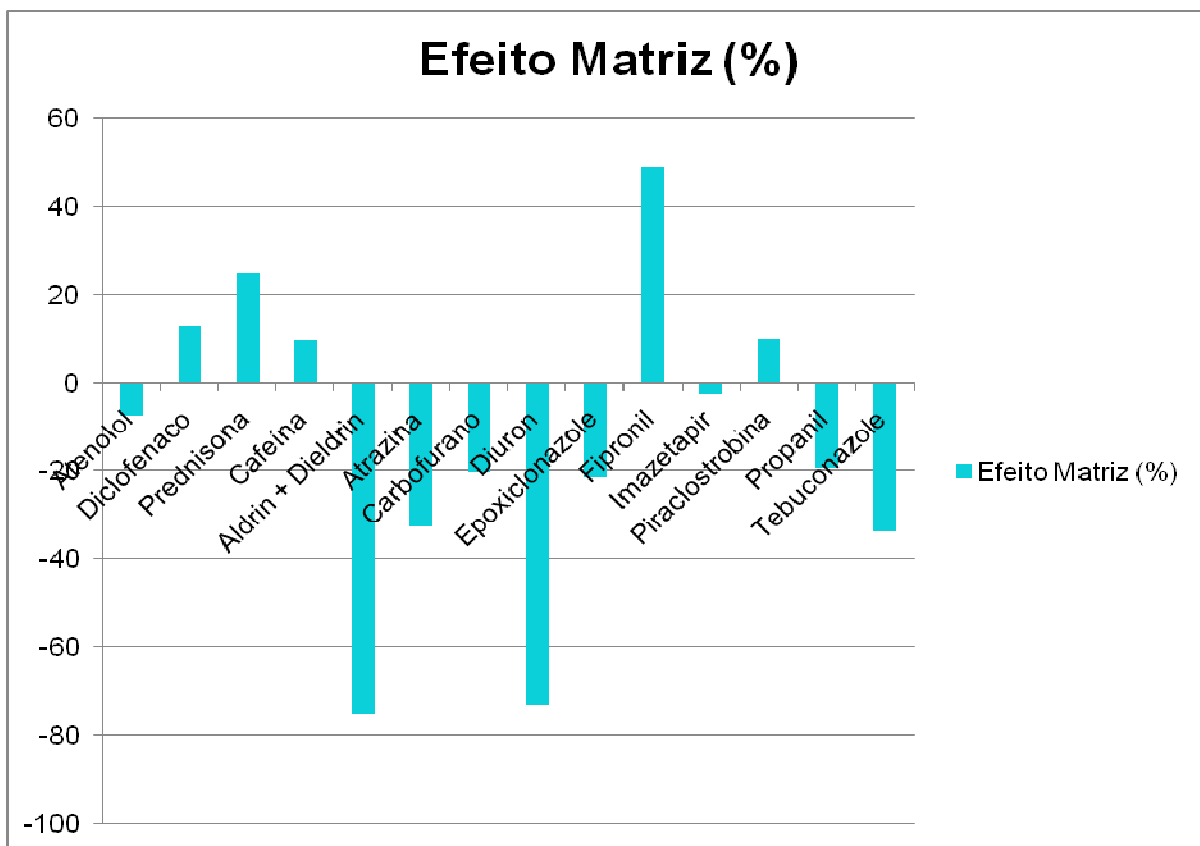
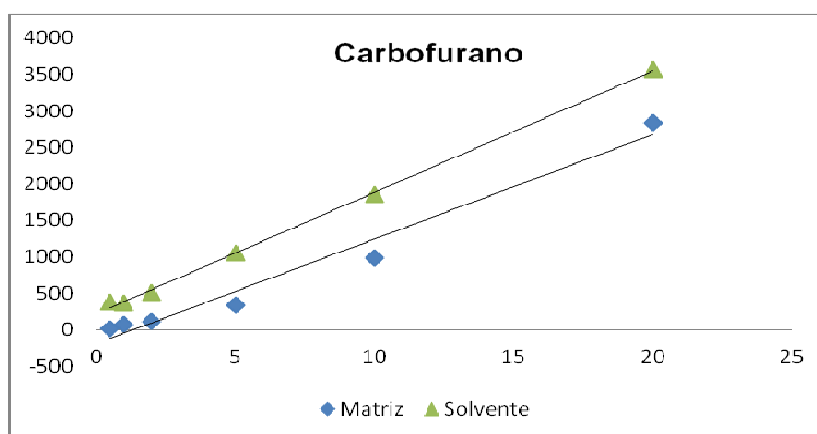


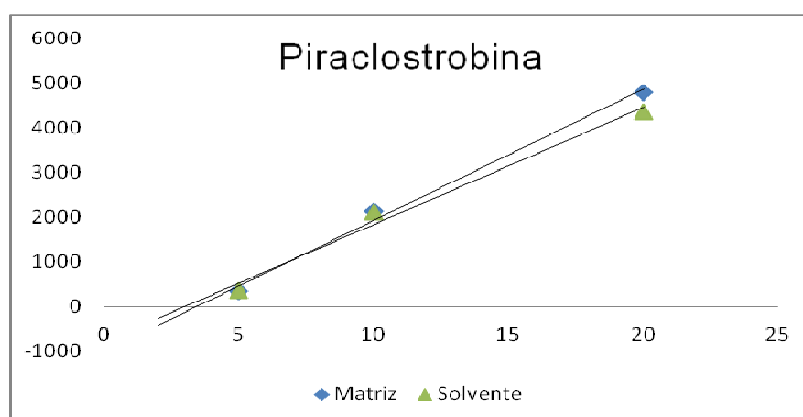
Figura 15 : Percentual de efeito matriz (EM) para a técnica empregando SPE, UHPLC-MS/MS e GC-MS para determinação de fármacos e agrotóxicos em água.

Com base nos resultados obtidos para os compostos diclofenaco, prednisona, cafeína, fipronil e piraclostrobina observou-se aumento do sinal possivelmente pela presença de componentes que são co-extraídos da matriz e competem com os analitos no processo de ionização (RIZZETTI, 2013). Os compostos atenolol, aldrin, dieldrin, atrazina, carbofurano, diuron, epoxiconazol, imazetapir, propanil e tebuconazol, na comparação das áreas apresentaram um sinal de supressão, para alguns inferiores a - 20%. Para alguns compostos foram observadas variações superiores e inferiores a 20%, de acordo com a literatura o efeito matriz não é considerado significativo na faixa de - 20 a 20% (FERRER *et al.*, 2011).

Estes resultados salientam a importância da curva analítica preparada no extrato da matriz para a quantificação dos analitos, como forma de compensar o efeito matriz. Na Figura 16 são apresentadas as comparações entre as áreas, elucidando a presença do efeito matriz causado por enriquecimento e supressão de sinal na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. No carbofurano observa-se o efeito matriz com a supressão do sinal. Para a piroclostroquina observa-se um enriquecimento menor que 20 % de efeito matriz.



(1)



(2)

Figura 16: 1 - Curva analítica preparada no solvente e no extrato da matriz para o carbofurano mostrando supressão do sinal. 2 - Curva analítica preparada no solvente e no extrato da matriz para a piroclostroquina com concentração dentro dos 20%.

5.6 Aplicabilidade do método

A aplicabilidade do método foi verificada na determinação de resíduos de agrotóxicos e fármacos em amostras de água de rio e lagoa, conforme descrito no item 4.8.

De acordo com a Tabela 17, foram encontrados resíduos de cafeína nas amostras A2, A3 e A4. O Aldrin e Dieldrin foram detectados nas amostras A2, A3 e A4. Os demais compostos não foram detectados.

Tabela 17: Resultados das amostras de água analisadas.

Compostos	Amostras			
	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$			
	A1	A2	A3	A4
Diclofenaco	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prednisona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cafeína	n.d.	0,035	0,11	0,07
Atrazina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbofurano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diuron	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epoxiconazole	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fipronil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imazetapir	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Piraclostrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Propanil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tebuconazole	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aldrin + Dieldrin	n.d.	0,67	1,87	1,25

n.d. = não detectado.

Os resultados para a cafeína são esperados, pois é utilizada como marcador da atividade humana (contaminação antropogênica) em águas superficiais (BECKER, 2012). Isto por que a principal via de entrada desse fármaco em águas superficiais é via excreção, já que é um componente de variados medicamentos e também é encontrado em alimentos como café, chá, chocolate, cacau, refrigerantes, energéticos e outros.

Os compostos aldrin e dieldrin fazem parte dos POPs, agrotóxicos muito utilizado nas lavouras no passado e banido nos dias de hoje devido a sua capacidade de bioacumulação (CETESB, 2008). Os valores encontrados para esses dois agrotóxicos podem estar relacionado ao seu uso no passado que se acumularam no sedimento. Durante a coleta da amostra, o rio estava com nível de água muito baixo, este fato pode ter proporcionado maior contato da água com o sedimento e assim tornando-os suspensos na água.

O método foi desenvolvido para verificar a presença dos agrotóxicos e fármacos. Por isso, os níveis estabelecidos no método não atendem a Portaria MS Nº 2914/2011, que estabelece o VMP de $0,03 \mu\text{L}^{-1}$ para a soma do aldrin e dieldrin. Usa-se o somatório de ambos, pois o aldrin é convertido em dieldrin sob a ação de luz solar e bactérias (CETESB, 2008).

6. CONCLUSÕES

O método por SPE, com acetonitrila e metanol utilizando cartucho C18 e posterior determinação via UHPLC-MS/MS E GC-MS demonstrou eficácia para a maioria dos compostos do estudo.

A utilização de SPE para a extração dos analitos de interesse apresentou ser uma excelente técnica para extração em matrizes aquosas, permitiu preparo simultâneo de até 12 amostras e possibilitou a extração e pré-concentração, utilização de menor volume de solventes e gerando poucos resíduos.

Os fármacos atenolol e fluoxetina e o agrotóxico imazetapir não apresentaram bons resultados, sendo que a fluoxetina não pode ser extraída com o cartucho C18. O fármaco atenolol e o agrotóxico imazetapir mostraram valores de recuperação, sendo esses muito abaixo dos valores considerados para a validação.

A determinação dos contaminantes por UHPLC-MS/MS com ionização por eletronebulização de modo de operação SRM e GC-MS com detector do tipo armadilha de íons (ITD) proporcionou uma análise quantitativa dos compostos em estudo, com alta sensibilidade, seletividade e detectabilidade.

Os compostos apresentaram LOQ entre 0,025 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOD entre 0,01 e 0,17 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de recuperação para os variados níveis de fortificação variaram entre 70 a 120%, com exceção dos compostos atenolol e imazetapir, que mostraram recuperações abaixo dos valores de referência. Os RSDs variaram entre 0,6 e 20%, estando de acordo com os valores recomendados pela literatura.

A aplicação do método em amostras reais, proposto por este trabalho apresentou eficiência em sua aplicabilidade, sendo que foram encontrados resíduos de fármaco e agrotóxico nas amostras analisadas. O fármaco cafeína e os agrotóxicos aldrin e dieldrin foram encontrados nas amostras e os dois agrotóxicos com valores acima dos VMPs.

O método SPE vem ano após ano facilitando e demonstrando sua eficiência e aplicabilidade na extração de analitos para análise cromatográfica. Neste trabalho ficou comprovada essa aplicabilidade do método aliado ao UHPLC-MS/MS e ao GC-MS para análise de contaminantes em amostras de água.

DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho, foram coletados, rotulados e encaminhados ao Departamento de Química da FURG campus Santo Antônio.

Os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos adequados separados e identificados de acordo com o tipo de solvente, resíduo de agrotóxico ou fármaco. Os resíduos sólidos foram identificados e colocados em sacos plásticos.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Monitorar a presença de agrotóxicos e fármacos nas águas do rio e da lagoa.
- ✓ Otimizar os parâmetros cromatográficos para os compostos para os quais não foi possível determinar uma faixa linear de trabalho.
- ✓ Aplicar novamente o método nas amostras de água do rio para confirmar os valores encontrados para o aldrin e dieldrin.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Panorama do Enquadramento dos corpos d'água no Brasil, e, Panorama da Qualidade das Águas Subterrâneas no Brasil. Brasília: ANA, 2007. 124 p. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br>, Acesso em 15/10/2012.
2. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); **Manual de Gerenciamento dos Resíduos de Serviço de Saúde**. 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em outubro, 2012.
3. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); **Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 899, 2003.
4. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em outubro, 2011.
5. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma Brasileira **NBR 9898:1987**. Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores.
6. AVILA, L. A., MARCHESAN, E., ZANELLA, R., CAMARGO, E. R., MACHADO, S. L., MACEDO, V. R. M. Rice herbicide monitoring in two Brazilian, Rivers during the rice growing season. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.64, n.2, p.131-137, 2007.
7. BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
8. BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 215 p. 2004.
9. BECKER, Raquel W. Determinação de anti-inflamatórios em efluentes urbanos na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS. 2012. 167 p. **Dissertação de Mestrado** do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
10. BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Senado, 1998.
11. BRASIL. 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.. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011.
12. BRASIL. Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 abril 2008. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em 11/10/2012.
13. BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 11/10/2012.
14. CALDAS, S. S., DEMOLINER, A., PRIMEL, E. G., Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 20, nº 1. p. 125-132. 2009.
15. CALDAS, S. S., GONÇALVES, F. F., PRIMEL, E. G., 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. **Química Nova**. v. 34, nº 9. p. 1604-1617. 2011.
16. CALDAS, S. S., Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD ELC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea. 2009. 125 p. **Dissertação Metrado em Química**. Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Química Analítica Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal de Rio Grande.
17. CARDOSO, L. V., Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público. 2011. 90 p. **Dissertação Metrado em Química**. Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Química Analítica Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal de Rio Grande.
18. CERQUEIRA, W. Água. Disponível em: <http://www.brasilecola.com/geografia/agua.htm>. Acessado em 15/10/2012.

19. CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Aldrin, Dieldrin e Endrin: Valores de Referência: Toxicidade para a Saúde Humana, São Paulo: CETESB, 2008. 98p.
20. CHEN., H-C. Using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. **Chemosphere**, v. 72, p.863–869, 2008.
21. CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimento. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
22. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.
23. CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, 58.
24. CRESTANA, G. B., SILVA, J. H. Fármacos Residuais: Panorama de um Cenário Negligenciado. **Revista Internacional de Direito e Cidadania**. Nº 9. p. 55-65. 2011.
25. DEZOTTI, M., BILA, D. M. **FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE**, Quim. Nova, Vol. 26, No. 4, 523-530, 2003.
26. DONATO, F., KEMMERICH, M., FACCO, J., FRIGGI, C., PRESTES, O., ADAIME, M., ZANELLA, R., Simultaneous determination of pesticide and antibiotic residues at trace levels in water samples by SPE and LC-MS/MS **BrJAC**. 02, 07, 331, 2012.
27. EEC Drinking Water Directive (80/778/EEC), EEC No. L229/11-29, European Union, Brussels, 1980.
28. ERNEY, D. R.; PAWLOWSKI, T. M.; POOLE, C. F.; J. High Resolut. Chromatogr. **1997**, 20, 375.
29. EICKHOFF, P. Gerenciamento e destinação final de medicamentos: uma discussão sobre o problema. Revista Brasileira de Farmácia. v. 90, n. 1, p. 64-68. 2009. **In**: CRESTANA, G., B., SILVA, J., H. Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado. **Revista Internacional de Direito e Cidadania**, n. 9, p. 55-65. 2011

30. FARIA, M. V. C., **Avaliação de Ambientes e Produtos Contaminados por Agrotóxicos. In É veneno ou é Remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente.** Fiocruz, Rio de Janeiro. pp. 177-209. 2003.
31. FARIA, M. A., MALDANER, L., SANTANA, C. C., JARDIM, I. C. S., COLLINS, C. H., Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters. **Analytica chimica Acta.** v. 582, p. 34-40, 2007.
32. FERRER, C.; LOZANO, A.; AGUERA, A. A.; JIMÉNEZ, G.; FERNÁNDEZ A. R. – ALBA. Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods for Fruits and Vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634 – 7639, 2011.
33. GARCIA, S., O., PINTO, G., P., ENCINA, P., G., MATA, R., I. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. **Science of the Total Environment.** v.444, p. 451–465. 2013.
34. GIL, E. S.; MATHIAS, R. O. Classificação e Riscos Associados aos Resíduos Químicos – Farmacêuticos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2(2), 87-93, 2005.
35. GONÇALVES, F. F, Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado. 2007. 148 p. **Tese (Doutorado em Química)**, UFSM, Santa Maria, RS.
36. GREEN, C. E., ABRAHAM, M. H. Investigation into the effects of temperature and stirring rate on the solid-phase extraction of diuron from water using a C18 extraction disk. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 41-49, 2000.
37. GRÜTZMACHER, D. D., GRÜTZMACHER A. D., AGOSTINETTO, D., LOECK, A. E., ROMAN, R., PEIXOTO, S. C., ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v. 12. p. 632-637, 2008.
38. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003. 876 p.
39. HEBERER, T., ADAM, M. Input of pharmaceuticals, pesticides and industrial chemicals as a consequence of using conventional and non-conventional sources of water for artificial groundwater recharge. **Environment Chelstrym.** V. 1, P. 22. 2004.

40. HERNÁNDEZ, F., SANCHO J.V., POZO O.J., LARA A., PITARCH E. Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/L}$ level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 939, p. 1-11, 2001.
41. HERCEGOVÁ, A. DÖMÖTÖROVÁ, M., MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal Chromatography A**, v.1153, p. 53-74, 2007.
42. ILHA, M. H., MARTINEZ, A. S., BONATO, P. S., Enantioselective analysis of atenolol in biologic fluids: comparison of liquid–liquid and solid-phase extraction method. **Journal of Chromatography B**, v. 767, p. 1-9, 2002.
43. INEA - INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/fma/qualidade-agua.asp>. Acessado em 15/10/2012.
44. INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQ-CGCRE-008**, 2011.
45. JARDIM, I.C.S.F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.
46. KOLBERG, D. I., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. Development of a fast Multiresidue Method for the Determination of Pesticides in dry Samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Journal Food Chemistry**. v. 125. p. 1436-1442. 2011.
47. KOLPIN, D. A. SKOPEC, M., MEYER, M. T., FURLONG, E. T., ZAUGG, S. D. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**, v. 36, p.1202–1211, 2002.
48. KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417–434, 2009.
49. LACEY, C.; BASHA, S.; MORRISSEY, A.; TOBIN, J.M. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. **Environ Monit Assess**, v.10.1007/s, p. 1-14. 2008.
50. LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)** / Fernando M. Lanças – São Carlos: RiMa, 2004a, 96 p.

51. LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004b, 62 p.
52. LAPWORTH, D.J., BARAN, N., STUART, M.E., WARD R.S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and Occurrence. **Environmental Pollution**. 163, p. 287-303. 2012.
53. LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; SZPYLKA, K. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified Quechers Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58. p. 5959-5972. 2010.
54. MANAHAN, Stanley E., Química Ambiental. 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 912 p. 2013.
55. MOMPLAISIR, G. M., ROSAL, C. G., HEITHMAR, E. M., VARNER, K. E. Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples. *Talanta*. v. 81. p. 1380-1386, 2010.
56. MORAZ, S. R., ALDA, M. J. L., BARCEL D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**. 1152. p. 97-115. 2007.
57. MULROY, A.; Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, v. 13 (2), p. 32-36 . 2001.
58. MURRAY, K.E., THOMAS, S.M., BODOUR, A.A. **Environmental Pollution**. 158, p. 3462. 2010.
59. NETO, Maria de L. F., SARCINELLI, Paula de N., Pesticides in Drinking Water: a Risk Assessment Approach and Contribution to the Brazilian Legislation Updating Process. **Eng Sanit Ambient**. v.14, nº 1. p. 69-78. 2009.
60. OMS – **Organização Mundial de Saúde**. Disponível em: <http://www.who.int> . Acessado em: 07/10/2011.
61. ONU - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. População Mundial. Disponível em: <http://www.onu.org.br>. Acessado em 15/10/2012.
62. PERES F, MOREIRA JC & DUBOIS GS. **Agrotóxicos, Saúde e Ambiente: uma introdução ao tema**. In **É veneno ou é Remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Fiocruz, Rio de Janeiro. pp. 21-41. 2003.

63. PERES F, ROZEMBERG B, ALVES SR, MOREIRA, JC & Oliveira-Silva JJ. Comunicação Relacionada ao Uso de Agrotóxicos em Região Agrícola do Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**. v. 35, nº 6. p.564-570. 2001.
64. PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; STARLING M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**. v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.
65. PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1216, p. 4539–4552, 2009.
66. PRIMEL, E. G., ZANELLA, R., KURZ, M. H., GONÇALVES, F. F., MACHADO, S. O., MARCHEZAN, E.. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central de estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica e Monitoramento, **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.
67. PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
68. PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., FRIGGI, C.A., MUNARETTO, J. S., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.
69. RIBANI, M.; BOTTOLI C. B. G.; COLLINS C. H.; JARDIM I. C. S. F.; MELO L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
70. REBOUÇAS, A. C. Estratégias para se Beber Água Limpa. In: Fundação Prefeito Faria Lima-CEPAM. **O Município no Século XXI: cenários e perspectivas**. São Paulo: CEPAM, 1999, pp. 199-215.
71. REBOUÇAS, A., BRAGA, B., TUNDISI, J. G., **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico Uso e Conservação**. 3. ed. São Paulo: Escritura Editora, 2006. 748 p.

72. RISSATO, S. R. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru/SP. **Química Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.
73. RIZZETTI, Tiele M. Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Suco de Laranja Integral Empregando Método QuEChERS e UHPLC-MS/MS. 2013. 125. **Dissertação Mestrado em Química**. Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria.
74. RODRIGUEZ, A.M. FERREIRA, V., CARDOSO, V. V., FERREIRA, E., BENOLIEL, M. J. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **J Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 267 – 278, 2007.
75. SANCO (EUROPEAN COMMISSION), Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Documento Nº SANCO/**12495/2011**, 21/04/2013.
76. SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). **Brasil supera EUA no uso de agroquímicos**. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php>. Acesso em 10 out.2012.
77. SKOOG, D.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
78. SOUZA, L.M, **APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**. 2008. 13 p. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – UFP, Curitiba, PR.
79. SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C., ANDRÉA, M. M. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).
80. STUART, M.E., LAPWORTH, D.J., CRANE, E., HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**. 416, p. 1-21. 2012.
81. STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R., RODRIGUES, S. V., BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

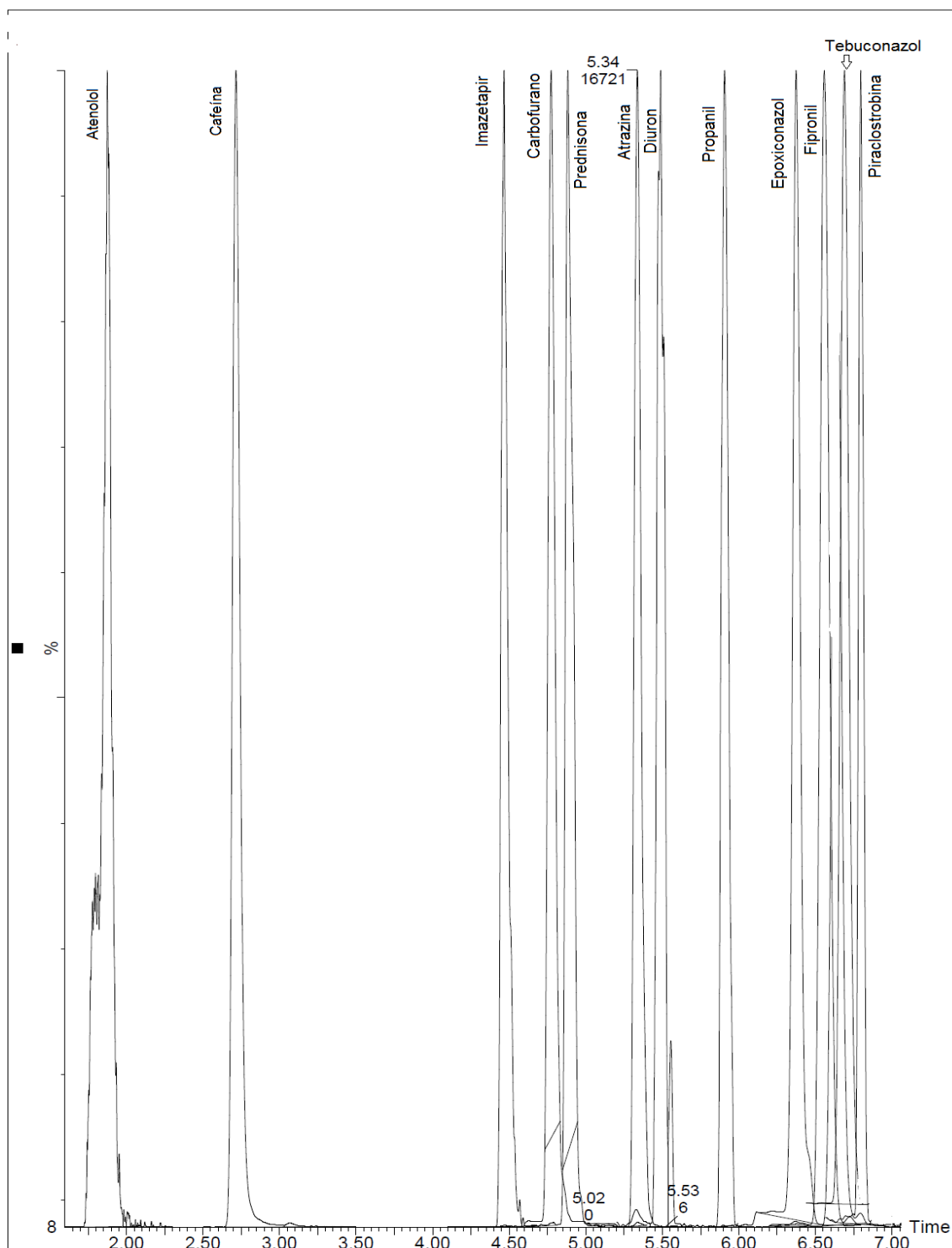
82. SWARTZ, W.C.H., REDDY, S., BENOTTI, M.J., YIN, H.F., BARBER, L.B., BROWNAWELL, B.J., RUDEL, R.A. Steroid Estrogens, Nonylphenol Ethoxylate Metabolites, and Other Wastewater Contaminants in Groundwater Affected by a Residential Septic System on Cape Cod, MA. **Environmental Science and Technology**. 2006, 40, 4894.
83. TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0**. Londres, 2003.
84. VALARINI, P. J.; de NARDO, E. A. B.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, C. J. A.; CASTRO, V. L. S. S. Dinâmica e efeitos de agrotóxicos no meio ambiente. In: SPADOTTO C., A., GOMES, M., A., LUCHINI, L., C., ANDRÉA, M., M. **Monitoramento de riscos ambientais: princípios e recomendações**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 29 p. 2004.
85. VEIGA, M. M., SILVA, DALTON M., VEIGA, LILIAN B., E., FARIA, MAURO V., C., Análise da contaminação dos sistemas Hídricos por agrotóxicos numa Pequena Comunidade Rural do Sudeste do Brasil. Cad. Saúde Pública. v. 22, nº 11. p. 2391-2399. 2006.
86. VERSTRAETEN, I.M., FETTERMAN, G.S., MEYER, M.T., BULLEN, T., SEBREE, S.K. Use of Tracers and Isotopes to Evaluate Vulnerability of Water in Domestic Wells to Septic Waste **Ground Water Monitoring and Remediation**. 2005, 25, 107.
87. ZANELLA, R. PRIMEL, E. G., GONÇALVES, F. F., MARTINS, A. F.. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.
88. WATANABE, N., BERGAMASCHI, B.A., LOFTIN, K.A., MEYER, M.T., HARTER, T. Cod, MA. **Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manure forage fields**. Environmental Science and Technology. 2010, 44, 6591.
89. WILLE, K. NOPPE, H., VERHEYDEN, K., BUSSCHE, V. J., CAETER, P. V., JASSEN, C. R., BRABANDER, H. F., VANHAECKE, L. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 1797–1808, 2010.
90. YAO, C., LI, T., TWU, P., PITNER, W. R., ANDERSON, J. L. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid–

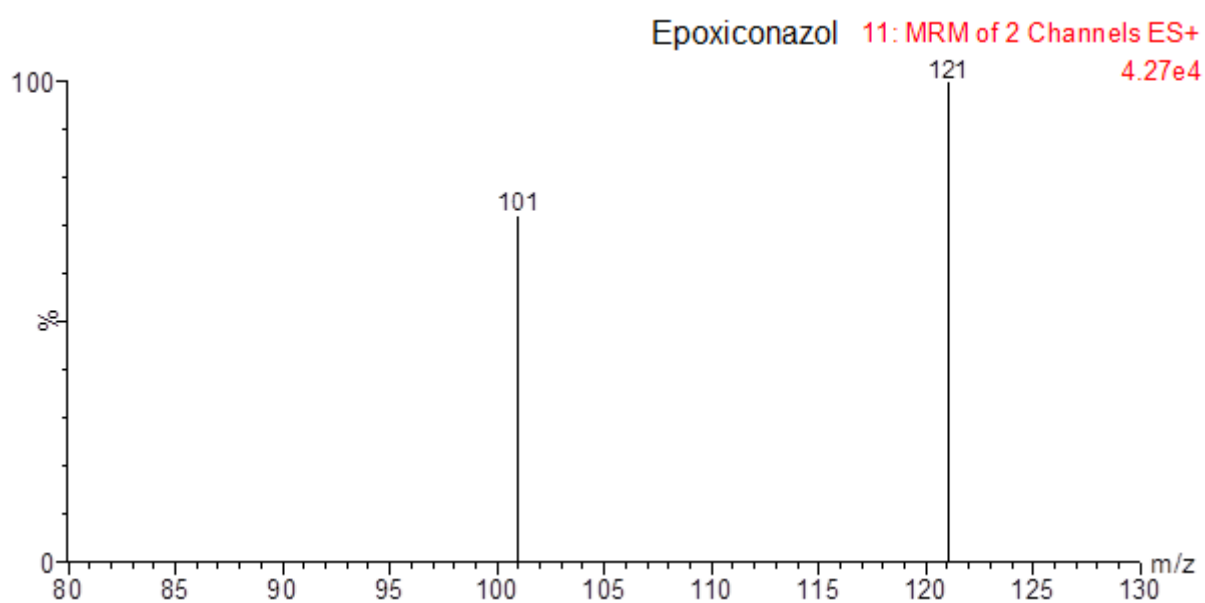
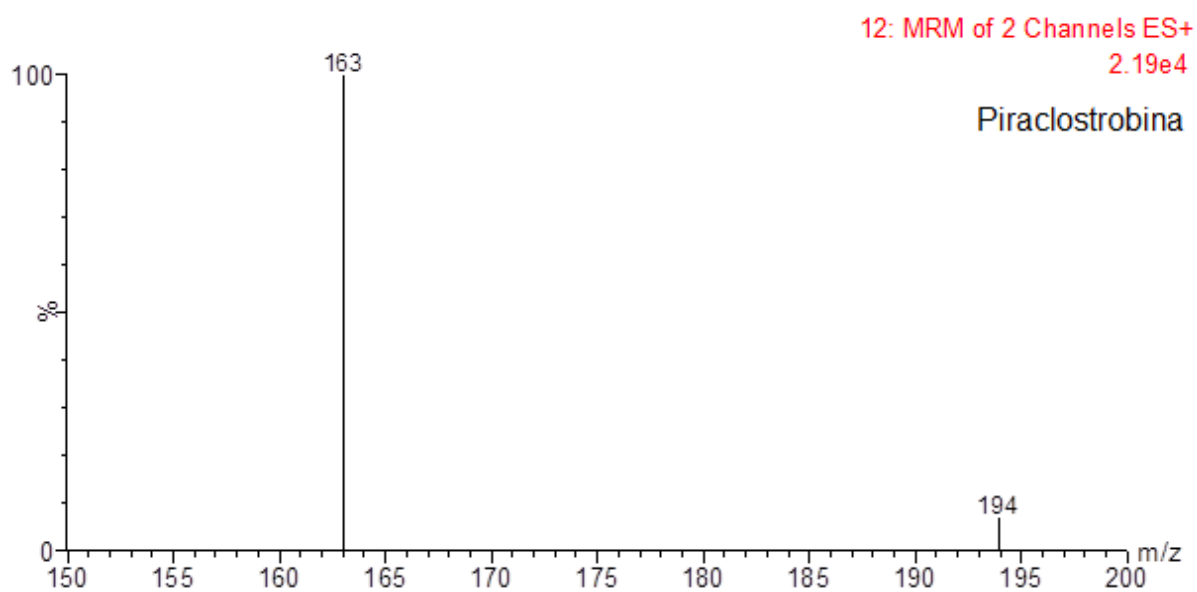
liquid microextraction using functionalized ionic liquids **J. Chromatogr. A.** v.1218, p. 1556. 2011.

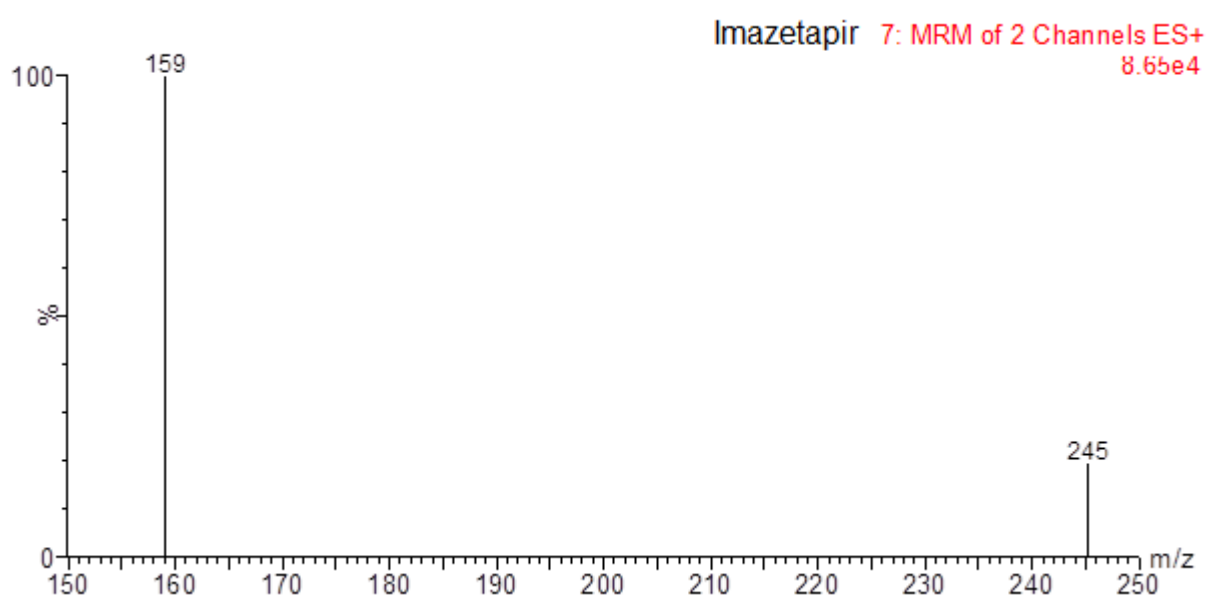
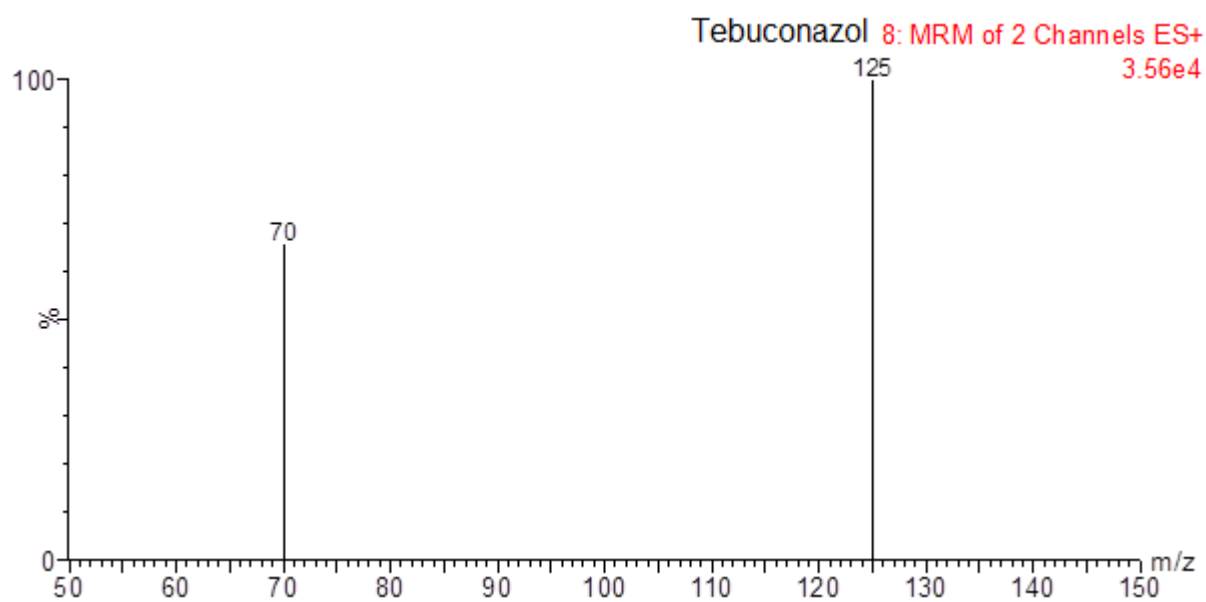
ANEXO 1

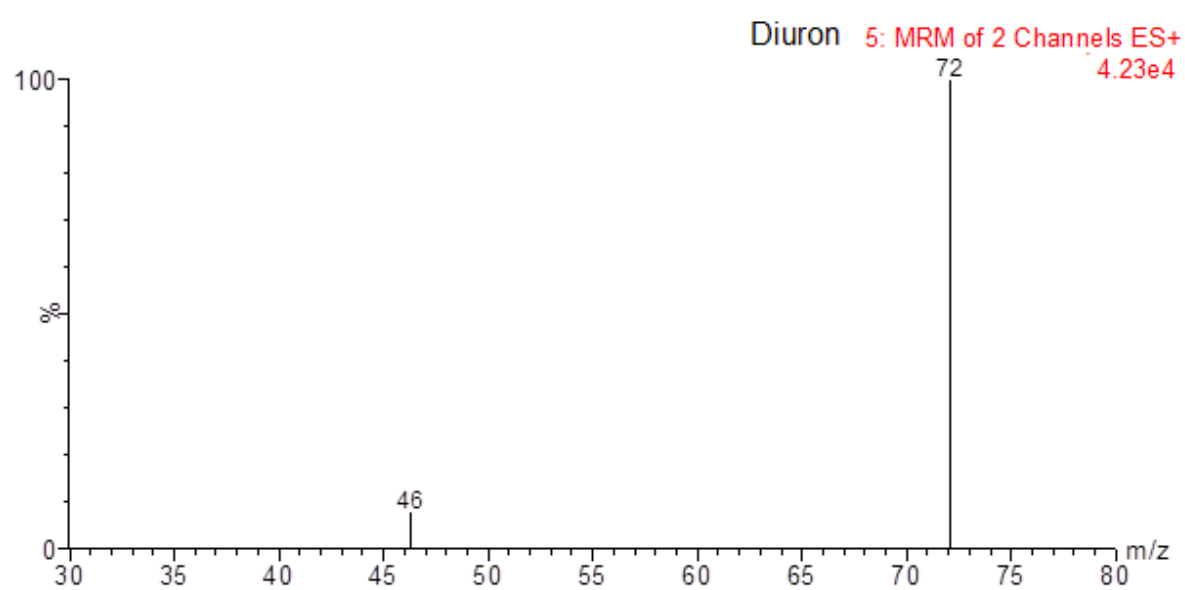
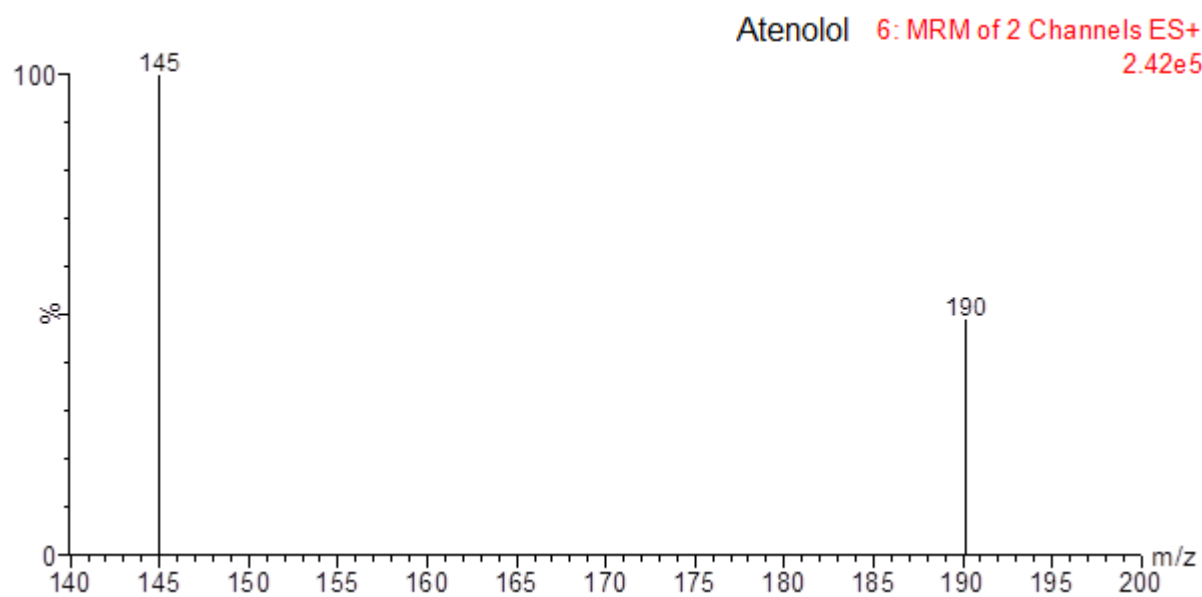
Cromatogramas obtidos para os compostos estudados.

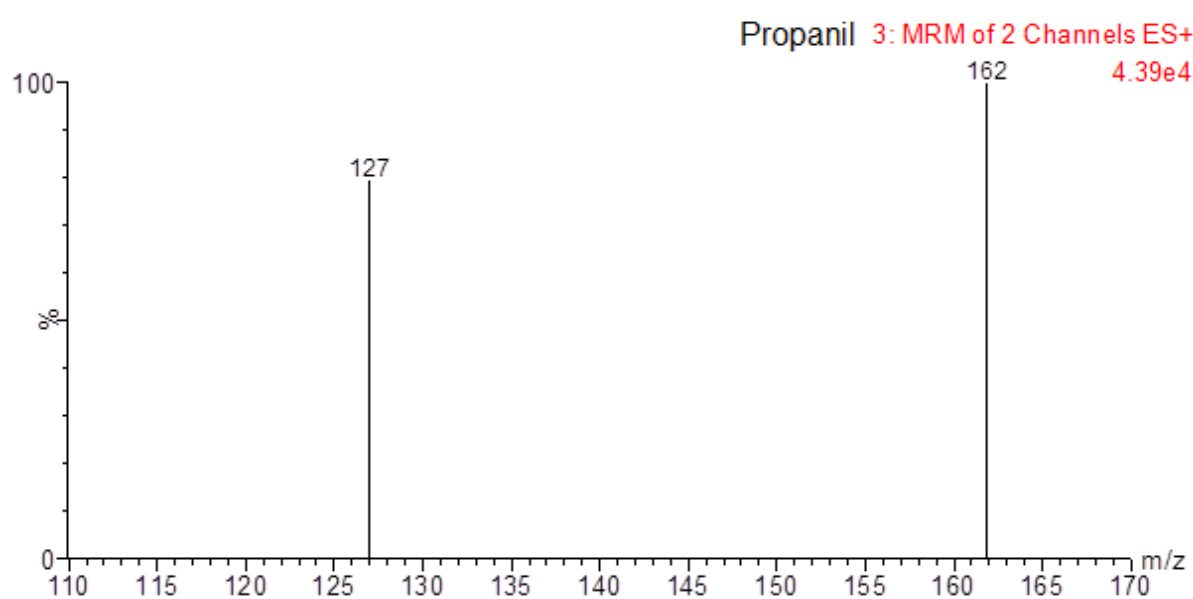
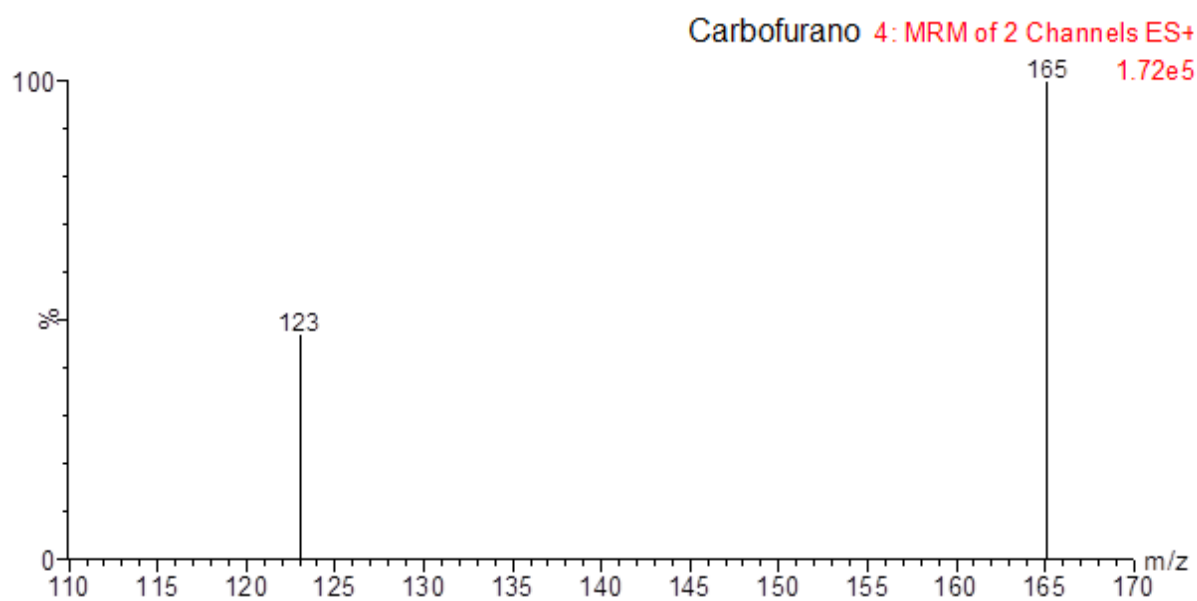
Cromatograma total, no UHPLC, obtido na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato da matriz.

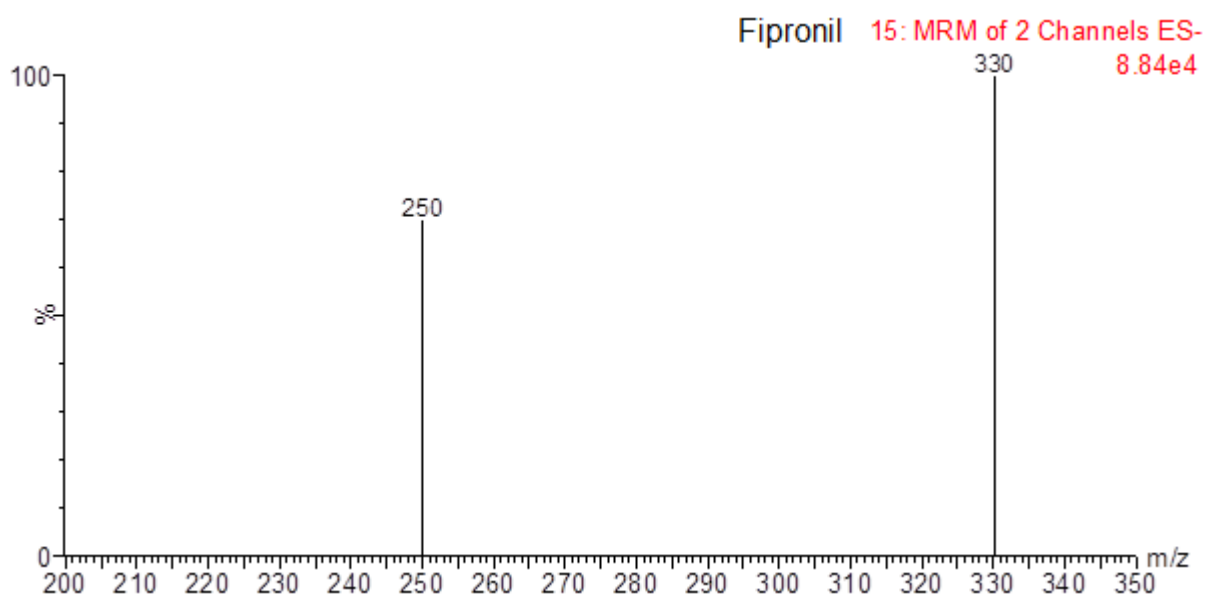
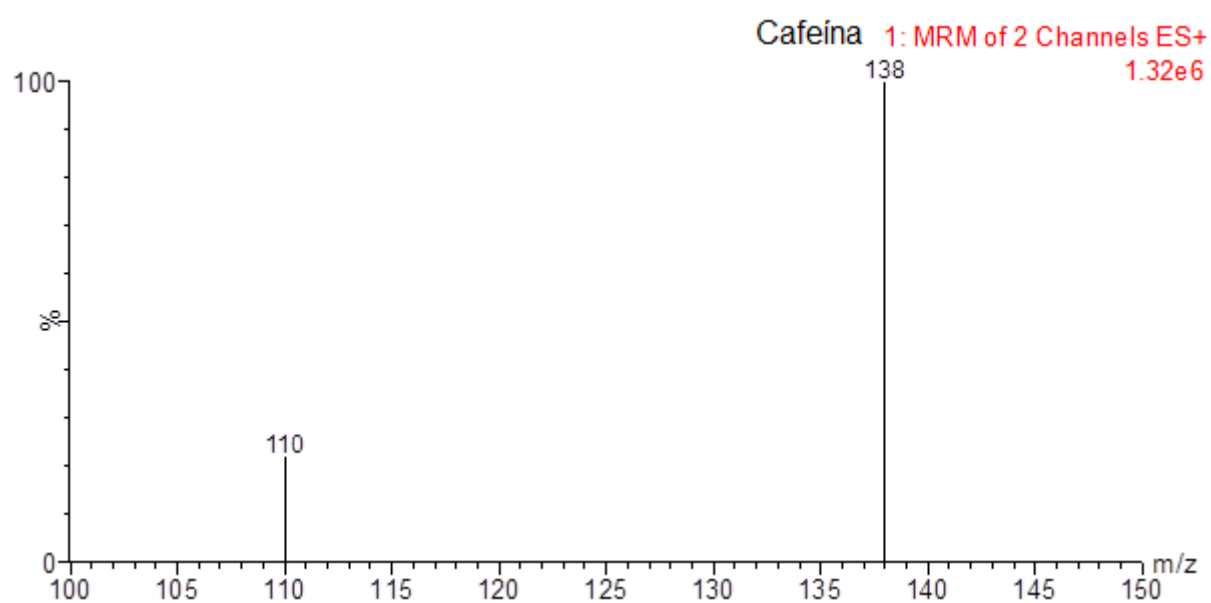


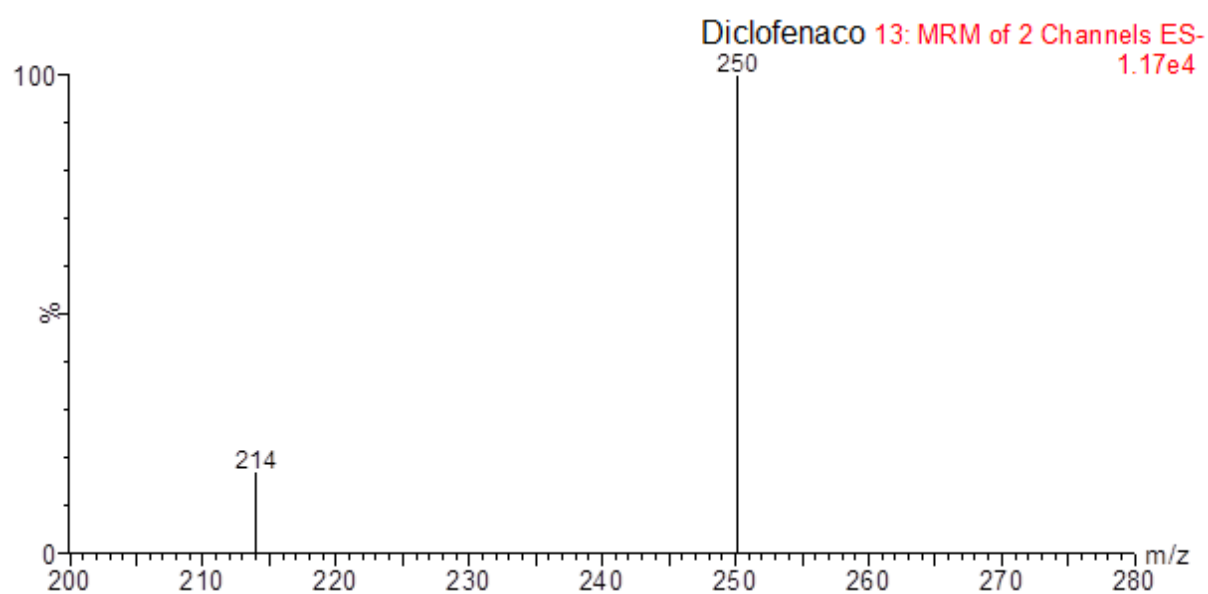
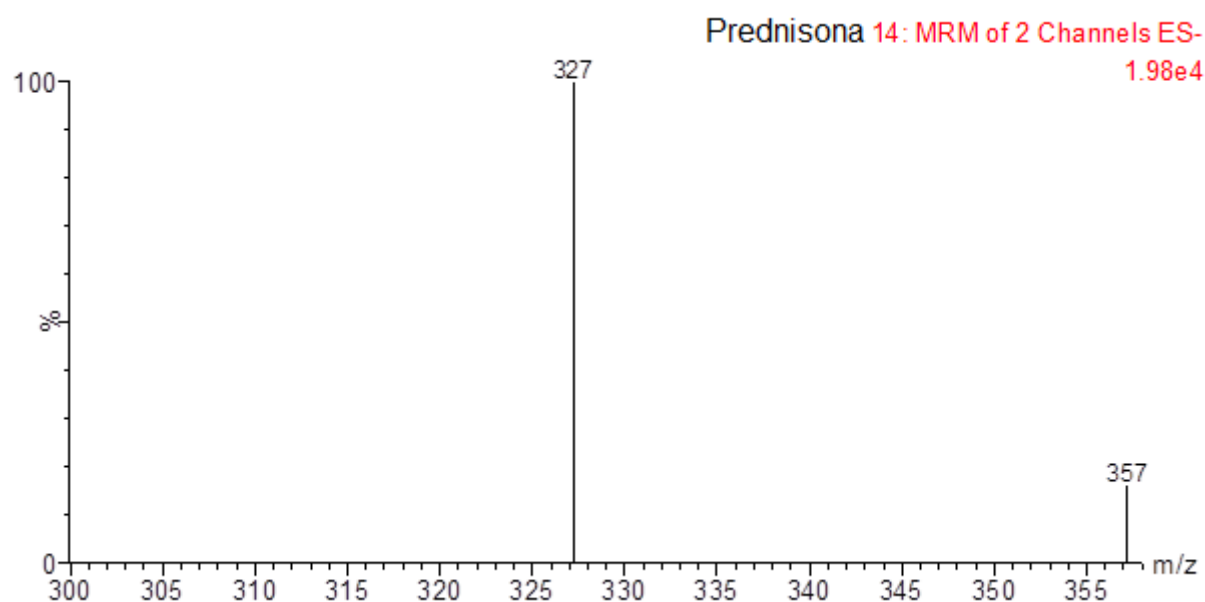
Espectro de massas para os compostos obtido no modo MRM



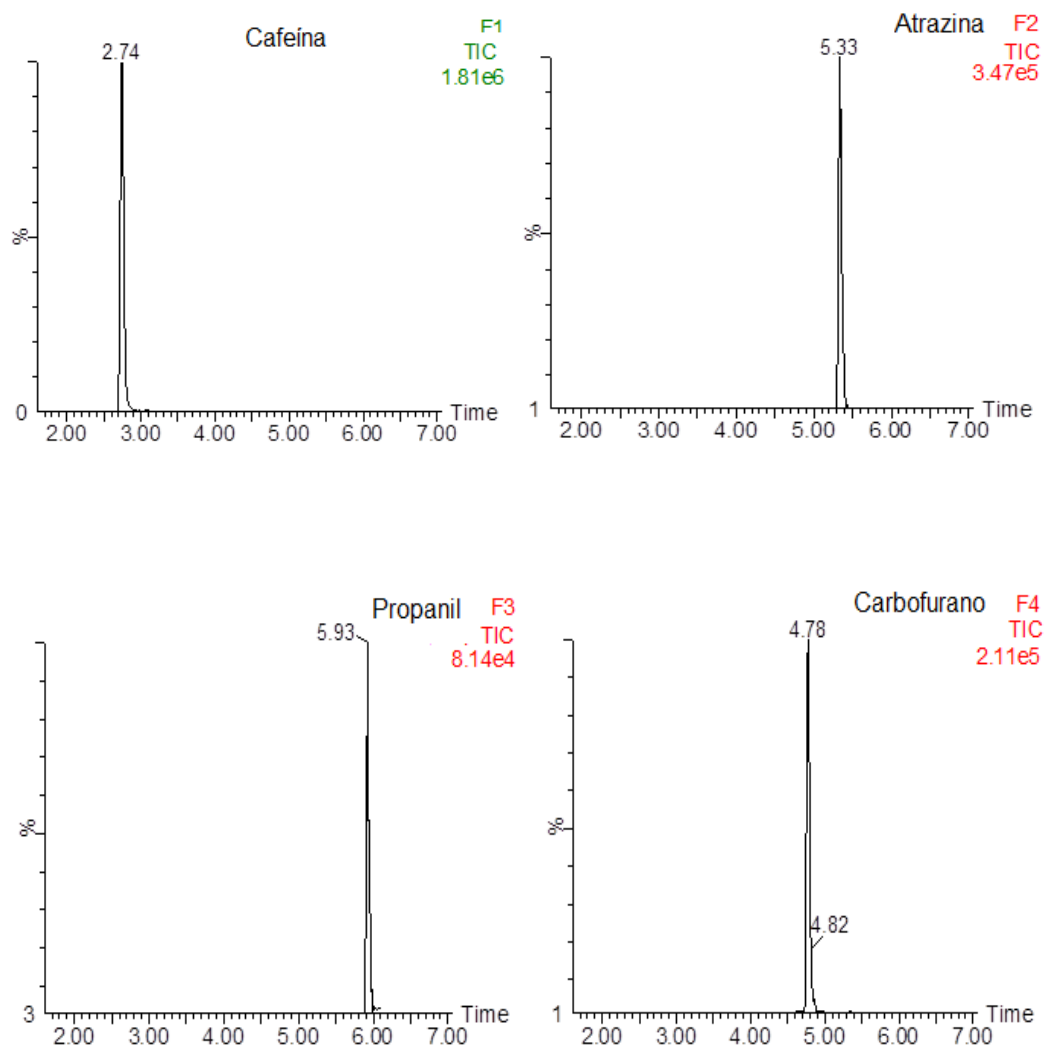


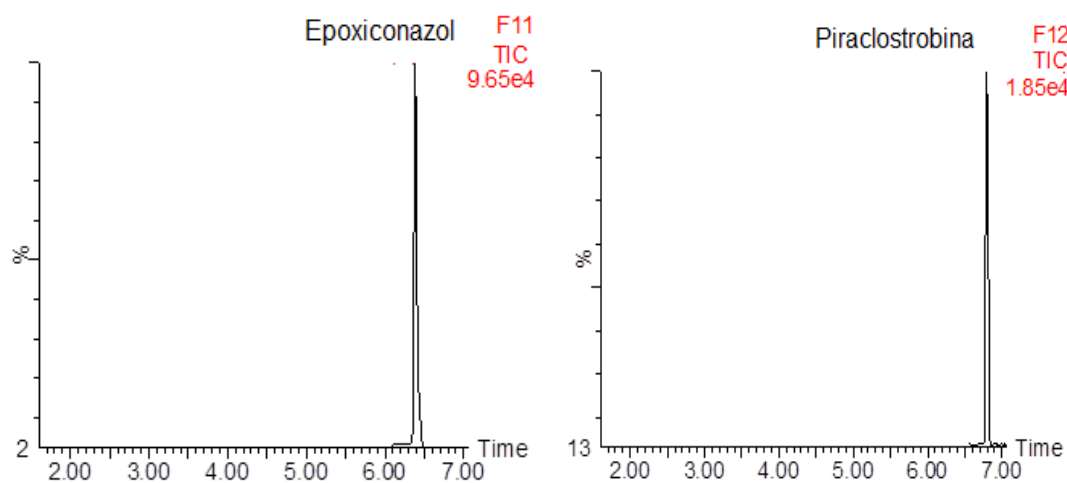
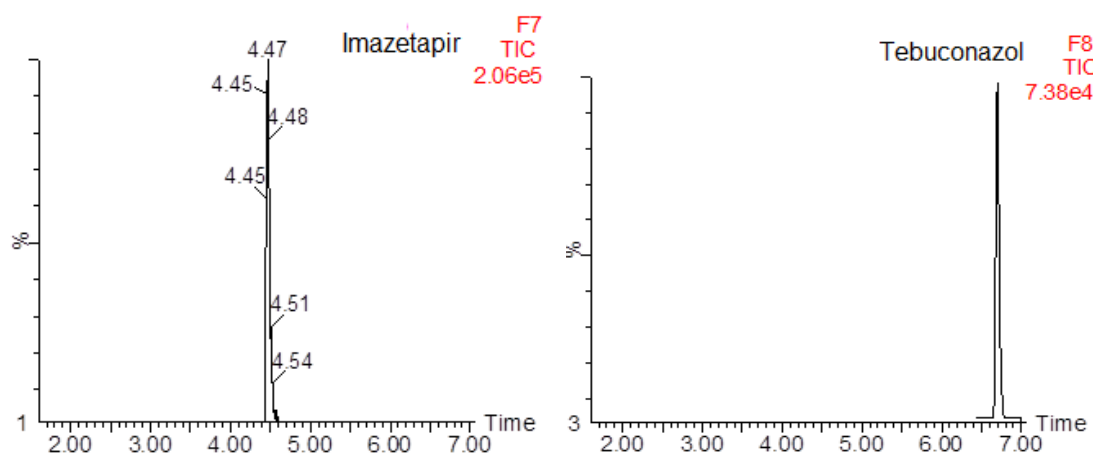
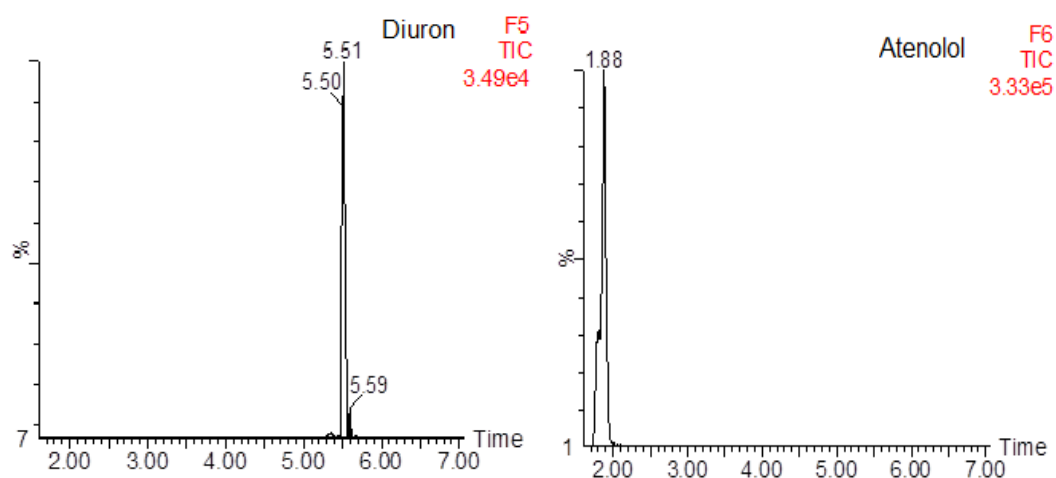


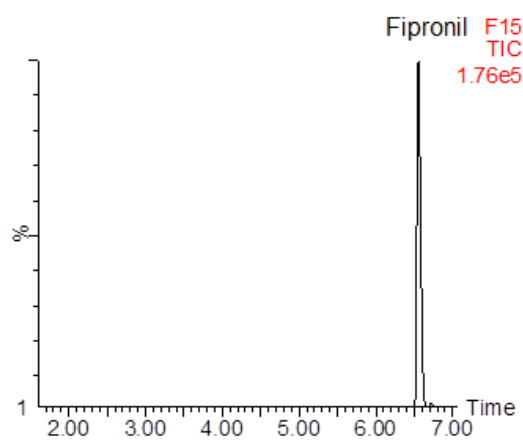
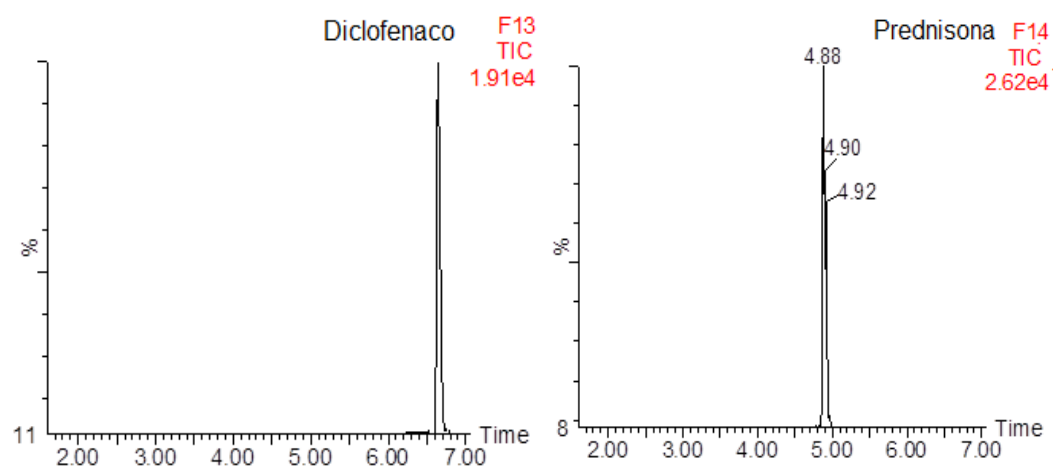




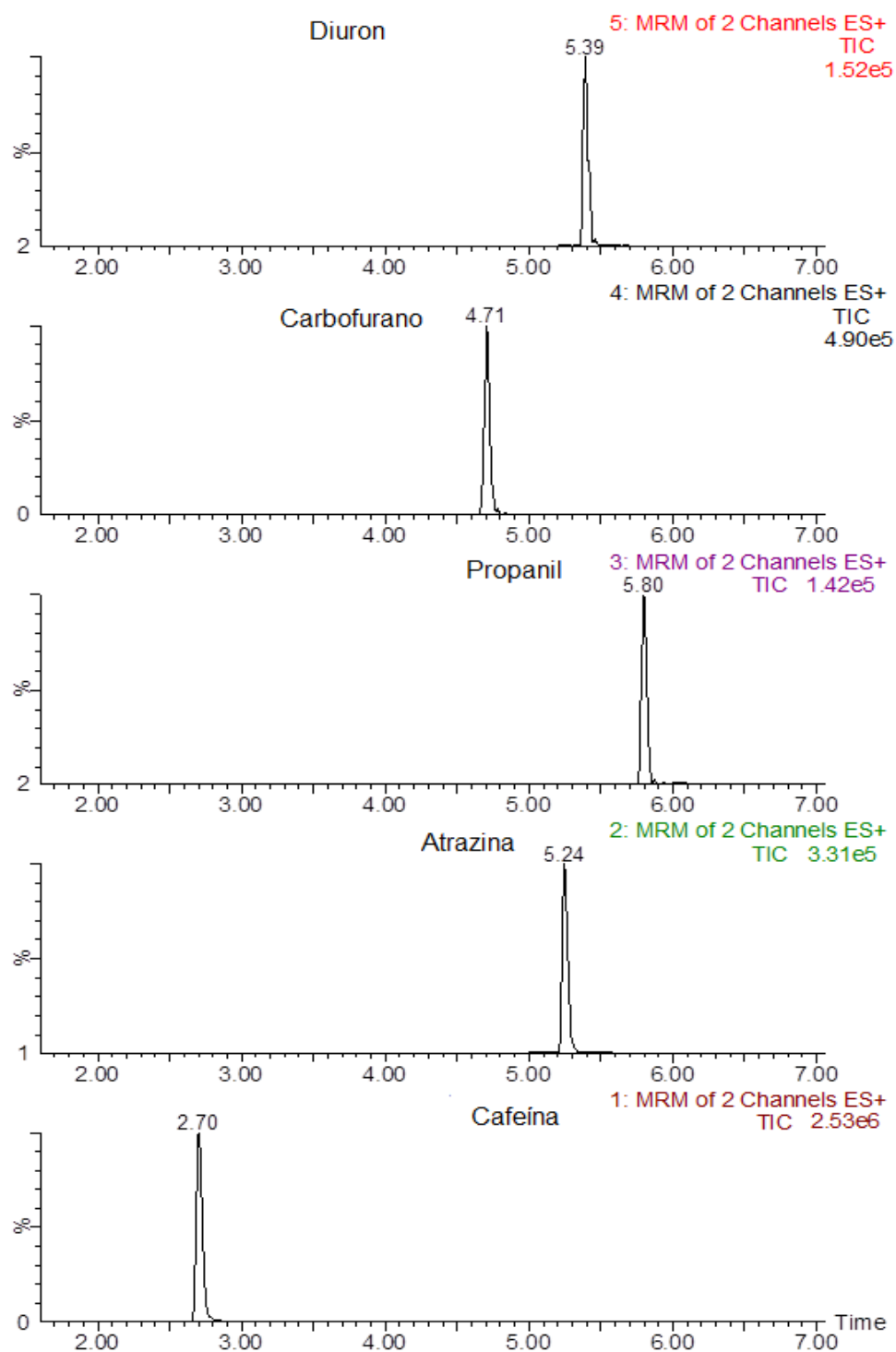
Cromatograma para cada analito em estudo, obtido a partir de uma solução analítica de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

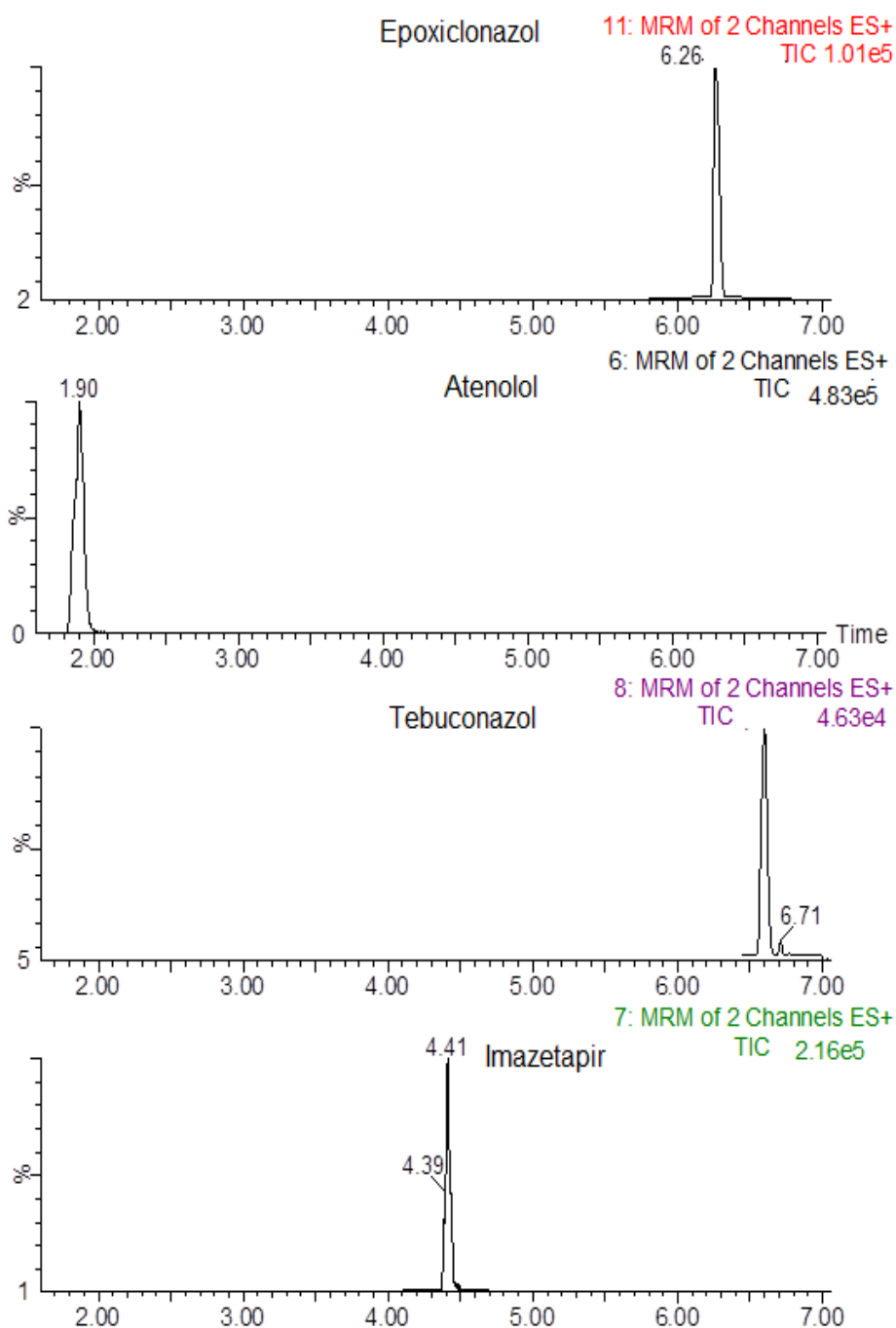


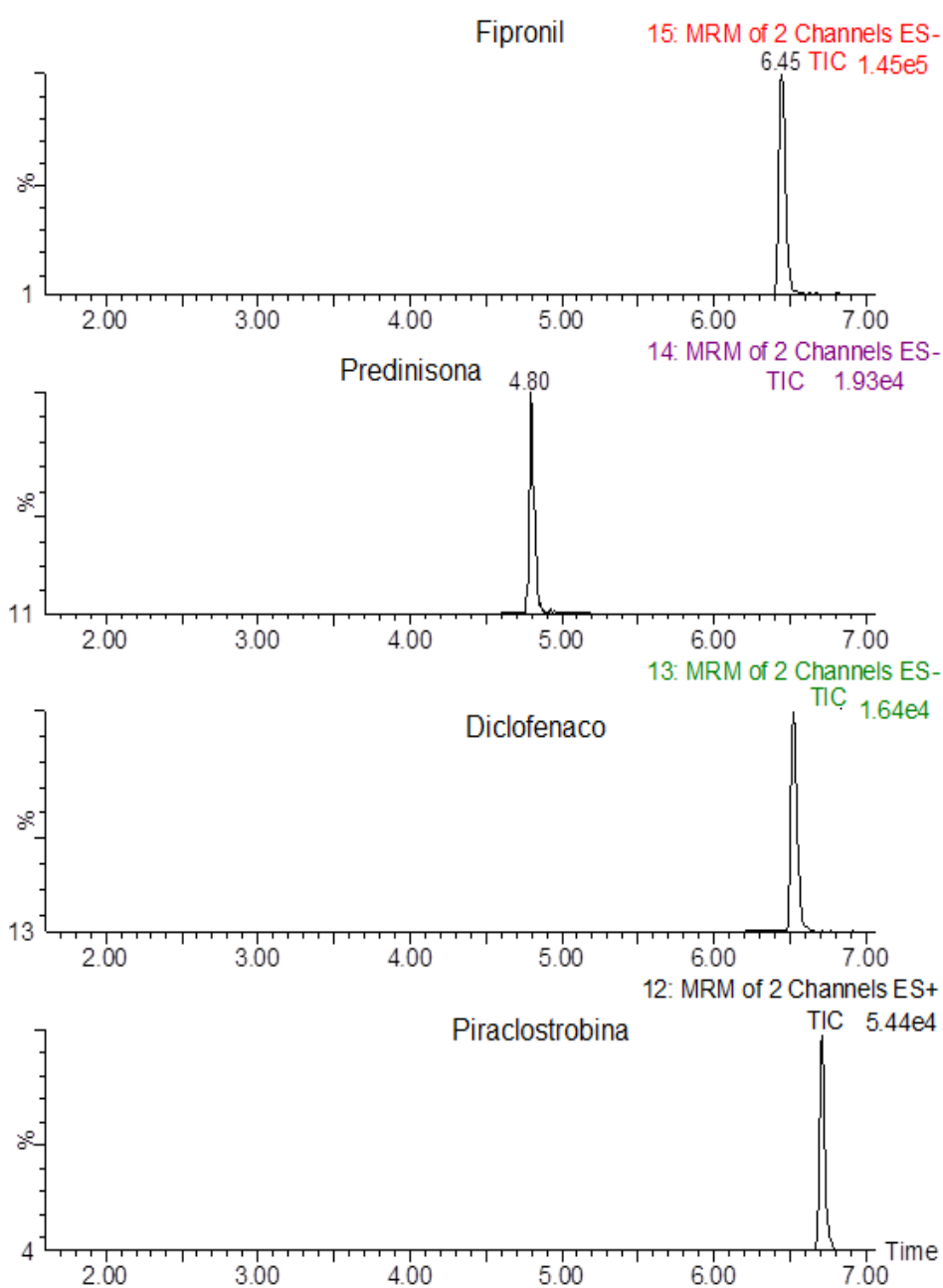




Cromatograma para cada analito em estudo, obtido a partir de uma solução analítica de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada solvente.







ANEXO 2

Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %).

Tabela 18: Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %).

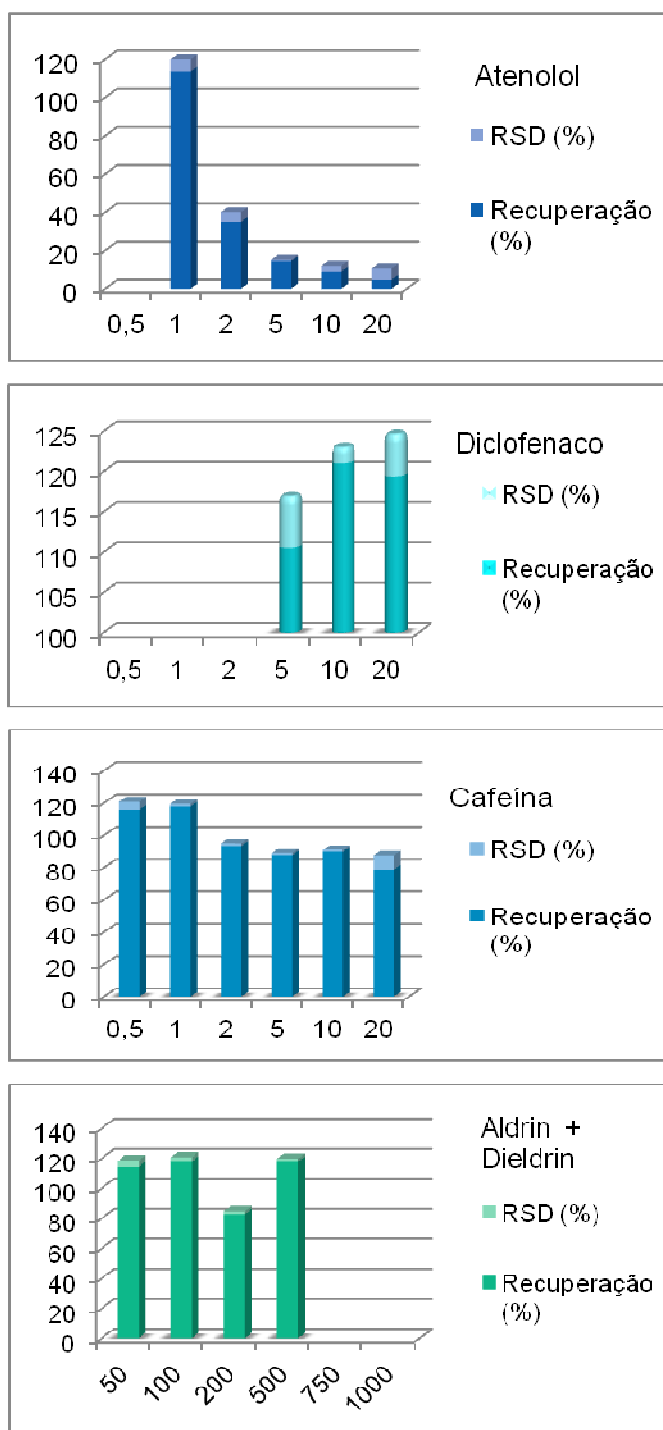


Tabela 19: Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %). (Continuação)

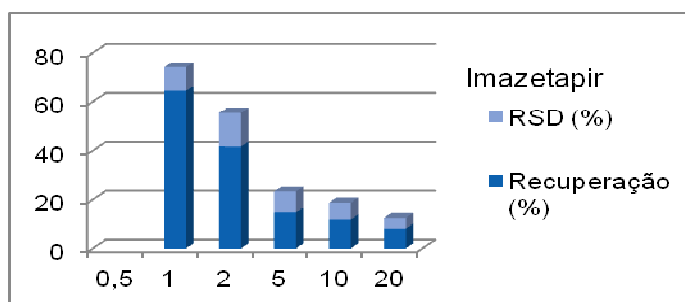
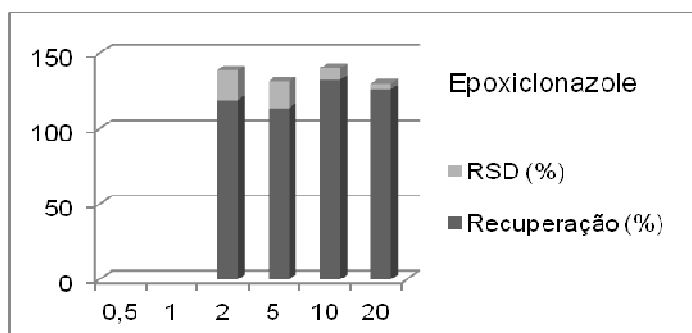
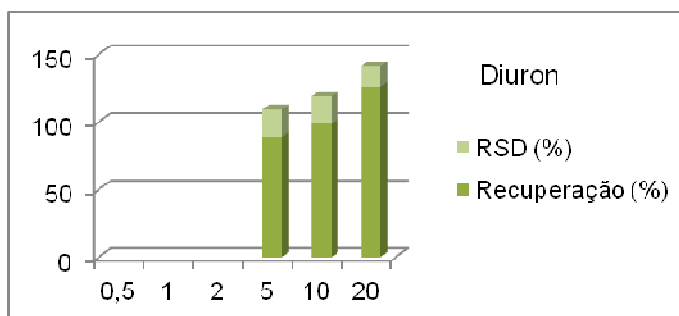
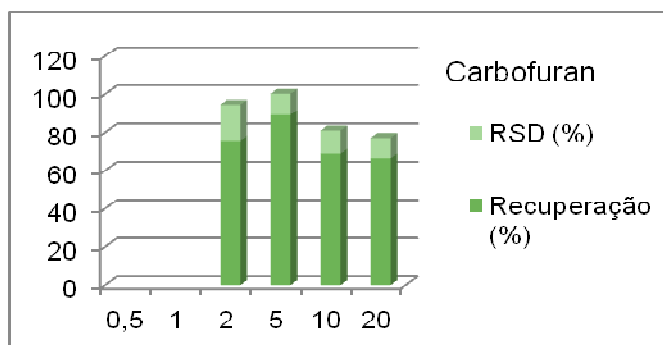


Tabela 20: Resultados das recuperações (R %) obtidas e desvio padrão relativo (RSD %). (Continuação)

