UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO SPE E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Adriana Demoliner

Rio Grande, RS, Brasil

2008

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO SPE E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

por

Adriana Demoliner

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, RS, Brasil

2008

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO SPE E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

elaborada por

Adriana Demoliner

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

_____

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
(Orientador - Presidente)

_____

Profª.Drª. Elina Bastos Caramão (UFRGS)

_____

Profª.Drª. Rosilene Maria Clementin (FURG)

_____

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)

Rio Grande, 17 de dezembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela orientação, pela oportunidade concedida, acreditando em minha capacidade e na confiança em mim depositada . Obrigada!

Aos meus pais, **Ines** e **Armando**, pelo amor, pelo apoio, pela minha educação, por acreditarem em mim e por isso suportando a saudade do dia-a-dia, pelos exemplos de honestidade, perseverança e fé. Pai e mãe, obrigada pela vida.

Às minhas adoráveis irmãs, **Fernanda** e **Cristiana**, e ao meu cunhado **Cleverton**, pelo carinho e apoio incondicional.

À minha querida **Tia Irene**, pelo amor, pelo apoio, pela paciência e por incentivar e aconselhar em tudo que faço.

Ao meu namorado, **Luciano Trevizan**, por seu exemplo de perseverança e fonte de minha inspiração, que me deu forças para vencer cada etapa. Pela compreensão de todos finais de semana de trabalho e ausência e não de descanço, e que por isso, mais uma das nossas etapas chegou ao fim. Amor, te amo.

Aos Mestres,

Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani, **Drª. Márcia Helena Scherer Kurz** e **Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves**, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e por todo saber compartilhado.

À **Prof. Drª. Elina Bastos Caramão**, pelo aceite em participar na defesa da dissertação, membro da banca, e que desde já tenho a certeza de suas contribuições pertinentes que muito vão contribuir para o final deste estudo.

Aos membros da banca, professores doutores **Rosilene Maria Clementin** e **Fábio Ferreira Gonçalves**, pela disposição que terão em ler e dispensar tempo para avaliação deste trabalho, e desde já sei das suas valiosas sugestões.

À minha grande amiga, **Maria Regina Casartelli**, que me acolheu desde o início da graduação, minha conselheira e companheira de todos os momentos, principalmente pelo apoio nas horas mais difíceis, pela contribuição intelectual que foi a base para o meu crescimento,... muito tenho a te agradecer!

À minha amiga **Liziara**, por sua amizade, estando sempre pronta a me ajudar, por seus debates acalorados no grupo e pela sua forma alegre e desprendida tão agradável de compartilhar durante estes dois anos.

À minha colega e amiga **Sergi**, pelo companheirismo e todo apoio durante esta jornada, estando sempre pronta para me ajudar na realização deste trabalho.

À **Elisa**, minha amigona e colega desde a graduação, obrigada pela tua amizade, companhia tão agradável, pelas nossos momentos de estudo, pelas tuas aulas de química orgânica e pela forma alegre e desprendida que compartilhamos cada uma das nossas vitórias.

Às amigas **Aline** e **Adriana**, que sempre me incentivaram em todos os momentos, pela amizade, carinho e apoio.

Aos colegas do LACOM, **Ana Laura**, **Lizi**, **Sergi**, **Adriana**, **Luis**, **Sherol**, **Vivi**, **Fabi**, **Ana Raisa**, **Flávio**, **Bruno**, **Maristela**, **Márcia** e **Fábio** que me acolheram no grupo, por suas contibuições de variadas formas e pelos momentos de descontração.

Aos amigos **Renato** e **Bianca**, por suas amizades, conselhos e momentos de descontração.

À **Prof. Dr[a]. Rosilene Maria Clementin**, por sempre estar disposta a sanar minhas dúvidas de espectrometria de massas e ao incentivo pelo meu trabalho.

À **Waters**, em especial ao **Dr. Michael Murgu**, pelo meu desempenho e aprendizado em LC-MS/MS e por sua paciência durante esta jornada.

À **CORSAN**, em especial ao **Júlio** e a **Carla**, que sempre me receberam de forma tão agradável, por suas contribuições e incentivo na pesquisa.

À **FURG**, por todo apoio desde a graduação, e ao ensino gratuito e de qualidade.

Aos professores criadores, do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, no qual me proporcionaram esta realização e formação com qualidade.

Agradeço à **Deus**, pela proteção e por me dar a vida.

"Os ideais que iluminaram meu caminho
e sempre me deram coragem para enfrentar a vida com alegria foram
a Verdade, a Bondade e a Beleza."

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal do Rio Grande

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO SPE E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

AUTORA: ADRIANA DEMOLINER
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL
Data e local da defesa: Rio Grande, 17 dezembro de 2008

A aplicação de agrotóxicos nas práticas agrícolas aumentou muito nos últimos anos. Isto vem ocorrendo devido ao crescimento populacional, demandando maior produção de alimentos. O uso de agrotóxicos e seus resíduos tornaram-se um problema devido a possível contaminação das águas de superfície e subterrânea, podendo impactar o meio ambiente e causar danos à saúde pública.

Na cidade de Rio Grande, RS, Brasil, o suprimento de água potável é realizado pela CORSAN (Companhia Riograndense de Saneamento), que capta a água do Canal São Gonçalo, o qual estabelece uma ligação entre as duas lagoas: Lagoa dos Patos e Lagoa Mirim. Em suas margens há também a captação de água para irrigação das culturas agrícolas. Esta interação entre o uso da água das lagoas e a agricultura, pode resultar na contaminação das águas que são captadas para abastecimento dos municípios situados na região.

Uma metodologia analítica empregando Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Líquida acoplada a uma fonte de ionização por *Electrospray tandem* Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS) foi desenvolvida e validada para a determinação de dezoito agrotóxicos multiclasses (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e dois metabólitos em amostras de água superficial e de abastecimento público. Esta metodologia foi aplicada para monitoramento durante dez meses na água superficial do Canal São Gonçalo e na água de consumo da cidade de Rio Grande, após o tratamento pela CORSAN. Os agrotóxicos selecionados foram: clomazona, bispiribaque-sódio, diurom, atrazina, simazina, imazetapir, imazapique, metsulfuron-metílico, quincloraque, penoxsulam, 2,4-D, pirazosulfuron-etílico, bentazona, propanil, irgarol, tebuconazol, fipronil e carbofurano. Os metabólitos foram: 3,4-DCA e 3-hidroxicarbofurano. Os limites de detecção do método variaram entre 0,4 – 40,0 ng L^{-1}, enquanto para os limites de quantificação a variação foi de 4,0 – 100,0 ng L^{-1}. Todos os compostos apresentaram excelente linearidade, com coeficiente de determinação maior do que 0,99. As recuperações empregando SPE com cartuchos contendo 500 mg de C18ec, variaram entre 70 a 120%, para 95% dos compostos, apresentando %RSD $\leq$ 20%. Através do monitoramento de múltiplas reações (MRM), duas transições diferentes (íon precursor – íon produto) foram selecionadas para cada composto, uma para quantificação e outra para confirmação, o que aumentou a seletividade do método. Para as amostras analisadas, foram detectados agrotóxicos nível de ng L^{-1}. O método desenvolvido é sensível, rápido e apresenta elevada seletividade, permitindo a identificação e a quantificação dos agrotóxicos em águas superficiais e de abastecimento público, atendendo os níveis requeridos pelos órgãos reguladores como da União Européia (98/83/EC) e do Brasil segundo a Portaria Nº. 518 (25/03/2004).

Palavras-chave: Validação, SPE, LC-ESI-MS/MS, agrotóxicos, metabólitos, água.

ABSTRACT

Master's Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal de Rio Grande

OTIMIZATION AND VALIDATION OF A ANALYTICAL METHOD USING SPE AND LC-ESI-MS/MS FOR DETERMINATION OF MULTIPLE CLASSES OF PESTICIDES AND METABOLITES IN SURFACE AND DRINKING WATER

AUTHOR: ADRIANA DEMOLINER
ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.
December 17th, 2008, Rio Grande, RS, Brazil

Pesticide application has increased in agricultural cultures lately. It has happened because of the population growth since more production of food is needed to meet the demands. Pesticide application and its residues have become a problem due to the possibility of contamination of ground and surface waters, and have had potential impact on the environment and public health.

In Rio Grande, RS, Brazil, the potable water is supplied by *CORSAN* (*Companhia Riograndense de Saneamento*), which collects water from *São Gonçalo* Channel, an important channel that connects two lagoons - *Lagoa dos Patos* and *Lagoa Mirim* - and treats it for public supply. Near the spots on the banks where the company collects the water, some farmers raise grains, mainly rice. The interaction between the culture and the lagoon may be a strong factor for water contamination.

An analytical method based on the solid-phase extraction with liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed and validated for the determination and confirmation of eighteen polar pesticides (herbicides, insecticides and fungicides) and two metabolites in water samples. This method was applied to the 10-month monitoring of surface waters from *São Gonçalo* Channel, and drinking water in Rio Grande, after having been treated by *CORSAN*. The analyzed pesticides were: clomazone, tebuconazole, bispyribac-sodium, diuron, irgarol, atrazine, simazine, imazetapir, imazapic, metsulfuron-methyl, quinclorac, penoxsulam, 2,4-D, pyrazosulfuron-ethyl, fipronil, bentazone, pronanil, carbofuran and the metabolites 3,4-DCA and carbofuran 3-hidroxy. The limits of detection varied between 0.4 - 40.0 ng L^{-1} and the limits of quantification, between 4.0 – 100.0 ng L^{-1}. Good linearity, with r^2>0.99 for all compounds, was obtained. The recovery, using SPE with 500 mg C18ec, varied from 70% to 120%, for 95% of the compounds, with RSD below 21% for all. Through multiple reaction monitoring (MRM), two different transitions, precursor ion-product ion were selected for each pesticide for quantification and qualification; they increased the selectivity of the method. The methodology employed SPE and LC-ESI-MS/MS, which are fast, sensitive and selective in a simple sample preparation procedure that can be used for the convenient and effective determination of pesticide residues in surface and drinking water samples in accordance with Law no. 518 (25/03/2004) of the Ministry of Health, Brazil, and the European Union Directive on drinking water quality (98/83/EC).

Keywords: Validation, SPE, LC-ESI-MS/MS, pesticides, metabolites, water

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estimativa do mercado de defensivos agrícolas no período de Jan a Set de 2007 vs 2008.....9
FIGURA 2: Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por agrotóxicos.....12
FIGURA 3: Classificação do potencial de poluição segundo o método de Goss.....14
FIGURA 4: Etapas em SPE para isolamento de um composto.....22
FIGURA 5: Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....23
FIGURA 6: Teoria da Ionização por *Eletrospray*.....25
FIGURA 7: Sistema MS em *tandem*.....29
FIGURA 8: Sistema LC-MS/MS.....42
FIGURA 9: Sistema SPE para a pré-concentração das amostras.....46
FIGURA 10: Fluxograma das etapas para a extração e pré-concentração das amostras por SPE.....47
FIGURA 11: Localização da região de estudo.....50
FIGURA 12: Locais de amostragem (A) coleta da água de abastecimento público e (B) entrada da água do Canal São Gonçalo na ETA.....50
FIGURA 13: Cromatograma mostrando a razão Sinal/Ruído.....53
FIGURA 14: Espectro de massas (ESI +) do herbicida simazina demostrando o íon precursor e os íons produto.....60
FIGURA 15: Cromatograma obtido pelo monitoramento de múltiplas reações (MRM) para o herbicida simazina. (A) fragmento *m/z*=132 e (B) fragmento *m/z*=124.....60
FIGURA 16: Cromatograma da separação dos compostos contendo as transições empregadas para a quantificação.....63

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Evolução do consumo de água em âmbito mundial (Km^3/ano).....4

TABELA 2: Percentagem de consumo de agrotóxicos em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004 9

TABELA 3: Variação geral na dose dos agrotóxicos aplicados, ocorrida no século XX.....11

TABELA 4: Classificação dos agrotóxicos.....17

TABELA 5: Agrotóxicos estudados que possuem registro na legislação brasileira.....18

TABELA 6: Descrições dos padrões analíticos sólidos utilizados.....40

TABELA 7: Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos que indicam seu potencial de risco para ambientes aquáticos.....41

TABELA 8: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, para o modo de aquisição MRM.....57

TABELA 9: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo ESI-, para o modo de aquisição MRM.....58

TABELA 10: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por LC-ESI-MS/MS.....65

TABELA 11: Valores de LOD e LOQ obtidos para a mistura dos 20 compostos.....65

TABELA 12: Valores de LOD e LOQ obtidos em solução contendo cada padrão individualmente.....68

TABELA 13: Resultados da repetibilidade (RSD_r) e da precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento.....70

TABELA 14: Resultados da precisão intermediária (%RSDpi) do método.....72

TABELA 15: Recuperações (R) e RSD (%) para os agrotóxicos e metabólitos em amostras de água e analisados por LC-ESI-MS/MS.....74

TABELA 16: Resultados do monitoramento realizado de janeiro a outubro nas água de superfície do Canal são Gonçalo (Concentrações em ng L^{-1}).....78

TABELA 17: Resultados do monitoramento realizado de janeiro a outubro na água de abastecimento público no município de Rio Grande (Concentração em ng L^{-1}).....79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental

ANA - Agência Nacional das Águas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

API – Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APPI **-** Fotoionização a Pressão Atmosférica**,** do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*

APTAS – Alto Potencial de Transporte Associado ao Sedimento

APTDA – Alto Potencial de Transporte Dissolvido em Água

BPTAS – Baixo Potencial de Transporte Associado ao Sedimento

BPTDA – Baixo Potencial de Transporte Dissolvido em Água

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CI - Ionização Química, do inglês Chemical Ionization

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CORSAN – Companhia Riograndense de Saneamento

Da – Daltons (unidade de massa)

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

d.i. – diâmetro interno

DL_{50} – dose letal 50%

DT_{50} – meia-vida

EI - Ionização por Impacto de Elétrons, do inglês *Electron Ionization*

EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

ESI – Ionização por Eletrospray, do inglês *ElectroSpray Ionization*

ESI+ – Ionização por Eletrospray no modo positivo, do inglês *ElectroSpray Ionization Positive Mode*

ESI- – Ionização por Eletrospray no modo negativo, do inglês *ElectroSpray Ionization Negative Mode*

ETA – Estação de Tratamento e Água

FM – fase móvel

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

h - horas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO – International Standard Organisation

k_H = Constante de Henry

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

K_{oc} – Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

m/z – razão massa-por-carga

MeOH – metanol

MRM – Monitoramento de múltiplas reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

n – Número de medidas

nd – não detectado

OMS – Organização Mundial da Saúde

pK_a – potencial de dissociação ácida

PTFE - politetrafluoretileno

PV – pressão de vapor

R – Recuperação

r- Coeficiente de correlação

r^2 – Coeficiente de determinação

Rs - resolução

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

s – estimativa do desvio padrão absoluto

S – Solubilidade em água

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Micro Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

s_r = desvio padrão dos resíduos

t - tempo

$t_{1/2}$ – tempo de meia-vida

t_R – tempo de retenção

UV – ultravioleta

v/v – volume por volume

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Cromatogramas dos composto quantificados pelo programa QuanLnyx que foram ionizados no modo positivo (ESI+).....91
APÊNDICE 2 - Cromatogramas dos composto quantificados pelo programa QuanLnyx que foram ionizados no modo negativo (ESI-).....92
APÊNDICE 3 - Estruturas dos compostos analisados no modo de ionização positivo.....93
APÊNDICE 4 - Estrutura dos agrotóxicos analisados no modo de ionização negativo.....94
APÊNDICE 5 - Espectros de massa de cada um dos 20 compostos analisados demonstrando as fragmentações.....95
APÊNDICE 6 - Compostos que foram detectados ao longo do período de amostragem.....105
APÊNDICE 7 - Somatório das concentrações dos compostos detectados durante cada um dos dez meses de amostragem..... 106
APÊNDICE 8 - Recuperações para SPE empregando cartuchos C18ec de 500 mg 107

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Valores de referência dos agrotóxicos presentes em água para consumo humano adotados pela Portaria nº 518 de março de 2004 do Ministério as Saúde Publicado no Diário Oficial da União.....108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 Água 3

2.1.1 Consumo da água 4

2.2 Os Agrotóxicos 5

2.2.1 Conceitos 5

2.2.2 Aspectos gerais 6

2.3 Uso dos agrotóxicos 8

2.4 Destino dos agrotóxicos no ambiente 10

2.4.1 Potencial de risco de contaminação das águas superficias 13

2.4.2 Caracterização e propriedades físico-químicas 15

2.4.3 Toxicidade dos agrotóxicos 16

2.5 Legislação para agrotóxicos 17

2.6 Análise de agrotóxicos em água 18

2.6.1 Preparo de amostra 19

2.6.2 Extração de agrotóxicos 20

2.6.3 Extração em Fase Sólida para a pré-concentração e extração dos compostos 21

2.7 Procedimentos da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas 22

2.7.1 Estágios do processo de LC-MS/MS 24

2.7.2 Modos de operação 29

2.8 Aplicação da LC-MS/MS na análise de agrotóxicos em água 30

2.9 Validação do método analítico 34

2.9.1 Curva analítica e linearidade 35

2.9.2 Sensibilidade 35

2.9.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação 36

2.9.4 Recuperação (Exatidão) 36
2.9.5 Precisão 37
3 OBJETIVOS 38
4 MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1 Compostos escolhidos para este estudo 39
4.2 Instrumentação 42
4.3 Solventes, reagentes e materiais 43
4.4 Preparo das soluções analíticas 43
4.5 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS 44
4.6 Otimização do sistema cromatográfico para determinação dos compostos 45
4.6.1 Seleção da fase móvel e da vazão 45
4.6.2 Acidez da fase móvel 45
4.6.3 Volume de injeção 46
4.7 Sistema SPE para a pré-concentração das amostras 46
4.7.1 Procedimento SPE para a extração e pré-concentração dos compostos 47
4.7.2 Sorvente empregado 48
4.8 Ajuste do pH da amostra 49
4.9 Procedimento de LC-ESI-MS/MS 49
4.10 Amostragem e conservação 49
4.11 Validação do método para amostras aquosas 51
4.11.1 Curva analítica 51
4.11.2 Linearidade e faixa de trabalho 52
4.11.3 Sensibilidade 52
4.11.4 Limite de detecção e limite de quantificação 53
4.11.5 Recuperação (Exatidão) 54
4.11.6 Precisão 55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
5.1 Parâmetros para a otimização das fragmentações por LC-MS/MS 56
5.1.1 Escolha da fonte de ionização 56
5.1.2 Estudo das fragmentações 59
5.2 Sistema da Cromatografia Líquida para a injeção dos compostos 61
5.3 Validação do método analítico 64
5.3.1 Curva analítica e linearidade 64

5.3.2 LOD e LOQ determinados para a mistura 66
5.3.3 LOD e LOQ analisados individualmente 67
5.3.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) 69
5.3.5 Exatidão (Recuperação) 73
5.4 Avaliação do monitoramento da água de superfície do Canal São Gonçalo e da água de abastecimento público do município de Rio Grande 75
6 CONCLUSÃO 80
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO ESTUDO 82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, o homem tem se esforçado para melhorar sua condição de vida. Seu esforço para aumentar a produção de alimentos em quantidades suficientes, contrapôs às devastações causadas pelas pragas, dando origem então, aos compostos denominados de agroquímicos, incluindo fertilizantes e agrotóxicos.

A população humana vem crescendo continuamente, estima-se que 300.000 pessoas habitavam a Terra no ano um da Era Cristã e que em 1900 esse número era de 1,3 bilhão. A população atual gira em torno de 6,2 bilhões e as estimativas apontam que em 2050 a população humana deverá ultrapassar os 11 bilhões e, consequentemente será necessário produzir pelo menos o dobro de alimentos. (BARBOSA, 2004). A partir de 1950 o consumo mundial triplicou e o consumo médio por habitante foi ampliado em 50%, mas, no entanto a quantidade de água disponível para os diversos setores, seja para a agricultura, produção e saneamento básico, é a mesma.

Se, por um lado os agrotóxicos cumprem o papel de proteger as culturas agrícolas, por outro com o seu uso indiscriminado e pouco criterioso, podem causar sérios problemas para o meio ambiente e para a saúde humana (BALLESTEROS *et al*., 2004; SPADOTTO *et al*., 2004). Por esse motivo, monitorar as possíveis contaminações oriundas do uso de agrotóxicos tornou-se um assunto de extrema relevância.

No caso dos agrotóxicos, os constantes avanços da Química Orgânica têm produzido novas substâncias cada vez mais efetivas e seletivas à determinadas pragas. Os novos compostos usados apresentam efeitos em concentrações cada vez mais baixas, na ordem de microgramas por litro ou por kilograma. Porém, a partir dos resultados de estudos dos efeitos toxicológicos, carcinogênicos e teratogênicos destas substâncias, têm sido estabelecidos parâmetros de controle cada vez mais rígidos, na ordem de micro, nano e picogramas por litro de água, solo ou alimento.

A Comunidade Européia, com o objetivo de assegurar um nível elevado de proteção do meio ambiente e da saúde das pessoas, optou por um nível zero de agrotóxicos nas águas potáveis. Esse nível zero foi fixado pelo valor de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ para cada agrotóxico e em 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para o total. Esse valor, estabelecido na Diretiva Européia, é próximo ao limite de detecção das técnicas analíticas de rotina, sendo esta a mais rígida legislação atualmente (COUNCIL DIRECTIVE, 1998). Já no Brasil, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde

estabelece os limites máximos permitidos somente para alguns agrotóxicos (Anexo 1) (BRASIL, 2004).

Por este fato, o meio científico, em especial a Química Analítica, vem se empenhando muito para desenvolver metodologias e instrumentação analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas, afim de atender às normas de controle vigentes, que são de extrema importância para monitorar a possível contaminação do meio ambiente, dos alimentos e consequentemente da saúde humana.

Nesse sentido as principais técnicas empregadas para analisar agrotóxicos em água são a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*). Por sua vez, estas técnicas cromatográficas podem ser acopladas a diversos detectores e ultimamente o mais utilizado, devido as suas vantagens, tem sido Espectrômetro de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). Para o preparo das amostras, destaca-se o emprego da Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*).

Devido à maioria dos agrotóxicos existentes apresentarem características polares e serem termicamente instáveis, o emprego da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*) tornou-se a principal ferramenta analítica para análise destes compostos em amostras ambientais.

Como um princípio moderno de controle da qualidade da água que visa garantir que a água consumida por uma população esteja adequada para uso, a mesma deve ser analisada periodicamente. A Organização Mundial da Saúde define como água potável aquela que atende as seguintes exigências:

> *"apresenta aspecto límpido e transparente; não apresenta cheiro ou gosto objetáveis; não contém nenhum tipo de microorganismo que possa causar doença no ser humano; não contém nenhuma substância em concentrações que possam causar qualquer tipo de prejuízo a saúde do ser humano".*

Com base nesta definição são estabelecidos os padrões de potabilidade para águas destinadas ao abastecimento público.

No município de Rio Grande a Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) mantém o programa de monitoramento sendo responsável pelo sistema de abastecimento, desde a captação (Canal São Gonçalo) até à distribuição da água aos consumidores (população e indústrias).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água

Debate-se muito, e com freqüência, sobre a "crise da água", acelerada pela iminente escassez deste precioso bem. Importante mencionar que 97% das águas de nosso planeta estão nos oceanos, portanto, restam apenas 3% com potencial de uso pelos seres humanos. Desses 3%, aproximadamente, 2% está armazenada sob a forma de gelo nas geleiras. Enfim, apenas 1% da água em nosso planeta está disponível para consumo humano através de reservas subterrâneas ou superficiais (BAIRD, 2002, DEMOLINER, 2008). É de conhecimento público que apenas 0,3% dos recursos hídricos existentes no planeta estão disponíveis em rios e lagos para a satisfação das necessidades dos seres humanos, aí incluídas: a dessedentação das pessoas e dos animais, a irrigação para a agricultura, o saneamento básico, a produção de energia dentre outras (Ministério do Meio Ambiente e Agência Nacional das Águas - ANA). O que torna mais preocupante em relação à gravidade e extensão desta "crise", é o homem não agir refletidamente e com um pensamento de médio a longo prazo quando se trata de degradar o meio ambiente.

O quadro mundial é alarmante, e os números impressionam: estima-se que um bilhão de pessoas – quase um quinto da população – não disponha de água tratada, e que cerca de um bilhão e oitocentos milhões não tenha acesso ao saneamento básico, conforme informado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Segundo a Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES, 2003), a cada ano, milhares de vidas são perdidas em razão de enfermidades conhecidas cruelmente no ambiente médico como "doenças de pobres", relacionadas a má qualidade hídrica.

2.1.1 Consumo da água

Em todas as partes do mundo o uso agrícola da água ocupa um lugar de destaque. A Tabela 1 apresenta a evolução, em âmbito mundial, do uso da água nos últimos 100 anos (REBOUÇAS, 2002).

Tabela 1: Evolução do consumo de água em âmbito mundial (Km^3/ano)

Ano	1900	1920	1940	1960	1980	2000	2020*
tipo/uso							
Doméstico	-	-	-	30	250	500	850
Industrial	30	45	100	350	750	1350	1900
Agrícola	500	705	1000	1580	2400	3600	4300
TOTAL	530	750	1100	1960	3400	5450	7050

(-) Sem dados (*) Estimativa **Fonte**: REBOUÇAS, 2002.

Observa-se que atualmente 50% do total de água doce é destinada ao aproveitamento agrícola. A prática da irrigação se constitui no maior usuário de águas no país, utilizando metade de toda a água doce disponível (NUNES, 2002). A irrigação além de exigir grandes volumes de água é um uso do tipo consuntivo. Cerca de 98% do volume retirado com essa finalidade é transferido diretamente para a atmosfera através da evapotranspiração das culturas. Os demais 2% são transformados em matéria orgânica, portanto nada retorna logo a jusante (REBOUÇAS, 2002).

O Estado do Rio Grande do Sul (RS) demanda 34% do total da água usada para esse fim no Brasil, com maior emprego no cultivo do arroz irrigado (REBOUÇAS, 2002). Estima-se que o consumo total de água por lavouras de arroz situe-se entre 7 a 10 mil m^3 ha^{-1} para toda a safra (NOLDIN, 2003). Considerando-se que uma pessoa consome 150 L de água por dia, ou 55 m^3 por ano (SAMAE, 2006), o consumo de 1 hectare (ha) de arroz equivale ao de cerca de 150 pessoas.

2.2 Os Agrotóxicos

2.2.1 Conceitos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e até biocidas são denominações dadas às substâncias sintéticas ou naturais, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo as pragas. No sentido mais amplo: tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem. Adotando-se essa definição, arrolam-se entre as pragas: insetos, carrapatos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida animal ou vegetal danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e seus produtos e a outras matérias-primas alimentares. Por extensão, incluem-se nesta categoria os agentes desfolhantes, os dessecantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Excluem-se as vacinas, os medicamentos, os antibióticos de uso humano e veterinário e os agentes usados para o controle biológico das pragas (BARBOSA, 2004).

No Brasil, de acordo com o Decreto nº. 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº. 7802/1989, os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Nas referências consultadas o termo “pesticida” é utilizado em substituição à “defensivos agrícolas” e “agrotóxicos”, tendo a mesma definição e sendo aplicado aos mesmos casos descritos acima.

Os agrotóxicos classificam-se em:

Acaricidas, para o controle de ácaros.

Algicidas, para o controle de algas.

Fungicidas, para o controle de fungos.

Herbicidas, para o controle de plantas daninhas.

Inseticidas, para o controle de insetos.

Moluscocidas, para o controle de moluscos e lesmas.

Rodenticidas, para o controle de ratos e outros tipos de roedores.

Vermífugos, para o controle de vermes.

E também podem ser classificados em:

Orgânicos Sintéticos: Carbamatos (nitrogenados), clorados, fosforados e clorofosforados.

Inorgânicos: À base de arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco.

Botânicos: À base de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona.

Os principais produtos usados comercialmente são compostos orgânicos sintéticos com baixa massa molecular, geralmente com baixa solubilidade em água e alta atividade biológica (SILVA e FAY, 2004). Do ponto de vista do ambiente, o melhor sistema de classificação para os agrotóxicos é aquele baseado no mecanismo de ação. O conhecimento dos mecanismos de ação permitirá uma melhor previsão do que pode acontecer para organismos não alvos, assim também como verificar o comportamento do agrotóxico no ecossistema.

2.2.2 Aspectos gerais

Os agrotóxicos orgânicos sintéticos foram introduzidos imediatamente após a segunda Guerra Mundial, sendo que vários deles já serviram de arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o Agente Laranja (mistura de 2,4-D e 2,4,5 T), desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (BARBOSA, 2004). A agricultura praticada em nosso país ainda tem uma forte dependência da utilização de agrotóxicos, os quais têm a finalidade de controlar pragas, doenças e plantas daninhas, garantindo patamares mais elevados de produtividade e, conseqüentemente, maior retorno econômico da atividade agrícola. No entanto, os agrotóxicos podem ser altamente tóxicos aos diversos organismos não-alvo, incluindo os seres humanos.

Atualmente, é difícil imaginar a possibilidade de suprir a demanda mundial de alimentos sem o uso de agrotóxicos, pois tais produtos melhoram a produtividade agrícola, podendo diminuir os preços dos alimentos e da mão-de-obra (ROCHA *et al*., 2004).

Embora os agrotóxicos sejam de grande benefício para o homem, ajudando no aumento da produção de alimentos, controlando as pragas das plantas e animais, e protegendo a saúde e o bem estar público, eles devem ser cuidadosamente usados e monitorados, porque podem ser perigosos tanto para a vida humana, animal e também para o meio ambiente.

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e alguns agrotóxicos podem acumular-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana podem sofrer enriquecimento em relação à concentração inicial de agrotóxicos, como o leite, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais (BAIRD, 2002). Diversos estudos associam a exposição aos agrotóxicos comuns a inúmeras doenças, de asma a câncer, com destaque de maior risco para alguns grupos de pessoas como agricultores, as de fraca imunologia, idosos e crianças, as quais consomem uma grande quantidade de alimentos comparativamente ao seu peso. Um estudo no ano de 2003, revela que a exposição aos agrotóxicos por crianças no primeiro ano de vida aumenta os riscos de doenças respiratórias, como a asma, em até 4 vezes (VIDA INTEGRAL, 2006).

Nos livros de Rachel Carson (Silent Spring, 1962) e Rudd (Pesticides and the Living Landscape, 1964) foram relatadas várias implicações que surgiram após o uso dos agrotóxicos:

1. Surgimento de toxicidade aguda e crônica aos agrotóxicos nos seres humanos, animais domésticos, e vida selvagem;
2. Fitotoxidade em plantas;
3. Desenvolvimento de novas espécies de pragas devido ao uso dos agrotóxicos;
4. Desenvolvimento de resistência das pragas aos agrotóxicos;
5. Persistência dos agrotóxicos nos solos e água;
6. Potencial de transporte global e contaminação do ambiente.

Em resposta ao reconhecimento de tais potenciais de risco dos agrotóxicos ao ambiente, muitos países e relevantes agências internacionais desenvolveram sistemas complexos de registro. Estabelecimento de programas de monitoramento, e exigências rígidas à obtenção de dados foram feitas, de tal modo que tudo isto deve ser atendido antes que um novo agrotóxico possa ser liberado para uso (LAVORENTI, 1996). Assim sendo, hoje em dia, as grandes companhias gastam em média cerca de US$ 100.000.000,00 em 10 anos para poder lançar um único agrotóxico novo no mercado, após terem sido sintetizadas e testadas cerca de 50.000 novas moléculas

2.3 Uso dos agrotóxicos

Agrotóxicos são poluentes particularmente importantes dentre os compostos orgânicos devido ao seu uso freqüente e muitas vezes descontrolado. A partir da segunda metade do século XX houve uma expansão do seu uso. De acordo com os dados do British Crop Protection Council, aproximadamente 860 substâncias ativas são comercializadas como agrotóxicos nos mais variados tipos de formulações. Estas substâncias são divididas em mais de 100 classes, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (TOMLIN, 2004).

De acordo com um relatório publicado pela EPA, mais de 500.000 toneladas de agrotóxicos foram usadas nos Estados Unidos em 1985. Na Europa, o uso é difícil de estimar, porém o Reino Unido reportou o uso de 14.000 toneladas por ano durante o período de 1980 a 1983. O valor do mercado mundial para agrotóxicos foi estimado em US$ 32 bilhões em 2000, correspondendo à comercialização de mais de 3000 ingredientes ativos. As vendas totais de agrotóxicos variam muito com a categoria, sendo que os herbicidas representam 48%, os inseticidas 28%, os fungicidas 19% e os outros produtos 5% (BARBOSA, 2004). A nível mundial, as vendas de agrotóxicos por cultura são aproximadamente: hortaliças 23,6%, arroz 13%, milho 10,6%, soja 11,3%, algodão 9,6%, outros cereais 14,3% e outras culturas 17,6% (BARBOSA, 2004).

O consumo de agrotóxicos varia de acordo com a região do mundo. Em 1999, as vendas por região foram assim distribuídas: Ásia 22,8%, América Latina 12,5%, América do Norte 28,6%, Oeste da Europa 25,2% e restante do mundo 10,9%. Na América do Sul, o Brasil e a Argentina são os mercados que mais têm crescido nos últimos anos (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a introdução de agrotóxicos organossintéticos teve início em 1943, quando chegaram as primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO *et al.*, 2004). Em 1998, o consumo no Brasil foi de cerca de 307 mil toneladas de produtos comerciais, formulados com cerca de 250 ingredientes ativos. No período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78% enquanto que o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700%, no mesmo período (SPADOTTO *et al.*, 2004). A partir de 1994, as vendas de agrotóxicos no Brasil vêm crescendo continuamente, tendo ultrapassado os US$ 2 bilhões, correspondendo a 6% do mercado mundial (BARBOSA, 2004). Estas substâncias têm sido mais usadas nas regiões sudeste (38,9% em 1998), sul (31,2%) e centro-oeste (22,8%), sendo que o Rio Grande do Sul

utiliza 10,4 % do total (SPADOTTO *et al.*, 2004). A cultura de arroz irrigado está em 9º lugar dentre as culturas que mais utilizam agrotóxicos no Brasil, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 : Percentagem de consumo de agrotóxicos em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004

Cultura agrícola	**Participação (%)**
Soja	50
Algodão	10
Milho	7
Cana-de-açúcar	7
Tratamento de sementes	4
Citros	3
Trigo	3
Café	3
Arroz	2
Demais	11
Total	100

Fonte: SINDAG, 2004.

Segundo a pesquisa da Câmara Temática de Insumos Agropecuários (SINDAG, 2008) as vendas de defensivos no Brasil de Janeiro a Setembro de 2008, comparado ao mesmo período de 2007, apresentaram um crescimento acumulado de 35%, totalizando um mercado de R$ 8.484 milhões, conforme representado na Figura 1.

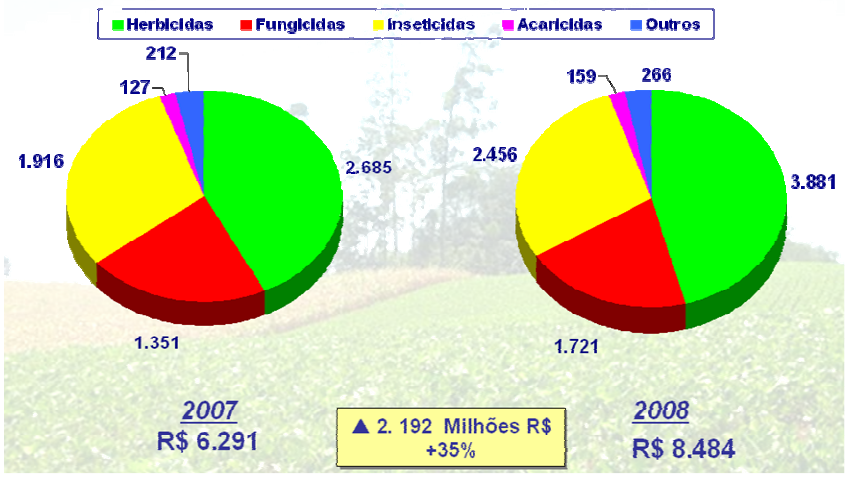


Figura 1: Estimativa do mercado de defensivos agrícolas no período de Janeiro a Setembro de 2007 *vs* 2008 (**Fonte:** SINDAG, 2008).

O estado do Rio Grande do Sul (RS) em 2006 foi responsável por 12 % do consumo nacional de pesticidas (SINDAG, 2008). Devido intensa atividade agrícola, com destaque para o cultivo de arroz irrigado (IRGA, 2008). Dentre os 1,3 milhões de hectares de arroz irrigado cultivados no Brasil, cerca de 73% encontram-se no estado do RS, contribuindo com cerca de 50% da produção nacional de arroz. Essa atividade demanda um elevado consumo de água, equivalente a 80% da água consumida no estado (IBGE, 2008).

No extremo sul do Rio Grande do Sul, nas cidades de Rio Grande (RG) e de Santa Vitória do Palmar (SVP) uma das atividades predominantes é o cultivo de arroz irrigado, com destaque para o município de SVP que produz cerca de 500 mil toneladas ao ano, sendo juntamente com o município de Uruguaiana os maiores produtores nacionais de arroz, o município de Rio Grande destaca-se também com uma produção anual de 85 mil toneladas (IRGA, 2008).

Embora os gastos com agrotóxicos fiquem elevados para os agricultores, estima-se que para cada dólar investido o retorno financeiro seja de 4 a 5 dólares, o que, por si só, justifica o grande consumo destes produtos. E além do mais, as expectativas dos analistas é de que o mercado de agrotóxicos, nos próximos cinco anos, tenha aumento de 0,9% ao ano (BARBOSA, 2004).

2.4 Destino dos agrotóxicos no ambiente

Os agrotóxicos são aplicados diretamente nas plantas ou no solo. Estudos mostram que mesmo aqueles aplicados diretamente nas plantas têm como destino final o solo, sendo lavados das folhas através da ação da chuva ou da água de irrigação. Após chegarem ao solo, infiltram até as camadas mais profundas podendo atingir o lençol freático (reserva de água subterrânea). Este tipo de transporte dos agrotóxicos denomina-se de lixiviação. Outro tipo importante de transporte ocorre na superfície do solo juntamente com a água das enxurradas, sendo denominado de escoamento superficial. Esses dois tipos de transporte podem levar à contaminação dos recursos hídricos por resíduos de agrotóxicos. A lixiviação é a principal forma de contaminação das águas subterrâneas enquanto o escoamento superficial tem papel fundamental na contaminação das águas superficiais (rios, lagos, córregos, açudes, etc.). O

uso de agrotóxicos sem afetar a qualidade dos recursos hídricos é um grande desafio, ainda mais quando se tem escassez de água potável.

Os efeitos para o meio ambiente ocasionados por um agrotóxico dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do agrotóxico no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004). Os agrotóxicos podem alcançar os corpos de água diretamente em aplicações para controle de plantas aquáticas e mosquitos, ou indiretamente pela drenagem de terras agrícolas, permeação através do solo, em resíduos de produção de agrotóxicos e resíduos municipais (fungicidas e bactericidas) (BIZIUK *et al.*, 1996). Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e/ou aviões, na forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir águas superficiais.

Os avanços ocorridos no século XX tiveram reflexo direto na indústria de agrotóxicos, que vem desenvolvendo produtos cada vez mais eficazes, mais seletivos e, em geral, menos agressivos ao meio ambiente (BARBOSA, 2004). Esse aumento de eficácia dos compostos é de grande importância, pois a quantidade de produtos químicos lançados no meio ambiente pode ser reduzida. O que não significa, necessariamente, que o impacto ambiental seja menor, pois deve-se levar em conta também a ecotoxicidade destes compostos e o seu impacto em organismos não-alvo. Estima-se que aproximadamente 700 mil toneladas de agrotóxicos sejam lançadas, anualmente, no meio ambiente (BARBOSA, 2004). Essa evolução pode ser percebida nos dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Variação geral na dose dos agrotóxicos aplicados, ocorrida no século XX

Década	Produto	Dose (Kg ha^{-1})
1900	Metaborato de sódio	1900 – 5000
1910	Clorato de sódio	22 – 600
1930	2-metil-4,6-dinitrofenol	11
1940	Ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético	1 – 2
1960	Trifluralina	0,5 – 1
1980	Fluazifope de butila	0,25
1980	Sulfoniluréias	0,002 – 0,025

Fonte: BARBOSA, 2004.

Depois da aplicação de um agrotóxico, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento, como mostra a Figura 2. O destino de um agrotóxico no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), e por interações desses processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos (SPADOTTO, 2002).

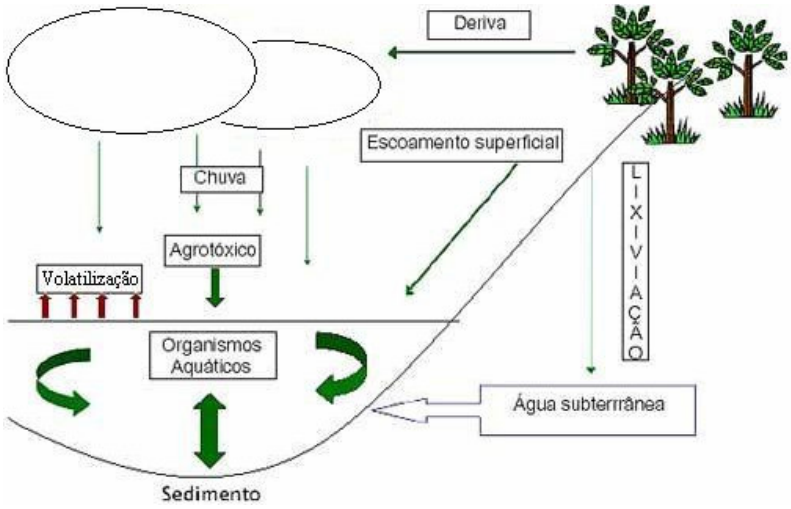


Figura 2: Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por agrotóxicos (Adaptado de BEYRUTH; TOMITA, 2003).

A água que chega aos rios é produto do ciclo hidrológico (PEIXOTO, 2007). A energia solar aquece a água, faz com que esta evapore, seja transportada pelo vento, condensada e precipitada. No solo, a ação da gravidade leva esta água para os pontos mais baixos do terreno, até chegar aos rios e oceanos, sendo que, parte desta água atinge os lençóis subterrâneos por infiltração. No ciclo hidrológico, o processo de evaporação e precipitação age como um gigantesco destilador. A partir da condensação inicia-se o processo de contaminação com a dissolução de gases nas gotas da chuva, e no solo a água dissolve uma série de substâncias presentes (GÁNDARA *et al*., 2003).

Alguns compostos se bioacumulam em numerosas espécies e podem ser biomagnificados (ampliação biológica) através das cadeias tróficas. A cadeia alimentar aquática é um bom exemplo de como ocorre esse processo. Como exemplo, considere que a concentração de 2,2-bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) na água é

de 0,003 µg L^{-1}, mas que atinge 0,040 µg L^{-1} no plâncton, 0,500 µg L^{-1} na gordura de vairões, 2000 µg L^{-1} nos peixes-agulha que nadam nessas águas e 25,000 µg L^{-1} na gordura das águias pescadoras que alimentam-se de peixe, perfazendo um fator de biomagnificação total de dez milhões (BAIRD, 2002). Essencialmente, a biomagnificação resulta de uma seqüência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia.

2.4.1 Potencial de risco de contaminação das águas superficias

As propriedades físico-químicas dos compostos bem como a sua estrutura molecular, governam o seu comportamento no ambiente (SILVA & FAY, 2004; ALISTER & KOGAN, 2006). Assim, é possível avaliar teoricamente se um determinado composto apresenta algum risco potencial de poluição das águas. A primeira etapa da avaliação deve ser um levantamento sobre o uso de agrotóxicos na região do estudo, considerando as características ambientais e propriedades físico-químicas dos princípios ativos usados (DORES & DE-LAMONICA-FREIRA, 2001).

A avaliação da contaminação de águas superficiais por pesticidas pode ser realizada através do Método de Goss (CABRERA *et al*., 2008). PRIMEL *et al.* (2005) utilizaram o método de Goss para estimar a poluição de águas de superfície, localizadas na região central do RS, por herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado.

Os critérios propostos por esse método para avaliar o potencial de poluição de águas superficiais por pesticidas estão expostos na Figura 3 e descritos a seguir:

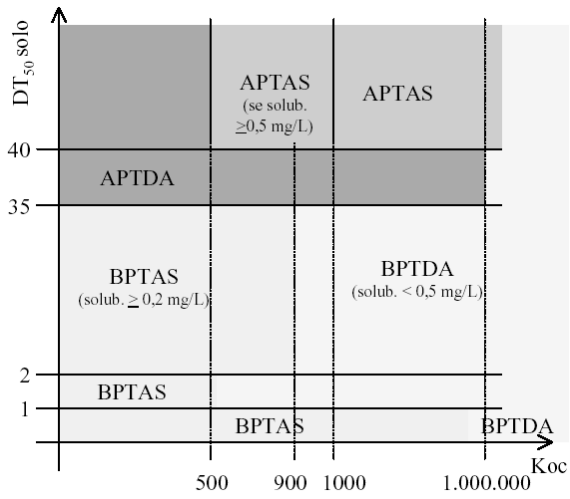


Figura 3: Classificação do potencial de poluição segundo o método de Goss (BRITO *et al*., 2001).

Para avaliar o potencial de contaminação das águas de superfície por agrotóxicos foi utilizado o critério de Goss, o qual considera a meia-vida do composto no solo ($t_{1/2\ no\ solo}$), sua solubilidade em água à 25 ºC e a constante de adsorção à matéria orgânica do solo (K_{oc}).

Segundo este critério os agrotóxicos são divididos nos seguintes grupos: Alto Potencial de Transporte das Águas Superficiais devido ao transporte associado ao sedimento em suspensão (APTAS); Baixo Potencial de Transporte das Águas Superficiais devido ao transporte associados ao sedimento em suspensão (BPTAS); Alto Potencial de Transporte das Águas superficiais devido a serem Transportados Dissolvidos na Água (APTDA) e Baixo Potencial de Transporte das Águas Superficiais devido a serem Transportados Dissolvidos na Água (BPTDA). Os valores de cada parâmetro para estes grupos são:

- APTAS - $t_{1/2\ no\ solo} \geq 40$ dias e $K_{oc} = 1000\ cm^3\ g^{-1}$, ou $t_{1/2\ no\ solo} \geq 40$ dias, $K_{oc} \geq 500\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade em água $\leq 0{,}5\ mg\ L^{-1}$;
- BPTAS - $t_{1/2\ no\ solo} < 1$ dia, ou $t_{1/2\ no\ solo} \leq 40$ dias, $K_{oc} \leq 500\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade $\geq 0{,}5\ mg\ L^{-1}$, ou $t_{1/2\ no\ solo} \leq 2$ dias e $K_{oc} \leq 500\ cm^3\ g^{-1}$ ou $t_{1/2\ no\ solo} \leq 4$ dias, $K_{oc} \leq 900\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade em água $\geq 0{,}5\ mg\ L^{-1}$ ou ≤ 40 dias e $K_{oc} \leq 900\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade em água $\geq 2\ mg\ L^{-1}$;
- APTDA - $t_{1/2\ no\ solo} > 35$ dias, $K_{oc} < 1.000.000\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade $> 1\ mg\ L^{-1}$, ou $t_{1/2\ no\ solo} > 35$ dias, $K_{oc} < 700\ cm^3\ g^{-1}$ e solubilidade em água entre 10 e 100 $mg\ L^{-1}$;
- BPTDA - $K_{oc} > 1.000.000\ cm^3\ g^{-1}$, ou $t_{1/2\ no\ solo} < 1$ dia e $K_{oc} < 100\ cm^3\ g^{-1}$, ou $t_{1/2\ no\ solo} < 35$ dias e solubilidade em água $< 0{,}5\ mg\ L^{-1}$.

Os compostos que não se enquadram em nenhum destes grupos são considerados com potencial médio, ou seja, Médio Potencial de contaminação das Águas Superficiais devido a serem Transportados Dissolvidos na Água (MPTDA) ou associado ao sedimento em suspensão (MPTAS) (DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; CABRERA *et al*., 2008).

2.4.2 Caracterização e propriedades físico-químicas

Segundo CABRERA *et al*. (2008), além da estrutura e massa molecular, as propriedades físico-químicas de cada pesticida possibilitam prever o seu comportamento no meio ambiente. As principais propriedades físico-químicas relacionadas com o seu comportamento são: solubilidade em água (S), coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}), produto da constante de dissociação do composto (pk_a), pressão de vapor (PV), constante da lei de Henry (K_H), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no solo e na água.

A estrutura molecular definida de cada pesticida determina, pelo menos parcialmente, o grau com que ele irá interagir no ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios também torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo tornando-o mais estável ambientalmente (SILVA & FAY, 2004).

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atuam no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do pesticida em ser carreado superficialmente no solo atingindo águas superficiais. No entanto este não é o único parâmetro para prever a percolação, devendo ser analisado em conjunto com outras propriedades (SILVA & FAY, 2004).

Os valores do produto da constante de dissociação (pK_a) tem efeito sobre a solubilidade do pesticida, e através do pK_a do pesticida e do pH do solo, é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um pesticida ácido, a mesma relação pode ser obtida usando pK_b para pesticidas alcalinos (BARCELÓ, 2006).

Com o coeficiente de adsorção (K_{oc}) é possível prever a tendência do pesticida a ficar adsorvido na matéria orgânica no solo. Moléculas altamente solúveis tendem apresentar valores de K_{oc} relativamente baixos (menores que 150 $cm^3\ g^{-1}$), podendo ser mais rapidamente biodegradáveis no solo e na água (BARCELÓ, 2006).

A Constante da Lei de Henry (K_H), também chamada de coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (PV) mostra a tendência do pesticida a volatilizar ou permanecer na fase aquosa. Para algumas moléculas, dependendo do valor da pressão de vapor e/ou valor da solubilidade em água, o K_H dificilmente pode ser medido (SILVA & FAY, 2004).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando a tendência a bioconcentração destes compostos, sendo um fator importante na avaliação de riscos, pois em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação dos pesticidas que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ, 2006).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos (SILVA & FAY, 2004).

2.4.3 Toxicidade dos agrotóxicos

O manuseio e o uso de qualquer produto químico deve ser sempre realizado com cautela, uma vez que seu uso inadequado pode colocar em risco a saúde ou mesmo a vida de muitas pessoas.

Conforme a legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Lei 9.974 de 06/06/2000 e Decreto 4.074, de 04/01/2001), são obrigatórios a devolução das embalagens vazias (após a tríplica lavagem das embalagens de produtos), no prazo de um ano após a compra do produto, ao posto de recebimento indicado na nota fiscal da compra. E além do mais é recomendado utilizar herbicidas devidamente registrados no MAPA e cadastrados na Secretaria da Agricultura dos estados que adotem o procedimento de uso para a espécie de planta daninha que se deseja controlar. O número do registro consta no rótulo do produto.

Uma medida freqüente empregada para avaliar a toxicidade aguda dos agrotóxicos e outras substâncias químicas é a Dose Letal 50% (DL_{50}). A DL_{50} representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas (SANCHES, et al., 2003 e BARBOSA, 2004).

A legislação brasileira obriga às formulações de agrotóxicos a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade, para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002). De acordo com a Tabela 4, a identificação dos rótulos desses produtos é feita por meio de faixas coloridas.

Tabela 4: Classificação dos agrotóxicos

Classe	DL_{50}	Classificação	Cor da faixa do rótulo da embalagem
I	0-50	Extremamente tóxico	Vermelho vivo
II	50-500	Altamente tóxico	Amarelo intenso
III	500-5000	Mediamente tóxico	Azul intenso
IV	>5000	Pouco tóxico	Verde intenso

Fonte: ANVISA, 2005.

2.5 Legislação para agrotóxicos

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente quando a água é utilizada para consumo humano.

A Comunidade Européia (DIRECTIVE 98/83/EC) estabeleceu 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico em águas destinadas para o consumo humano e 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para soma de agrotóxicos, incluindo metabólitos ou produtos de degradação tóxicos (KUSTER *et al*., 2006; RODRIGUES *et al*., 2007; GREULICH *et al*., 2008; CARVALHO *et al*., 2008). Para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a 3 $\mu g\ L^{-1}$ (SLOBODNÍK *et al.*, 1997).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram níveis máximos de agrotóxicos individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 357, de março de 2005 estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra (BRASIL, 2005). A Portaria nº 518 de março de 2004, do Ministério da Saúde, estabelece limites de agrotóxicos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2004). Dentre os 20 compostos estudados, cinco possuem registro na legislação brasileira (Tabela 5).

Tabela 5: Agrotóxicos estudados que possuem registro na legislação brasileira.

Composto	Nível máximo permitido pela Portaria nº518 do Ministério da Saúde ($\mu g\ L^{-1}$)
Bentazona	300
2,4-D	30
Propanil	20
Atrazina	2
Simazina	2

Fonte: BRASIL, 2004.

2.6 Análise de agrotóxicos em água

A contaminação das fontes de água ocasionada por resíduos de agrotóxicos tornou-se o maior desafio para a preservação e manutenção do meio ambiente. O extenso uso nas práticas agrícolas juntamente com suas emissões durante seu processo de produção, conduziu a ocorrência de resíduos de agrotóxicos e seus metabólitos em diversos compartimentos como, produtos alimentícios, solo e água (KUSTER *et al*., 2008). Nos programas governamentais e no setor privado, o controle de resíduos vêm ganhando mais importância a cada dia e há uma pressão crescente para o aperfeiçoamento do desempenho analítico, exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e tempo das análises. Para atender essas necessidades, os fabricantes de equipamentos e os analistas de resíduos de todo o mundo estão continuamente desenvolvendo e implementando novas técnicas analíticas, com o objetivo de simplificar e acelerar os procedimentos, melhorando com isso a qualidade e o número de análises e reduzindo o consumo de reagentes e o trabalho necessário.

As características físico-químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que, podem apresentar caráter ácido, básico ou neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura, halogêneos, fósforo, enxofre, nitrogênio ou heteroátomos, os quais possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. Além do mais, um grande número de agrotóxicos são voláteis, outros não, e esta grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método "universal" para análise de resíduos destes compostos (ALDER *et al*., 2006).

Com os crescentes níveis de exigência imposta pelas agências regulamentadoras para um alto padrão de pureza da água potável, requer o desenvolvimento de métodos analíticos de elevada sensibilidade e seletividade (BALINOVA, 1996; KUSTER *et al*., 2008).

Esses compostos são geralmente determinados por Cromatografia Gasosa (GC), Cromatografia Líquida (LC) ou por Eletroforese Capilar (CE), dependendo de sua polaridade, volatilidade ou estabilidade térmica (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al*., 2004, PICÓ *et al*., 2004; PICÓ *et al*., 2007; GATIDOU *et al*., 2007).

Nas últimas décadas a LC-MS/MS, tornou-se a ferramenta analítica mais empregada para analisar e monitorar a contaminação por agrotóxicos, já que estes se encontram no ambiente, em nível de traços. A instrumentação possui elevada seletividade, sensibilidade, permitindo analisar qualitativamente e quantitativamente (REEMTSMA *et al*., 2001; PICÓ *et al*., 2004; PETROVÍC *et al*., 2005; ALDER *et al*., 2006; KUSTER *et al*., 2008). Além do mais, a grande maioria dos compostos são polares e não são estáveis termicamente, característica que faz com que a análise por GC necessite de um processo de derivatização (HIEMSTRA & KOK, 2007).

2.6.1 Preparo de amostra

Nas análises de resíduos de agrotóxicos, as concentrações do analito geralmente são muito baixas e as amostras são muito complexas para serem analisadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra. Devido ao fato de que as medidas são efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados.

O objetivo principal do preparo de amostra é, portanto, promover o enriquecimento, limpeza e o fracionamento da mesma, com todos os analitos. Além do mais, qualquer perda

do analito que ocorrer nessa etapa, não pode ser compensada por nenhuma das etapas subsequentes. Dessa maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo procedimento analítico (MAJORS, 2001a).

2.6.2 Extração de agrotóxicos

Análises ambientais frequentemente envolvem analitos em uma ampla variedade de matrizes, incluindo ar, águas e amostras de solo. Procedimentos apropriados para o preparo das amostras são necessários para chegar a resultados analíticos confiáveis (MAJORS, 2001a).

A SPE é atualmente uma das técnicas mais utilizadas para extração, *clean-up* e/ou pré-concentração de amostras complexas, permite que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados (QUEIROZ, 2006).

Muitos analitos polares são parcialmente dissolvidos em água e, como conseqüência disso, a LLE (Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid Liquid Extraction*) não apresenta boa recuperação para estes analitos (FARIA, 2004). A SPE, além de ser menos trabalhosa, possui uma série de vantagens sobre a LLE, tais como o uso de volumes menores de solventes orgânicos sem formação de emulsões e a possibilidade de automação (QUEIROZ, 2001, 2006; LANÇAS, 2003). Outra vantagem adicional é que a extração de analitos em amostras de água pode ser feita no próprio local da coleta (no campo), usando aparatos simples. Os cartuchos utilizados na extração podem ser estocados e transportados mais facilmente até o laboratório (QUEIROZ, 2006). Devido ao fato de que essa técnica atende as necessidades dos analistas em relação aos procedimentos de preparo da amostra, apresentando-se simples, relativamente barata, com boa recuperação dos analitos e adequada seletividade, reduzido uso de solventes orgânicos e capacidade de automação, tem crescido o uso durante os últimos anos (MAJORS, 2001b).

2.6.3 Extração em Fase Sólida para a pré-concentração e extração dos compostos

As etapas para a extração em fase sólida são descritas a seguir e demonstradas na Figura 4. Dependendo do interesse do experimento, as etapas podem ser adaptadas ou modificadas, para obter-se a máxima recuperação (LANÇAS, 2004).

a) Solvente de eluição

Destina ativar o material dentro do cartucho, para obtenção de uma maior afinidade com o analito.

b) Adição da Amostra

De acordo com a literatura, idealmente esta etapa deve ser lenta (LANÇAS, 2004), onde os interferentes da matriz não são adsorvidos e escoam através do cartucho de extração para o resíduo.

c) Remoção dos interferentes

Visa eliminar os interferentes da matriz, passando-se um solvente que não possua força suficiente para deslocar o analito de interesse do material de empacotamento.

d) Eluição dos analitos

O ideal é eluir os analitos em um pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para análise. Em geral, o solvente de eluição deverá ter maior força de eluição que o solvente usado na etapa anterior, o que é obtido aumentando-se a quantidade de solvente orgânico na concentração salina ou mudando-se o pH da solução de eluição (LANÇAS, 2004).

Portanto, para que haja uma boa escolha do solvente, são necessários conhecimentos do analito e informações suficientes no que se refere à estrutura, solubilidade, polaridadoutras propriedades do analito (PRIMEL, 2003)

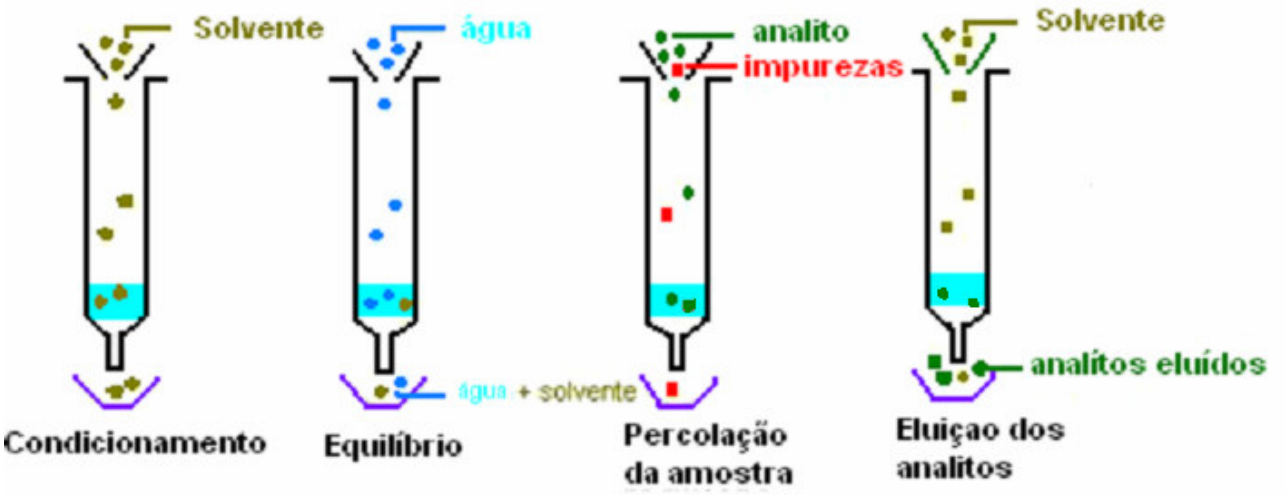


Figura 4: Etapas em SPE para isolamento de um composto.

2.7 Procedimentos da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Desenvolvida a mais de um século, a Cromatografia Líquida é uma técnica analítica de separação de compostos muito bem estabelecida, podendo identificar e quantificar estes compostos em uma amostra. A grande aplicabilidade da técnica é atribuída a sua sensibilidade, capacidade de quantificação e de separação de moléculas não voláteis e termicamente frágeis, que constituem 80% dos compostos sintéticos naturais. Com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como as frágeis biomoléculas, por exemplo, as proteínas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

O Espectrômetro de Massas é um dos detectores utilizados na Cromatografia Líquida. Esta é uma das técnicas analíticas mais importantes, uma vez que é capaz de prover informação sobre**:** a composição qualitativa e quantitativa de analitos orgânicos e inorgânicos em misturas complexas; as estruturas de uma grande variedade de espécies moleculares, assim como a razão isotópica de átomos em amostras (SKOOG & LEARY, 1992; FERNÁNDEZ-ALDA, 2005). As maiores vantagens em relação a outros detectores é o fato de ser altamente seletivo para o constituinte de interesse, podendo a separação cromatográfica não ser completa; permitir análises de substâncias não voláteis, o que não é possível na Cromatografia Gasosa sem a etapa de derivatização (COLLINS, 1993), e melhor razão sinal/ruído, conseqüente melhor limite de quantificação (HARRIS, 2001).

Entretanto, houve uma grande demora no desenvolvimento do acoplamento LC à MS, devido a problemas técnicos provenientes da transferência dos constituintes do eluato da coluna cromatográfica, que se encontra em uma fase líquida para uma fase gasosa na forma de íons, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (SKOOG & LEARY, 1992; FERNÁNDEZ-ALDA, 2005). As vazões utilizadas em LC são relativamente grandes (da ordem de 1,0 mL min $^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de 1,3 x 10^{-4} Pa. Assim uma das mais importantes funções de uma interface empregada em LC-MS é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (ANDREY, 2003; CHIARADIA *et al*., 2008). Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por LC são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá-lo utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na MS. Desta forma, para o acoplamento da LC à MS foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas (CHIARADIA *et al*., 2008).

O sistema básico de um espectrômetro de massas é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de ionização, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de amostras, cuja representação pode está na Figura 5.

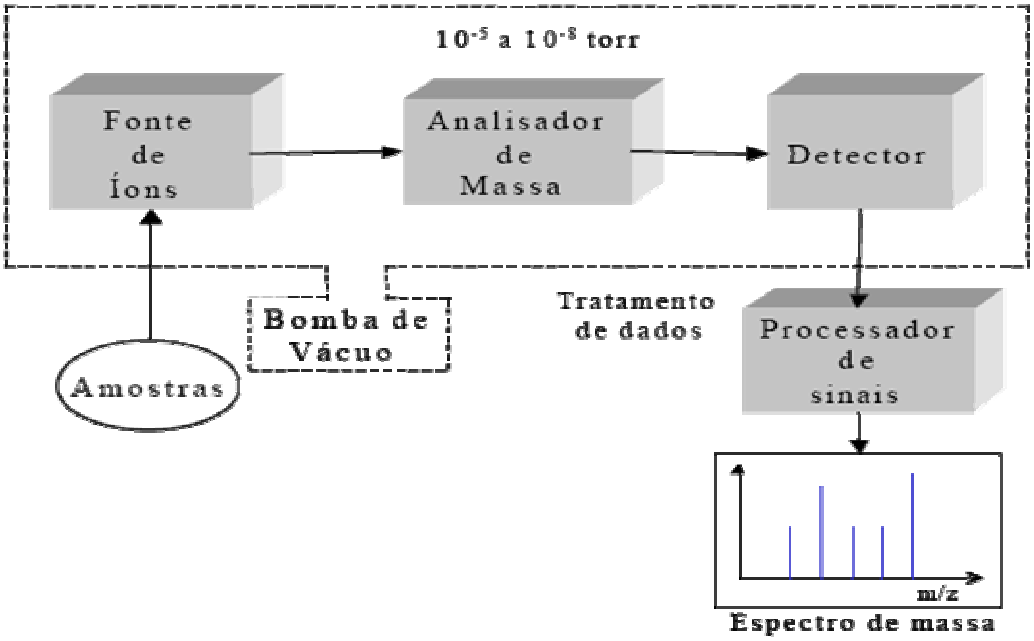


Figura 5: Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à MS são a GC e a LC. A combinação com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar, por exemplo, estão sendo usadas com menor freqüência (CHIARADIA *et al*., 2008).

2.7.1 Estágios do processo de LC-MS/MS

Em LC/MS, a amostra é inicialmente separada e depois detectada, o espectrômetro de massas faz isso produzindo partículas carregadas (íons) a partir dos analitos da amostra, e usando campos elétricos e/ou magnéticos para separar as partículas carregadas de acordo com sua relação massa/carga (*m/z*) (HARRIS, 2001).

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema LC com MS foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al*., 2008). Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização.

I - FONTE DE ÍONS

Após a introdução da amostra a partir do sistema LC, esta é ionizada pela fonte de íons. Os tipos de fontes incluem ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*), ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*) e ionização a pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*). Em LC/MS, a fonte mais comum é a API, na qual a fase móvel e a amostra são ionizadas à pressão atmosférica e os íons do analito são introduzidos no espectrômetro de massas. Existem três métodos API comumente usados:

A Ionização por *Eletrospray* (ESI do inglês, *Electrospray Ionization*) – tornou-se uma das técnicas mais importantes para analisar pequenas moléculas polares, peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos e outros compostos de alto peso molecular (HARRIS, 2001). O líquido no qual o analito se encontra dissolvido (na fase móvel (FM), no caso do eluente da LC) passa

através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*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 N_2) 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 (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada "explosão coulômbica", que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas 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 (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003, CHIARADIA *et al*., 2008), conforme ilustrado na Figura 6.

Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003). Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente grandes pois, como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (*m/z*) dos íons, o intervalo de "massa" de aplicabilidade do instrumento pode ser expandido por uma fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, um íon com *m/z* 1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20.000 Da (ARDREY, 2003). Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida (VÉKEY, 2001).

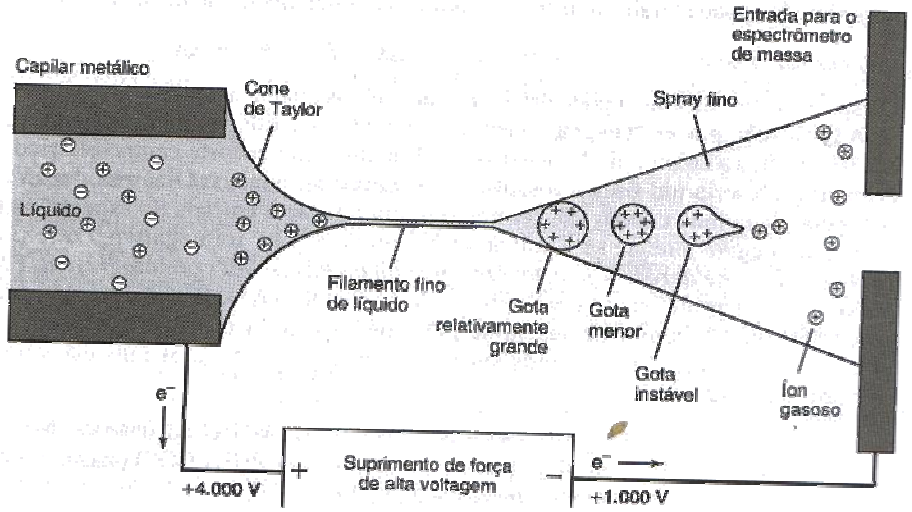


Figura 6: Teoria da Ionização por *Eletrospray*.

Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) – na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gostas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (VÉKEY, 2001; SMERAGLIA *et al*., 2002; ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al*., 2008).

A APCI pode ser considerada uma fonte de ionização completa à ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis ou termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa (ARDREY, 2003; NÚÑEZ *et al*., 2005) e também porque APCI é aplicável a vazões de eluente cromatográfico maiores que as suportadas por ESI (0,5 a 2,0 mL min^{-1}) (ARDREY, 2003).

Tanto na ESI quanto na APCI ocorre a denominada ionização suave, isto é, são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito. Nestas fontes de ionização, mais comumente na APCI, também pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na^+, NH_4^+, $HCOO^-$ e CH_3COO^-, que são espécies iônicas presentes nas FM provenientes dos modificadores adicionados a elas (ARDREY, 2003; NÚÑEZ *et al*., 2005).

A Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI do inglês, *Atmospheric pressure photoionization*) – é uma técnica de ionização relativamente nova, introduzida por Bruins *et al*., 2000, que pode ser considerada complementar às outras técnicas de ionização à pressão atmosférica (ESI e APCI), uma vez que certos grupos de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, só podem ser analisados por LC-MS quando se aplica a fotoionização (BOS *et al*., 2006). A fonte da APPI é muito semelhante à APCI, sendo constituída por um nebulizador aquecido que transforma o eluente da coluna cromatográfica em um *spray* e gera sua dessolvatação parcial (CHIARADIA *et al*., 2008). Entretanto, no lugar da corona de descarga da APCI a APPI possui um lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ocasionar a ionização das moléculas do analito presentes nas gotículas do *spray*. A detectabilidade em APPI é comparável a APCI, quando são empregadas altas vazões do eluente é superior, quando utilizadas baixas vazões. Esta fonte de

ionização é também menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente que a ESI e a APCI (BOS *et al*., 2006; CHIARADIA *et al*., 2008).

II. INTERFACE

A interface assegura a transição dos íons da fonte API para o analisador de massas, mantido sob alto vácuo.

III. ANALISADOR DE MASSAS

Da fonte de íons, os íons são transferidos para o analisador de massas, onde são separados de acordo com seus valores de massa-por-carga (*m/z*). O analisador de massas opera sob vácuo, para assegurar que os íons se desloquem com eficiência máxima.

Existem vários tipos de analisadores de massas:

Sistemas Quadrupolo (QqQ)

Os analisadores de massas quadrupolo usam quatro eletrodos em forma de bastão paralelos organizados em um quadrado para gerar campos elétricos que filtram os íons com base em sua relação massa/carga enquanto se deslocam pelos eletrodos. Em determinadas magnitudes e freqüências, apenas íons com a massa selecionada atingem o detector. Alterando os campos elétricos, as massas de todos os íons podem ser varridas sequencialmente, de baixa para alta ou vice-versa, gerando um espectro de massas (SKOOG & LEARY, 1992).

Analisadores de Tempo-de-Vôo (Time-of-Flight – TOF)

Os analisadores TOF baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a mesma energia cinética, de maneira que as sua velocidades serão apenas diferenciadas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isso, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são

acelerados através de um tubo de vôo para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon (ARDREY, 2003; CHIARADIA et al., 2008).

Sistemas Íon-trap

O íon-trap é um quadrupolo tridimensional que "captura" todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantêm "aprisionados" até que uma determinada radiofreqüência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são liberados do *trap* (ARDREY, 2003).

Triplo Quadrupolo

Em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo é formado pela junção de três quadrupolos em seqüência. No primeiro um íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons. No segundo quadrupolo este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou Ar. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos fragmentos iônicos formados para enviar ao detector (HARRIS, 2001).

Sistemas de MS em tandem (MS/MS)

A espectrometria de massas sequencial (Tandem, MS/MS ou MSné a técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão *m/z* gerados na fonte de ionização, utiliza dois ou mais estágios de análise de massa. (Q_1 e Q_2). O compartimento Q1 funciona como um filtro de massas, usado para isolar o íon precursor (*m/z*), e em Q2 é o segundo filtro de massas usado para estabelecer uma relação entre o íon precursor isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida, que é o processo de fragmentação ocorrido na célula de colisão, com auxílio de um gás inerte, argônio ou hélio (ARDREY, 2003).

A principal vantagem de um sistema MS em *tandem* , está na possibilidade de monitorar mais de um fragmento originado do íon precursor. Desta forma, torna-se maior a confirmação analítica. A Figura 7 ilustra um sistema MS em *tandem*.

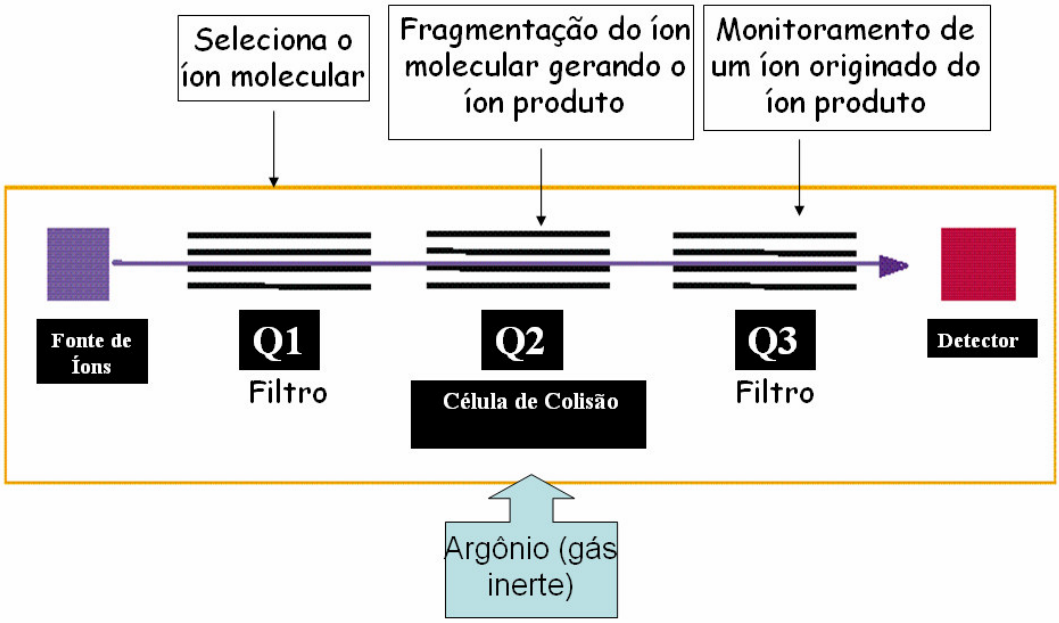


Figura 7: Sistema MS em *tandem*.

IV – DETECTOR

O detector mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z. A maioria dos sistemas de MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector, combinado a um ampliador de sinal. O registro de todas as cargas detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas (SCHREIBER, 2007).

2.7.2 Modos de operação

O espectrômetro de massas pode ser programado para aquisição de dados conforme os modos de operação a seguir:

a) Scan

Neste modo de operação o espectrômetro de massas é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z. Por exemplo, de 50 a 650 m/z (VÉKEY, 2001).

b) SIM

No modo SIM (Single Ion Monitoring) após a ionização o espectrômetro faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade uma vez que o ruído ejetado sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

c) *Tandem* MS (MS/MS)

Dependendo do tipo de espectrômetro de massas esta técnica pode ser considerada como um modo de operação, no caso do Íon Trap ou requer uma instrumentação diferente que é o caso do triplo quadrupolo (MARTINS, 2004).

Uma mistura de íons entra no quadrupolo Q1, que deixa passar somente uma determinada massa para o segundo estágio, Q2. O segundo estágio é chamado célula de colisão induzida (CID, do inglês, *Colision Induced Cell*) porque é preenchido com N_2 ou Ar a uma pressão de 0,1 Pa. O íon precursor selecionado em Q1 colido com o N_2 ou Ar com energia suficiente para se quebrar em fragmentos chamados resultantes. O quadrupolo Q3 seleciona apenas um tipo de íons resultante para passar para o detector (HARRIS, 2001).

d) MRM

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM – Multiple Reactions Monitoring) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados (SIM) e fragmentados novamente (MS/MS). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). Através deste modo, MRM, é possível analisar multianalitos dentro de uma mesma análise, já que permite a identificação e separação de cada transição monitorada, apresentando como principal vantagem a seletividade.

2.8 Aplicação da LC-MS/MS na análise de agrotóxicos em água

RODRIGUES *et al.* (2007) desenvolveram um método para avaliar o impacto do uso de agrotóxicos na qualidade da água de consumo em Lisboa, seguindo as normas da Directive União Européia (EU) 98/83/EC. A metodologia analítica validada baseou-se na combinação da SPE com a LC-MS/MS. Foram testados cinco diferentes cartuchos para a técnica de SPE.

Dentre estes, o que apresentou melhor recuperação dos agrotóxicos foi C18 (Waters Oasis HBL, 6 mL, 200 mg) no qual foram ativados com 6 mL de metanol:acetona (3:2), 3 mL de metanol e 3 mL de água ultra pura em fluxo de 10 mL min^{-1}. A fonte de ionização empregada foi a ESI. A metodologia mostrou uma boa linearidade (r>0,9989) e baixos limites de detecção (0,0041 a 0,0480 µg L^{-1}).

BAUGROS et al. (2008) analisaram 33 classes de poluentes em amostras de água residual, de superfície e subterrânea empregando a SPE para a pré-concentração das amostras. Utilizando 300 mL e após a evaporação com nitrogênio, e reconstituição a 200 µL. Foram analisados por LC-MS/MS injetando 10 µL, com vazão da fase móvel de 0,2 mL min^{-1}, apresentando LOD entre 7,5 e 220 ng L^{-1} .

LIU *et al*. (2006) analisaram alguns agrotóxicos de características polares em água. O emprego da SPE foi utilizado para a extração das amostras, testando diferentes tipos de materiais para o empacotamento dos cartuchos, assim como diferentes volumes de amostra. A injeção foi de 20 µL para análise por LC-MS/MS.

GONÇALVES (2007) desenvolveu e validou um método para a determinação de agrotóxicos em água e solo, de resíduos de herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir. Foram determinados por HPLC-DAD, utilizando-se fase móvel de acetonitrila:água e fase estacionária C18, para as amostras de solo foi feita a confirmação por LC-MS/MS, utilizando a ESI no modo positivo. Para o detector por MS, os valores de limite de quantificação foram de 25,0 ng Kg^{-1}. As recuperações ficaram na faixa de 80,9 a 106,7%, com RSDs menores que 8,7% para as amostras de solo. Portanto a MS foi uma ferramenta analítica fundamental neste trabalho para confirmar as análises, já que este tipo de amostra gera um grande efeito de matriz.

VEGA *et al*. (2005) descreveram o desenvolvimento de um método analítico para determinar 32 agrotóxicos, em amostras de solo e de água, usados em áreas agrícolas do sul da Espanha, através da LC-MS utilizando a ESI no modo positivo. Os limites de detecção variaram entre 10 e 50 ng L^{-1}.

AYANO *et al.* (2002) estudaram a determinação de 5 sulfonilurériase 3 uréias em amostras de água pura, potável e de rio. Para a extração utilizaram SPE com 3 tipos de cartuchos: polimérico de poliestireno (PS2), C18 e polímero de N-vinil-pirrolidona (Oasis®). Usando 500 mL de amostra e eluição com metanol (para os cartuchos poliméricos Oasis®) ou acetonitrila para os demais (polimérico de poliestireno e C18). O sistema de detecção utilizado foi a LC-ESI-MS, no modo de ionização positivo, com colunas C18 e fase móvel composta por ácido acético 0,15% e acetonitrila. De maneira geral, as melhores recuperações

foram obtidas com cartuchos poliméricos (Oásis®). Os limites de quantificação variaram de 0,6 a 65,9 ng L^{-1}.

KUSTER *et al.* (2008) otimizaram um método rápido acoplando em linha a SPE com a LC-ESI-MS/MS para determinar simultaneamente 17 agrotóxicos de polaridade média a polar em amostras de água. A lista dos analitos alvos inclui organofosfatos, triazinas, feniluréias, anilidas, cloroacetanilidas, ácidos e tiocarbamatos. A eluição dos analitos de interesse foi realizada diretamente para a coluna cromatográfica, através da fase móvel utilizada para a cromatografia. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com vazão de 0,2 mL min^{-1}, utilizando um gradiente entre acetonitrila e água. O fragmento mais intenso foi utilizado para a quantificação e o segundo para confirmação. A metodologia mostrou alta sensibilidade, com limites de detecção menores que 50 ng L^{-1} para todos os compostos, boa reprodutibilidade com desvio padrão abaixo de 22% e alta seletividade devido ao detector. A aplicação do método para monitorar o delta do Rio Ebro mostrou a presença de alguns agrotóxicos selecionados, muitos em elevadas concentrações em nível de µg L^{-1}.

KAMPIOTI *et al*. (2005) desenvolveram um método semelhante utilizando a SPE em linha com a LC-ESI-MS/MS. Foram analisadas diferentes classes de agrotóxicos em um total de 20 compostos em amostras de água natural e tratadas. Neste trabalho, 20 mL de amostra foi passada através dos cartuchos, para então 20 µL ser injetado no LC. Elevada sensibilidade revelou o método apresentando limites de detecção entre 0,004 a 2,8 ng L^{-1}.

MARÍN *et al.* (2006) desenvolveram dois métodos *on line* antes da análise por LC-ESI-MS/MS, para analisar 18 agrotóxicos polares e 9 produtos de transformação em amostras de água de superfície e subterrânea. Empregaram a SPE, e o método obteve recuperação de 0,025 µg L^{-1} a 0,1 µg L^{-1}, e nível de detecção menor que 10 ng L^{-1}, utilizando um volume de 2,2 mL de injeção da amostra. A linearidade foi satisfatória ($r>0,99$) dentro do intervalo de 0,01 a 0,5 µg L^{-1}. Outro estudo bastante semelhante e realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores está descrito em SANCHO *et al*. (2004).

Mais um estudo do acoplamento *on line* da SPE em amostras de águas naturais para analisar um grupo de antibióticos sulfonamidas, agrotóxicos ácidos e neutros, sendo analisados por LC-MS/MS foi realizado por STOOB *et al*., 2005.

GREULICH *et al.* (2008) desenvolveram uma metodologia para analisar 300 agrotóxicos em amostras de água mineral. O grande diferencial da técnica foi a análise por injeção direta de 100 µL da amostra, sem a etapa de concentração/limpeza dos interferentes, por LC-MS/MS. As amostras foram desgaseificadas em ultra-som, e fortificadas com padrão no nível do limite de quantificação, 0,1 µg L^{-1} a 1,0 µg L^{-1}, após filtradas (0,2 µm). A fase

móvel para a separação cromatográfica dos compostos foi um gradiente entre metanol e água a uma vazão de 0,3 mL min^{-1}. A metodologia mostrou eficiência apresentando elevada sensibilidade, 95% dos compostos foram analisados em nível de 0,1 µg L^{-1} e o restante até 1 µg L^{-1}. A faixa linear de 0,03 a 5 ng L^{-1} foi adequada para a quantificação. A adição de padrão interno, evitou a supressão dos sinais causado pelo efeito da matriz. Através do detector MS, foi possível quantificar e confirmar a presença dos agrotóxicos, devido aos dois fragmentos originados de cada composto.

CUNHA *et al*. (2004) descreveram a otimização de um método por LC-ESI-MS/MS para determinar 20 agrotóxicos, selecionados devido ao extenso uso. Dentre estes se encontram grupo das triazinas (deisopropilatrazina, desethlatrazine, simazina, cianazina, atrazina e terbutilazina) pheniluréias (clortolurom, isoproturom, diurom e linurom), organofosfatos (dimetoato e diazinon), anilinas e molinato (metolaclor, alaclor e molinate) foram ionizados por ESI no modo positivo, e os compostos com características ácidas e propanil (bentazone, MCPA, 2,4 D, mecoprop e propanil) pela mesma fonte de ionização, porém no modo negativo. A separação cromatográfica foi realizada com um gradiente entre acetonitrila e água. A partir do íon precursor duas diferentes transições foram selecionadas para quantificar e confirmar a resposta analítica. O método mostrou ser linear no intervalo de 1 a 1000 ng mL^{-1}, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Os limites de detecção foram calculados com injeção de 20 µL de soluções padrão e revelaram elevada sensibilidade (0,010 a 4,528 ng mL^{-1}). Finalizou ressaltando que para a aplicação do método em amostras ambientais, o uso da SPE irá concentrar as amostras em um fator de 10^3, reduzindo o limite de detecção (em níveis de pg L^{-1} ou abaixo de ng L^{-1}), bem abaixo do limite de 100 ng L^{-1} que é estabelecido pela legislação da União Européia.

PERREU *et al.* (2007) analisaram 6 herbicidas sulfoniluréias e cinco de seus principais produtos de degradação em amostras de água. Para isso, desenvolveram dois métodos empregando a SPE, um deles em linha, e o outro separado da técnica cromatográfica utilizada, que foi a LC-MS/MS. Para ambos os métodos, a fase móvel empregada foi com água e acetonitrila, acidificadas com ácido acético. A aplicação SPE separada da técnica cromatográfica, o limite de detecção foi de 0,1 µg L^{-1}, já com a SPE em linha, o limite atingido foi de 1 ng L^{-1}. O método em linha, SPE-LC-MS/MS, revelou também maior precisão para a quantificação de todos os herbicidas sulfoniluréias estudados, assim como para 3 de seus produtos de degradação, que foram quantificados em níveis menores que 0,1 µg L^{-1}. A técnica empregou a fonte de ionização ESI operando no modo positivo.

ALPENDURADA *et al*. (2008) desenvolveram e validaram um método multirresíduo para analisar 28 agrotóxicos de 14 grupos químicos diferentes, em amostras de água durante o período de um ano. A SPE foi a técnica empregada para a extração e subsequentemente analisaram as amostras por LC-MS/MS. Os limites de quantificação atingidos foram abaixo de 0,050 $\mu g\ L^{-1}$.

2.9 Validação do método analítico

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, ratreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada de validação (RIBANI *et al*., 2004).

Atualmente, há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores (RIBANI *et al*., 2004; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al*., 2008) como de agências e normas reguladoras (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003) que objetivam responder questões como: qual a função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada.

Validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Os instrumentos e métodos analíticos devem ser validados antes do uso de rotina, após manutenção e em intervalos de tempos regulares (LANÇAS, 2004).

Portanto, o objetivo desse incessante cuidado é garantir que os dados gerados através da metodologia desenvolvida possua a qualidade necessária, em termos de confiabilidade, reprodutibilidade, entre outros, para a aplicação analítica desejada.

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação.

2.9.1 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios fundamentais na análise química. A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais freqüentemente utilizada e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (ZANELLA *et al.*, 2000; FEINBERG, 2007).

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser descrita pela Equação 1 da regressão linear.

Equação 1: $y = ax + b$

Em que ***a*** é a inclinação da reta, coeficiente angular e ***b*** é a intersecção com o eixo y, coeficiente linear, y é uma variável dependente e x a variável independente. Idealmente, *a* deve ser reprodutível e *b* não deve ser estatisticamente diferente de zero. A regressão linear deve também ter um alto coeficiente de correlação (r > 0,9999) (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica específica. Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de determinação (r^2) do gráfico analítico. Também é possível calcular o coeficiente de correlação (*r*), que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de *r* (RIBANI *et al*., 2004).

Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente , pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003).

2.9.2 Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico indica sua capacidade de discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito. A sensibilidade pode ser determinada por intermédio da inclinação da curva de calibração. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004).

2.9.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A detectabilidade de um método analítico pode ser definida considerando-se o Limite de detecção (LOD, do inglês, *Limit of Detection*) e oLimite de quantificação (LOQ, do inglês, *Limit of Quantification*) apresentado por este.

O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Enquanto o LOQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida/quantificada, também utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*., 2004).

A estimativa do valor do LOD pode ser calculada por várias maneiras, como por exemplo através do método visual, método da relação sinal/ruído e aqueles baseados em parâmetros da curva analítica (PASCHOAL *et al*., 2008).

2.9.4 Recuperação (Exatidão)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (PASCHOAL *et al*., 2008).

A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado, comparação de métodos ou, ensaios de recuperação (geralmente expressos em percentual) (PASCHOAL *et al*., 2008).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (RIBANI *et al*., 2004).

2.9.5 Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, e avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra (RIBANI *et al*., 2004). A precisão do método analítico fornece informações da semelhança dos resultados obtidos, ou seja, mede a capacidade de repetir e reproduzir o método analítico.

3 OBJETIVOS

Considerando o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de agrotóxicos para o controle de pragas, assim como para atender a demanda mundial crescente de alimentos e a consequente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) a validação de um método multirresíduo de extração e pré-concentração empregando SPE (ii) otimização e validação de um método empregando a Cromatografia Líquida acoplada à fonte de ionização por *Electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*)e a Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS) para determinar as multiclasses de resíduos de agrotóxicos (herbicida, inseticida e fungicida). Para tanto, um total de dezoito agrotóxicos e dois metabólitos foram selecionados para serem analisados, a saber: clomazona, bispiribaque-sódico, diurom, atrazina, simazina, imazetapir, imazapique, metsulfurom-metílico, quincloraque, penoxsulam, 2,4-D (2,4-diclorofenoxi-ácido acético), pirazossulfurom-etílico, bentazona, propanil, irgarol, tebuconazol, fipronil e carbofurano. Os metabólitos foram: 3,4-DCA (3,4-dicloroanilina) e 3-hidroxicarbofurano e (iii) aplicação do método desenvolvido para monitorar amostras de água superficial do Canal São Gonçalo e em amostras de água destinada ao abastecimento público do município de Rio Grande, a fim de avaliar a possível contaminação por resíduos dos agrotóxicos e metabólitos selecionados.

Ressalta-se que este estudo torna-se relevante devido à inexistência de trabalhos científicos sobre a presença de resíduos de agrotóxicos em águas de superfície e de abastecimento público, no município de Rio Grande, no qual a captação da água para o serviço de abastecimento público se encontra nas imediações de áreas agrícolas, em destaque ao plantio de arroz irrigado. Além de contribuir para o desenvolvimento de metodologias analíticas validadas empregando LC-ESI-MS/MS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de um método para determinar multiclasses (herbicidas, inseticidas e fungicidas) de dezoito agrotóxicos e de dois metabólitos em águas superficiais e de abastecimento público. Para a extração e a pré-concentração das amostras foi aplicada SPE. Também foram otimizados os parâmetros de fragmentação dos compostos orgânicos para serem analisados por LC-ESI-MS/MS.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Compostos escolhidos para este estudo

Para este estudo selecionaram-se dezoito agrotóxicos multiclasses (herbicida, inseticida e fungicida) que foram: clomazona, bispiribaque-sódio, diurom, atrazina, simazina, imazetapir, imazapique, metsulfuron-metílico, quincloraque, penoxsulam, 2,4-D, pirazosulfuron-etílico, bentazona, propanil, irgarol, tebuconazol, fipronil e carbofurano. Os metabólitos foram: 3,4-DCA e 3-hidroxicarbofurano. A escolha baseou-se no fato que no município de Rio Grande-RS, o abastecimento de água potável realizado pela CORSAN (Companhia Riograndense de Saneamento) tem como ponto de captação o Canal São Gonçalo. Este canal é uma importante linha de ligação entre a Lagoa dos Patos e a Lagoa Mirim e em suas margens há captação de água para diversos usos, por exemplo: para o cultivo de hortigranjeiros, cereais, culturas de arroz irrigado, industrial, bem como para a potabilidade e sendo também de intensa navegação.

A listagem dos padrões analíticos utilizados nesse trabalho, o grau de pureza, a classe, os fornecedores e as propriedades físico-químicas relacionadas à sua relevância ambiental constam nas Tabela 6 e 7.

Tabela 6: Descrições dos padrões analíticos sólidos utilizados.

Compostos	Fornecedores	Grau de pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Número CAS	Fórmula Molecular
2,4-D	Sigma Aldrich	99,6	Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	94-75-7	$C_8H_6Cl_2O_3$
3,4-DCA	Sigma Aldrich	99,9	Metabólito	Metabólito do Propanil e Diurom	95-76-1	$C_6H_5Cl_2N$
3-hidroxicarbofurano	Sigma Aldrich	97,4	Metabólito	Metabólito do Carbofuran	16655-82-6	$C_{12}H_{14}NO_4$
Atrazina	Sigma Aldrich	97,4	Herbicida	Triazina	1912-24-9	$C_8H_{14}ClN_5$
Bentazona	Sigma Aldrich	99,1	Herbicida	Benzotiadiazinona	25057-89-0	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$
Bispiribaque-sódico	Dr. Ehrenstorfer	99,0	Herbicida	Ácido pirimidiniloxibenzóico	125401-75-4	$C_{19}H_{17}N_4NaO_8$
Carbofurano	Sigma Aldrich	98,8	Inseticida/nematicida	Metilcarbamato de benzofuralina	1563-66-2	$C_{12}H_{15}NO_3$
Clomazona	Sigma Aldrich	97,4	Herbicida	Isoxazolidinona	81777-89-1	$C_{12}H_{14}ClNO_2$
Diurom	Sigma Aldrich	99,5	Herbicida	Feniluréia	330-54-1	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$
Fipronil	Dr. Ehrenstorfer	96,5	Inseticida	Pirazóis	120068-37-3	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$
Imazapique	Dr. Ehrenstorfer	99,0	Herbicida	Imidazolinona	104098-48-8	$C_{14}H_{17}N_3O_3$
Imazetapir	Sigma Aldrich	99,9	Herbicida	Imidazolinona	81335-77-5	$C_{15}H_{19}N_3O_3$
Irgarol	Sigma Aldrich	98,8	Fungicida	Triazina	28159-98-0	$C_{11}H_{19}N_5S$
Metsulfurom-metílico	Sigma Aldrich	99,9	Herbicida	Sulfoniluréia	74223-64-6	$C_{14}H_{15}N_5O_6S$
Penoxsulam	LARP (UFSM)	80,0	Herbicida	Sulfonanilida triazolopirimidina	219714-96-2	$C_{16}H_{14}F_5N_5O_5S$
Pirazossulfurom-etílico	Sigma Aldrich	99,7	Herbicida	Sulfoniluréias	93697-74-6	$C_{14}H_{18}N_6O_7S$
Propanil	Sigma Aldrich	99,7	Herbicida	Anilida	709-98-8	$C_9H_9Cl_2NO$
Quincloraque	Sigma Aldrich	99,8	Herbicida	Quinolinas	84087-01-4	$C_{10}H_5Cl_2NO_2$
Simazina	Sigma Aldrich	99,9	Herbicida	Triazina	122-34-9	$C_7H_{12}ClN_5$
Tebuconazol	Sigma Aldrich	99,6	Fungicida	Triazol	107534-96-3	$C_{16}H_{22}ClN_3O$

Tabela 7: Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos que indicam seu potencial de risco para ambientes aquáticos

Compostos	Solubilidade em H_2O (mg L^{-1})	K_{oc} (cm^3 g^{-1})	log K_{ow}	PV (mPa) (20 ºC)	pKa	K_H (Pa m^3 mol^{-1})	$t_{1/2}$ solo (d)	$t_{1/2}$ H_2O (d)
2,4-D	311,0 (25 ºC)	60	2,6-2,8	$1,9.10^{-2}$	2,7	$1,3.10^{-5}$	<7	7,5
Atrazina	33,0 (pH 7)	24	2,5	$3,8.10^{-2}$	1,7	$1,5.10^{-4}$ $3,0.10^{-4}$	50	55
Bentazona	570,0 (20 ºC)	34	5,8 (pH 5,0)	0,2	3,2 - 3,3	$7,4.10^{-5}$		
Bispiribaque-sódico	73300,0		1,0	$5,0.10^{-6}$	3,0	$3,0.10^{-11}$	<10	>365 (pH 7-9) 19 (pH4)
Carbofurano	320,0	22	1,5	0,03 - 0,07		$5,0.10^{-4}$	30-60 50	>360 (pH 4) 121(pH 7)
Clomazona	1100,0 (25 ºC)	150-562	2,5	19,2		$4,2.10^{-3}$	30 - 135	>30
Diurom	36,4 (25 ºC)	400	2,8	$1,1.10^{-3}$		$7,0.10^{-6}$	Meses-1 ano	
Imazapique	$3,6 \times 10^4$	206					140	
Imazetapir	1400,0 (25 ºC)	10	1,0 (pH 5,0)	<0,01 (60 ºC)	2,1	$2,7 .10^{-6}$	30-90	
Irgarol	7,0 (25 ºC)	2,38	3,9	$8,8 \times 10^{-5}$		$2,0 .10^{-6}$	120 – 200	
Metsulfuron-metílico	548,0 (pH 5) 2790,0(pH 7)	35	0,02 (pH 7) -1,7	3.10^{-7}	3-4	$4,0.10^{-11}$ (pH 7)	52	
Penoxsulam	0,005 (pH 5,0) 1,5 (pH 9,0 19ºC)		-0,3	$9,5.10^{-11}$	5,1	$2,4 .10^{-12}$		
Pirazossulfuron-etílico	9,8		3,2	4.10^{-5}	3,7		<15	28
Propanil	130,0 (25 ºC)	239 – 800	3,3	0,03		$3,6.10^{-3}$	2	1 – 2
Quincloraque	0,065 (20 ºC)		-1,1 (pH 7,0)	<0,01	4,3	$<3,7.10^{-2}$		
Simazina	6,2 (pH 7, 20 ºC)	103-277	2,1	$2,9 .10^{-3}$	1,6 (20ºC)	$5,6 .10^{-5}$		
Tebuconazol	36,0 (pH 5-9)		3,7	$2 .10^{-3}$		$1,0.10^{-5}$		7-28 (pH 4-9)

Onde: K_{oc} = coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo; K_{ow} = coeficiente partição octanol-água; PV = pressão de vapor; pKa= produto da constante ácida; K_H = constante de Henry; $t_{1/2}$ solo = tempo de meia vida no solo; $t_{1/2}$ água = tempo de meia vida na água; d = dias;

Fonte: TOMLIN, 2000; PRIMEL, 2003; KURZ, 2007, GONÇALVES, 2008; CABRERA *et al*., 2008..

4.2 Instrumentação

Os equipamentos utilizados durante o estudo experimental foram os seguintes:

➢ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo Líquido *Alliance Separations Module* 2695 (Waters, Milford, MA, USA) (Figura 8) equipado com:

Figura 8 : Sistema LC-MS/MS.

- Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação;
- Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*; atuando no modo MRM;
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx 4.1 (Waters, Inglaterra);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia);
- Coluna XTerra® MS C18, 50x3,0 mm de d.i. e 3,5 µm de tamanho de partícula (Waters, Irlanda).

➢ Sistema de purificação de água Direct-Q UV3®, resistividade 18,2 MΩ cm Millipore (Bedford, MA, USA);

➢ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP);

➢ *Manifold* para SPE Phenomenex (Torrance, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;

➢ pHmetro modelo pH21 Hanna – eletrodo de vidro combinado com BNC (São Paulo, Brasil);

➢ Ultra-som Quimis® modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);

- Balança analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (Brasil).

4.3 Solventes, reagentes e materiais

Os solventes, os reagentes e os materiais utilizados durante toda a experimentação encontram-se listados a seguir:

- Água purificada em sistema Direct-Q UV3® resistividade 18,2 MΩ cm (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Acetonitrila e metanol grau HPLC Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA);
- Ácido fórmico p.a. 98 - 100% (Merck, Brasil);
- Ácido fosfórico p.a. 85% (Merck, Brasil);
- Detergente neutro Extran® (Merck, Brasil);
- Cartuchos para SPE Chromabond C18-ec, 500 mg/3 mL, 0,45 µm de partícula, com diâmetro de poro de 60 Å (Düran, Alemanha);
- Gás argônio de alta pureza usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Rio Grande do Sul, Brasil);
- Membrana de nylon com poros de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore, Brasil) utilizadas no preparo das soluções das fases móveis;
- Membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro, Sartorius (Biolab products, Goettingen, Alemanha) utilizadas para filtração das amostras de águas;
- Frascos de vidro âmbar, com capacidade para 30, 50, 100 e 1000 mL;
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade para 1,5 mL;
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos. pipetas volumétricas calibradas, Béquer, etc...).

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoques de padrões dos agrotóxicos e metabólitos foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol, efetuando-se o

cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado considerando o grau de pureza. As soluções analíticas estoques foram preparadas em balão volumétrico calibrado de 25 mL, logo após foram condicionadas em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas a temperatura de -18 °C em freezer.

A partir das soluções estoque foram preparadas as diluições na concentração de 100 mg L^{-1} para cada um dos 18 agrotóxicos (irgarol, diurom, imazetapir, imazapique, tebuconazol, bispiribaque-sódico, atrazina, simazina, propanil, carbofurano, clomazona, 2,4-D ácido, bentazona, quincloraque, metsulfuron-metílico, fipronil, penoxsulam e pirazossulfurom-etílico) e para os dois metabólitos (3,4-DCA e 3-hidroxicarbofurano). Das soluções de 100 mg L^{-1} foi preparada uma solução trabalho de 5 mg L^{-1} contendo a mistura dos 20 compostos (18 agrotóxicos e 2 metabólitos). Através da diluição desta solução foram preparadas as soluções para construção das curvas analíticas, em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0; e 500,0 µg L^{-1}). Além dessas, também foram preparadas misturas intermediárias para os ensaios de recuperação, a partir da solução de 5 mg L^{-1}. Para a otimização dos parâmetros de fragmentação, através da infusão no Espectrômetro de Massas, foi preparada uma solução de 1 mg L^{-1} através da diluição da solução de 100 mg L^{-1}.

4.5 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS

As infusões diretas no Espectrômetro de Massas com solução analítica padrão de 1,0 mg L^{-1} de cada agrotóxico e metabólito estudados foram realizadas individualmente, para otimizar as melhores condições de fragmentação dos íons na análise por MS. Para esta etapa foram variados os seguintes parâmetros: o modo de ionização da fonte (*electrospray* positivo ou *electrospray* negativo); a voltagem do cone para selecionar o íon precursor; a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; a temperatura da fonte; a temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente; a voltagem do capilar e do cone extrator. Essa etapa de otimização é determinante para selecionar os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos compostos estudados.

4.6 Otimização do sistema cromatográfico para determinação dos compostos

4.6.1 Seleção da fase móvel e da vazão

Todos os solventes empregados na preparação da fase móvel (metanol, acetonitrila e água purificada em sistema Direct-Q UV3®) sempre foram filtrados e desgaseificados por 20 minutos em banho de ultra-som a temperatura do laboratório (23 ºC).

Foram testadas diferentes composições dos solventes da fase móvel, a saber:

- Metanol:água:acetonitrila (30:46:24, v/v/v);
- Metanol:água:acetonitrila (45:45:10, v/v);
- Acetonitrila:água (50:50, v/v);
- Metanol:água (50:50, v/v);

nas vazões de 0,3; 0,4 e 0,5 mL min^{-1}.

A acetonitrila e a água da fase móvel foram acidificadas com ácido fórmico adicionando-se 1 mL por litro de solvente.

4.6.2 Acidez da fase móvel

No sistema de LC-MS(MS) é indicado o uso de aditivos orgânicos voláteis para a fase móvel a fim de evitar que estes cristalizem na interface. Como exemplo de aditivos emprega-se: ácido acético e ácido fórmico até 1% v/v e hidróxido de amônio e acetato de amônio até 0,1 M. Além disso, a acidificação torna os solventes mais ionizáveis como, por exemplo, a acetonitrila que é pouco ionizável, favorecendo a fragmentação dos compostos a serem determinados.

Em cromatografia líquida de fase reversa, a fase estacionária mais utilizada é do tipo C18, e devido às características polares da maioria dos agrotóxicos analisados por esta técnica, faz-se necessário a acidificação do eluente para ocorrer uma melhor interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Além disso, quanto mais hidrofóbico for o analito, maior sua retenção. Quando o analito se ioniza, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Para garantir uma maior interação dos compostos em estudo com a fase estacionária utilizada é necessária a acidificação da fase móvel. Neste estudo experimental foi

utilizado o ácido fórmico para acidificar a 0,1% a solução de acetonitrila e a água para o preparo das fases móveis.

4.6.3 Volume de injeção

Para a escolha do volume de injeção, levou-se em conta a capacidade que a coluna suporta, calculado pela Equação 2, que relaciona o comprimento da coluna com o seu diâmetro.

Equação 2: $V_0 = (3,14 \times (r)^2) \times C/2$

Onde:

V_0 = volume da coluna, 17,66 µL

r = raio da coluna, 1,5 mm

C = comprimento da coluna, 50 mm

4.7 Sistema SPE para a pré-concentração das amostras

A Figura 9 apresenta o sistema *manifold* utilizado para a pré-concentração de amostras de água em cartuchos para SPE.

O sistema é composto por uma caixa de vácuo com espaço para trabalhar, simultaneamente, com 12 cartuchos para SPE. Esse sistema é conveniente quando é necessário pré-concentrar um número considerável de amostras. As amostras, colocadas em balões volumétricos de 250 mL foram transferidas para cartuchos de SPE de 500 mg de fase estacionária, acomodados em tubos do tipo seringa com capacidade de 3 mL, com tamanho médio das partículas de 0,45 µm, através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorreu a uma vazão de 3 mL min^{-1} por sucção em função do vácuo aplicado ao sistema, controlado para cada cartucho através das válvulas.

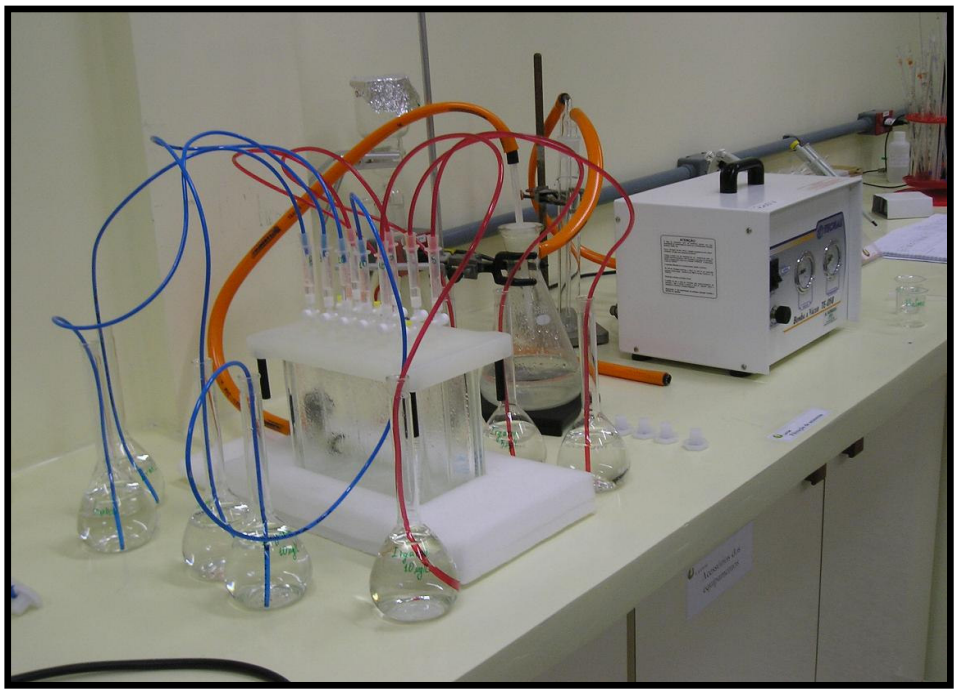


Figura 9: Sistema SPE para a pré-concentração das amostras.

4.7.1 Procedimento SPE para a extração e pré-concentração dos compostos

As amostras após serem coletadas, tiveram ajuste para pH 3,0 com a adição de ácido fosfórico (1:1 v/v), a seguir foram filtradas em membrana 0,45 µm. A seguir dividiu-se cada amostra de 1 L em 3 volumes de 250 mL, para serem permeadas através dos cartuchos em uma vazão de 2 mL min^{-1} até a secagem total. Após fazia-se a eluição dos analitos em 1 mL de metanol (500 + 500 µL).

As etapas para a otimização da extração em fase sólida estão descritas no fluxograma abaixo (Figura 10).

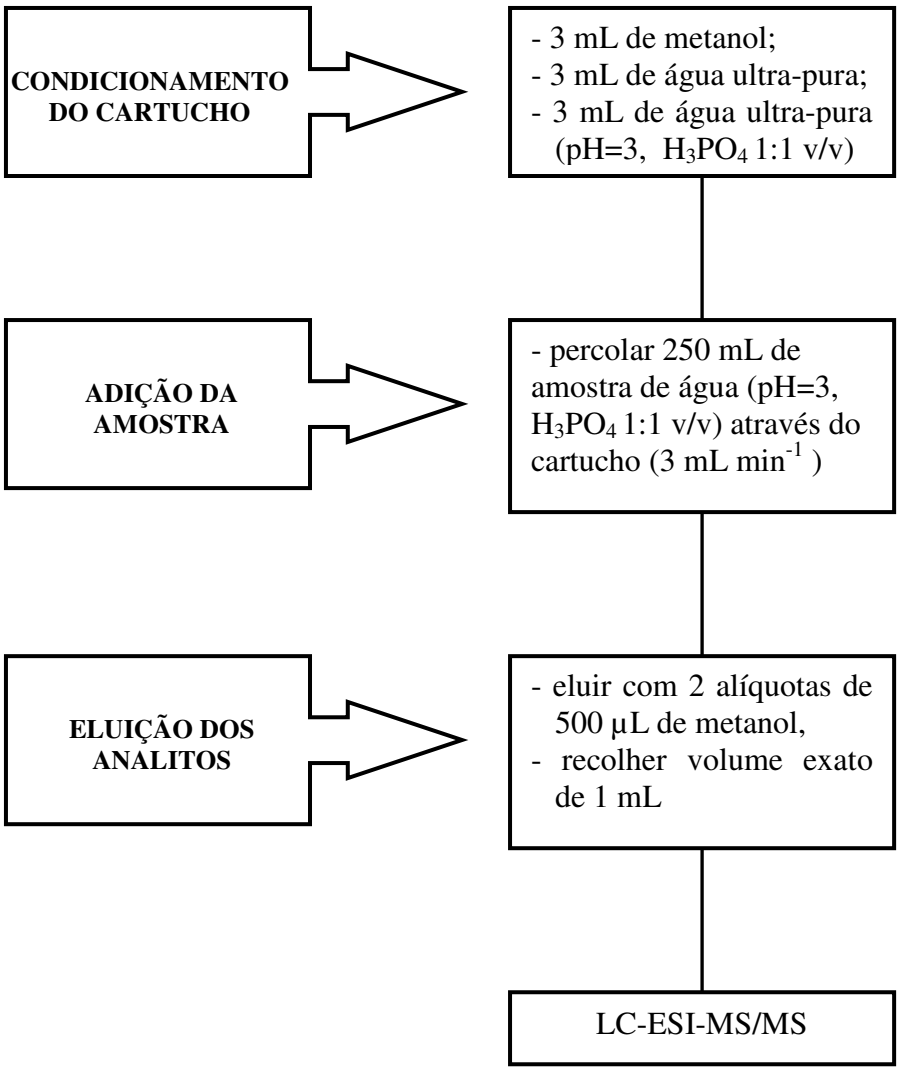


Figura 10: Fluxograma das etapas para a extração e pré-concentração das amostras por SPE.

4.7.2 Sorvente empregado

Para a pré-concentração dos analitos foram empregados cartuchos de octadecilsilano (C18ec) contendo 500 mg e com capacidade para 3 mL. Como a quantidade adsorvida (recuperada) depende da capacidade do sorvente (gramas do analito adsorvido/grama de fase sólida) e portanto, a quantidade adsorvida poderá variar de amostra para amostra, a escolha da quantidade de sorvente a ser empregada teve como base as condições disponíveis no laboratório e o recomendado na literatura.

4.8 Ajuste do pH da amostra

Compostos ionizáveis apenas são retidos em sílica modificada com C18 se estiverem na sua forma neutra, de tal forma que o pH da amostra é um parâmetro importante, especialmente para a extração de agrotóxicos fracamente ácidos ou básicos. O pH da amostra foi ajustado em 3,0 com ácido fosfórico 1:1 (v/v) para haver uma adsorção reprodutível dos analitos na fase sólida e uma menor retenção dos compostos interferentes na mesma, permitindo assim maior retenção e seletividade dos analitos na C18.

4.9 Procedimento de LC-ESI-MS/MS

Após extração dos analitos, aferidos em 1 mL com metanol, injetou-se os extratos no sistema cromatográfico (LC-ESI-MS/MS). Foram testados três diferentes volumes de injeção, de 2,0; 10,0 e 20 µL, sendo que a alíquota de 20 µL foi determinado como o volume ideal para ser injetado no sistema. Este volume ultrapassa uma pequena faixa do ideal (17,5 µL) porém não afetou a resolução dos cromatogramas e aumentou a sensibilidade.

Construía-se a curva analítica para cada análise de cada amostragem, e ao final das injeções, integrava-se os dados dos padrões, assim como das amostragens, através do programa MassLynx 4.1.

4.10 Amostragem e conservação

Após a etapa de validação do método foram aplicados os procedimentos para analisar as amostras de água (superficial e de consumo). Durante o ensaio de recuperação no sistema SPE utilizaram-se amostras de água de abastecimento coletadas diretamente da torneira do laboratório (LACOM-FURG).

Área de estudo: As amostragens foram realizadas na Estação de Tratamento de Água da CORSAN no município de Rio Grande (Figura 11), mensalmente no período de Janeiro a Outubro de 2008. Coletavam-se duas amostras distintas, uma de superfície, direto no canal de

entrada da água para o tratamento, oriunda do Canal São Gonçalo; e a outra após a etapa de tratamento da água, na saída para o abastecimento à comunidade, conforme ilustrado na Figura 12.

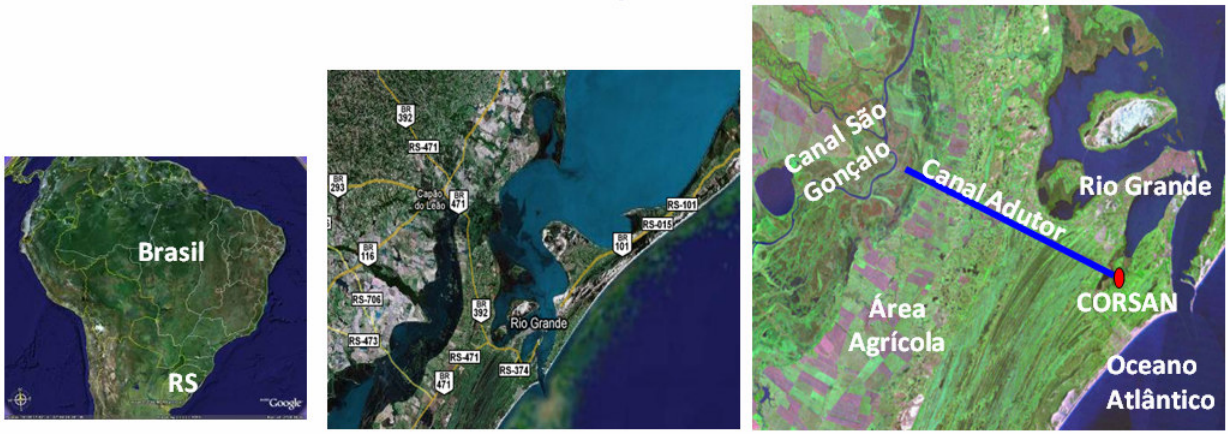


Figura 11: Localização da região de estudo.

(A) **(B)**

Figura 12 : Locais de amostragem (A) coleta da água de abastecimento público e (B) entrada da água do Canal São Gonçalo na ETA.

Procedimento experimental: Foi coletado 1 L de cada amostra de água (de superfície e de abastecimento público) em frascos de vidro âmbar. Os frascos com as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com bolsas de gelo e transportadas para o LACOM. Imediatamente foram ajustados o pH de cada amostra para 3,0 com ácido fosfórico (1:1 v/v). Logo após, foram filtradas as amostras em membranas de acetato de celulose (0,45 µm de diâmetro de poro). Das alíquotas filtradas de cada amostra, três porções de 250 mL foram submetidas ao procedimento de SPE, para a extração dos analitos em cartuchos C18ec. Em

geral, os extratos foram analisados no mesmo dia da amostragem. Na impossibilidade da realização da análise, os extratos foram mantidos nos cartuchos e envoltos em papel alumínio, armazenados no freezer a -18 ºC e por no máximo 72h.

4.11 Validação do método para amostras aquosas

Definidas as melhores condições para a separação dos compostos foi feita a validação do método. Sendo assim, para este estudo foram selecionados como parâmetros: a curva analítica, a linearidade, o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ), a exatidão (recuperação) e a precisão (repetitividade e precisão intermediária).

4.11.1 Curva analítica

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Segundo PASCHOAL *et al*. (2008), a curva analítica representa a relação sinal (resposta) do instrumento em função da concentração do analito.

As soluções padrões foram preparadas em metanol e cada solução padrão foi injetada cinco vezes, seguindo os parâmetros da legislação (EUROPEAN COMISSION 17/08/2002). De acordo com as características de cada composto e suas formas de ionização, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por isso, para construção das curvas analíticas foram preparadas diferentes soluções padrões a partir do LOQ de cada composto até a concentração de 500,0 µg L^{-1}, conforme visto a seguir:

- 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 µg L^{-1} para irgarol, tebuconazol, simazina e atrazina;

- 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 µg L^{-1} para carbofurano, clomazona, bentazona e fipronil;

- 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 µg L^{-1} para imazapique, imazetapir, 3,4-DCA, propanil, diurom, 3-hidroxicarbofurano, 2,4-D ácido, metsulfuron-metílico e pirazossulfuron-etílico;

- 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 µg L^{-1} para bispiribaque-sódico, quincloraque e penoxsulam.

Através do programa MassLynx 4.1 foi gerada a equação de regressão linear, fornecendo os coeficientes de determinação (r^2), os coeficientes angulares (a) e o coeficiente linear (b), após a integração dos picos dos compostos analisados.

4.11.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada variação. Está normalmente relacionada com a variação da inclinação de linha de regressão e é determinada através da curva analítica do princípio ativo (VIEIRA & LIGHITIG, 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO, 1997). Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de determinação $\mathbf{r^2}$. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI, 2004). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados à linha de regressão (SHABIR, 2003). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Deste modo, a partir das curvas analíticas, avaliou-se a linearidade do método, observando o valor de r^2.

4.11.3 Sensibilidade

A sensibilidade que cada composto respondeu no método foi representada pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica. Sendo que a sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, esta foi expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (PASCHOAL, 2008; LANÇAS, 2004).

Para tanto, quanto maior o coeficiente angular, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004).

4.11.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Na determinação de compostos em nível de traço, é importante saber qual é a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância na forma de estabelecer os limites de detecção e de quantificação.

O limite de detecção (LOD) do instrumento pode ser definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento (Figura 13)(USEPA 40 CFR, 1994).

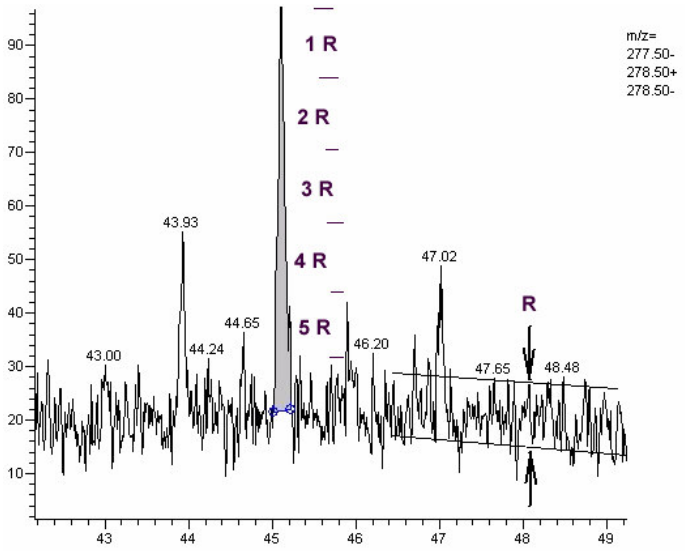


Figura 13: Cromatograma mostrando a razão Sinal/Ruído (USEPA 40 CFR, 1994).

O LOD do instrumento foi determinado seguindo as recomendações da USEPA 40 CFR (1994), em que a solução menos concentrada utilizada para obtenção da curva analítica deve ser diluída e analisada até obtenção de um pico resposta, cuja altura seja de 2,5 a 5,0 em relação ao sinal/ruído. Este procedimento é realizado por tentativa e erro. No exemplo acima, Figura 13, a altura do pico está ligeiramente acima da faixa (~5,5). Esta concentração é analisada 7 vezes e determinado o desvio padrão, sendo calculado o limite de detecção através da Equação 3:

Equação 3: $LOD\ [área]_{instrumento} = t_{student} * s$

Onde:

$t_{student}$ (n=7, α=99%) = 3,143

s = desvio padrão das réplicas

O limite de quantificação (LOQ) do instrumento foi a menor concentração do analito que pode ser determinado com um nível aceitável de precisão e exatidão. Para este, o sua determinação foi efetuada seguindo os mesmos procedimentos para determinação do LOD, porém considerando ser o LOQ um pico resposta cuja altura seja ≥ 10,0 em relação ao sinal/ruído.

Para os LOD e LOQ do método para este estudo foi considerado o fator de pré-concentração da etapa da SPE.

4.11.5 Recuperação (Exatidão)

Em testes de recuperação (R) faz-se a adição do componente de interesse à matriz, seguida da execução do método que está sendo avaliado. O estudo da recuperação consiste na fortificação da amostra, ou seja, adição de uma solução analítica com diferentes concentrações definidas do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Portanto, para os valores de massa obtidos após a SPE e determinação por LC-ESI-MS/MS são denominados de "massa obtida", e a "massa real" foi aquele valor adicionado na fortificação, calculados conforme a Equação 4 (CAUSON, 1997):

Equação 4: $$R\ (\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100$$

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada através da fortificação em triplicata, injetando-se cada réplica 3 vezes no sistema cromatográfico, das amostras de água em 6 níveis diferentes de concentrações, totalizando 54 análises para cada um dos princípios ativos. As recuperações dos compostos foram avaliadas nos níveis de fortificação de 2,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,02 e 0,004 μg L^{-1}, que foi obtido a partir da adição da solução padrão em um volume de 1 L de amostra para cada nível de fortificação, sendo separadas 3 frações de 250 mL para pré-concentrar por SPE.

4.11.6 Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003).

A **repetitividade** (% RSDr) é o grau de concordância entre os resultados de medições repetidas de uma mesma medida, efetuadas sobre as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado nas mesmas condições, mesmo local e curto espaço de tempo (INMETRO, 2003). A precisão é expressa, normalmente, através do desvio padrão relativo (%RSD) em um número significativo de amostra (RIBANI, 2004; PASCHOAL, 2008).

A **precisão intermediária** (% RSDpi) refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, variando uma das seguintes condições: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos (INMETRO, 2003). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004).

A precisão é geralmente expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária, através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A repetitividade do instrumento, expressa em termos de desvio padrão relativo (%RSD), foi estudada efetuando-se 9 injeções das concentrações (10,0; 25,0 e 500,0 $\mu g\ L^{-1}$) das soluções analíticas no sistema LC-MS/MS. A repetitividade do método analítico foi avaliada através da extração por SPE e análise no LC-MS/MS dos analitos determinados nas amostras fortificadas. Cada um dos 6 níveis de fortificação foi extraído 3 vezes, e cada um dos extratos foi injetado 3 vezes, conforme descrito no item 4.10.5.

Para avaliar a precisão intermediária do instrumento realizaram-se 9 injeções das soluções padrões dos compostos estudados no LC-ESI-MS/MS em diferentes dias.

As análises de precisão podem ser calculadas pela Equação 5 (CAUSON, 1997).

Equação 5: $RSD\ (\%) = s/x_m \times 100$

Onde: s = estimativa do desvio padrão absoluto; x_m = média das medidas em replicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros para a otimização das fragmentações por LC-MS/MS

5.1.1 Escolha da fonte de ionização

De acordo com as características dos compostos, que são na grande maioria moléculas polares e termicamente instáveis, empregou-se a fonte de ionização à pressão atmosférica (API) no modo por *electrospray* (ESI). Na fonte API, a fase móvel e a amostra são ionizadas à pressão atmosférica e os íons do analito são introduzidos no Espectrômetro de Massas. Na seqüência, com o modo por ESI, ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, transformando-os em íons gasosos, para em seguida serem introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram a temperatura de 100 ºC na fonte, e vazão de injeção do padrão de 10 μL min^{-1}. A temperatura do gás N_2 (gás de dessolvatação) variou de 300-400 ºC, mantida a uma vazão para a dessolvatação da amostra de 350-550 L h^{-1} e para o cone de seleção dos íons a 50 L h^{-1}. A energia do capilar variou de 3-4 kV e o segundo cone, o extrator de 2-6 V.

Na Tabela 8 são demonstrados os compostos que foram analisados no modo de ionização positivo (ESI+), de acordo com os parâmetros necessários para a montagem do modo de aquisição, o MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). Na Tabela 9, são apresentados os resultados para os compostos que responderam melhor no modo de ionização negativo (ESI-). A fragmentação de íons negativos é menos comum do que a fragmentação de íons positivos, pois há menor possibilidade de remover um próton do que de adição um próton (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Tabela 8: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, para o modo de aquisição MRM

Compostos	Massa Molar ($g\ mol^{-1}$)	Transição (*m/z*) Íon Precursor > Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do Cone (V)	t_R (mim)	Função	*Time Window* (min)
Imazapique	275	276>231	20	40	0,80	1	0,5-7,0
		276>185	30	40			
Imazetapir	289	290>230	20	40	0,91	1	
		290>177	20	40			
Irgarol	253	254>198	19	30	1,63	1	
		254>125	26	30			
Bispiribaque-sódico	452	453>297	25	35	3,20	1	
		453>275	22	35			
Tebuconazol	308	308>70	20	40	5,96	1	
		308>88	50	33			
3-Hidroxi-carbofurano	237	238 >163	15	25	0,71	1	
		238>135	20	25			
Simazina	201	202>132	18	35	1,15	2	0,5-3,0
		202>124	18	35			
Carbofurano	221	222>165	20	25	1,15	2	
		222>123	20	25			
Atrazina	215	216>174	20	33	1,66	2	
		216>146	22	35			
3,4-DCA	162	162>127	15	35	1,71	2	
		162>109	25	40			
Propanil	218	218>127	28	25	2,61	2	
		218>162	14	30			
Diurom	233	233>72	20	28	1,71	2	
		233>160	25	28			
Clomazona	240	240>125	20	25	2,14	2	
		240>100	15	30			

Dwell Time: 0,05 s.

Para os compostos acima, Tabela 8, foi necessário a separação em dois métodos, devido ao número de transições que ultrapassou o limite máximo que cada método comporta. Portanto, para os compostos analisados no modo ESI+, ficaram divididos em duas funções: 1 e 2. Os compostos da Função 1 foram analisados dentro de um segmento de tempo (*Time Window*) de 0,5 – 7,0 min, enquanto que na Função 2, o segmento de tempo variou de 0,5 – 3,0 min, pois o composto desta função apresentou o maior t_R foi de 2,14 min para o clomazona. Desta forma, não é necessário que o analisador de massas trabalhe com um segmento de tempo igual para todas as funções, obtendo assim maior sensibilidade.

Para a função *Dwell Time* (tempo de permanência para monitorar cada uma das transições), foi programada para um tempo pequeno, 0,05 s, já que existem no total 39 transições para serem monitoradas simultaneamente, e desta forma, melhora-se a resolução dos picos cromatográficos.

Tabela 9: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo ESI-, para o modo de aquisição MRM

Compostos	**Massa Molar (g mol^{-1})**	**Transição (*m/z*) Íon Precursor > Íon Produto**	**Energia de Colisão (eV)**	**Voltagem do Cone (V)**	**t_R (mim)**	**Função**	***Time Window* (min)**
Metsulfuron-metílico	381	380>139	15	30	1,12	3	1,0-10,0
		380>214	10	30			
Quincloraque	242	240>196	6	15	1,28	3	
Bentazona	240	239>132	25	35	1,45	3	
		239>197	20	35			
Penoxsulam	483	482>109	40	35	1,53	3	
		482>179	25	35			
2,4-D	221	219>161	20	15	2,12	3	
		219>89	30	15			
Pirazossulfuron-etiílico	414	413>232	15	35	3,97	3	
		413>154	26	35			
Fipronil	437	435>330	15	30	8,93	3	
		435>250	26	25			

Dwell Time: 0,05 s.

5.1.2 Estudo das fragmentações

De acordo com as Tabelas 8 e 9, dentre os vinte compostos estudados, 13 mostraram ser melhor ionizados e fragmentados no modo positivo e 7 no modo negativo. A molécula do composto torna-se íon através da adição de um próton de hidrogênio, dando origem ao íon molecular $[M + H]^+$ e em outros casos, pela adição de sódio $[M+23]^+$ ou de um íon amônio $[M+18]^+$. A adição de um próton ou de um íon amônio é resultado da fase móvel, e a adição de sódio é resultado de qualquer sódio na fase móvel, no padrão ou na amostra que está sendo analisada. Íons heterocíclicos (i.e., N e O), são comumente protonados (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; HARRIS, 2001).

Para todos estes compostos foi possível comprovar as vantagens que um analisador de massas em série, *tandem*, LC-MS/MS pode fornecer. Foram selecionados dois fragmentos característicos de cada composto (Tabela 8 e 9). Os fragmentos mais estáveis, e por isso mais intensos, foram utilizados para a quantificação dos compostos, enquanto o segundo fragmento mais intenso serviram para a confirmação analítica. Porém observa-se que em alguns espectros, o pico base (mais intenso) não é o escolhido para ser um fragmento monitorado, como exemplo na Figura 14, o pico base é o íon *m/z* = 74, que é característico de qualquer fragmento de anel aromático. Sendo assim, não é um íon que caracteriza a estrutura analisada, pois ocorre em vários compostos.

A Figura 14 mostra o espectro de massas do herbicida simazina, que por ser ionizado no modo ESI+, ganhou um próton aumentando uma unidade de massa ($201 + H^+$).

A Figura 15 apresenta o cromatograma com as duas transições: 202>132 *m/z* para a quantificação (A) e 202>124 *m/z* para a confirmação (B), reafirmando a elevada seletividade da instrumentação analítica.

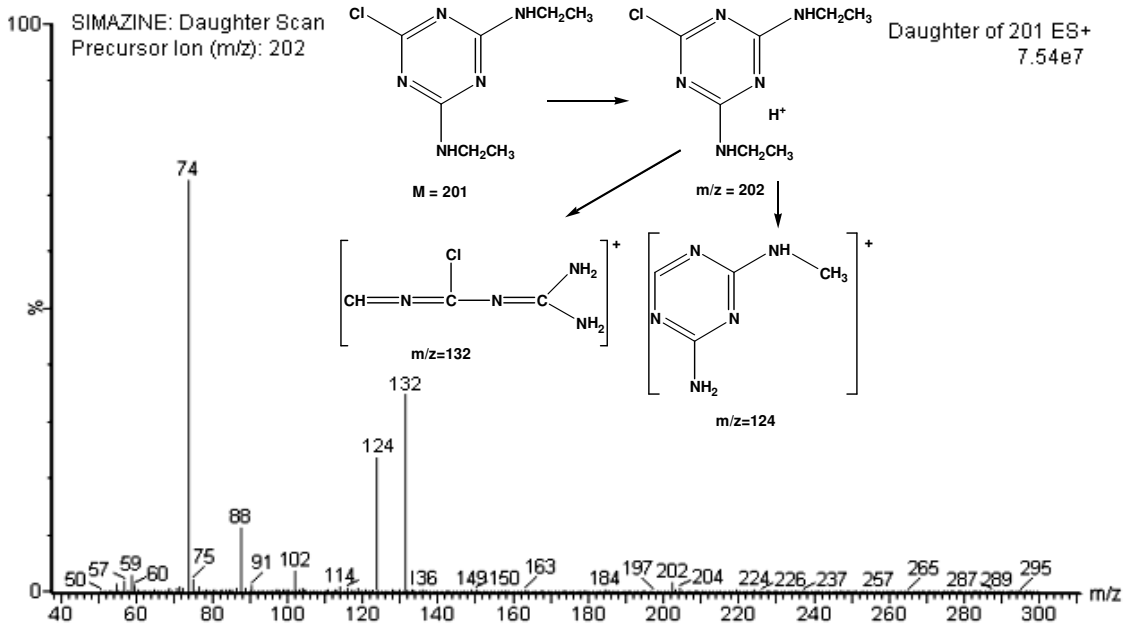
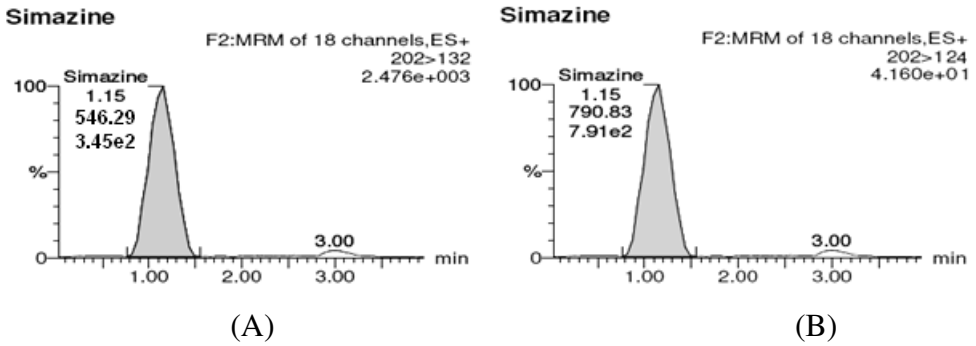


Figura 14: Espectro de massas (ESI +) do herbicida simazina demostrando o íon precursor e os íons produto.



(A) (B)

Figura 15: Cromatograma obtido pelo monitoramento de múltiplas reações (MRM) para o herbicida simazina. (A) fragmento *m/z*=132 e (B) fragmento *m/z*=124.

Para os outros 7 compostos (Tabela 9) a ionização e fragmentação somente foram possíveis no modo de ionização negativo. Íons negativos são formados pela remoção de um próton da molécula ou mais raramente, pela adição de um elétron. Este processo é mais raro porque os íons formados são íons com elétrons desemparelhados, rapidamente reagem e são removidos antes de entrarem no espectrômetro de massas. Para a remoção de prótons é geralmente necessário haver um grupo ácido funcional, como uma carboxila, o que é menos comum nas estruturas dos agrotóxicos (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Para o herbicida quincloraque só foi possível obter uma única transição para a quantificação, monitorando a transição 240>196 *m/z*. Isto ocorreu provavelmente porque a estrutura molecular do composto não gera um segundo fragmento estável além do fragmento

196 *m/z*, não permitindo que os demais fragmentos de íons passem pelo analisador e atinjam o detector. No entanto, como o detector de massas está acoplado à cromatografia líquida, o herbicida quincloraque pode ser analisado com confiabilidade pelo método, pois este possui um tempo de retenção específico, de 1,28 min, sendo que também este composto possui um fragmento de massa específico (240>196 *m/z*).

Para todos os demais compostos analisados por este modo, foi possível gerar as duas transições permitindo a quantificação e qualificação simultaneamente durante as análises.

5.2 Sistema da Cromatografia Líquida para a injeção dos compostos

Na otimização da separação cromatográfica dos compostos, foi preparada uma mistura de solução padrão analítica contendo os ingredientes ativos dos 18 agrotóxicos e 2 metabólitos. Para este estudo, foi injetada a solução contendo a mistura dos compostos na concentração de 1,0 mg L^{-1}, a fim de observar o tempo de retenção de cada analito.

Nesta etapa, a principal meta foi estabelecer uma condição para eluir os analitos da coluna cromatográfica em menor tempo de retenção, para que assim as análises sejam rápidas, e também uma menor vazão da fase móvel para evitar gastos de solventes. Desta forma, após a realização dos testes que foram: escolha de solventes, proporção destes solventes, vazão e pH; as melhores condições obtidas foram fase móvel contendo 46% de água ultra pura acidificada a 0,1% com ácido fórmico + 24% de acetonitrila acidificada a 0,1% com ácido fórmico + 30% de metanol, em uma vazão de 0,5 mL min^{-1}, resultando em um tempo total de corrida de 10 min.

Visualizando o cromatograma de MRM (Figura 16), alguns compostos co-eluíram, e 4 dos compostos obtiveram exatamente o mesmo tempo de retenção, como é o caso dos pares carbofuran e simazina que eluíram em 1,15 min, e do 3,4-DCA e diurom eluídos em 1,71 min. Portanto, não houve separação adequada, mas, como o detector empregado é um espectrômetro de massas, e este detecta pela massa do composto, tem-se a grande vantagem de não necessitar uma perfeita separação cromatográfica de cada analito contido na solução (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Além disso, foram usadas duas transições para as análises de cada composto, o que torna a técnica altamente seletiva; sendo que para o herbicida

quincloraque, em que só foi possível obter um fragmento estável, este foi seletivo, assim como seu tempo de retenção.

A detecção de agrotóxicos e/ou demais analitos em misturas ou em amostras mais complexas, pode ser um problema para a LC, quando a resolução dos cromatogramas não está adequada, com detectores tradicionais, como por exemplo, detector UV ou até mesmo detector DAD, os quais não são específicos suficientes quando as diferenças espectrais são pequenas, prejudicando a quantificação (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.,* 2004).

Entretanto, o emprego de LC-ESI-MS/MS pode contornar estes problemas de separação cromatográfica, pois o detector de massas em *tandem* operando no modo MRM é altamente seletivo para os analitos da mistura (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.,* 2004). Esta seletividade pode ser observada neste estudo, como está representada na Figura 16, na qual mostra-se que todos os compostos foram identificados mesmo com tempos de retenção muito próximos, ou em alguns casos idênticos.

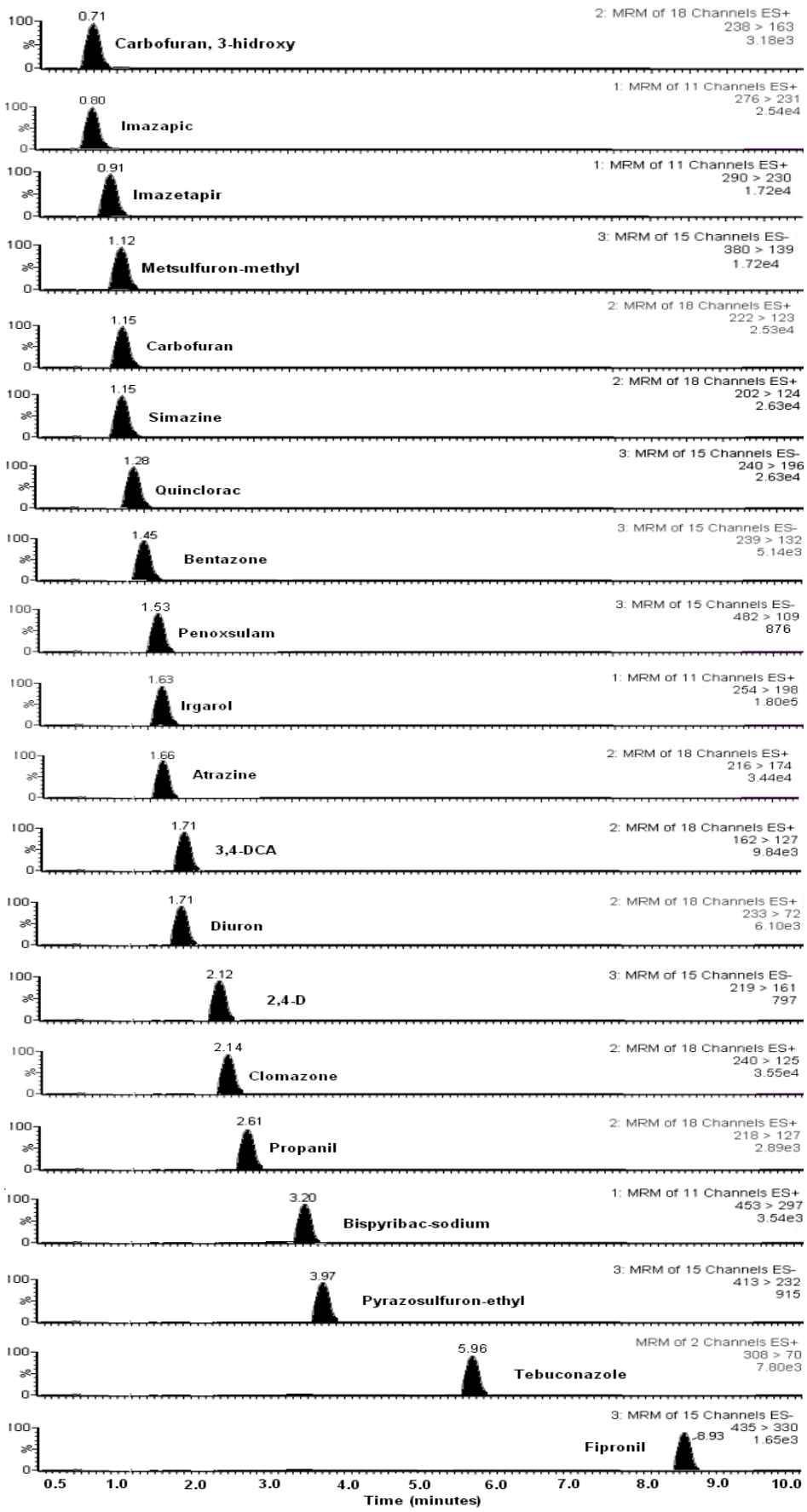


Figura 16: Cromatograma da separação dos compostos contendo as transições empregadas para a quantificação.

No Apêndice 1 estão apresentados todos os cromatogramas obtidos após a quantificação e identificação pelo programa MassLynx, contendo a identificação do composto, o tempo de retenção, a área e a intensidade correspondente a abundância da transição. Para os compostos ionizados no modo negativo, os cromatogramas estão no Apêndice 2.

5.3 Validação do método analítico

5.3.1 Curva analítica e linearidade

As equações das curvas analíticas, bem como os coeficientes de determinação (r^2), o intervalo linear e o número de injeções para os 18 agrotóxicos e 2 metabólitos presentes na solução analítica, preparada em metanol, encontram-se na Tabela 10. O número de injeções variou devido que os composto também variaram o valor de LOQ

Analisando as equações das curvas obtidas por LC-MS/MS, pode-se perceber que quanto maiores foram os coeficientes angulares "a" das equações, mais sensível foi o método para o composto (LANÇAS, 2004). Outro parâmetro avaliado, e que mostrou ser adequado foi o modelo linear, representado pelo coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, no qual é recomendado pela ANVISA (2003). Para o INMETRO (2003), acima de 0,90 já é um valor considerado adequado.

Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por LC-ESI-MS/MS

Compostos	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	Nº de injeções	Linearidade (µg L^{-1})
2,4-D	880,17 x + 1,4984	0,9955	7	10,0-500,0
3,4-DCA	3454,27 x + -2,0848	0,9933	7	10,0-500,0
3-hidroxicarbofurano	728,53 x + 0,6356	0,9949	6	10,0-500,0
Atrazina	6704,22 x +- 0,9301	0,9963	9	1,0-500,0
Bentazona	8116,92 x + 31,14	0,9917	8	5,0-500,0
Bispiribaque-sódico	445,337 x + 4,3321	0,9930	6	25,0-500,0
Carbofurano	7111,70 x + -12,2961	0,9957	8	5,0-500,0
Clomazona	8328,98 x + 88,5199	0,9931	8	5,0-500,0
Diurom	1346,77 x + -3,6104	0,9952	7	10,0-500,0
Fipronil	7383,74 x + -4.3607	0,9967	8	1,0-500,0
Imazapique	1175,42 x + 0,5272	0,9939	7	10,0-500,0
Imazetapir	1412,92 x + 1,3255	0,9967	7	10,0-500,0
Irgarol	20717,8 x + -0,8419	0,9948	9	1,0-500,0
Metsulfuron-metílico	1813,11 x + 3,8861	0,9930	7	10,0-500,0
Penoxsulam	341,41 x + 1,8486	0,9909	6	25,0-500,0
Pirazossulfuron-etílico	1153,90 x + 0,9321	0,9990	7	10,0-500,0
Propanil	900,743 x + 0,0473	0,9905	7	10,0-500,0
Quincloraque	173,96 x + 0,7514	0,9910	6	25,0-500,0
Simazina	6220,64 x + 1,5481	0,9972	9	1,0-500,0
Tebuconazol	13131,2 x + -1,8451	0,9972	9	1,0-500,0

5.3.2 LOD e LOQ determinados para a mistura

Na Tabela 11 são apresentados os valores para os LODs e LOQs obtidos para a mistura dos 18 agrotóxicos e dois metabólitos, comparando-se os limites instrumentais e do método. Para a determinação do LOD e LOQ do método, um fator de pré-concentração de 250 vezes, foi considerado na sua determinação. Os valores obtidos para o LOD e LOQ do instrumento ficaram entre 0,1 a 10,0 $\mu g\ L^{-1}$ e 1,0 a 25,0 $\mu g\ L^{-1}$, respectivamente. Considerando a etapa de pré-concentração, que permitiu concentrar uma amostra até 250 vezes, os LODs teóricos ficaram entre 0,4 a 40,0 ng L^{-1} enquanto os LOQs teóricos ficaram entre 4,0 a 100,0 ng L^{-1}.

A legislação da União Européia estabelece limites rígidos para a concentração de agrotóxicos em águas destinadas para consumo humano, sendo de no máximo 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ para agrotóxicos individuais e no máximo 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para a soma de todos agrotóxicos analisados, incluindo metabólitos (EEC 76/464/ECC). No caso das águas superficiais que poderão ser destinadas ao abastecimento público, os limites máximos permitidos são de 1 $\mu g\ L^{-1}$, para agrotóxicos individuais e de 5 $\mu g\ L^{-1}$ para a soma total de agrotóxicos (EEC 80/778/ECC). Portanto, os limites de quantificação para o método desenvolvido neste trabalho, atendem as exigências da legislação internacional.

No Brasil, a lei que regulamenta o controle para a qualidade da água destinada ao consumo humano é a Portaria Nº. 518 do Ministério da Saúde de 25 de Março de 2004. Nesta, somente 5 dentre os 18 agrotóxicos selecionados para este estudo estão registrados. O herbicida bentazona apresenta um nível máximo permitido de 300 $\mu g\ L^{-1}$, para o 2,4-D é de 30 $\mu g\ L^{-1}$, para o propanil é de 20 $\mu g\ L^{-1}$, e 2 $\mu g\ L^{-1}$ para simazina e atrazina. Portanto, a metodologia desenvolvida neste estudo é adequada para aplicação no monitoramento de águas para controle de possíveis contaminações pelos agrotóxicos estudados, pois os níveis de detecção atingidos estão abaixo dos limites estabelecidos pela União Européia, sendo esta a mais rígida legislação para controle de agrotóxicos em água.

Tabela 11: Valores de LOD e LOQ obtidos para a mistura dos 20 compostos

Compostos	Limites do instrumento ($\mu g\ L^{-1}$)		Limites do método ($ng\ L^{-1}$)	
	LOD	**LOQ**	**LOD**	**LOQ**
2,4-D	5,0	10,0	20,0	40,0
3,4-DCA	0,5	10,0	2,0	40,0
3-hidroxicarbofurano	5,0	10,0	20,0	40,0
Atrazina	0,5	5,0	2,0	20,0
Bentazona	0,1	10,0	0,4	40,0
Bispiribaque-sódico	5,0	25,0	20,0	100,0
Carbofurano	0,5	5,0	2,0	20,0
Clomazona	0,5	5,0	2,0	20,0
Diurom	5,0	10,0	20,0	40,0
Fipronil	0,5	1,0	10,0	4,0
Imazapique	0,1	10,0	0,4	40,0
Imazetapir	1,0	10,0	4,0	40,0
Irgarol	0,1	1,0	0,4	4,0
Metsulfuron-metílico	5,0	10,0	20,0	40,0
Penoxsulam	10,0	25,0	40,0	100,0
Pirazossulfuron-etílico	5,0	10,0	20,0	40,0
Propanil	0,5	10,0	2,0	40,0
Quincloraque	10,0	25,0	40,0	100,0
Simazina	0,1	1,0	0,4	4,0
Tebuconazol	0,5	1,0	2,0	4,0

5.3.3 LOD e LOQ analisados individualmente

Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos LODs e LOQs que foram obtidos para cada composto, preparados em solução padrão individual. Para obter os limites do

método, dividiu-se os limites do instrumento pelo fator de pré-concentração de 250 vezes, por isso denominado também de limites teóricos.

Limites do método= Limites do instrumento ÷ 250 (fator de pré-concentração)

Tabela 12 : Valores de LOD e LOQ obtidos em solução contendo cada padrão individualmente

Compostos	Limites do instrumento ($\mu g\ L^{-1}$)		Limites do método ($ng\ L^{-1}$)	
	LOD	**LOQ**	**LOD**	**LOQ**
2,4-D	0,1	1,0	0,4	4,0
3,4-DCA	0,1	0,5	0,4	2,0
3-hidroxicarbofurano	0,1	1,0	0,4	4,0
Atrazina	0,1	1,0	0,4	4,0
Bentazona	0,05	0,1	0,2	0,4
Bispiribaque-sódico	0,1	1,0	0,4	4,0
Carbofurano	0,1	0,5	0,4	2,0
Clomazona	0,05	0,1	0,2	0,4
Diurom	0,05	1,0	0,2	4,0
Fipronil	0,25	0,5	1,0	2,0
Imazapique	0,05	0,1	0,2	0,4
Imazetapir	0,05	0,1	0,2	0,4
Irgarol	0,01	0,05	0,04	0,2
Metsulfuron-metílico	0,1	0,5	0,4	2,0
Penoxsulam	1,0	2,5	4,0	10,0
Pirazossulfuron-etílico	0,05	0,1	0,2	0,4
Propanil	0,1	0,5	0,4	2,0
Quincloraque	0,5	1,0	2,0	4,0
Simazina	0,05	0,1	0,2	0,4
Tebuconazol	0,1	0,5	0,4	2,0

Observou-se que os valores dos limites, tanto de LOD quanto de LOQ, foram menores nas soluções analisadas nos padrões individuais do que quando analisado na mistura dos 20 compostos.

Quando o espectrômetro de massas opera monitorando menor quantidade de íons, a sensibilidade dos fragmentos aumenta, pois durante o tempo de análise o analisador de massas está voltado somente para alguns íons, permitindo que mais fragmentos cheguem ao detector.

5.3.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão do instrumento proposto em termos de repetitividade (RSD_r) foi obtida através da injeção de 3 níveis de concentração selecionados utilizados na elaboração das curvas analíticas. Os resultados estão apresentados na Tabela 13. Os resultados para precisão do método, considerando os resultados dos ensaios de fortificação estão listados na Tabela 15. Para ambos os resultados, utilizou-se a equação 4 para realizar os cálculos.

Para o teste de precisão intermediária (RSDpi) do instrumento empregaram-se dias diferentes na análise das soluções analíticas, e os resultados são descritos na Tabela 13. A RSDpi do método, empregaram-se dias diferentes de análise das amostras fortificadas com 3 diferentes níveis, conforme mostra na Tabela 14.

Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar de 2% a mais de 20% (HUBER *et al*., 2001; KURZ, 2007; GONÇALVES, 2007)). Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar RSD ≤ 20% (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, todos os resultados obtidos, mostrados nas Tabelas 13 e 14, estão dentro dos limites sugeridos.

Tabela 13: Resultados da repetibilidade (RSD_r) e da precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento

Composto	Concentração do padrão (µg L^{-1})	(%RSD_r)	(%RSDpi)	Composto	Concentração do padrão (µg L^{-1})	(%RSD_r)	(%RSDpi)
2,4-D	10,0	7,3	10,3	Clomazone	10,0	2,5	5,9
	25,0	4,2	6,1		25,0	1,1	6,8
	500,0	4,0	9,2		500,0	1,1	4,1
3,4-DCA	10,0	5,3	9,8	Diurom	10,0	2,8	4,9
	25,0	5,7	8,8		25,0	1,9	3,5
	500,0	4,1	5,1		500,0	1,6	2,3
3-hidroxi-carbofuran	10,0	6,4	12,4	Fipronil	10,0	1,0	4,6
	25,0	5,4	14,2		25,0	0,6	1,8
	500,0	3,1	8,8		500,0	0,1	0,1
Atrazina	10,0	4.7	12,8	Irgarol	10,0	0,9	1,4
	25,0	3,2	7,4		25,0	0,5	0,9
	500,0	2,0	4,5		500,0	0,1	0,1
Bentazona	10,0	1,1	2,4	Imazapique	10,0	1,2	3,4
	25,0	1,4	5,9		25,0	1,1	2,9
	500,0	0,9	1,5		500,0	1,0	2,2
Bispiribaque-sódico	10,0	4,3	8,9	Imazetapir	10,0	1,4	4,3
	25,0	3,2	11,0		25,0	2,1	3,6
	500,0	2,1	5,3		500,0	1,1	2,8
Carbofurano	10,0	3,4	8,9	Metsulfuron-metílico	10,0	5,2	11,5
	25,0	2,1	9,6		25,0	2,8	10,3
	500,0	1.1	3,5		500,0	3,3	5,4

Composto	Concentração do padrão (µg L^{-1})	(%RSD_r)	(%RSDpi)	Composto	Concentração do padrão (µg L^{-1})	(%RSD_r)	(%RSDpi)
Pirazossulfuron-etílico	10,0	5,1	14,2	Quincloraque	10,0	6,7	13,4
	25,0	1,3	11,2		25,0	5,3	9,2
	500,0	3,3	8,4		500,0	2,5	6,6
Penoxsulam	10,0	5,6	13,2	Simazina	10,0	3,5	6,9
	25,0	4,2	9,9		25,0	2,7	12,4
	500,0	2.2	6,7		500,0	1,1	7,3
Propanil	10,0	2,1	8,4	Tebuconazol	10,0	2,1	5,6
	25,0	1,1	4,5		25,0	1,7	4,6
	500,0	1,0	3,1		500,0	1,8	3,2

n=9 (3 soluções padrão x 3 injeções) de cada concentração da solução padrão

Tabela 14: Resultados da precisão intermediária (%RSDpi) do método

Compostos	2,0 µg L^{-1}		0,5 µg L^{-1}		0,1 µg L^{-1}	
	R (%)	RSDpi %	R (%)	RSDpi %	R (%)	RSDpi %
2,4-D	89,8	8,2	94,4	17,3	83,0	5,4
3,4-DCA	86,1	4,2	71,3	8,5	97,2	7,5
3-hidroxicarbofurano	91,1	16,7	99,8	7,5	93,3	15,7
Atrazina	100,3	7,4	108,1	12,3	85,3	5,4
Bentazona	84,9	4,7	89,6	4,5	74,2	8,7
Bispiribaque-sódico	90,0	9,3	111,5	6,8	99,5	5,5
Carbofurano	103,2	5,5	92,8	8,2	94,5	6,2
Clomazona	89,5	3,2	81,7	7,1	72,7	8,8
Diurom	98,7	5,0	102,5	2,2	77,3	14,1
Fipronil	105,0	3,5	89,6	4,7	88,0	5,7
Imazapique	99,4	3,9	101,8	12,4	94,3	7,5
Imazetapir	116,1	6,4	89,1	7,8	99,8	10,3
Irgarol	98,4	3,5	100,8	6,7	96,9	9,3
Metsulfuron-metílico	75,9	3,8	85,7	9,2	98,8	6,7
Penoxsulam	124,9	8,9	73,1	11,8	119,2	6,5
Pirazossulfuron-etílico	69,9	8,7	76,0	4,2	93,3	3,1
Propanil	96,3	5,2	92,8	3,5	107,7	3,8
Quincloraque	82,1	14,7	81,0	9,5	84,3	4,7
Simazina	124,7	15,2	89,6	11,7	88,5	13,2
Tebuconazol	90,4	1,8	97,5	6,9	90,4	7,9

5.3.5 Exatidão (Recuperação)

A Tabela 15 apresenta os valores das recuperações e seus respectivos RSD (%) obtidos para as fortificações nos níveis de 0,004; 0,02; 0,05; 0,1; 0,5 e 2,0 µg $L^{-1,}$ para os 18 agrotóxicos e 2 metabólitos estudados. Obteve-se percentagens de recuperação entre 70 e 120% para 95% dos compostos em todos os níveis de fortificações. Estes resultados estão de acordo com as recomendações do processo de validação de métodos cromatográficos para o estudo das recuperações (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003). Somente alguns compostos apresentaram recuperações menores do que 70%, como é o caso dos compostos 3,4-DCA, bentazona e pirazosulfuron etílico com recuperações de 65,3% para o nível de 0,5 µg L^{-1}, 60,2% no nível 0,1 µg L^{-1} e 65% no nível 2,0 µg $L^{-1,}$ respectivamente. No entanto, alguns outros compostos em determinados níveis de fortificação, apresentaram recuperação maior do que 120%, como é o caso do imazapique com recuperação 136,4% no nível de fortificação de 2,0 µg L^{-1}; imazetapir 136,3% e 123,1% nos níveis de 2,0 e 0,05 µg $L^{-1,}$ respectivamente; bispiribaque sódico, simazina e penoxsulan, com recuperações de 122,5; 134,7 e 127,7%, para os níveis de 0,5 µg L^{-1}, 2,0 µg L^{-1} e 2,0 µg $L^{-1,}$ respectivamente. Os valores de precisão também foram satisfatórios, apresentando valores de RSD (%) menores ou iguais do que 20% para todos os compostos.

Tabela 15 : Recuperações (R) e RSD (%) para os agrotóxicos e metabólitos em amostras de água e analisados por LC-ESI-MS/MS

Compostos	2,0 µg L^{-1}		0,5 µg L^{-1}		0,1 µg L^{-1}		0,05 µg L^{-1}		0,02 µg L^{-1}		0,004 µg L^{-1}	
	R (%)	RSD %	R (%)	RSD %	R (%)	RSD %	R (%)	RSD %	R (%)	RSD %	R (%)	RSD %
2,4-D	110,8	7,8	128,4	20,3	108,0	3,4	100,0	11,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,4-DCA	103,1	3,2	65,3	8,2	104,2	7,0	93,2	5,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-hidroxicarbofurano	100,1	15,3	94,8	7,5	93,3	15,7	103,6	10,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Atrazina	82,3	9,8	119,1	14,9	75,7	6,3	115,9	15,4	96,4	7,8	n.d.	n.d.
Bentazona	75,6	2,7	81,6	8,5	60,2	7,8	72,5	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bispiribaque-sódico	98,5	8,1	122,5	7,2	89,5	5,1	93,3	4,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbofurano	95,2	6,3	111,8	9,9	84,5	4,2	76,7	4,8	95,7	11.9	n.d.	n.d.
Clomazona	110,5	5,2	91,6	7,7	82,7	7,8	74,5	2,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diurom	100,5	7,1	109,5	1,2	75,3	15,1	92,7	6,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fipronil	103,1	4,5	99,8	5,7	84,0	4,7	103,1	11,2	93,0	14,0	102,2	10,2
Imazapique	136,4	1,9	111,9	15,4	92,3	9,7	96,8	9,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imazetapir	136,3	7,4	109,1	0,7	117,8	9,3	123,1	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Irgarol	110,4	4,9	107,8	8,7	101,9	9,3	105,4	5,1	111,9	11,4	121,3	4,9
Metsulfuron-metílico	71,9	2,8	80,7	10,2	118,8	5,7	96,3	13,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Penoxsulam	127,7	2,4	53,1	12,8	120,2	4,5	93,5	19,8	n.d..	n.d.	n.d.	n.d.
Pirazossulfuron-etílico	64,9	7,9	70,0	4,0	91,3	1,9	82,3	10,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Propanil	86,3	7,2	92,8	5,5	101,2	4,0	108,4	4,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quincloraque	84,1	12,7	87,4	11,5	94,2	3,8	98,1	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Simazina	134,7	16,2	95,1	10,2	89,6	11,1	93,2	3,2	97,4	14,1	101,8	17,7
Tebuconazol	96,4	2,6	102,5	9,9	92,2	6,9	91,2	5,5	109,2	11,9	95,3	12,5

5.4 Avaliação do monitoramento da água de superfície do Canal São Gonçalo e da água de abastecimento público do município de Rio Grande

Cada agrotóxico possui propriedades físico-químicas específicas. O conhecimento dessas propriedades é uma importante etapa durante as análises e suas interpretações. Outra informação importante para determinar se a amostra estaria ou não contaminada, é o limite de detecção do método utilizado para a análise. Assim, resultados acima do limite de detecção podem ser detectados analiticamente muito embora estes valores, ainda possam estar dentro da faixa permitida pela legislação (VEIGA et al., 2006).

Nas Tabelas 16 e 17 são apresentados os resultados mensais das análises para o período de monitoramento das águas superficiais do Canal São Gonçalo, e da água de consumo que abastece o município de Rio Grande/RS, no período de janeiro a outubro de 2008. Dos 18 agrotóxicos e 2 metabólitos analisados, houve contaminação detectável, ou seja, acima do limite de detecção do método para: diurom, irgarol, imazetapir, imazapique, fipronil, clomazona, tebuconazol e atrazina, embora estas concentrações encontram-se abaixo dos limites estabelecido pela legislação (COUNCIL DIRECTIVE, 98/83/EC).

A presença do diurom e irgarol ao longo de todo monitoramento indica que a região do Canal São Gonçalo, no que diz respeito à contaminação por agrotóxicos, não sofre influência somente do processo agrário em especial da cultura de arroz irrigado. A ocorrência do diurom pode ser devido a este herbicida ser amplamente utilizado, em diferentes tipos de culturas como, alface, frutas cítricas, cebola e outros (CÂMARA DE AGROTÓXICOS, 2008). Além disso, diurom e irgarol são utilizados como anti incrustantes de embarcações (SAPOZHNIKOVA, 2007; ZHANG, 2008). A associação desses usos agrava a contaminação por diurom em águas, especialmente em regiões como a de Rio Grande que por ser uma região portuária, tem intensa navegação e aporte de embarcações. Embora tenha sido detectado diurom, seu principal produto de hidrólise, a 3,4-DCA, assim como este também é um metabólito do herbicida propanil, não foi detectado nas amostras. Os períodos de maior contaminação para o herbicida diurom foram de março a maio. O tratamento de água da estação foi eficiente na redução do diurom, pois a concentração foi reduzida de 50-90% do valor antes do tratamento. Tal fato pode ser explicado pela característica desse composto em ficar adsorvido a matéria orgânica, pois tem alto valor de K_{oc} = 400. Desta forma, a etapa de

floculação, durante o tratamento de água, pode ser a responsável por esta redução possivelmente pela partição do herbicida ao sedimento ou a partículas orgânicas. O herbicida irgarol não é utilizado na cultura de arroz como o diurom, porém ambos são empregados como anti incrustantes, indicando que a contaminação por estes compostos tem a mesma fonte, as embarcações. As menores concentrações de irgarol em relação ao diurom podem ser devido ao fato do irgarol não ser usado em culturas agrícolas e, ter menor solubilidade em água (7 mg L^{-1}) e K_{ow} de 3,95, mostrando a tendência lipofílica deste composto, sendo possivelmente acumulado em organismos vivos e no sedimento, aumentando a sua dissipação em meio aquoso. No entanto, todas as concentrações detectadas estão abaixo do nível permitido pelas legislações.

Os demais compostos encontrados em água são provavelmente provenientes dos cultivos de arroz irrigado, pois todos esses compostos são indicados para essa cultura, sendo que esta é a prática agrícola que predomina seguido da cebola e do tomate, na região Sul do Rio Grande do Sul. (CABRERA *et al*., 2008).

Os herbicidas da classe imidazolinônicos analisados neste estudo, imazetapir e imazapique, foram detectados ao longo de todo o período de amostragem, tanto na água de superfície quanto na água de abastecimento, o que pode ser explicado pela tendência do imazetapir e imazapique ficarem solúveis em água, já que possuem elevada solubilidade e um baixo valor de K_{oc}, e por isso não apresentam afinidade em se particionar em sedimento, biota ou qualquer partícula orgânica. Para imazapique, a eficiência do processo de tratamento reduziu 30% em média na concentração, enquanto para imazetapir a redução no tratamento foi de 40%, em média. Essa diferença de redução pode ser explicada pelo fato do imazapique ter maior solubilidade em água em comparação com imazetapir.

O fungicida tebuconazol e o herbicida atrazina foram detectados nas amostragens a partir do mês de maio, sendo que tebuconazol seguiu sendo detectado em todas as amostras. Analisando tebuconazol, o tratamento foi eficiente na redução durante o mês de maio, junho e setembro, reduzindo em média 70%, exceto no mês de julho e agosto que a redução foi de apenas 5% em média. Através do K_{ow}, pode-se observar que o composto apresenta tendência de se particionar no sedimento, fato que explica sua redução no tratamento possivelmente na etapa da floculação. Já atrazina, por apresentar um baixo Koc, possui a tendência de ficar dissolvido em água, e devido a esta característica, o tratamento de água apresentou 13% de eficiência na sua redução. Isto pode ser evidenciado no mês de junho em que as concentrações detectadas não foram reduzidas significantemente, assim como nos próximos meses de amostragens.

O herbicida clomazona, em todas as amostragens, foi detectado em concentrações menores que o LOQ, exceto no mês de julho, onde foram detectadas concentrações de 15,87 ng L^{-1} na amostra de água para consumo, e 39,85 ng L^{-1}, na água superficial. Essa redução pode ser explicada pelo valor de K_{oc} (entre 150-500 cm^3 g^{-1}), o qual indica média mobilidade em água e tendência em ficar particionado em sedimentos e ou partículas orgânicas (K_{ow} 2,5).

O inseticida fipronil foi detectado em todas as amostragens, sendo este amplamente empregado em diversas culturas, além do seu uso amplo como cupinicida. De acordo com suas propriedades físico-químicas, elevado valor de K_{ow} e K_{oc}, e baixa solubilidade em água, sua tendência é não se particionar em água. Porém, ele é amplamente utilizado na região, em especial no cultivo do arroz irrigado, e por esse fato foi quantificado durante todo o período de amostragem. O sistema de tratamento não demonstrou elevada eficiência na retenção, apresentado em média 14% de redução, exceto nos meses de maio e junho em que o tratamento foi mais eficiente. O inseticida fipronil, mesmo estando presente em baixas concentrações, é de elevado risco para os organismos devido a sua tendência lipofílica, e por isso a possível bioacumulação em lipídios.

Levando-se em conta que o período analisado não correspondeu ao período de maior probabilidade de ocorrência de contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos, pó qual se inicia nos próximos meses após a aplicação nas lavouras de arroz irrigado, os valores encontrados foram bastante significativos. Os resultados indicam que o modelo de produção agrícola baseado na utilização de agrotóxicos causa contaminação nos recursos hídricos. Apesar dos resultados das análises provarem que as amostras estão com concentrações abaixo do limite permitido pela legislação, houve contaminação detectável de alguns dos agrotóxicos analisados.

Tabela 16 : Resultados do monitoramento realizado de janeiro a outubro nas água de superfície do Canal são Gonçalo (Concentrações em ng L^{-1})

Compostos	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
2,4-D	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
3,4-DCA	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-hidroxi carbofurano	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Atrazina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,9 ± 4,7	2,7 ± 5,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Bentazona	nd	nd	nd	nd	Nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd
Bispiribaque- sódico	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carbofurano	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clomazona	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	33,3 ± 4,2	<LOQ	5,4 ± 5,3	nd
Diurom	17,4 ±2,2	42,4 ± 2,1	133,0 ± 1,7	82,5 ± 3,7	131,0 ±3,0	43,6 ± 2,2	39,8 ± 2,3	64,4 ± 2,9	22,5 ± 2,5	40,5 ± 2,9
Fipronil	9,2 ± 3,1	8,3 ± 1,9	10,2 ± 3,2	8,5 ± 1,7	7,5 ±2,2	5,5 ± 3,2	6,24 ± 3,5	2,4 ± 3,3	3,4 ± 2,9	nd
Imazapique	17,3 ± 2,8	21,7 ± 4,0	26,0 ± 3,2	16,2 ± 2,8	60,5 ± 4,1	56,0 ± 2,9	10,3 ± 2,3	76,0 ± 3,2	161,8 ± 3,9	80,8 ± 3,0
Imazetapir	33,4± 3,6	45,9 ± 2,8	50,4± 1,9	39,1 ±3,5	13,8 ± 3,2	44,7 ± 3,1	39,4 ± 2,2	59,3 ± 2,7	72,6 ± 2,8	64,6 ± 2,2
Irgarol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9,3	17,6 ± 4,3	17,3 ± 3,9	5,3 ± 4,3	11,5 ± 3,5	20,5 ± 3,9
Metsulfuron-metílico	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Penoxsulam	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pirazossulfuron- etílico	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propanil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quincloraque	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Simazina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,9±4,4	nd	nd
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,7±2,3	20,5±3,5	16,6±3,8	6,2±3,6	21,1±4,5	41,1±4,5

nd = não detectado

Tabela 17: Resultados do monitoramento realizado de janeiro a outubro na água de abastecimento público no município de Rio Grande (Concentração em ng L^{-1})

Compostos	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
2,4-D	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3,4-DCA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-hidroxi carbofurano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Atrazina	<LOQ	nd	nd	nd	nd	4,3 ± 5,8	nd	nd	nd	<LOQ
Bentazona	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bispiribaque- sódico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carbofurano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clomazona	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15,9± 4,6	<LOQ	1,13 ± 5,8	nd
Diurom	22,8 ± 4,1	20,1 ± 5,2	55,0 ± 4,2	14,3 ± 6,4	13,9 ± 5,9	20,5 ± 4,5	17,0 ± 3,2	25,7 ± 4,2	10,4 ± 3,7	20,5 ± 3,9
Fipronil	8,0 ± 3,6	8,3 ± 2,5	7,8 ± 4,2	7,8 ± 2,8	3,9 ± 3,5	4,6 ± 2,9	nd	<LOQ	<LOQ	nd
Imazapique	7,7 ± 3,6	2,1 ± 4,6	20,3 ± 5,6	14,8 ± 4,5	37,4± 6,5	44,7± 4,2	8,4 ±3,7	51,8 ± 4,2	103,3 ± 3,4	78,8 ± 2,0
Imazetapir	23,6 ± 5,3	31,3 ± 4,9	22,8 ± 4,3	25,3 ± 5,7	12,1 ± 4,9	5,8 ± 4,2	27,1 ± 2,9	50,7 ± 3,2	44,8 ± 3,5	44,6 ± 2,2
Irgarol	nd	nd	nd	nd	0,40	<LOQ	nd	0,97 ± 5,80	nd	nd
Metsulfuron-metílico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Penoxsulam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pirazossulfuron- etílico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propanil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quincloraque	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Simazina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,5±5,8	6,7±3,8	15,2±4,3	6,1±4,2	4,6±3,3	19,1±4,5

nd = não detectado

6 CONCLUSÃO

Esse estudo teve como objetivo principal a otimização e a validação de uma metodologia analítica, empregando-se a técnica de SPE para a extração dos analitos (agrotóxicos e metabólitos selecionados), e quantificação e qualificação empregando LC-ESI-MS/MS, para analisar a água de superfície do Canal São Gonçalo e a água de abastecimento público da cidade de Rio Grande.

A SPE provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras. As principais vantagens foram: rapidez, permitindo o preparo simultâneo de várias amostras e possibilitando a extração e pré-concentração dos agrotóxicos ao mesmo tempo, boa seletividade, baixo consumo de solvente e, consequentemente gerando poucos resíduos. O emprego de cartuchos contendo 500 mg do adsorvente C18 e eluição com metanol, possibilitaram a extração dos dezoito agrotóxicos (clomazona, bispiribaque-sódico, diurom, atrazina, simazina, imazetapir, imazapique, metsulfurom-metílico, quincloraque, penoxsulam, 2,4-D (2,4-diclorofenoxi-ácido acético), pirazossulfurom-etílico, bentazona, propanil, irgarol, tebuconazol, fipronil e carbofurano) e dois metabólitos (3,4-DCA (3,4-dicloroanilina) e 3-hidroxicarbofurano) com rapidez e eficiência.

O método por LC-ESI-MS/MS demonstrou ser uma técnica ideal para a determinação dos compostos, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As seguintes condições cromatográficas otimizadas, com fase móvel de água: acetonitrila: metanol (46:24:30, v/v/v) acidificada (água e acetonitrila) a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v), a uma vazão de 0,5 mL min^{-1}, coluna XTerra® MS 3,5 μm C18 (50 x 3,0 mm), permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise de 10 min.

Na validação do método obteve-se resultados satisfatórios A linearidade apresentou coeficientes de determinação maiores que 0,99 para todos os compostos estudados. Os valores de limite de detecção e quantificação foram adequados para análise de agrotóxicos, tanto nas amostras de água de superfície, quanto nas amostras de água de abastecimento público. Os limites de detecção do método variaram entre 0,4 – 40,0 ng L^{-1}, enquanto que para os limites de quantificação a variação foi de 4,0 – 100,0 ng L^{-1}. As recuperações empregando SPE com

cartuchos de 500 mg de C18ec, para 95% obtiveram variação entre 70 a 120%, apresentando boa precisão (RSD ≤ 20%) para todos os compostos.

Durante a aplicação da metodologia para análise dos agrotóxicos, oito dentre os vinte compostos selecionados foram detectados nas amostras, que são: imazetapir, imazapique, diuron, irgarol, fipronil, clomazona, tebuconazol e atrazina. Estes foram detectados em concentrações em nível de ng L^{-1}.

Com a implementação e desenvolvimento de novas metodologias analíticas para análises de agrotóxicos, cada vez mais seletivas e sensíveis, como é o caso da metodologia desenvolvida para este estudo, as legislações atuais, principalmente a Portaria nº 518 da legislação brasileira, necessitam de reavaliação dos limites máximos permitidos. Este estudo baseou-se na legislação européia, pois com a instrumentação analítica empregada para desenvolvimento e validação do método, pode-se atingir limites traços de quantificação (ng L^{-1}). Por este fato, no Brasil as normas da legislação necessitam serem reformuladas, já que se comprova por este estudo, a capacitação em se igualar aos demais controles como é o caso da legislação européia.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO ESTUDO

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Souza, CABRERA, Liziara, GONÇALVES, F. Fábio, ZANELA, Renato, PRIMEL, G. Ednei. Development and validation of method using SPE and LC-ESI-MS/MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples**. 5th European Conference on Pesticide and Related Organic Micropollutants in the Environmental e 11th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides** , 22 a 25 de outubro, Marseille, France, 2008.

DEMOLINER, Adriana, CABRERA, C. Liziara, RODRIGUES, A. Sherol, CALDAS, S. Sergiane, PRIMEL, G. Ednei. Monitoramento de multiclasses de agrotóxicos em águas superficiais e de abastecimento público na região Sul do Rio Grande do Sul. **XVI Encontro de Química da Região – 16 SBQSul**, 2008, 15 a 16 de novembro, Blumenau SC, Brasil, 2008.

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Sergiane, CLEMENTIN, M. Rosilene, PRIMEL, G. Ednei. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclasses de agrotóxicos e metabólitos em água**. VII Mostra de Produção Universitária – X Encontro de Pós-Graduação – FURG**, 2008, 24 de outubro, Rio Grande RS – Brasil

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Sergiane, CLEMENTIN, M. Rosilene, PRIMEL, G. Ednei. Validation of method using solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for multianalyte determination of different classes of pesticides and metabolites in water samples. **Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO XII & SIMCRO**,2008, 28 a 30 de Outubro, Florianópolis, SC, Brasil

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S.Sergiane, GONÇALVES, F. Fábio, KURZ, H. Márcia, CABRERA, C. Liziara, PRIMEL, G. Ednei. Otimização dos parâmetros das fontes ESI e APCI para a determinação de pesticidas em água por LC-MS/MS **Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO XII & SIMCRO**,2008, 28 a 30 de Outubro, Florianópolis, SC, Brasil

.

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Sergiane, GONÇALVES, F. Fábio, ZANELLA, Renato, PRIMEL, G. Ednei. Pesticide contamination in surface waters analyzed by the liquid chromatography tandem mass spectrometry in the public water supply in Rio Grande, RS, Brazil. In: **2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas – BrMASS**, 2007, Campinas SP – Brasil

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Sergiane, PRIMEL, G. Ednei. Otimização e validação do procedimento analítico usando SPE, HPLC-DAD e LC-MS/MS para análises de pesticidas em água. **XV Encontro de Química da Região Sul – SBQSul**, 2007, Ponta Grossa PR – Brasil

DEMOLINER, Adriana, PRIMEL, G. Ednei. Validação de metodologia analítica empregando SPE, HPLC-DAD e confirmação por LC-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água de superfície. **VI Mostra de Produção Universitária – IX Encontro de Pós-Graduação – FURG**, 2007, Rio Grande RS – Brasil

DEMOLINER, Adriana, CALDAS, S. Sergiane, PRIMEL, G. Ednei. Validação de metodologia analítica empregando SPE, HPLC-DAD e LC-MS/MS na determinação de agrotóxicos em águas In: **14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA**, 2007, João Pessoa PB – Brasil

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS - ANA. Disponível em: <http://www.ana.gov.br>. Acesso em 12 set. 2008.

ALDER, L. *et al*. Residue analysis of 500 high priority pesticides : better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Mass Spectrometry Review** , v.25 p. 838-865, 2006.

ALISTER, C.; KOGAN, M. ERI: Environmental risk index. A simple proposal to select agrochemicals for agricultural use. **Crop Protection**, v. 25, p. 202-211, 2006.

ALPENDURADA, M. F. *et al*. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups os pesticides in water by use of LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, p. 955-968, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Guia para validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899 de 29/05/2003.

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brasília. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp>. Acesso em: 15 set. 2008.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley: Huddersfield, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Seção Rio Grande do Sul. **Semana da Água no Rio Grande do Sul: uma experiência de mobilização**. Porto Alegre: ABES-RS, 2003, p.22.

AYANO, E. *et al*. Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, 2004, 507, 211.

BAIRD, C. **Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BALINOVA, A. Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water. **Journal of Chromatography A,** v. 728, p. 319-324, 1996.

BALLESTEROS, E.; PARRADO, M. J. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente.** Viçosa: UFV, 2004. p. 15-34.

BARCELÓ, D.; Hennion, M.C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2ª ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BAUGROS, J. B. *et al*. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority sunstances present in the list of REACH in real water samples. **Analytica Chimica Acta**, 2008, 607, 191.

BEYRUTH, Z.; TOMITA, R. Y. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Instituto Biológico, São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.geocities.com/~esabio/tomita.htm>. Acesso em 12 nov. 2008.

BIZIUK, M. *et al*. Ocurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v.754, p. 103-123, 1996.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: <dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf:>. Acesso em 12/08/2008.

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 14/08/2008.

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: Recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry **Anal Bioanal. Chem**. 2006, 384, 85.

CABRERA, L.C. *et al*. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região Sul do Estado do RS. **Química Nova**. 2008.

CÂMARA DE AGROTÓXICOS - I Mapeamento dos agrotóxicos utilizados no Rio Grande do Sul/, Conselho Regional de Química da 5. Região.-1.ed.-Porto Alegre, RS : CRQ-V, 2008. 116p.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962.

CARVALHO, J.J. et al. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. **Anal Bioanal. Chem**, 2008.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S**. Introdução a Métodos Cromatográficos**. 2.ed. Campinas: Unicamp, 1993. p. 218.

COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC, **Official J. European Communities, November 3,** 1998. Council Directive 98/83/EC, Official J. European Communities, November 3, 1998.

CUNHA, A. C. B. *et al*. Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 2004, 378, 940.

CUSTODIO, R. *et al* . O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Quimica Nova**, v. 20, p. 219-225, 1997.

DEMOLINER, K. S. **Água e saneamento básico: regimes jurídicos e marcos regulatórios no ordenamento brasileiro**. – Porto Alegre: Livraria do Advogado Editora, 2008. 220p.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. **Química Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.

EEC COUNCIL DIRECTIVE 76/464/ECC. **Official Journal of European Communities**, vol. L.129; 1976 (May 18 th). p. 23.
EEC COUNCIL DIRECTIVE 80/778/ECC. **Official Journal of European Communities**, vol. L.229; 1980 (Aug. 30 th). p. 11.

EUROPEAN COMMISSION. **Official Journal of the European Communities**, 17/08/2002, L221/8-36.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia.** 2004. 79f. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, SP.

FEINBERG, M. *et al*. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p. 174–183, 2007.

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. **Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Editora Elsevier, Amsterdam, v. XLIII, Capítulo 8, 2005.

GÁNDARA, S. *et al*. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid phase extraction followed by liquid chromatography-diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v.992, p. 121-131, 2003.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N.S.; ZHOU, J.L. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine system after restrictions in antifouling paints. **Environmental International**, 33, 70-77, 2007.

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.

GREULICH, K.; ALDER, L**.** Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS**. Anal. Bioanal. Chem.** *In Press.*

HARRIS, Daniel.C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

HIEMSTRA, M., KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography –tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1154, 3-25, 2007.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. 2001. Disponível em <http://www.labcompliance.com>. Acesso em 16 set. 2008.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Produção Agrícola Municipal – Cereais, Leguminosas e Oleaginosas, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2005/pamclo2005.pdf>. Acesso em 10 out 2008.

INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35p.

INSTITUTO RIOGRANDENSE DE ARROZ – IRGA. Disponível em <http:/www.irga.rs.gov.br>. Acesso em jan. 2008.

KAMPIOTI, A. A. *et al*. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 2005, 382, 1815.

KURZ, M. H. S, **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinaçãod eresíduos de agrotóxicoss em águas e degradação a campo**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

KUSTER, M.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, 2008 *In Press*

KUSTER, M. *et al*. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides en the Ebro river delta during the main growing of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2008, 75, 390.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE) /** Fernando M. Lanças – São Carlos: RiMa, 2004, 96p.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LANÇAS, F. M. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. **Sociedade Brasileira de Química**, Vol. 14, Nº 2, 183-197, 2003.

LAVORENTI, A. **Comportamento dos pesticidas no meio ambiente**. In: ANAIS DO WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, Campinas, 1996. Anais. Campinas: EMBRAPA/CNPMA.

LIU, F. *et al*. Multi-Residue Analysis of Some Polar Pesticides in Water Samples with SPE and LC–MS–MS. **Chromatographia**, 2006, 63, 233.

MAJORS, R. E. **A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples**. In: LCGC. Estados Unidos, 2001a. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com>. Acesso em 20 nov. 2008.

MAJORS, R. E. **New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation**. In: LCGC. Europa, 2001b. Disponível em: <http://www.lcgceurope.com>. Acesso em 20 nov. 2008.

MARIN, J. M. *et al*. Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticidas and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2006, 1133, 2004.

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2004. 123p. (Dissertação de Mestrado) – UFSM, Santa Maria, RS.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em 12 set. 2008.

NOLDIN, J. A.; DESCHAMPS, F. C.; EBERHARDT, D. S. Dissipação do herbicida Sirius, aplicado em benzedura em lâmina de água, na cultura do arroz irrigado, sistema pré-germinado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3., 2003, Balneário Camboriú, **Anais...** Itajaí: EPAGRI, 2003, p. 539-541.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food **Trends Anal. Chem**. 2005, 24, 683.

NUNES, V. da S. Agricultura Irrigada x Saúde Ambiental: Existe um conflito?, 2002. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php>. Acesso em 14 nov. 2008.

PASCHOAL, J. A. R. *et al*. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, nº 5, p. 1190-1198, 2008.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas carbofurano e quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD**. 2007. 108 p. (Dissertação Mestrado) – UFSM, Santa Maria, RS.

PERREU, F. et al. Trace analysis of sulfonylurea herbicides and their metabolites in water using a combination of off-line oro n-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. 2007, 388, 1265.

PETROVÍC, M. *et al*. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**. 1067, 1-14, 2005.

PICÓ, Y., FERNÁNDEZ, M., RUIZ, M.J., FONT, G. Review Current trends in solid-phase based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environmental. **J Biochem Biophys Methods**, 70, 117-131, 2007.

PICÓ, Y., BLASCO, C., FONT, G. Environmental and Food Applications of LC-tandem Mass Espectrometry in Pesticide-Resídue Analysis: an overview. **Mass Espectrometry** Reviews, 23, 45-85, 2004.

PRIMEL, E. G. **Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório.** 2003. 170 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova***,* Vol. 24, No. 1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, S. C. N; MELO, F. S. C; JARDIM, I. C. S. F.; Novos sorventes baseados em poli(metiloctilsiloxano) sobre sílica para uso em extração em fase sólida. **Química Nova**, Vol. 24, No.4, p. 637-640, 2006.

REEMTSMA, T. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis – Part II: Obstacles. **TrAC Trends Anal. Chem**. 20 (2001) 533.

REBOUÇAS, A., BRAGA, B., TUNDISI, J. G., **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico Uso e Conservação**, São Paulo, Escritura Editora e Distribuidora de Livros, 2002.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v.27, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M., *et al.* Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201–205, 2007.

ROCHA, J. C., ROSA, A. H., CARDOSO, A. A. **Introdução a Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.p.119.

RODRIGUES, M. A. *et al*. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 277 - 278, 2007.

ROGATSKY, E.; STEIN, S**.** Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development**. J. Am. Soc. Mass Spectrom**., v.16, p.1757, 2005.

RUDD, L. ROBERT. **Pesticides and the Living Landscape**. University of Wisconsin Press. Madison, 1964, 320 p.

SAMAE, Consumo de água. Disponível em: <http://www.samae.com.br>. Acesso em 15 set 2008.

SANCO, COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SANCHO, J. V.; POZO, O. J.; HERNÁNDEZ, F. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry: a powerful approuch for the sensitive and rapid multiclass determination of pesticides and transformation products in water. **Analyst**, 2004, 129, 38.

SAPOZHNIKOVA, Y. *et al*. Antifouling pesticides in the coastal waters of Southern California. **Baseline / Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1962–1989, 2007.

SCHREIBER, A. Introduction into LC/MS/MS Technology – LC/MS/MS in Food and Environmental Analysis. Applied Biosystems. 2º Br MASS Conference – Campinas/SP – 2007.

SHABIR, G. A. *et al*. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p.57-66, 2003.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA - SINDAG. Disponível em: <http:/www.sindag.br>. Acesso em set. 2008.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004, p. 400.

SKOOG, D. A. & Leary, J. J. **Principels of Instrumental Analysis**. 4.ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1992. p. 423.

SLOBODNÍK, J. *et al.* Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic systems with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A,** v. 768, p. 239-258, 1997.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS/MS **Chromatographia,** 2002, 55, 95.

SPADOTTO, C. A. et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações** (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42), 2004, 29p.

STEEN, R.J.C.A, BOBELDIJK, I., BRINKMAN, U.A.Th. Screening for transformation products of pesticides using tandem mass spectrometric scan modes. **Journal of Chromatography A**, 915, 129-137, 2001.

STOOB, K. *et al*. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1097, 138.

TOMLIN, C. D. S. The pesticides manual. 12 ed. **Farnahm: The British Crop Protection Councill**, 2000.

TOMLIN, C. D. S. The pesticides manual, **The British Crop Protection Councill**, versão eletrônica 3.0, 2004.

VÉKEY, 2001 Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 921, p.227, 2001.

VEGA, a. B., *et al.* Monitoring of pesticidas in agricultural water and soil simples from Andalucía by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2005, 538, 117.

VEIGA, M. M. *et al*. Pesticide pollution in water systems in a small rural community in Southeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22 (11), p. 2391-2399, 2006.

VIDA INTEGRAL, Jornal on line – notícias. Disponível em: <http://www.vidaintegral.com.br>. Acesso em 11 nov. 2008.

VIEIRA, E., LICHITIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análises de resíduos de pesticidas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p. 303-305, 2004.

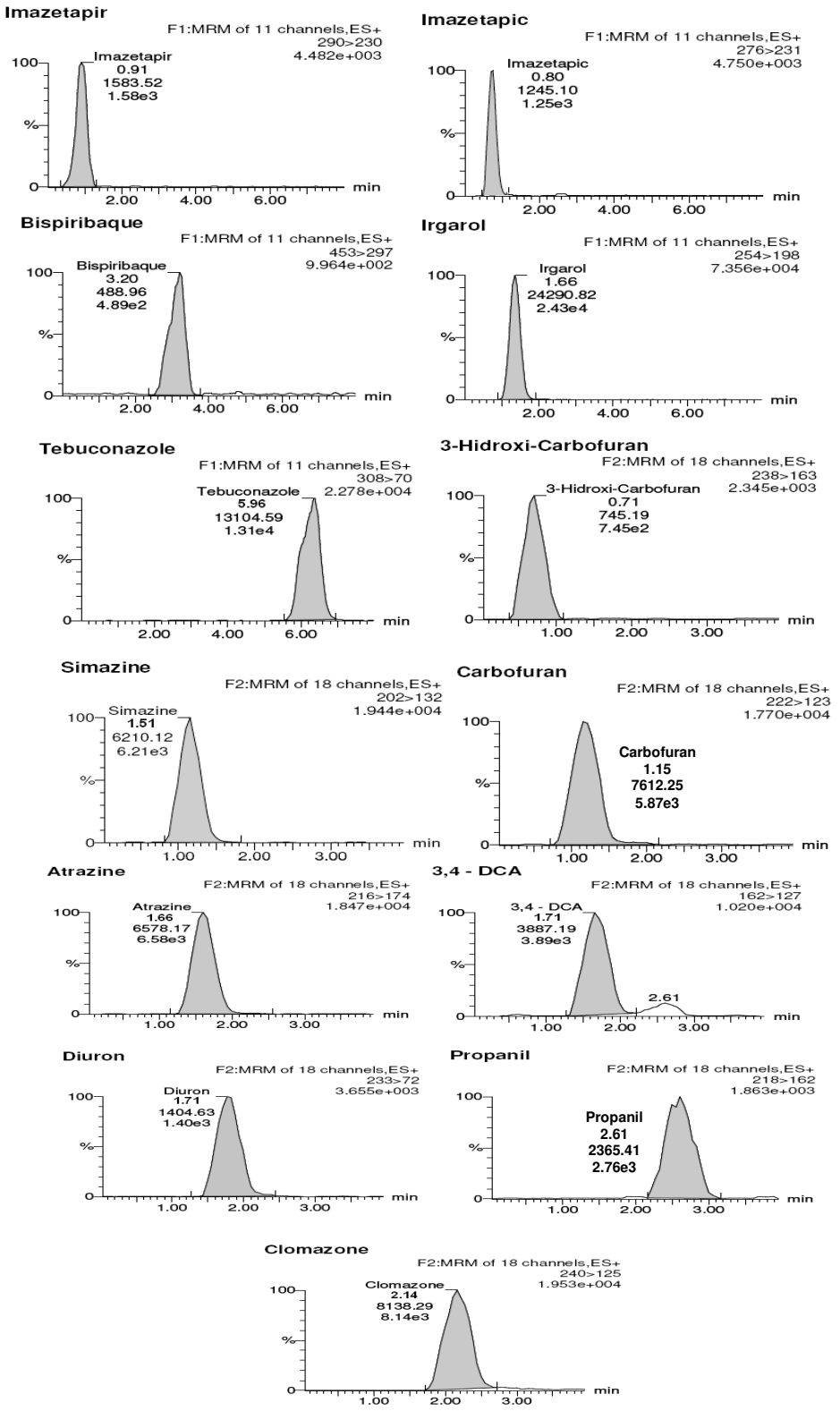
ZANELLA, R.; et. al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 257–262, 2000.

ZHANG, A.Q. *et al*. Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 575–586, 2008.

APÊNDICES

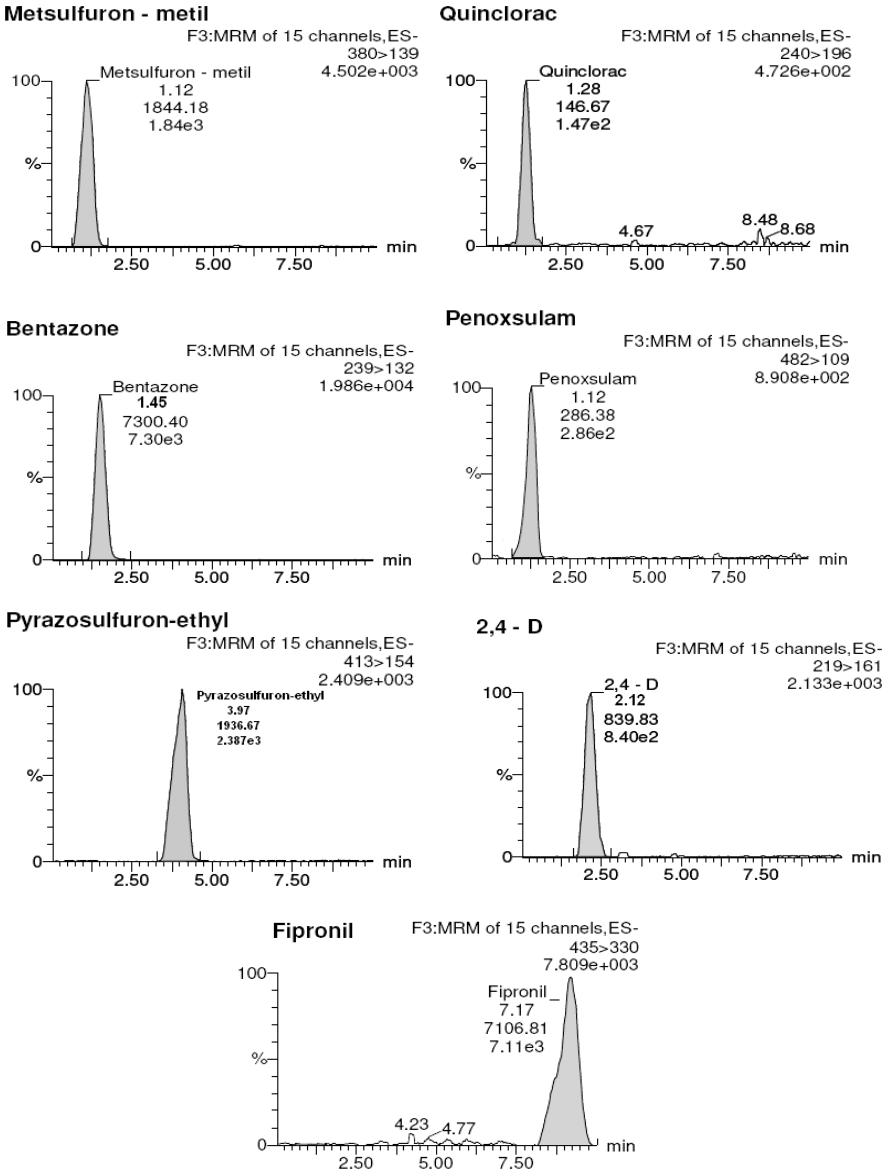
Apêndice 1:

Cromatogramas dos compostos quantificados pelo programa QuanLnyx que foram ionizados no modo positivo (ESI+).



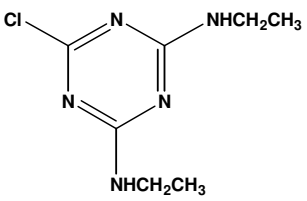
Apêndice 2

Cromatogramas dos compostos quantificados pelo programa QuanLnyx que foram ionizados no modo negativo (ESI-).

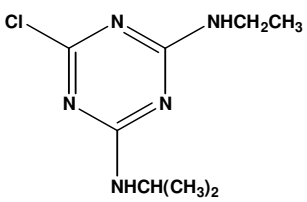


Apêndice 3:

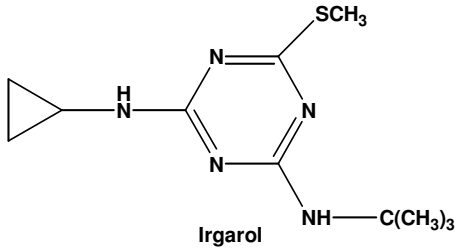
Estruturas dos compostos analisados no modo de ionização positivo:



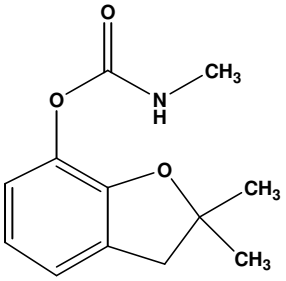
Simazina



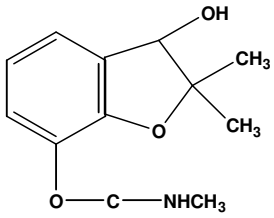
Atrazina



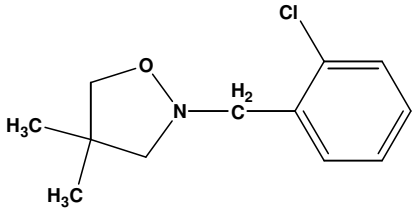
Irgarol



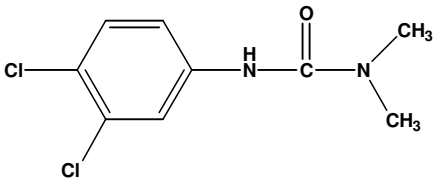
Carbofurano



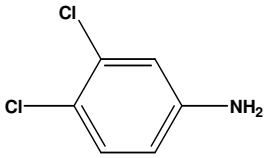
3-Hidroxi-carbofurano



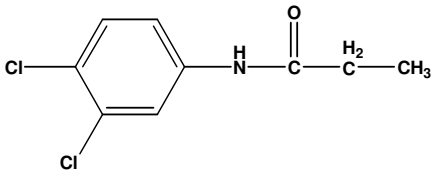
Clomazona



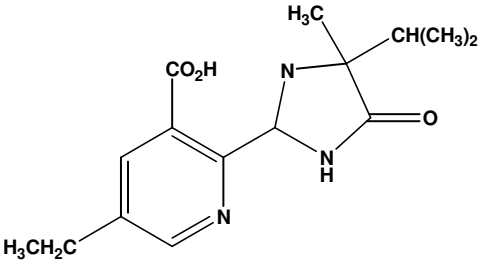
Diuron



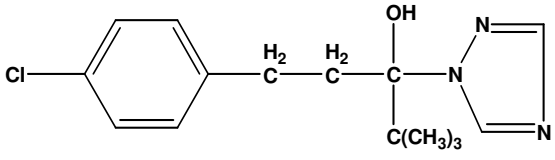
3,4-DCA



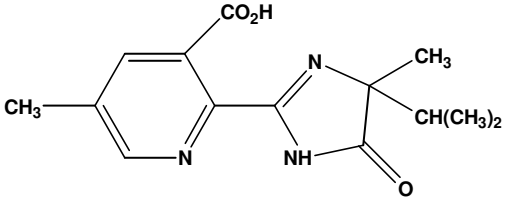
Propanil



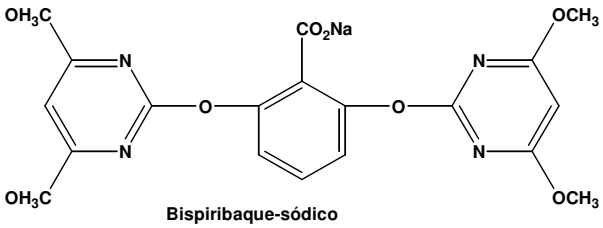
Imazetapir



Tebuconazole



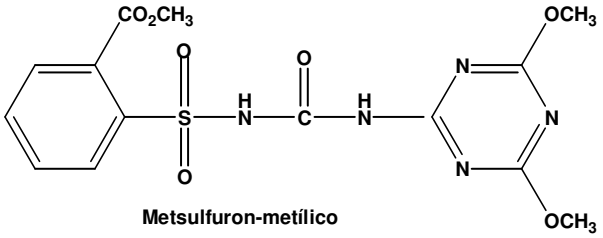
Imazapique



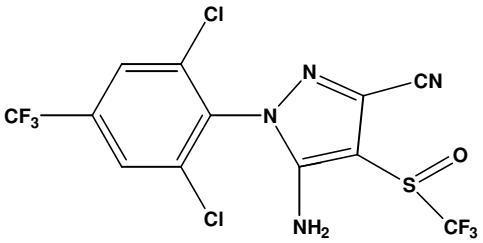
Bispiribaque-sódico

Apêndice 4:

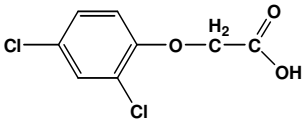
Estrutura dos agrotóxicos analisados no modo de ionização negativo:



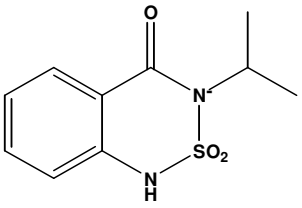
Metsulfuron-metílico



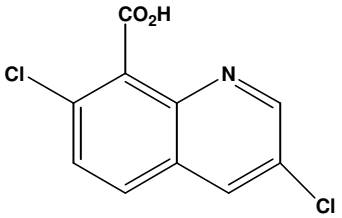
Fipronil



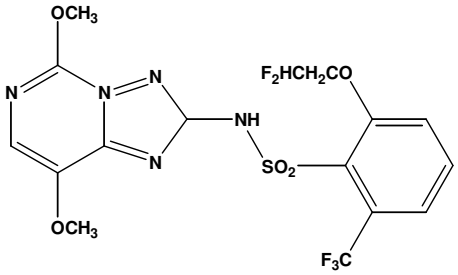
2,4-D



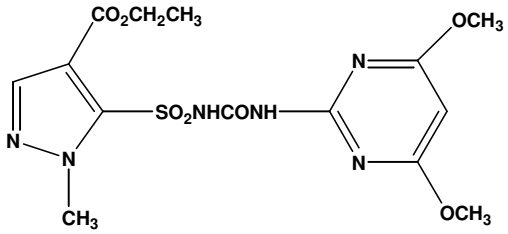
Bentazona



Quincloraque



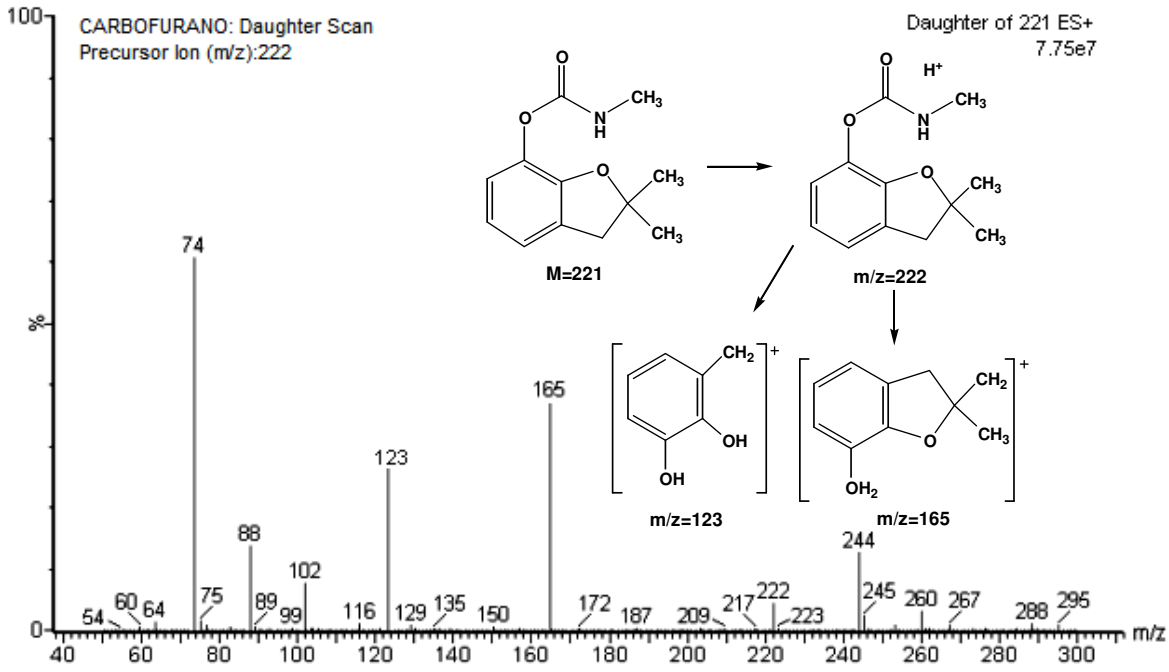
Penoxsulam

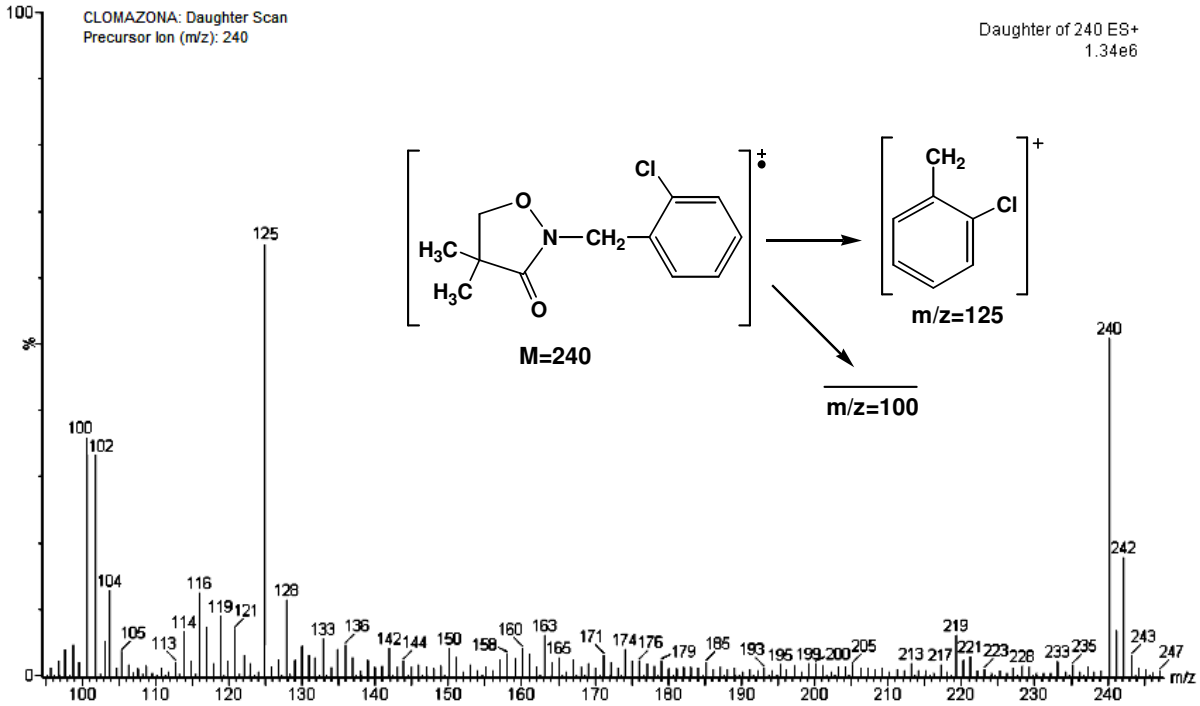


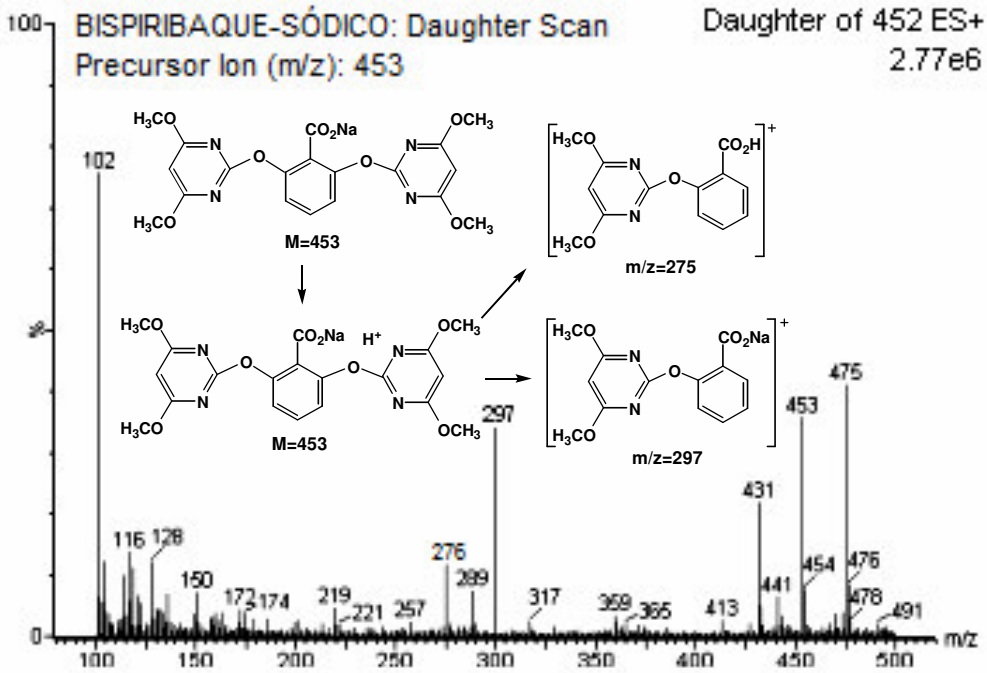
Pirazossulfuron-etílico

Apêndice 5:

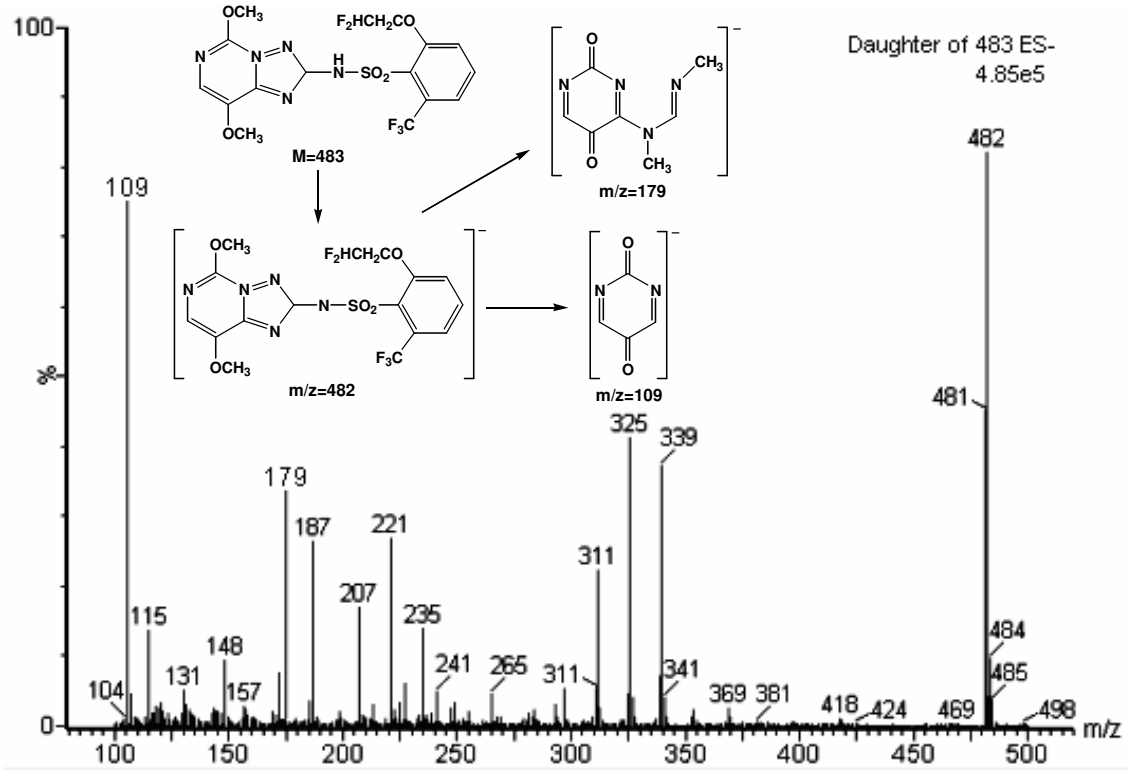
Espectros de massa de cada um dos 20 compostos analisados demonstrando as fragmentações:

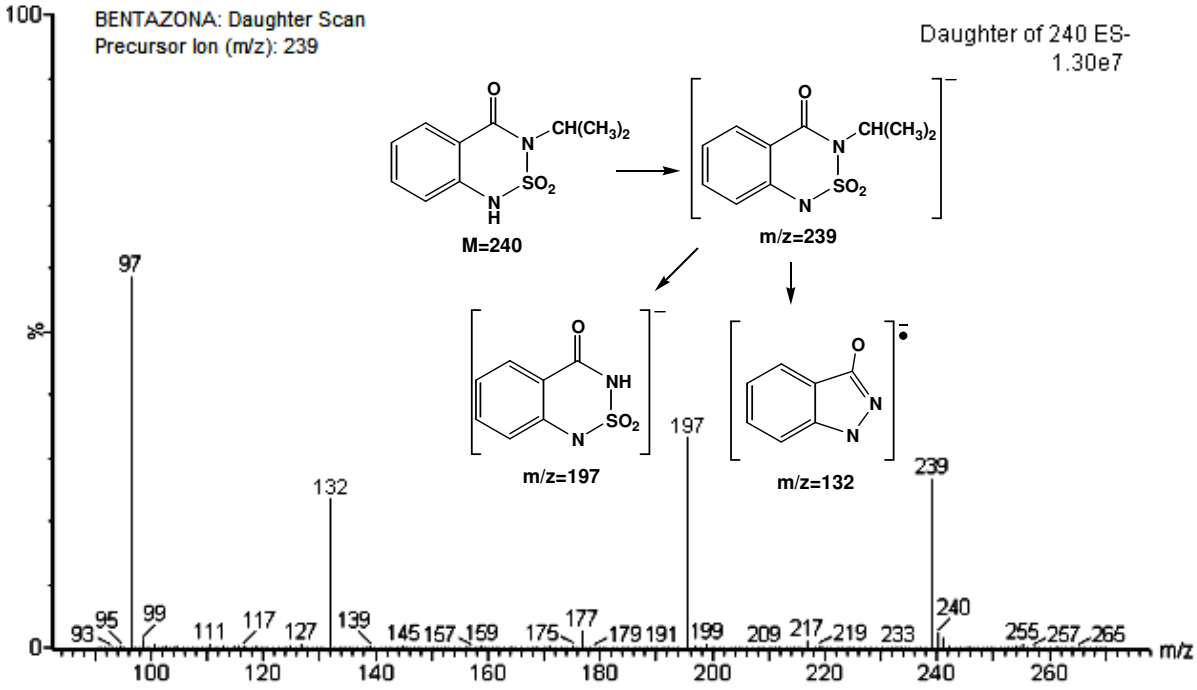


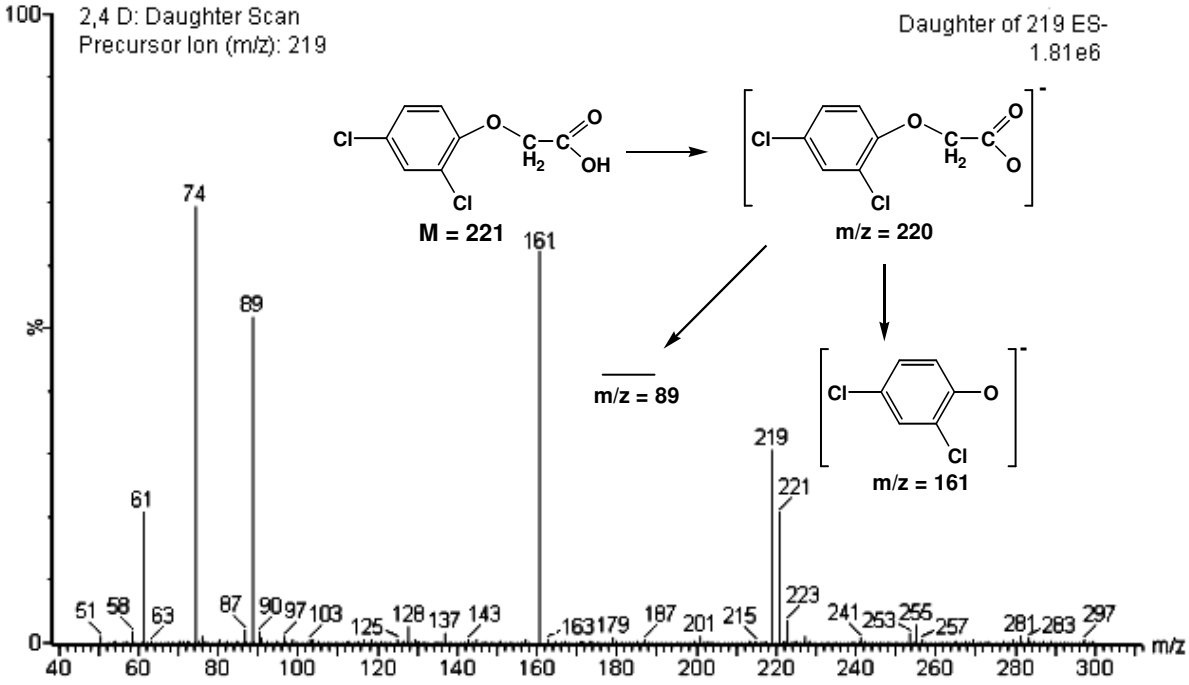


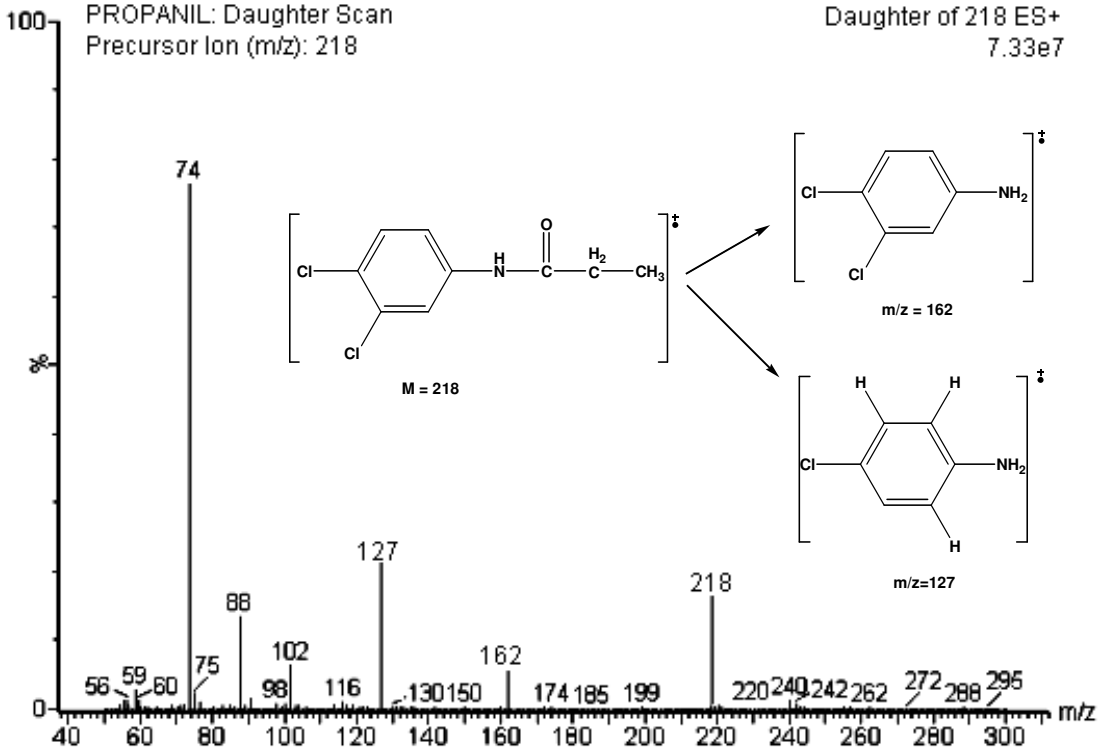


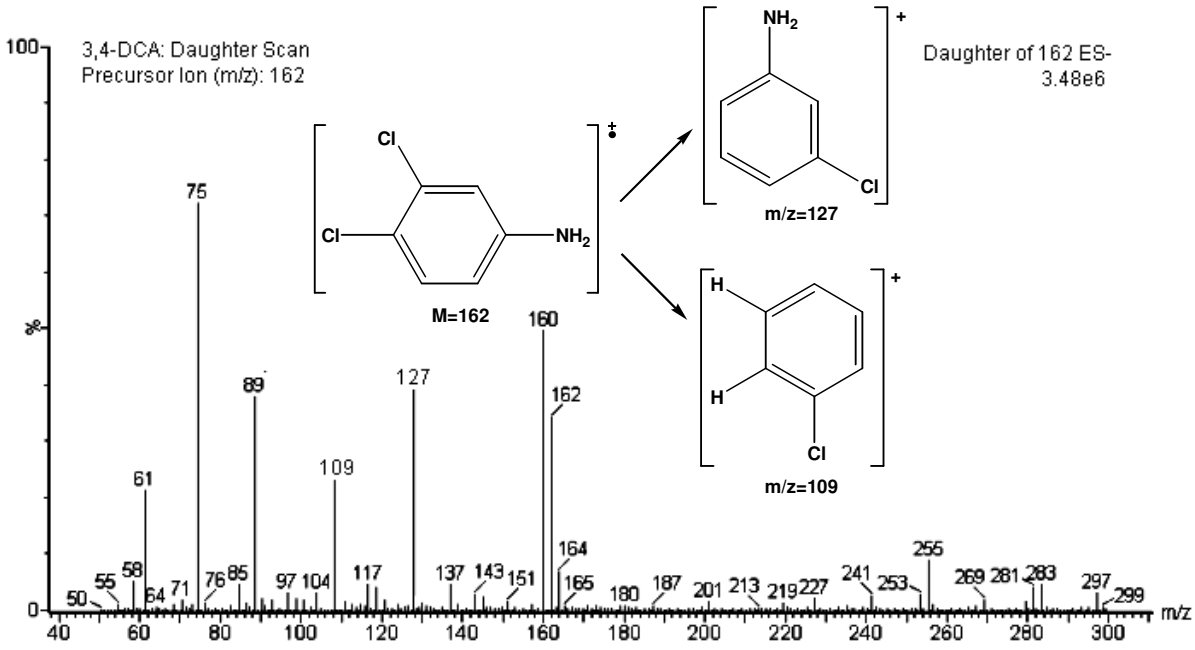
PENOXSULAM: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 482

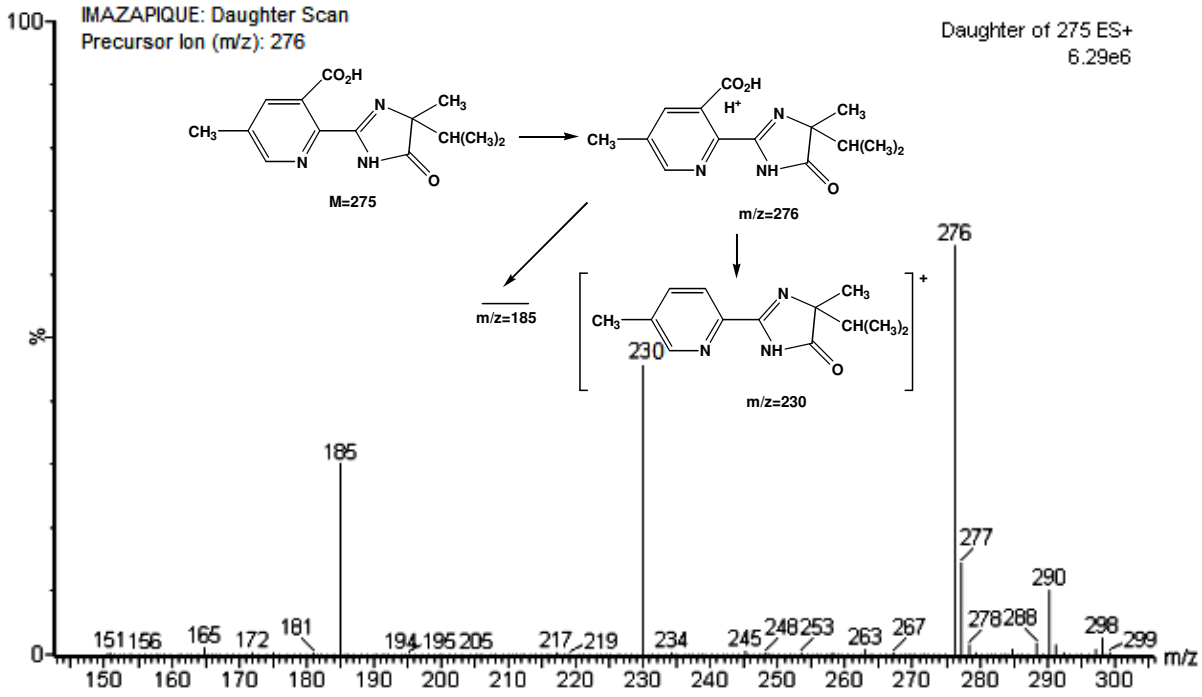


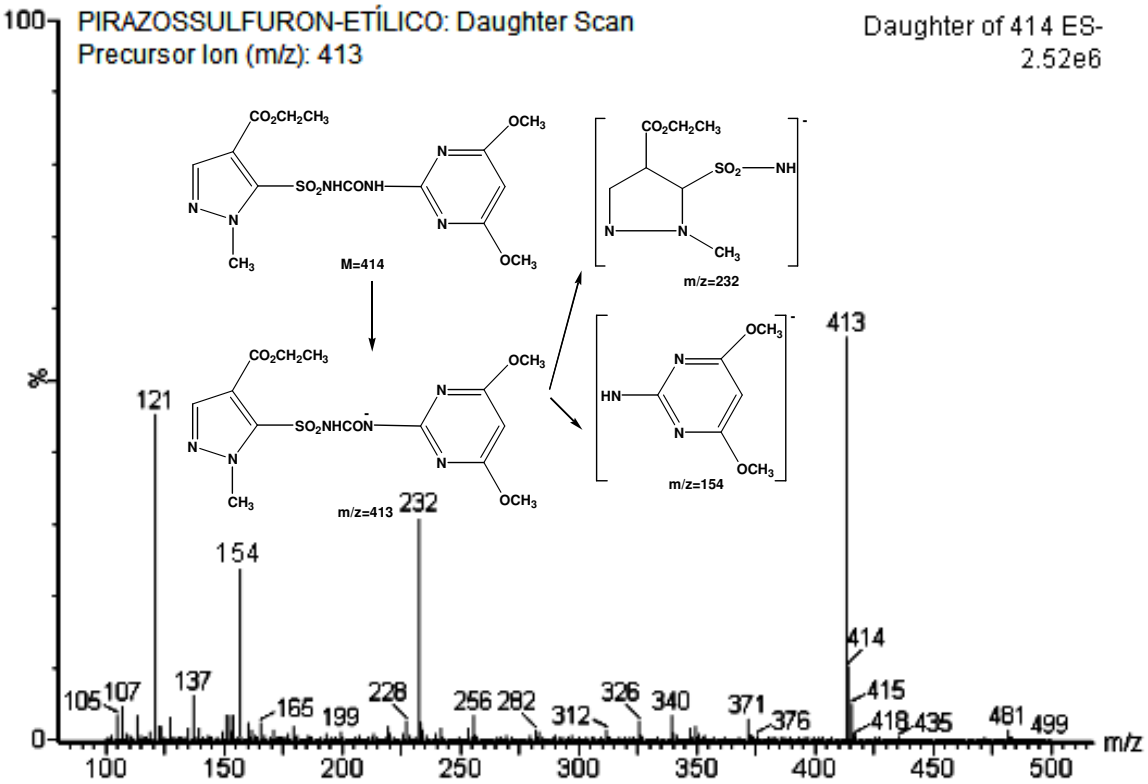

BENTAZONA: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 239
Daughter of 240 ES-
1.30e7
M=240
m/z=239
m/z=197
m/z=132
%
m/z

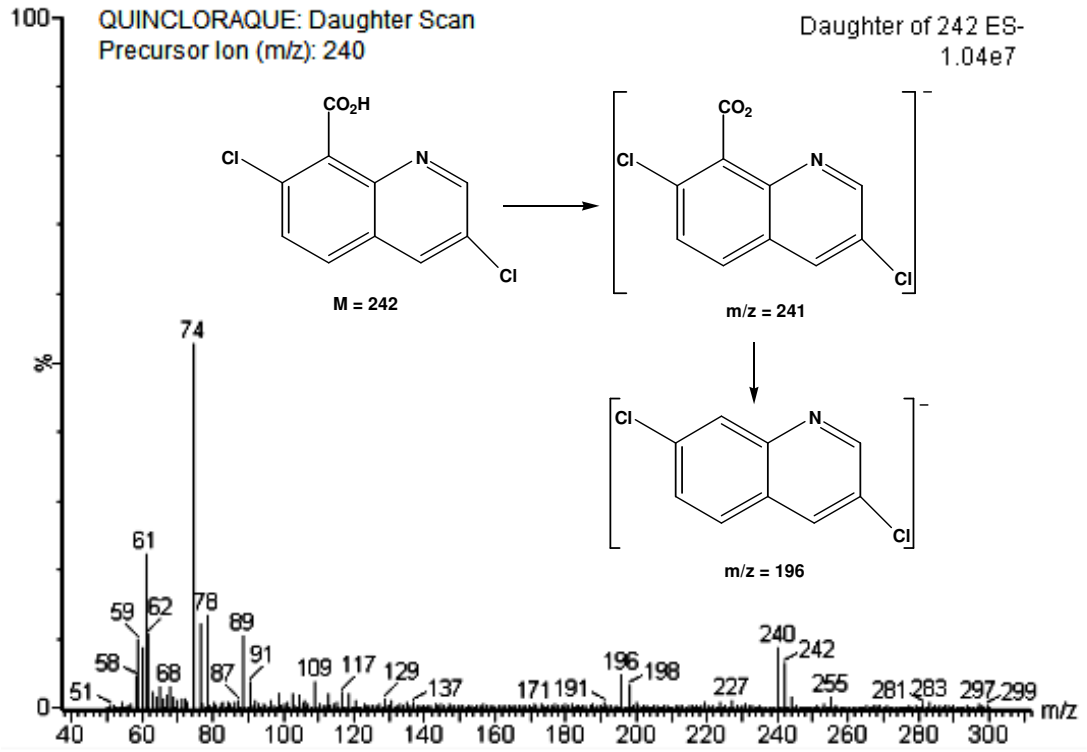

2,4 D: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 219
Daughter of 219 ES-
1.81e6
M = 221
m/z = 220
m/z = 89
m/z = 161
%
m/z

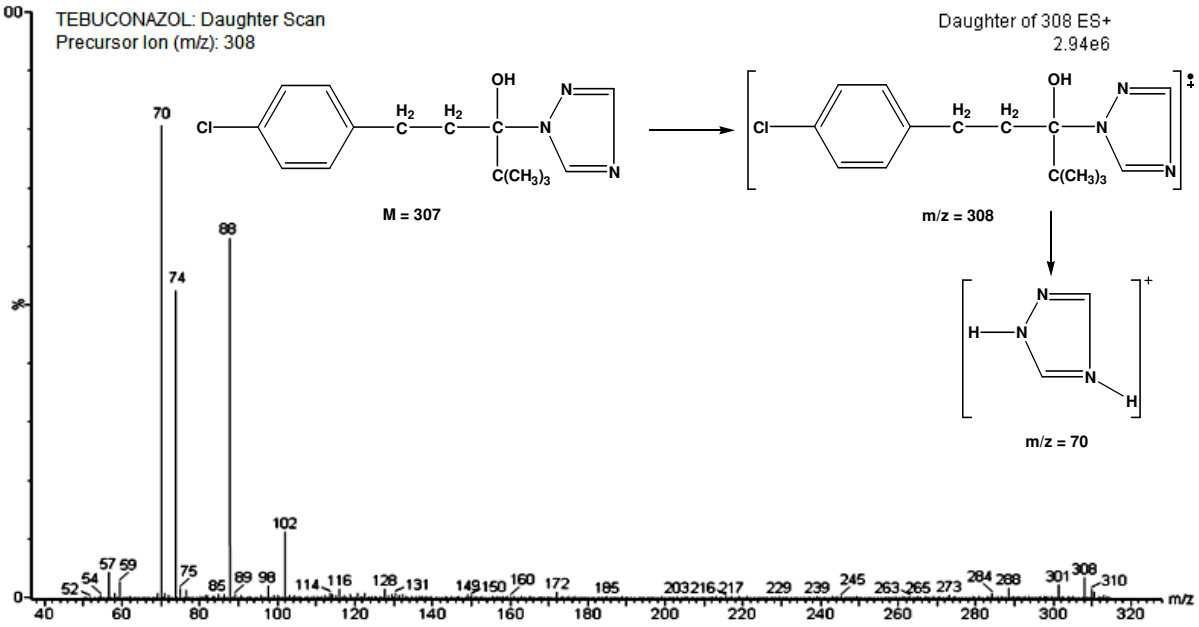

PROPANIL: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 218
Daughter of 218 ES+
7.33e7
100
%
0
m/z
M = 218
m/z = 162
m/z=127
74
127
88
218
102
162
75
56
59
60
98
116
130
150
174
185
199
220
240
242
262
272
288
295
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300

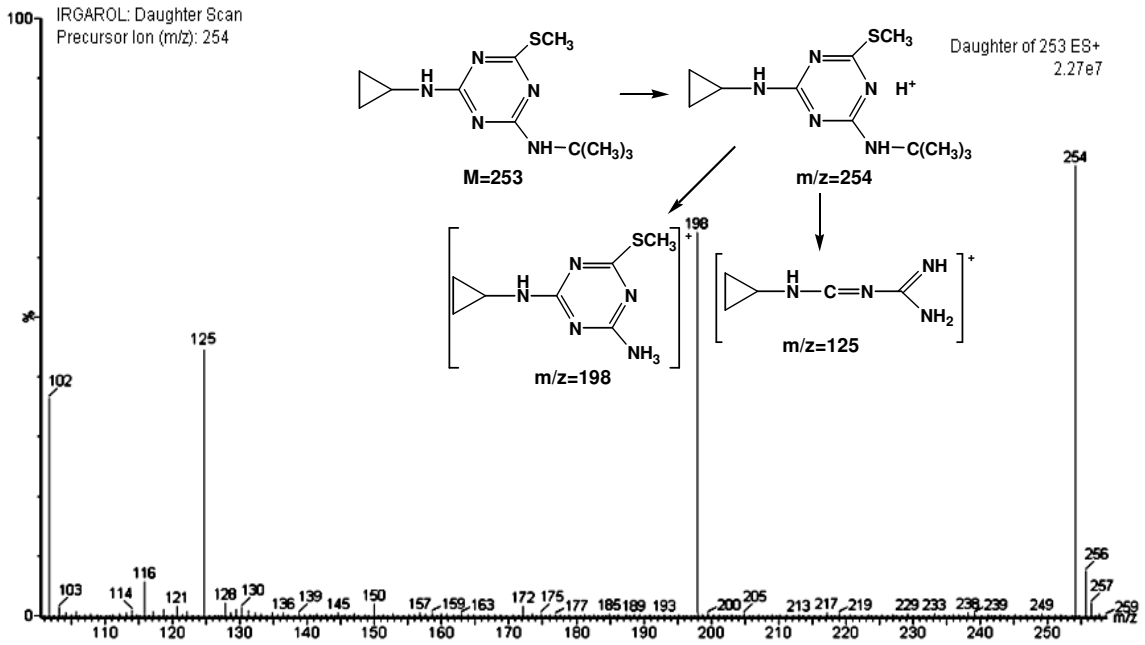

3,4-DCA: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 162
Daughter of 162 ES-
3.48e6
100
%
0
m/z
M=162
m/z=127
m/z=109
75
160
89
127
162
109
61
164
255
50
55
58
64
71
76
85
97
104
117
137
143
151
165
180
187
201
213
219
227
241
253
269
281
283
297
299
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300

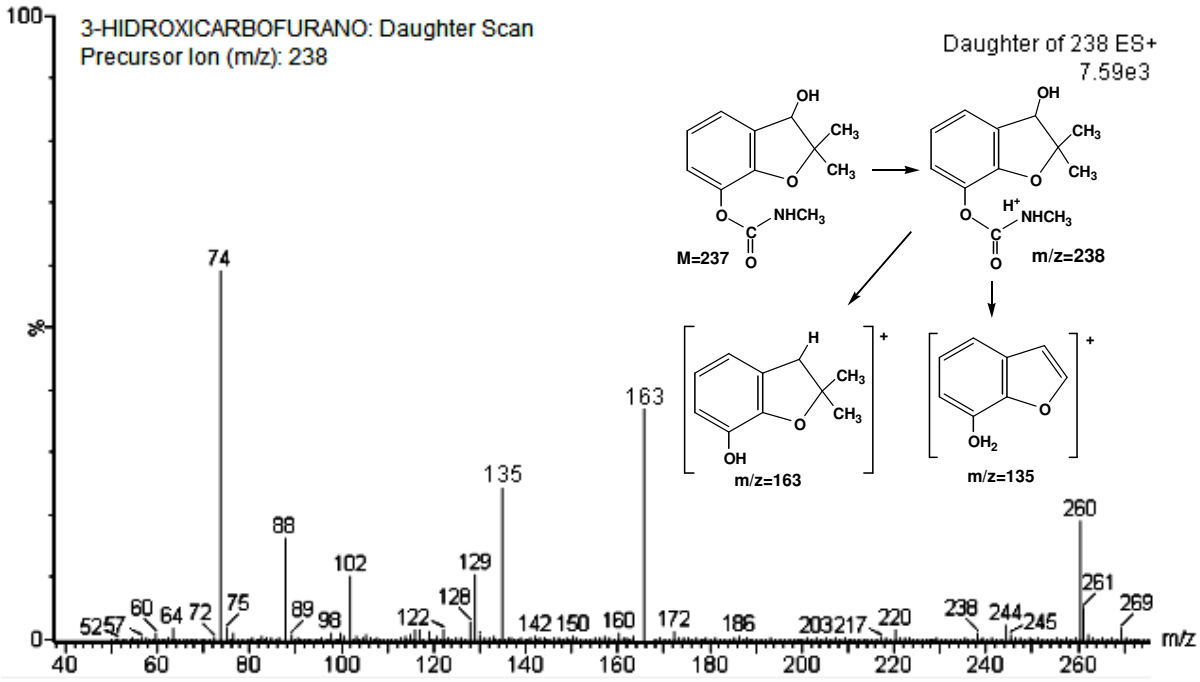

IMAZAPIQUE: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 276
Daughter of 275 ES+
6.29e6
M=275
m/z=276
m/z=185
m/z=230
100
%
0
276
185
277
290
230
181
151 156 165 172 194 195 205 217 219 234 245 248 253 263 267 278 288 298 299
150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
m/z

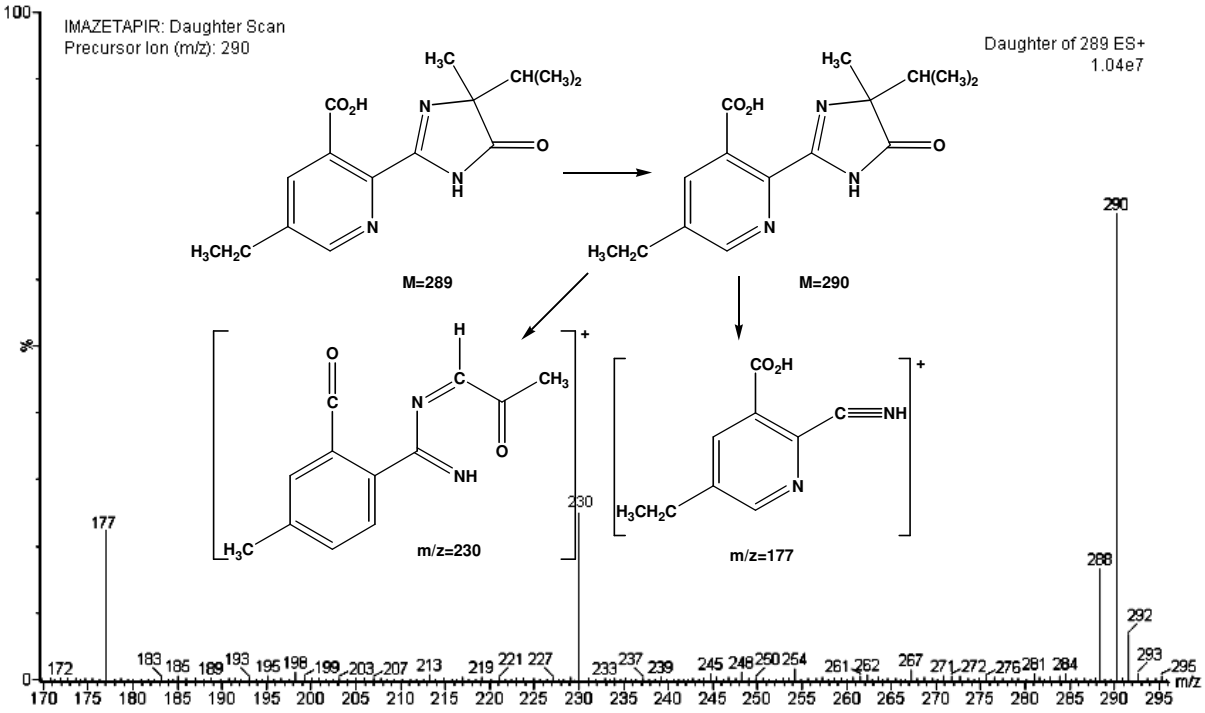

PIRAZOSSULFURON-ETÍLICO: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 413
Daughter of 414 ES-
2.52e6
M=414
m/z=413
m/z=232
m/z=154
100
%
0
121
232
154
413
414
105 107 137 165 199 228 256 282 312 326 340 371 376 415 418 435 481 499
100 150 200 250 300 350 400 450 500
m/z

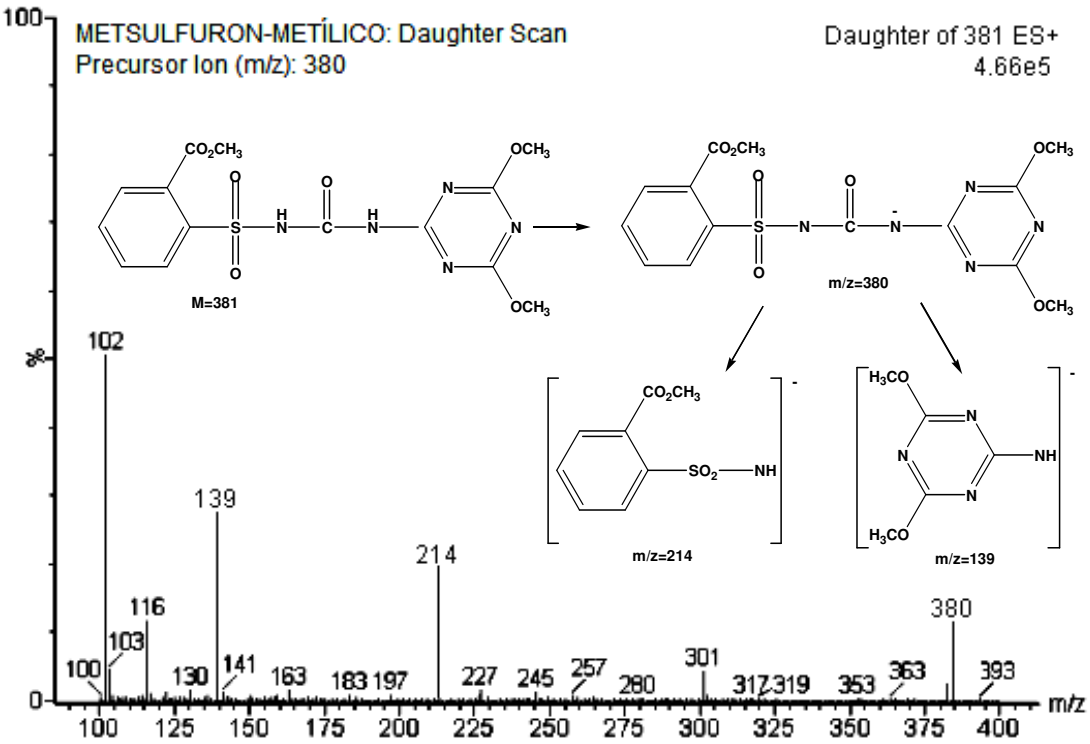

QUINCLORAQUE: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 240
Daughter of 242 ES-
1.04e7
M = 242
m/z = 241
m/z = 196
m/z

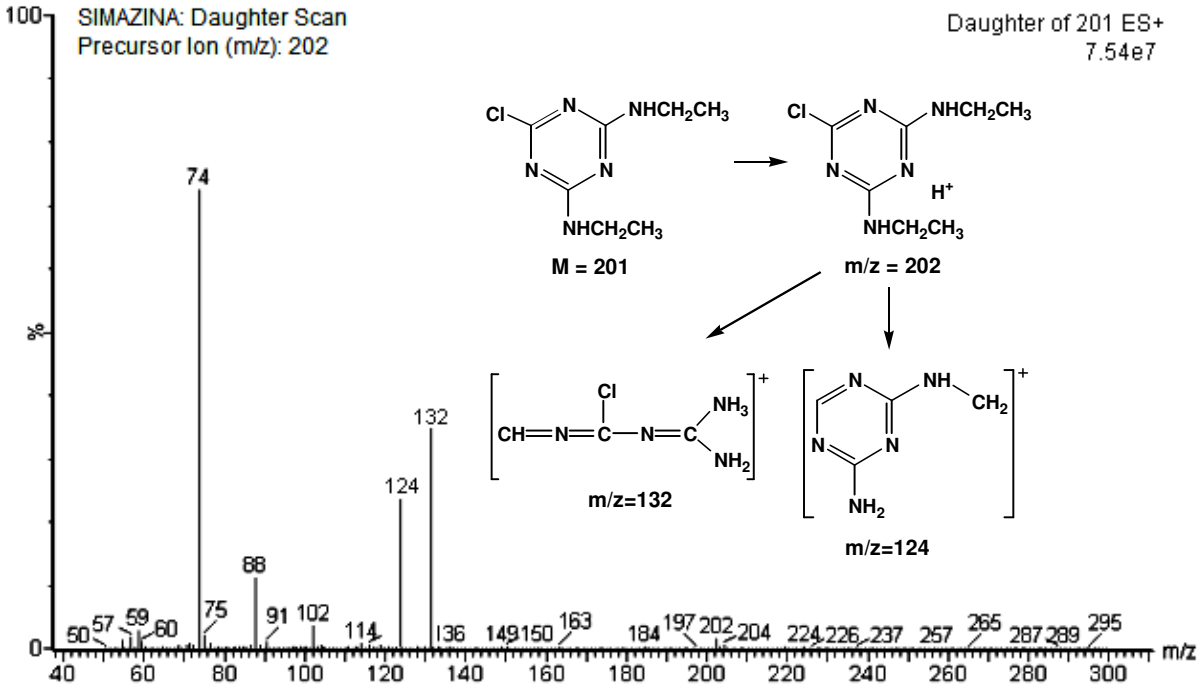

TEBUCONAZOL: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 308
Daughter of 308 ES+
2.94e6
M = 307
m/z = 308
m/z = 70
m/z

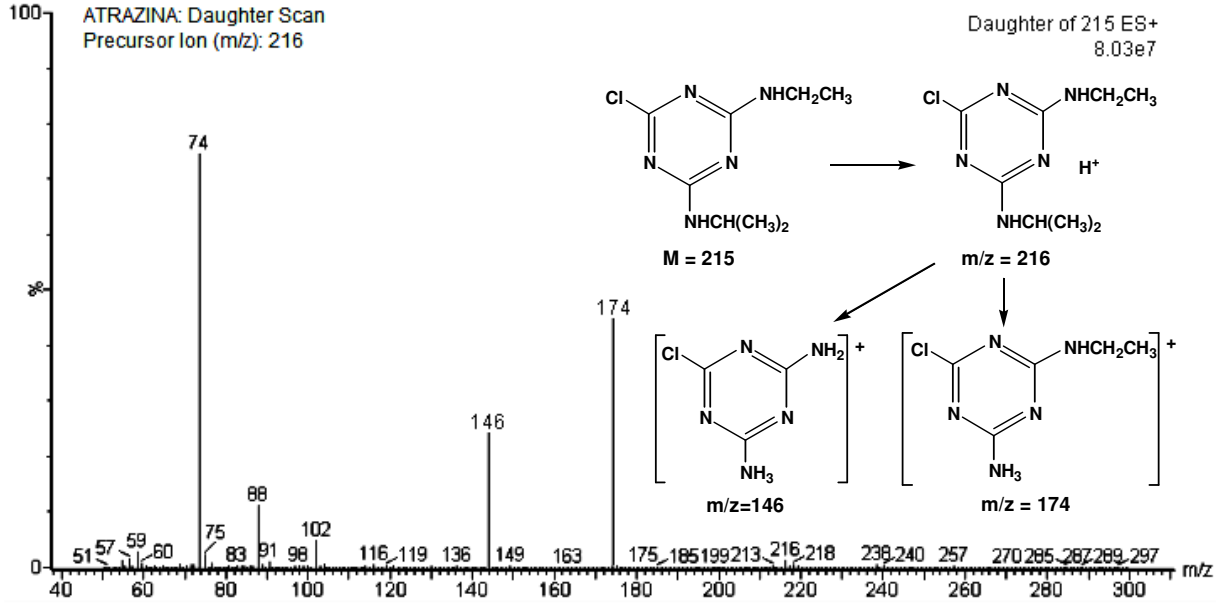

IRGAROL: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 254
Daughter of 253 ES+
2.27e7
M=253
m/z=254
m/z=198
m/z=125
%
m/z

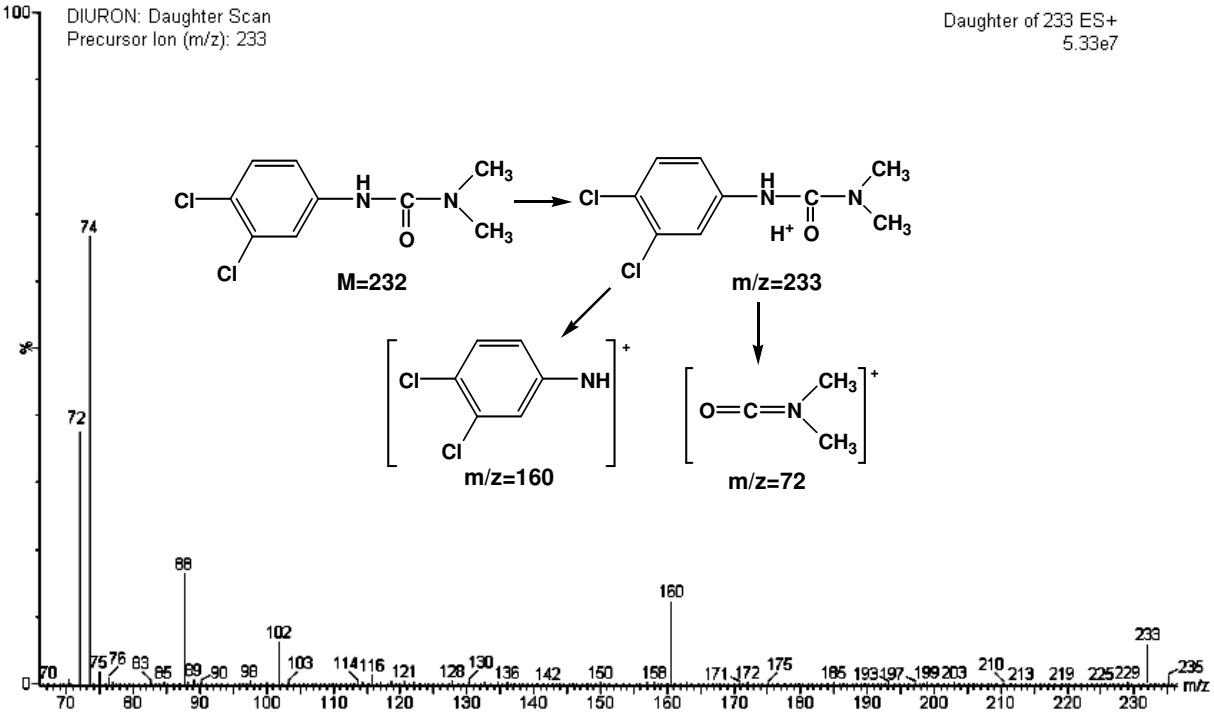

3-HIDROXICARBOFURANO: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 238
Daughter of 238 ES+
7.59e3
M=237
m/z=238
m/z=163
m/z=135
%
m/z

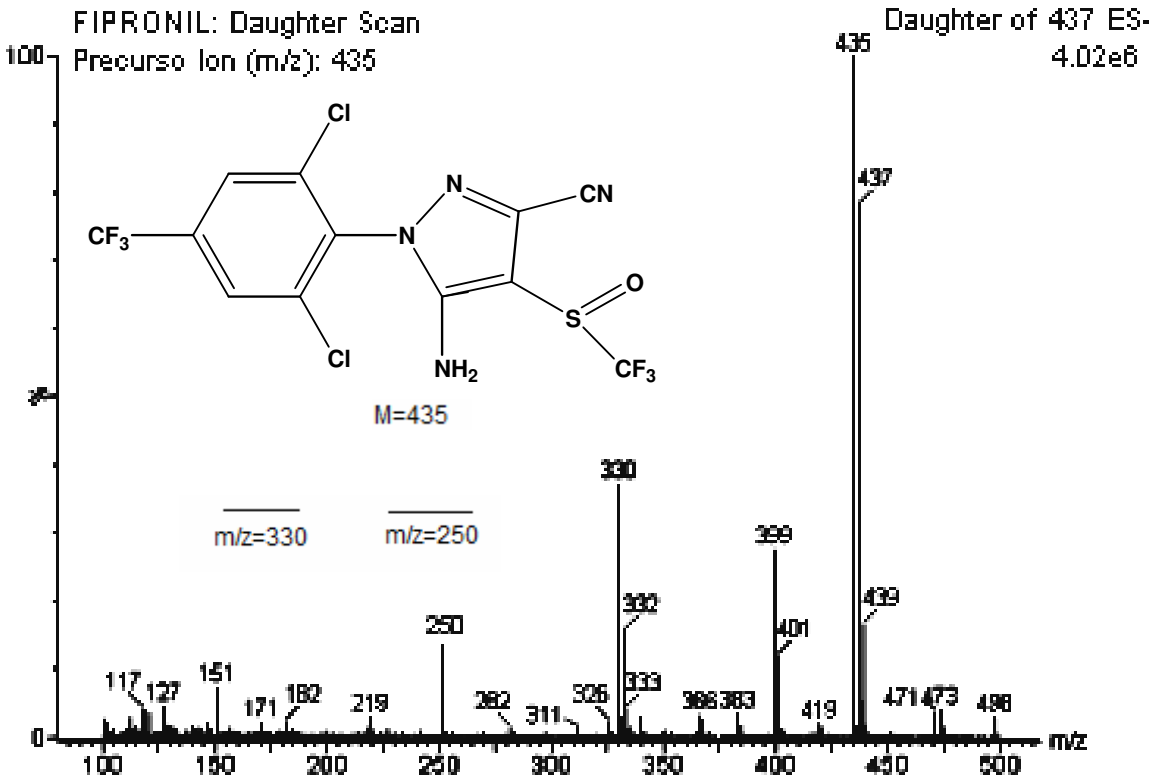

IMAZETAPIR: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 290
Daughter of 289 ES+
1.04e7
M=289
M=290
m/z=230
m/z=177
%
m/z


METSULFURON-METÍLICO: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 380
Daughter of 381 ES+
4.66e5
M=381
m/z=380
m/z=214
m/z=139
%
m/z


SIMAZINA: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 202
Daughter of 201 ES+
7.54e7
M = 201
m/z = 202
m/z=132
m/z=124
%
m/z

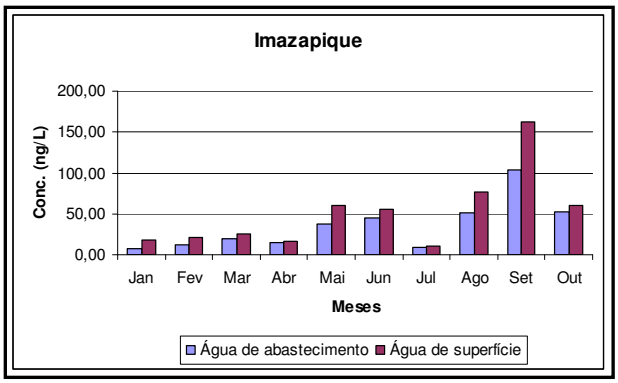

ATRAZINA: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 216
Daughter of 215 ES+
8.03e7
M = 215
m/z = 216
m/z=146
m/z = 174
%
m/z

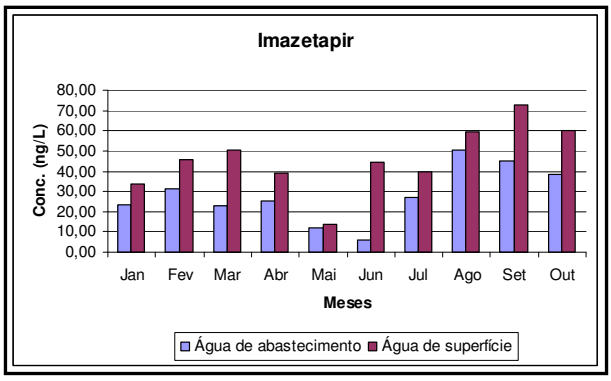

DIURON: Daughter Scan
Precursor Ion (m/z): 233
Daughter of 233 ES+
5.33e7
M=232
m/z=233
m/z=160
m/z=72
m/z

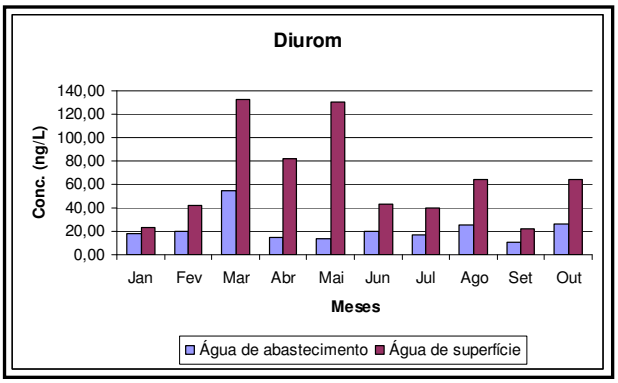

FIPRONIL: Daughter Scan
Precurso Ion (m/z): 435
Daughter of 437 ES-
4.02e6
M=435
m/z=330
m/z=250
m/z

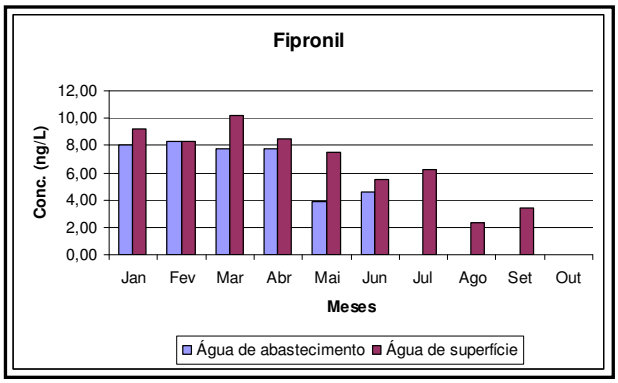
Apêndice 6:

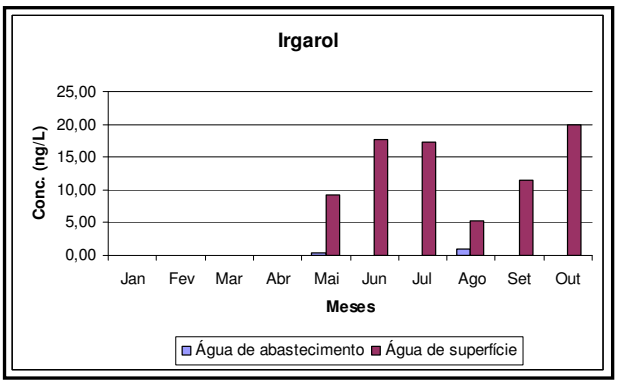
Compostos que foram detectados ao longo do período de amostragem

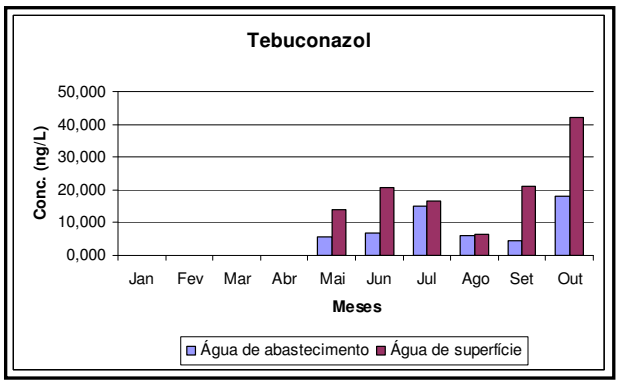






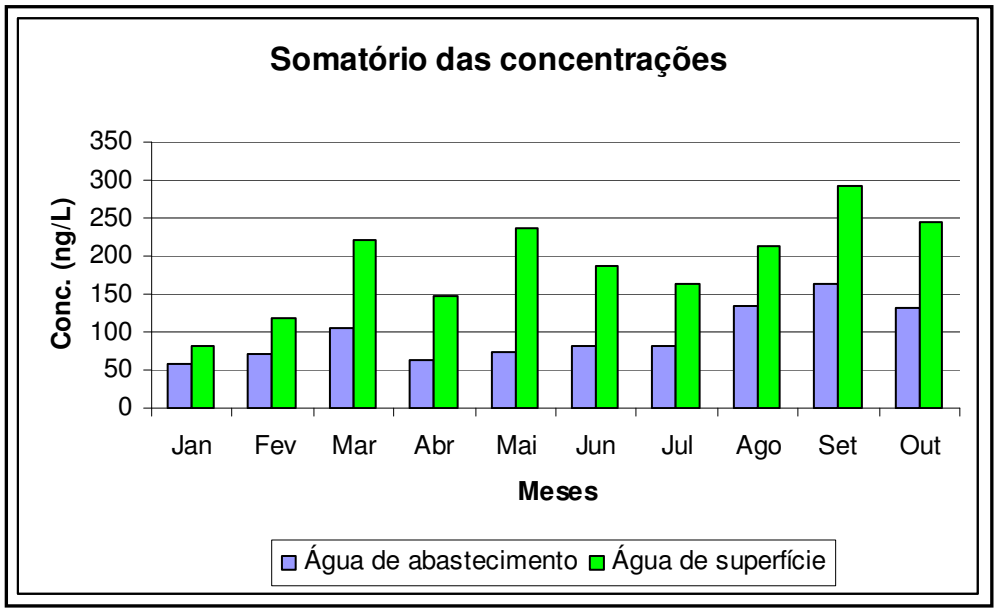






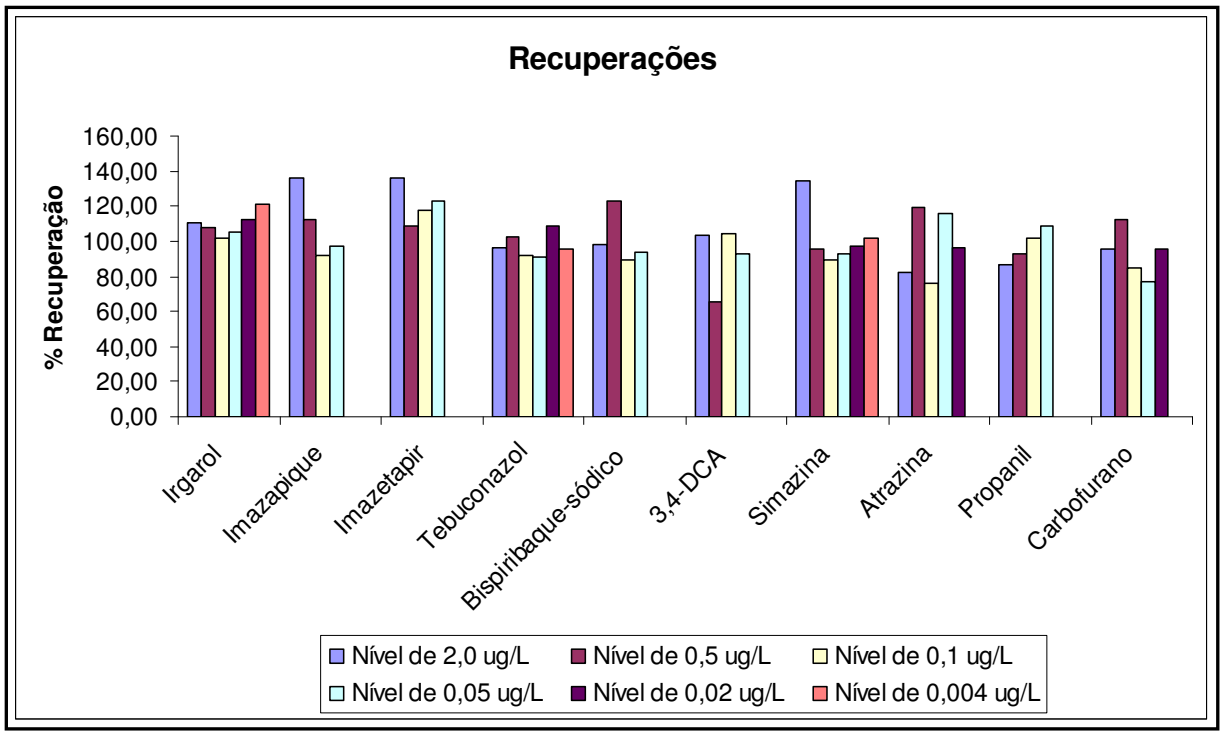
Apêndice 7:

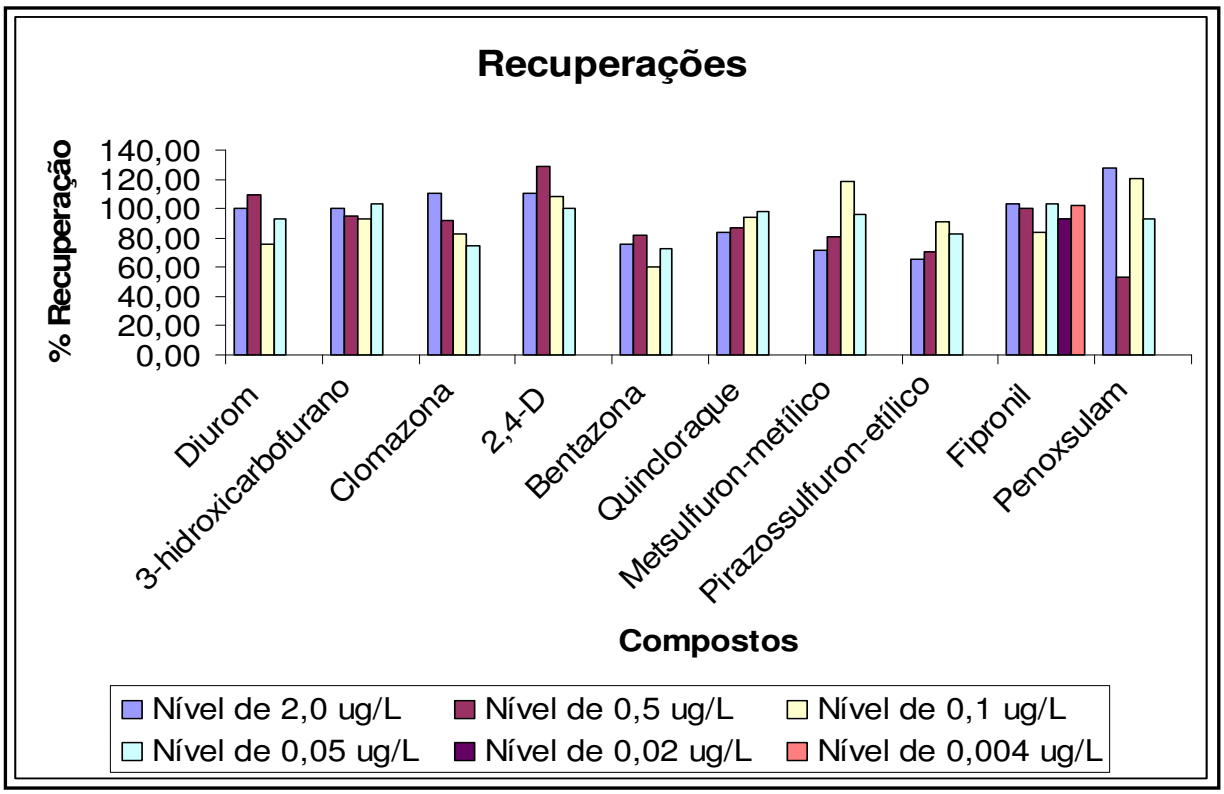
Somatório das concentrações dos compostos detectados durante cada um dos dez meses de amostragem



Apêndice 8:

Valores de recuperações para SPE empregando cartuchos C18ec de 500 mg.





ANEXOS

ANEXO 1 – Valores de referência dos agrotóxicos presentes em água para consumo humano adotados pela Portaria nº 518 de março de 2004 do Ministério as Saúde Publicado no Diário Oficial da União.

AGROTÓXICOS	UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO	NÍVEL MÁXIMO PERMITIDO
Alaclor	µg/L	20,0
Aldrin e Dieldrin	µg/L	0,03
Atrazina	µg/L	2
Bentazona	µg/L	300
Clordano (isômeros)	µg/L	0,2
2,4 D	µg/L	30
DDT (isômeros)	µg/L	2
Endossulfan	µg/L	20
Endrin	µg/L	0,6
Glifosato	µg/L	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	µg/L	0,03
Hexaclorobenzeno	µg/L	1
Lindano (γ-BHC)	µg/L	2
Metolacloro	µg/L	10
Metoxicloro	µg/L	20
Molinato	µg/L	6
Pendimetalina	µg/L	20
Pentaclorofenol	µg/L	9
Permetrina	µg/L	20
Propanil	µg/L	20
Simazina	µg/L	2
Trifluralina	µg/L	20

Fonte: BRASIL (2004) adaptado neste estudo.