Campus de São Carlos

DETERMINAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO DO
MUNICÍPIO DE ARARAQUARA: RIBEIRÃO DAS
CRUZES, RIBEIRÃO DAS ANHUMAS E Córrego do
PAIÓL

Silvia Helena Govoni Brondi

Orientador: Prof. Tit. Fernando Mauro Lanças

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço: 18/07/00
Ass.: Nazareth

**DETERMINAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUAS DE
ABASTECIMENTO DO MUNICÍPIO DE
ARARAQUARA: RIBEIRÃO DAS CRUZES,
RIBEIRÃO DAS ANHUMAS E Córrego do
PAIÓL**

DEDALUS - Acervo - EESC

31100016454

Silvia Helena Govoni Brondi

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos
2000

Class.	TESE
Outt.	0979
Tombo	T0196/00

st 1099073

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B869d Brondi, Silvia Helena Govoni
Determinação de multiresíduos de agrotóxicos em
águas de abastecimento do município de Araraquara :
Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do
Paiól / Silvia Helena Govoni Brondi. -- São Carlos,
2000.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos-Universidade de São Paulo, 2000.
Área: Ciências da Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças.

1. Agrotóxicos. 2. Água. 3. Multiresíduos.
4. Extração. 5. Cromatografia. I. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvio e Helena, responsáveis pela minha formação intelectual e moral; ao Humberto, meu marido, pelo incentivo, paciência e carinho constante em todos os momentos e as minhas filhas, Mariana e Letícia.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela orientação, confiança e estímulo,
ao longo do trabalho;

Aos professores, Dra. Janete H. Vilegas e Dr. Emmanuel Carrilho;

Aos funcionários do laboratório de cromatografia: Odete, Luciano, Neno,
Alcimar, Luís, Marcos, Elaine, Maria Helena e Dona Maria;

Aos colegas do grupo de cromatografia: Dalva, Lívia, Haroldo, Jane, Vânia,
Cíntia, Rose, Nilson, Wilma, Marcelo M., Marcelo T., Guilherme, Paulo, Sérgio,
Claudete, Renatinha, Renata, Esmeraldo, Ricardo, Rogério, Jair, Cristina L., Wilson,
Sueli, Fernanda, Silvia, Luciana, Cristina D., Marçal, Cecília, Ana Paula, Jonathas,
André, Marlene, Vitor, José Carlos.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada – CRHEA.

À FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	01
1 – Ações de agentes químicos sobre o meio ambiente.....	01
2 – A água como fonte de vida e sua contaminação por compostos químicos.....	03
3 – Agrotóxicos.....	05
4 – Cultura da cana-de-açúcar.....	12
5 – Agrotóxicos organoclorados.....	14
6 – Metodologia analítica para análise de resíduos de agrotóxicos.....	16
6.1 – Extração.....	16
6.1.1 – Extração líquido-líquido (LLE)	17
6.1.2 – Extração em fase sólida (SPE).....	18
6.1.3 – Extração com fluido supercrítico (SFE).....	21
6.2 – “Clean-up”.....	24
6.3 – Cromatografia.....	24
6.3.1 – Cromatografia gasosa (GC).....	25
6.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	26
6.4 – Cromatografia acoplada a espectrometria de massas.....	29
7 – Justificativa.....	29

OBJETIVOS.....	30
EXPERIMENTAL.....	32
1 – Descrição da área de estudo.....	32
2 – Agrotóxicos a serem analisados.....	38
3 – Coleta das amostras reais de água.....	40
4 – Procedimento analítico.....	41
5 – Extração líquido-líquido (LLE).....	43
6 – Extração em fase sólida (SPE).....	47
7 – Extração com fluido supercrítico (SFE).....	51
8 – Análise cromatográfica.....	57
8.1 – Análise de padrões por cromatografia gasosa.....	57
8.2 – Análise de padrões por cromatografia líquida.....	58
8.3 – Análise de padrões por espectrometria de massas.....	59
9 – Tratamento estatístico dos dados.....	60
9.1 – Desvio padrão.....	61
9.2 – Coeficiente de variação.....	62
9.3 – Coeficiente de correlação.....	62
9.4 – Limite de detecção.....	63
9.5 – Linearidade.....	64
9.6 – Limite de quantificação.....	64
9.7 – Recuperação	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
1 – Análise cromatográfica dos padrões analíticos por cromatografia gasosa.....	66
1.1 – Recuperação dos agrotóxicos através da LLE.....	69
1.2 – Recuperação dos agrotóxicos através da SPE.....	73
1.3 – Recuperação dos agrotóxicos através da SFE.....	78
1.4 – Tratamento estatístico dos resultados	83
1.4.1 – Linearidade	83
1.4.2 – Cálculo do desvio padrão e coeficiente de variação	85

1.4.3 – Limite de detecção e limite de quantificação	87
2 – Análise cromatográfica dos padrões analíticos por cromatografia líquida.....	89
2.1 – Recuperação dos agrotóxicos analisados por HPLC através da SPE.....	93
2.2 – Recuperação dos agrotóxicos analisados por HPLC através da LLE	97
2.3 – Recuperação dos agrotóxicos analisados por HPLC através da SFE.....	99
2.4 – Tratamento estatístico dos resultados	100
2.4.1 – Linearidade	100
2.4.2 – Cálculo do desvio padrão e coeficiente de variação	102
2.4.3 – Limite de detecção e limite de quantificação	103
3 – Cromatografia gasosa – espectrometria de massas	105
3.1 – Confirmação da identidade dos padrões de agrotóxicos por espectrometria de massas	105
4 – Análise das amostras reais de água.....	108
CONCLUSÕES.....	120
1 – Compostos analisados por cromatografia gasosa.....	120
2 – Compostos analisados por cromatografia líquida.....	121
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Dinâmica dos agrotóxicos em meio aquático.....	09
FIGURA 02: Distribuição da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo	13
FIGURA 03 : Esquema de um cromatógrafo a gás.....	25
FIGURA 04: Esquema de instrumentação para HPLC.....	28
FIGURA 05: Áreas de estudo, destacando-se o Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól	33
FIGURA 06: Vista da Represa de captação de água do Ribeirão das Cruzes.....	35
FIGURA 07: Vista da Represa de captação de água do Ribeirão das Anhumas.....	36

FIGURA 08: Vista da Represa de captação de água do Córrego do Paiól.....	37
FIGURA 09: Etapas utilizadas na extração líquido-líquido.....	44
FIGURA 10: Diagrama esquemático da extração líquido-líquido de resíduos de agrotóxicos em amostra de água.....	46
FIGURA 11: Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto ou classe de compostos	47
FIGURA 12: Esquema utilizado na extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos em amostra de água	50
FIGURA 13: Sistema de extração com fluido supercrítico, utilizando adsorvente	53
FIGURA 14: Sistema de extração com fluido supercrítico direto da matriz aquosa.....	55
FIGURA 15: Esquema para a extração com fluido supercrítico de resíduos de agrotóxicos em amostra de água.....	56

- FIGURA 16:** Cromatograma dos padrões BHC, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin, DDT e fipronil, na concentração de 1 µg/mL..... 67
- FIGURA 17:** Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se a extração líquido-líquido..... 72
- FIGURA 18:** Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se a extração em fase sólida..... 77
- FIGURA 19:** Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se extração com fluido supercrítico..... 82
- FIGURA 20:** Cromatograma dos padrões tebuthiuron, hexazinona e diuron em água, na concentração de 1 µg/mL. $\lambda = 254$ nm..... 90
- FIGURA 21:** Cromatograma dos padrões 2,4 D e ametrina em água, na concentração de 1µg/mL. $\lambda = 238$ nm 91
- FIGURA 22:** Cromatograma do extrato obtido por extração em fase sólida, para os compostos tebuthiuron, hexazinona e diuron, em água.. 95

- FIGURA 23:** Cromatograma do extrato obtido por extração em fase sólida, para os compostos 2,4 D e ametrina, em água..... 96
- FIGURA 24:** Cromatograma do íon total por CGC – MSD para os compostos BHC, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin e fipronil 107
- FIGURA 25:** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de seca 111
- FIGURA 26:** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de chuva 112
- FIGURA 27:** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostra real de água do Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os padrões analíticos (A), e água preparada em sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos (B) 113
- FIGURA 28:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento de onda de 254 nm, através da técnica de extração em fase

sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes,
Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de seca.. 114

FIGURA 29: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento
de onda de 254 nm, através da técnica de extração em fase
sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes,
Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de
chuva 115

FIGURA 30: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento
de onda de 238 nm, através da técnica de extração em fase
sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes,
Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de seca . 116

FIGURA 31: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento
de onda de 238 nm, através da técnica de extração em fase
sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes,
Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de
chuva 117

FIGURA 32: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, através da
técnica de extração em fase sólida, de amostra real de água do
Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os padrões analíticos,
 $\lambda = 254 \text{ nm}$ (A) e $\lambda = 238 \text{ nm}$ (B), e água preparada em

sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos (C) 118

FIGURA 33: Cromatograma dos extratos obtidos através da extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, analisados por GC/MSD, no período de seca..... 119

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Características químicas e valores máximos permitidos, de compostos orgânicos que afetam a saúde	06
TABELA 02: Classificação toxicológica dos agrotóxicos ao ser humano..... ..	07
TABELA 03: Vendas de agrotóxicos por cultura em toneladas, período de 1997/1998	10
TABELA 04: Quanto o Brasil gasta com agrotóxicos	11
TABELA 05: Descrição dos padrões estudados.....	39
TABELA 06: Tempo de retenção típico dos padrões estudados.....	68
TABELA 07: Recuperação dos agrotóxicos organoclorados e fipronil em água, através da extração líquido-líquido	70

TABELA 08: Recuperação de agrotóxicos organoclorados e fipronil em água, através da extração em fase sólida.....	74
TABELA 09: Recuperação dos agrotóxicos organoclorados e fipronil através da extração com fluido supercrítico, direto da matriz água ou utilizando um adsorvente.....	79
TABELA 10: Resultados obtidos na calibração dos padrões e análise de regressão linear para os compostos analisados por cromatografia gasosa.....	84
TABELA 11: Valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluido supercrítico.....	86
TABELA 12: Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para os compostos estudados.....	88
TABELA 13: Tempo de retenção típico dos padrões estudados	92
TABELA 14: Recuperação dos agrotóxicos analisados por cromatografia líquida, através da extração em fase sólida.....	94
TABELA 15: Recuperação dos compostos analisados por cromatografia	

líquida, através da extração líquido-líquido.....	98
TABELA 16: Recuperação dos compostos analisados por cromatografia líquida, através da extração com fluido supercrítico, utilizando adsorvente	99
TABELA 17: Curvas de calibração com análise de regressão linear para os compostos analisados por cromatografia líquida	101
TABELA 18: Valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para a extração líquido-líquido e extração em fase sólida	102
TABELA 19: Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	104
TABELA 20: Íons selecionados para cada analito analisado (m/z), com o respectivo tempo de retenção (tr), obtidos através do fragmentograma de cada composto	106
TABELA 21: Parâmetros químicos medidos nas represas de captação de água, no período de seca e de chuva	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

C V – Coeficiente de variação

DL 50% – Dose letal 50%

ECD – Detector por captura de elétrons

GC – Cromatografia gasosa

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HPLC – High performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência

HRGC – High resolution gas chromatography – Cromatografia gasosa de alta resolução

IQA – Índice de qualidade de água

IT – Índice de toxicidade

LC/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LD – Limite de detecção

LLE – Extração líquido-líquido

LQ – Limite de quantificação

m/z – Relação massa/carga

r – Coeficiente de correlação

S – Desvio padrão

SFE – Extração com fluido supercrítico

SIM – Monitoramento do íon selecionado

SPE – Extração em fase sólida

RESUMO

BRONDI, S. H. G.. (2000). *Determinação de multiresíduos de agrotóxicos em águas de abastecimento do município de Araraquara: Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól*. São Carlos, 2000. 133p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Com o objetivo principal de aumentar a quantidade e qualidade dos produtos agrícolas, cada vez mais está-se empregando agrotóxicos, substâncias tóxicas as quais provocam problemas de saúde ambiental e pública.

Frente a esse crescente emprego de agrotóxicos propõe-se, no presente trabalho, determinar-se as concentrações de agrotóxicos usados na lavoura da cana-de-açúcar – ametrina, ácido 2,4 D, tebuthiuron, hexazinona, diuron e fipronil, assim como os organoclorados – BHC, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin e DDT, cujos resíduos podem estar presentes nas águas dos rios que abastecem a cidade de Araraquara (Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól), região esta altamente agrícola, com cultivo intensivo de cana-de-açúcar. Avaliou-se, também, a metodologia mais eficiente na extração e análise de multiresíduos de agrotóxicos em diversas matrizes aquosas.

Como técnicas de extração estudou-se a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluido supercrítico. Já como técnica de análise empregou-se a cromatografia sendo que para analitos voláteis ou parcialmente voláteis utilizou-se a cromatografia gasosa (HRGC) e para compostos menos voláteis a cromatografia líquida (HPLC). Amostras de água provenientes de vários pontos de captação foram analisadas empregando a metodologia desenvolvida.

Dentre as três técnicas avaliadas, os melhores resultados foram obtidos empregando-se a extração em fase sólida. Não foram registrados nenhum dos compostos estudados nas amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól.

Palavras-chave: agrotóxicos; água; multiresíduos; extração; cromatografia

ABSTRACT

BRONDI, S. H. G.. (2000). *Determination of pesticide multiresidues in drinking water from the municipal district of Araraquara (Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas and Córrego do Paiól)*. São Carlos, 2000. 133p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Pesticides are being used more and more with the main objective to increase the quantity and quality of agricultural products; they are toxic substances that cause public and environmental health problems.

Because of this increasing use of pesticides, this thesis aimed to determine the concentration of both pesticides widely used in sugar cane plantation – ametrina, ácido 2,4 D, tebuthiuron, hexazinona, diuron e fipronil, as well as organochlorine – BHC, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin e DDT in water samples. The residues of pesticides can be present in rivers that supply the city of Araraquara (Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas and Córrego do Paiól); this area is highly agricultural and it has a high sugar cane cultivation. The most efficient methodology for the extraction and analysis of multiresidues of pesticides in several fountains has been evaluated.

Liquid-liquid extraction, solid phase extraction and supercritical fluid extraction have been studied as extraction techniques. Gas chromatography (HRGC) was used for the determination of partially volatile analites and liquid chromatography (HPLC) was employed for less volatile compounds. Samples of water originating from several reception points were analyzed using the developed methodology.

Among the three appraised techniques, the best results were obtained being used the solid phase extraction. They were not registered none of the compositions studied at the real samples of water of Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas and Córrego do Paiól.

Keywords: pesticides; water; multiresidues; extraction; chromatography

INTRODUÇÃO

1 - AÇÕES DE AGENTES QUÍMICOS SOBRE O MEIO AMBIENTE

Nos últimos anos a poluição e a contaminação do planeta Terra tem aumentado muito; isto deve-se, principalmente, ao aumento populacional e industrial e à modernização das práticas agrícolas, com a utilização cada vez maior de agrotóxicos e levando a um crescente aumento das cargas de efluentes lançados no ar, água e solo. A presença dessas substâncias nos vários ecossistemas representa sempre um risco aos seres vivos não existindo, praticamente, aquilo que se poderia chamar de “risco zero”, ou seja, 100% de segurança quando ocorre exposição a estas substâncias (CAIRNS, 1980).

(1) Segundo PEREIRA et al. (1987) as atividades humanas podem causar modificações ambientais, resultando em mudanças na estrutura e dinâmica de um ecossistema. Essas mudanças são devidas, principalmente, à remoção direta ou indireta de elementos biológicos, ou pelo efeito indireto de modificações no ambiente físico, que resultam em mudanças no fluxo de energia num sistema natural. Um sistema quando sofre uma modificação responde ao “stress” através do restabelecimento do equilíbrio dinâmico entre seus componentes sendo que, dependendo da natureza e extensão da mudança, este pode apresentar um novo equilíbrio ou restabelecer o anterior.

Entre os ecossistemas, os aquáticos acabam, de uma forma ou de outra, constituindo em receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de poluentes, sejam estes lançados ao ar, ao solo, ou diretamente nos corpos d'água (LEE, 1980). A entrada de agentes tóxicos tais como metais pesados, pesticidas, efluentes industriais e outros, pode levar a alterações significativas quanto aos parâmetros físico-químicos e biológicos da água.

A vulnerabilidade do ambiente aquático aos agentes químicos, segundo RAND & PETROCELLI (1985), depende de vários fatores, incluindo:

- 1 – propriedades físico-químicas dos agentes químicos e seus produtos de transformação;
- 2 – concentrações dos agentes químicos que entram no ecossistema;
- 3 – duração e tipo de entrada;
- 4 – propriedade do ecossistema capaz de resistir a mudanças devido a presença de agentes químicos, ou retornar ao seu estado original depois dos agentes químicos serem removidos do sistema;
- 5 – localização do ecossistema em relação ao local de entrada do agente químico.

Na água um agente químico pode apresentar-se de três formas diferentes, afetando sua disponibilidade para os organismos:

- dissolvido;
- adsorvido pelos componentes bióticos e abióticos, suspenso na coluna d'água ou depositado no sedimento;
- incorporado nos organismos.

2 – A ÁGUA COMO FONTE DE VIDA E SUA CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS QUÍMICOS

A água é uma substância de fundamental importância para a manutenção da vida no planeta. O organismo humano necessita de uma quantidade variada de substâncias e elementos químicos indispensáveis à manutenção da vida, tais como carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, cálcio, fósforo, potássio, enxofre, sódio, cloro, magnésio, etc, que compõe a base química do protoplasma, e participam dos processos metabólicos vitais. Outros elementos que o organismo necessita em quantidades muito pequenas, como cromo, cobalto, cobre, estanho, ferro, iodo, manganês, molibidênio, selênio, zinco e fluor, são denominados elementos traços e, provavelmente (ainda não confirmado), são necessários o arsênio, bário, bromo, estrôncio, níquel, silício e vanádio. As águas naturais contém grande parte das substâncias e elementos facilmente absorvidos pelo organismo, constituindo fonte essencial ao desenvolvimento do ser humano (Di BERNARDO, 1993).

Apesar de 75% da superfície do globo ser recoberta por água, esta no futuro pode se tornar imprópria para consumo humano, já que cada vez mais torna-se contaminada por organismos, substâncias, compostos e elementos prejudiciais à saúde, devendo ter seu número ou concentração reduzidos ou eliminados para o abastecimento público.

Com o crescente aumento populacional e industrial, o tratamento da água potável, bem como a proteção do meio ambiente, tem se tornado uma das principais preocupações. Um tratamento adequado da água potável é de grande importância para uma boa saúde.

A CETESB, a partir de um estudo realizado pela “National Sanitation Foundation” dos Estados Unidos, adaptou e desenvolveu o Índice de Qualidade de Águas – IQA (CETESB, 1993). Este incorpora alguns parâmetros relevantes para a avaliação da qualidade das águas, tendo como determinante principal a utilização dessas para abastecimento público. Para determinar o IQA é levado em conta os seguintes parâmetros: temperatura da amostra, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes fecais, nitrogênio total, fosfato total, resíduo total e turbidez. Como no cálculo do IQA não são considerados os elementos tóxicos, a CETESB adota também o Índice de toxicidade – IT, no qual são avaliados conjuntamente nove parâmetros que determinam as condições tóxicas das águas: bário, cádmio, chumbo, cobre, cromo total, níquel, mercúrio, zinco e fenol.

Mesmo existindo no Brasil normas e padrões de potabilidade da água, a qual inclui a análise de agrotóxicos, válidas para todo o território nacional, estabelecidos pelo Ministério da Saúde através do decreto Federal nº 79.637 de 9/03/1977 e pela Portaria 56 BSB de 13/03/1977 utilizadas até janeiro de 1992, quando entrou em vigor a Portaria nº 36 / GM de 19/01/1990, a CETESB não inclui os agrotóxicos no cálculo do IQA, mesmo sabendo que estas substâncias altamente tóxicas podem condenar a água, tornando-a imprópria para o consumo.

3 – AGROTÓXICOS

O crescente aumento do uso de agrotóxicos com o objetivo principal de aumentar a quantidade e qualidade dos produtos agrícolas, combatendo pragas, doenças e ervas daninhas, tem agravado o problema de contaminação das águas superficiais e subterrâneas. O risco que um agente químico impõe no ambiente aquático é avaliado através do julgamento científico da probabilidade dos danos que suas concentrações ambientais, conhecidas ou estimadas podem causar (CAIRNS et al., 1978). O uso de agrotóxicos pode ser considerado seguro se seus riscos forem julgados como aceitáveis; para tanto sua manufatura, distribuição e monitoramento devem ser feitos corretamente (MARQUIS, 1986).

O termo agrotóxico foi introduzido pelas legislações estadual e federal dos últimos anos, sendo também conhecidos como defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas e praguicidas (ZAMBRONE, 1986).

Com respeito à composição química, os agrotóxicos podem ser divididos em três grupos principais: compostos inorgânicos, compostos de origem vegetal e compostos orgânicos. Os compostos orgânicos constituem o maior grupo de agrotóxicos com alta atividade fisiológica. A sua classificação pode estar ligada à sua ação; assim, temos os inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, etc. Quanto à estrutura química dos mesmos, são classificados em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, tiocarbamatos, derivados de uréia, etc (WORKSHOP, 1999).

A **Tabela 1** apresenta as características químicas e valores máximos permitidos de compostos orgânicos que afetam a saúde.

Tabela 1: Características químicas e valores máximos permitidos, de compostos orgânicos que afetam a saúde (Di BERNARDO, 1993).

CARACTERÍSTICAS	PORTARIA 56/BSB	PORTARIA 36/GM
	1977 (µg/L)	1990 (µg/L)
aldrin e dieldrin	1,0	0,03
Benzeno	---	10
benzo-a-pireno	---	0,01
clordano (total de isômeros)	3,0	0,03
DDT (total)	50	1
Endrin	0,2	0,2
Heptacloro	0,1	0,1
Hexaclorobenzeno	---	0,01
lindano (gama HCH)	4	3
Metoxicloro	100	30
Pentaclorofenol	---	10
Tetracloroeto de carbono	---	3
Tetracloroetano	---	5
Toxafeno	5	5
Tricloroetano	---	30
Trihalometanos	---	100(*)
1,1 dicloroetano	---	0,3
1,2 dicloroetano	---	10
2,4 D	20	10
2,4,6 triclorofenol	---	100(**)

(*) sujeito a revisão em função de estudos toxicológicos em andamento

(**) concentração limiar de odor de 0,1 µg/L.

Os agrotóxicos chegam aos corpos d'água diretamente ou através de águas de drenagem dos terrenos, mas seu uso indiscriminado pode causar graves problemas de saúde ambiental e pública. Dentre os males causados pelo uso indiscriminado, destaca-se (DE SÁ, 1993):

- 1 – ressurgência – retorno intensificado de pragas que deveria ser combatido;
- 2 – destruição não apenas da praga, mas sim dos inimigos naturais da praga;
- 3 – destruição de inimigos naturais de insetos, ácaros, etc;
- 4 – crescimento de pragas resistentes;
- 5 – carreamento para os cursos d'água, contaminando o ambiente aquático.

A **Tabela 2** apresenta a classificação toxicológica dos agrotóxicos ao ser humano, tomando-se como base a dose letal 50% - DL 50%.

Tabela 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos ao ser humano (WILLIAMS & AKIN, 1986).

Substância química	DL 50% (mg/kg)	Dose letal ao ser humano
Extremamente tóxica	5	Algumas gotas
Altamente tóxica	5 – 50	Algumas gotas a 1 colher de chá
Medianamente tóxica	50 – 500	1 colher de chá a 2 colheres de sopa
Levemente tóxica	500 – 5000	2 colheres de sopa a 2 copos
Relativamente tóxica	> 5000	2 copos a 1 litro

Muitas vezes os produtos de degradação dos agrotóxicos gerados através de processos físicos, químicos e biológicos podem ser mais tóxicos do que os componentes originais (BROWER, KOFMAN & BRINKMAN, 1995), sendo de grande interesse o estudo da degradação e estabilidade desses compostos no ambiente (LUCHINI, 1995).

A presença de agrotóxicos no ambiente pode levar à contaminação dos solos, cursos d'água, atmosfera e alimentos. Esta contaminação ambiental está diretamente relacionada com o comportamento destes compostos na água, pois quanto maior sua hidrossolubilidade, maior a facilidade de transporte do agrotóxico do ponto de aplicação até rios, cursos d'água e águas subterrâneas (RAO et al., 1983).

A solubilidade de um agrotóxico na água depende diretamente da interação agrotóxico-água, sendo que a capacidade da água em solubilizar um agrotóxico a uma dada temperatura, pH e concentração eletrolítica depende do agrotóxico considerado (GREEN, 1974).

Um fator ambiental que pode influenciar o comportamento de agrotóxicos num ambiente aquático é a exposição destes compostos à radiação solar, e a consequente degradação fotoquímica, sendo a fotodecomposição maior onde houver maior penetração de luz (LUCHINI, op cit.).

A **Figura 1** apresenta o movimento dinâmico dos agrotóxicos no meio aquático.

Figura 1: Dinâmica dos agrotóxicos em meio aquático (CHAU & AFGHAN, 1977).

Quando a aplicação de agrotóxicos é realizada adequadamente, há poucas chances de contaminação ou acumulação (MULLISON, 1970). Da necessidade de seu uso, algumas medidas devem ser tomadas para minimizar os seus efeitos (DE SÁ op. cit.):

- 1 – aplicação de agrotóxicos orientada por profissionais da área;
- 2 – cuidados nos processos de limpeza dos utensílios usados na aplicação dos agrotóxicos e na eliminação das sobras;
- 3 – aplicação de quantidades menores e com maior frequência;
- 4 – medidas de controle e fiscalização para evitar uso e armazenagem inadequados;
- 5 – adequação da quantidade de agrotóxicos ao tipo de solo, e à época de chuva.

A intensificação do uso de agrotóxicos nestas últimas décadas, e a ocorrência de efeitos danosos desses agentes químicos sobre o homem e o ambiente, fizeram com que vários países regulamentassem seu uso e sua produção, com o objetivo de minimizar as consequências sobre o meio ambiente (ZAGATTO, 1993). No Brasil as substâncias introduzidas na agricultura para combater pragas e doenças foram usadas

principalmente após a crise de 1929 em lavouras como o algodão, milho e cana-de-açúcar. As culturas de café e algodão foram as responsáveis pela introdução de inseticidas sintéticos. Foi na década de 70, porém, que houve a grande expansão na produção e uso de agrotóxicos no Brasil, em razão dos incentivos para a produção agrícola e a política de exportação (LARA & BATISTA, 1992). O Brasil ocupa a terceira posição entre os países que mais empregam agrotóxicos, não tendo a contrapartida necessária em pesquisa e precauções existentes nos demais países (BATISTA, 1996). A **Tabela 3** apresenta as vendas de agrotóxicos por cultura em toneladas, para o período de 97/98, e a **Tabela 4** apresenta quanto o Brasil gasta com agrotóxicos em milhares US\$, dados estes referentes a 1999, totalizando US\$ 2,3 bilhões. Registram no Brasil produtos banidos de outros países, vendem-se sem restrições substâncias proibidas, usam-se fora dos padrões venenos perigosos (ZAMBRONE, op cit.).

Tabela 3: Vendas de agrotóxicos por cultura em toneladas, período de 1997/1998.

Culturas	Herbicidas		Fungicidas		Inseticidas	
	1997	1998	1997	1998	1997	1998
café	5.423	7.838	13.310	15.831	11.289	12.302
cana	22.873	18.951	-	-	1.259	2.585
citros	3.804	4.030	2.839	4.131	3.414	7.875
frutas	355	948	2.232	1.267	1.244	753
reflorestamento	1.427	976	-	-	1	404

Fonte: SINDAG

Tabela 4: Quanto o Brasil gasta com agrotóxicos (Jornal Folha de São Paulo, 2000).

CLASSES	US\$ (milhares)
Herbicidas	1.172.969
Inseticidas	615.454
Fungicidas	409.547
Acaricidas	83.933
Outros*	64.636

Fonte: SINDAG

* Reguladores de crescimento, maturadores, antibrotantes, etc.

Segundo GONÇALVES (1995) as vendas de agrotóxicos no Brasil dispararam a partir de 1993, após o afrouxamento da classificação toxicológica desses produtos pelo Ministério da Saúde. Conforme informação da Associação Nacional de Defesa Vegetal – ANDEF, entidade esta que reúne fabricantes de agrotóxicos, as vendas desses produtos tiveram um crescimento de 70% a partir de 1992. Através de revisão da classificação toxicológica dos agrotóxicos utilizados no país pela Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, produtos anteriormente classificados como extremamente tóxicos (faixa vermelha) e altamente tóxicos (faixa amarela) passaram a medianamente tóxicos (faixa azul) e pouco tóxicos (faixa verde) aumentando, bastante, os casos de intoxicação por agrotóxicos.

4 – CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é considerada uma gramínea. Pertence à classe Monocotiledonea, ordem Cyperales, família Poaceae, gênero *Saccharum*, somando 30 espécies. Foi a primeira cultura introduzida no Brasil, sendo cultivada há séculos no litoral do nordeste. Com a fabricação de álcool etílico, essa cultura disseminou por quase todos os estados brasileiros, nos mais diferentes tipos de solo. Hoje a produção nacional de cana-de-açúcar é de 290 milhões toneladas/ano.

Devido a diversidade agroecológica do território e a variabilidade sócio-econômica existente no país, a agricultura brasileira é uma realidade heterogênea e complexa em seus sistemas e estruturas de produção. Temos os sistemas agrícolas mais primitivos, que consomem muitos recursos naturais (desmatamento, perdas de solo, redução da fertilidade natural, etc), sendo frequentes em Rondônia, Acre, Pará, Mato Grosso, etc. Do outro lado estão os sistemas de produção altamente intensificados que consomem relativamente menos recursos naturais no local, mas introduzem no meio ambiente novos elementos e produtos causadores de desequilíbrios (inseticidas, herbicidas, fertilizantes, sais, etc). É o caso da citricultura, cerealicultura, cana-de-açúcar, algodão, fruticultura, etc, cultivadas no Estado de São Paulo e em outras regiões do país, onde a fronteira agrícola não se expande mais e os processos de produção se intensificaram (EMBRAPA, 2000).

Segundo Lígia Celoria Poltronieri, pesquisadora do Instituto de Geociências e Ciências exatas, UNESP – Rio Claro, a maior incidência de intoxicações causadas por agrotóxicos no Estado de São Paulo ocorre nas plantações de cana-de-açúcar, milho, citrus e banana.

A cultura da cana-de-açúcar é uma das mais abundantes do Estado de São Paulo; existem poucas pesquisas e dados nos países denominados desenvolvidos os quais, por não a desenvolverem com tanta intensidade, possuem menos interesse na mesma.

A **Figura 2** apresenta a distribuição da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.

Figura 2: Distribuição da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (CATI, 2000).

5 – AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS

Uma das classes de poluentes orgânicos a qual tem ganho grande atenção nos estudos ambientais é a dos agrotóxicos organoclorados. Os clorados são relativamente estáveis quando comparados a outras classes de agrotóxicos, sendo esta alta estabilidade devida às ligações carbono-cloro. A grande produção, o consumo excessivo, e a estabilidade química, provocaram a acumulação desses compostos em praticamente toda a Terra. São altamente tóxicos e persistentes na natureza (CHEE, WONG & LEE, 1996).

O destino e a distribuição dos compostos organoclorados são aparentemente controlados por dois conjuntos de parâmetros: 1- suas propriedades inerentes, tais como solubilidade em água, pressão de vapor, reatividade, etc e 2- a natureza ou propriedade do ambiente no qual ele está presente, isto é, quantidade e tipo de matéria orgânica, pH, temperatura, precipitação, fluxo de ar, água e sólidos e a composição destas três fases.

Os agrotóxicos organoclorados foram, no passado, um grupo de compostos muito populares, sendo determinados por cromatografia gasosa devido seu caráter altamente hidrofóbico e estabilidade térmica relativamente alta (LISKA & SLOBODNÍK, 1996).

Há três tipos principais de agrotóxicos organoclorados (GRAY, 1994):

- DDT e substâncias relacionadas, tal como DDE, DDD. Amplamente utilizado no controle da malária, pois é o único inseticida eficiente no combate ao mosquito transmissor;

- Lindano (γ hexaclorociclohexano) também conhecido como γ BHC e produtos relacionados, muito utilizados, inseticidas com uma ampla faixa de aplicação, degradação lenta nos solos, águas superficiais e subterrâneas;
- Aldrin, dieldrin e todos os outros “drins”, usados principalmente para proteção de sementes. Aldrin é rapidamente convertido para dieldrin por oxidação química no solo, em animais e plantas. Muitos compostos tem resistido à degradação por décadas e tendem aparecer repentinamente, tais como aldrin e DDT, os quais foram banidos há tempo, aparecendo atualmente nos aquíferos.

Os compostos organoclorados pertencem à classe inseticida; com efeito, os inseticidas são mais tóxicos ao homem e aos animais superiores do que os fungicidas e herbicidas e, frequentemente, são os responsáveis por intoxicações ocupacionais no campo e nas fábricas. Isso se explica pelo fato de que, tanto em insetos como nos animais superiores, os inseticidas tem o mesmo modo e local de ação, que é, comumente, o sistema nervoso (WORKSHOP, 1999).

Em função de sua acumulação ambiental e toxicidade, muitos compostos desta classe tiveram seu uso proibido. Apesar de terem sido utilizados durante décadas, seus efeitos sobre o Homem, em baixas concentrações, não são perfeitamente conhecidos; acredita-se, entretanto, que apresentem também ação cancerígena.

O interesse em se estudar esta classe, deve-se ainda ao fato de, além de serem compostos perigosos como mencionado anteriormente, muitos dos proibidos ainda são encontrados nos aquíferos.

6 - METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

6.1 – Extração

Para se obter sucesso na detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos, deve-se, em primeiro lugar, levar-se em conta os métodos de extração e/ou concentração do analito de interesse.

A análise de agrotóxicos na água é uma tarefa difícil, uma vez que estes ocorrem em níveis baixos de concentração; sua diversidade; diferentes propriedades físico-químicas e as altas concentrações de compostos interferentes. Na maioria das vezes sua determinação envolve seu isolamento da matriz aquosa e preconcentração. Mais e mais ênfase é dada para os estágios iniciais da análise, os quais envolvem a amostragem, isolamento e preconcentração dos analitos e sua preparação para a determinação final. Segundo BIZIUK & PRYJAZNY (1996) as contribuições típicas dos vários passos analíticos no tempo total de análise são os seguintes:

Amostragem 6%

Pré-tratamento da amostra 61%

Análise propriamente dita 6%

Tratamento dos dados 27%

Esses dados indicam que o pré-tratamento, incluindo isolamento e preconcentração dos analitos, é um passo importante na análise de traços.

6.1.1 – Extração líquido - líquido (LLE)

A Extração Líquido - Líquido (LLE) é a mais simples técnica de separação empregada na análise de resíduos. Consiste na separação de componentes de misturas de substâncias (solutos) por partição entre dois sistemas imiscíveis. As substâncias contidas no soluto irão se distribuir entre dois solventes de acordo com sua solubilidade relativa (ALDERS,1992). As separações são simples, rápidas e convenientes.

Esta operação é largamente empregada para separar compostos orgânicos de soluções ou suspensões aquosas onde se encontram.

A extração líquido - líquido é aplicada principalmente nos seguintes casos:

- separação de uma ou mais substâncias de outras que podem, sub-sequentemente, interferir no resultado da análise;
- preconcentração de traços de analitos, a uma concentração na qual sua determinação seja possível;
- “clean-up” (limpeza) preliminar.

As propriedades físicas e químicas da substância influenciam seu comportamento em um sistema de extração com solvente. A solubilidade em cada solvente e o equilíbrio entre o soluto e o solvente são fatores que devem ser considerados.

A extração fundamenta-se no fato de que as substâncias orgânicas são, em geral, solúveis em solventes orgânicos e muito pouco solúveis em água (GONÇALVES et al., 1985). O analito de interesse, juntamente com os interferentes, encontram-se presentes em uma matriz líquida como, por exemplo, a água. Esta

solução é colocada em um funil de separação ao qual adiciona-se um solvente orgânico imiscível com a água. O sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto que os interferentes permanecem, na sua maioria na fase aquosa (LANÇAS, 1997). Na maioria dos casos a extração deve ser repetida uma ou mais vezes para se conseguir uma extração quantitativa do analito.

A LLE apresenta, também, desvantagens visto que tende a consumir grandes volumes de solventes de alta pureza, os quais podem apresentar perigo à saúde, além dos custos associados com seu uso e com o descarte (HATRÍK & TEKEL, 1996).

6.1.2 - Extração em fase sólida (SPE)

Nos anos 70 foi introduzida uma alternativa simples aos métodos de preparação de amostra (ZWEIG & SHERMA, 1972). Este conceito, similar à cromatografia líquida de baixa pressão, é a base de uma técnica prática de preparo de amostras, consistindo de pequenas colunas descartáveis preenchidas com uma grande variedade de adsorventes, denominada extração em fase sólida (SPE).

A técnica é empregada tanto para análise de analitos polares como para não polares, porém a amostra e o analito devem estar dissolvidos em um líquido.

Os principais modos de operação na extração em fase sólida (SPE) são (LANÇAS, op cit.):

a – concentração de analitos (“enriquecimento”): passar através do cartucho um grande volume de amostra de forma a aprisionar-se somente o analito, deixando passar o solvente e interferentes,

- b – Isolamento do analito: concentrar a amostra mas sem isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz,
- c – isolamento da matriz ('clean-up'): reter na fase sólida os interferentes da matriz, ao invés do analito de interesse, o qual passa direto com o solvente da amostra,
- d – estocagem de amostra: empregada para análise de amostras as quais se encontram em local distante do laboratório analítico.

As colunas são empacotadas geralmente com 100, 200, 500 ou 1000 mg de adsorvente encaixado entre dois filtros de polietileno. A capacidade dessas colunas varia geralmente de 1 a 6 mL, podendo reter até 10 mg de analito em 200 mg de adsorvente (MAJORS, 1986). Grandes volumes de amostra (até vários litros) podem ser adicionados às colunas, tornando-se um processo muito conveniente na análise de água (ZIEF & KISER, 1982) visto que, na análise de soluções muito diluídas, tais como amostras de água, utiliza-se grandes volumes de amostra, para obter-se concentrações de analito suficientes para detecção (FONT et al., 1993). A SPE é aplicada na análise de agrotóxicos em água por ser um processo mais fácil e rápido (ALBANIS & HELA, 1995).

As principais etapas envolvidas na extração em fase sólida são o condicionamento do cartucho, adição de amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito, sendo que pequenas adaptações e modificações poderão ser necessárias, dependendo do modo de operação.

- condicionamento do cartucho: esta etapa serve para ativar o material existente dentro do cartucho, o solvente a ser empregado dependerá principalmente do material a ser ativado,

- adição da amostra: geralmente feita com o auxílio de uma pipeta, micropipeta ou seringa, dependendo do volume da amostra,
- remoção dos interferentes: esta etapa visa eliminar os interferentes com um solvente o qual não possui força suficiente para arrancar o analito de interesse do material de empacotamento,
- eluição do analito: a escolha do eluente é importante neste ponto, pois ele deve eluir o(s) analito(s) de interesse mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior por estarem muito retidos no material de empacotamento.

Os mecanismos de separação em SPE são os mesmos da cromatografia líquida; como consequência, as fases sólidas empregadas em SPE são as mesmas empregadas em cromatografia líquida de baixa pressão. Este mecanismo ocorre de acordo com as interações intermoleculares entre analito e grupo funcional do adsorvente (LISKA et al., 1989 e PAULING, 1960).

As principais vantagens da SPE são: eficiência, economia, reprodutibilidade, rapidez, segurança e seletividade.

A escolha da fase sólida apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os principais mecanismos atualmente em uso em SPE são: adsorção, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão por tamanho.

Segundo FONT op cit. a recuperação dos agrotóxicos na extração em fase sólida de amostras de água depende do tipo de amostra de água (presença de material particulado, força iônica da água), pH e tratamento do adsorvente (ativação do adsorvente, lavagem da fase ligada, eluição dos agrotóxicos concentrados e

regeneração da coluna). Perdas na recuperação foram observadas em amostras de água com alto conteúdo de matéria orgânica.

6.1.3 – Extração com fluido supercrítico (SFE)

Um fluido supercrítico possui propriedades fisico-químicas intermediárias entre líquidos e gases, sendo qualquer substância que esteja acima de sua temperatura e pressão crítica. É uma condição de estado físico onde a matéria é comprimível e comporta-se como um gás, entretanto possui densidade típica de um líquido, com poder de solvatação característico. Um fluido supercrítico é um gás pesado com um poder de solvatação controlável ou como uma forma de matéria onde os estados líquido e gasoso são indistinguíveis (LUQUE DE CASTRO et al., 1994).

A SFE só emergiu como técnica analítica na década de 80 (RICHARDS & CAMPELL, 1991). Este tipo de extração vem se apresentando como uma alternativa atraente para substituir os métodos tradicionais de extração (CAMEL, TAMBUTÉ & CLAUDEL, 1992 e LANÇAS, 1986).

Na definição das condições ótimas de extração, a escolha é empírica por dois motivos: complexa variedade de analitos a serem extraídos da matriz e desconhecimento teórico (através de modelos matemáticos) a respeito da competição entre o analito e o fluido supercrítico e do analito como os sítios adsorptivos da matriz. A competição é mais importante do que as considerações teóricas sobre solubilidade (HAWTHORNE, 1990).

As técnicas experimentais para extração com fluido supercrítico podem ser operadas de dois modos principais: estático e dinâmico.

A extração com fluido supercrítico no modo estático é realizada com uma quantidade fixa de fluido. Geralmente, a cela de extração contendo a matriz é pressurizada com o fluido a uma certa temperatura e um tempo determinado. A agitação do sistema permite um bom contato do fluido com o soluto (CAMEL, TAMBUTÉ & CLAUDEL, op cit.).

O contato prolongado entre o fluido e a matriz permite uma melhor penetração do fluido através dos interstícios da matriz (HEDNICK; MULCAHEY & TAYLOR, 1992).

Uma das desvantagens encontradas na extração estática, é o fato dela ser exaustiva, ou seja, o fluido supercrítico pode se tornar completamente saturado com o soluto e, devido a isto, ocorrer uma diminuição no poder de extração do fluido supercrítico (BARTLE et al., 1990).

Na extração com fluido supercrítico no modo dinâmico, o fluido é percolado continuamente através da matriz (circuito aberto) ou, mais raramente, em circuito fechado onde o volume de fluido limitado é circulado várias vezes pela matriz. A maior parte dos compostos são extraídos em um curto período no início da extração, depois a velocidade de extração diminui exponencialmente (BARTLE et al., 1991).

Geralmente, o modo dinâmico é preferível devido à duração necessária da extração ser menor que no modo estático, rendimentos de extração superiores, além de permitir a variação da taxa de extração em função do tempo (CAMEL; TAMBUTÉ & CLAUDEL, op cit.).

A SFE tem substituído a maioria dos métodos de extração convencionais. As propriedades únicas dos fluidos levam a aumentar as taxas de difusão e a baixa viscosidade as quais garantem a rápida extração do analito (BARNABAS et al., 1994).

A SFE é uma técnica efetiva para extração de resíduos de pesticidas, apresentando como vantagens em relação às outras técnicas a economia de amostras, solventes, reagentes e tempo e apresentando uma maior recuperação (LANÇAS; GALHIANE & BARBIRATO, 1994). Segundo LEVY (1995) há pouca literatura disponível sobre a extração com fluido supercrítico de poluentes orgânicos em matrizes aquosas, devido à dificuldade mecânica de reter a matriz líquida e polar no vaso de extração.

O dióxido de carbono (CO_2) é o solvente mais largamente usado devido as suas condições críticas amenas, alta volatilidade, baixa viscosidade, alta difusividade, baixa entalpia de vaporização, facilidade de obtenção, atoxicidade, não inflamabilidade, baixo custo, miscível em quase todos os solventes e quimicamente inerte (RICHARDS & CAMPELL, op cit. e BOTT, 1982).

Este tipo de extração diz respeito a matrizes sólidas com pouco ou nenhum conteúdo em água, sendo o principal problema a alta solubilidade do dióxido de carbono supercrítico na água (HATRÍK & TEKEL, op cit. e BARNABAS, et al., op cit.). Entretanto, pode ser usada com líquidos se a amostra for imobilizada em um suporte sólido (FONT et al., op cit.).

6.2 – “Clean-up”

O processo de “clean-up” tem como função remover os principais interferentes da amostra, resultando em análises mais consistentes e reprodutíveis, bem como, minimizar os efeitos de possíveis contaminantes prejudiciais à coluna cromatográfica e resposta por contaminação ao detector. Pode ser realizado através de cromatografia líquida em baixa pressão utilizando colunas abertas, por SPE, e outros métodos de separação.

6.3 - Cromatografia

A determinação de resíduos de agrotóxicos em águas, seus metabólitos e produtos de transformação é normalmente realizada através de métodos de separação, especialmente cromatografia gasosa e cromatografia líquida (HATRÍK & TEKEL, op cit.).

A cromatografia como um método de análise química, destaca-se na separação, identificação e quantificação de espécies químicas. Sendo um método físico de separação, a cromatografia baseia-se na distribuição da amostra entre duas fases, uma móvel e a outra estacionária (LANÇAS, 1993).

6.3.1 - Cromatografia gasosa (GC)

Esta técnica de separação baseia-se na distribuição de substâncias entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa), sendo aplicada à análise de gases ou substâncias volatilizáveis.

Em função da constituição da fase estacionária, pode-se dividir a cromatografia gasosa em: cromatografia gás-líquido (C.G.L.), sendo a fase estacionária uma película delgada líquida, recobrindo um sólido inerte denominado suporte e cromatografia gás-sólido (C.G.S.), sendo a fase estacionária um sólido de grande área superficial.

A **Figura 3** apresenta um sistema cromatográfico, o qual é composto pelas seguintes unidades: gás de arraste, injetor, coluna, detector e registrador.

A cromatografia gasosa é utilizada quando a amostra é volátil ou parcialmente volátil.

Figura 3: Esquema de um cromatógrafo a gás (LANÇAS, 1993).

6.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)

A utilização de colunas de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado oferecendo grande resistência ao fluxo de fase móvel, resultou no uso de sistemas de bomba de alta pressão denominando-se, assim, Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

No início da década de 70 verificou-se que a alta pressão não era um fator importante na separação cromatográfica mas, sim, uma exigência decorrente da diminuição sucessiva do tamanho das partículas dentro da coluna. Apesar das controvérsias sobre a nomenclatura técnica, decidiu-se manter o símbolo HPLC, internacionalmente reconhecido, e encontrar-se um nome adequado para a sigla. A escolha recaiu sobre High Performance Liquid Chromatography ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (McNAIR et al., 1985).

A HPLC pode ser realizada de dois modos: fase normal e fase reversa.

- fase normal: quando a coluna possui grupos de natureza polar, com o uso de fase móvel apolar;
- fase reversa: quando a coluna possui grupos de natureza apolar, com o uso de fase móvel polar (COLLINS et al., 1990).

A HPLC (CLAE) apresenta (McNAIR, op cit.):

Vantagens:

- separações em HPLC podem ser realizadas em escala de tempo diminuta;
- alta resolução, ou seja habilidade em separar um número elevado de componentes com alto grau de pureza;

- grande versatilidade da HPLC, consistindo no emprego desta técnica a uma larga variedade de amostras, tanto orgânicas como inorgânicas, permitindo a análise de moléculas de uma vasta faixa de pesos moleculares;
- com relação à instrumentação, apresenta uma variedade muito grande de detectores disponíveis, que podem detectar quantidades tão pequenas quanto nanogramas;
- a automação em HPLC, atualmente permite a programação não somente da parte de análise como também no processamento dos dados,
- a análise quantitativa é realizada de maneira fácil e exata;
- os equipamentos modernos permitem a programação automática da injeção, das condições de separação e a impressão do relatório final contendo o tempo de retenção dos picos, a área e / ou altura de cada um por integração e, por comparação com tempos de retenção armazenados na memória, a identificação e impressão do nome dos compostos.

Limitações:

- elevado custo da instrumentação e sua manutenção;
- não existe ainda um detector que seja, ao mesmo tempo, universal e apresente boa sensibilidade;
- quando comparada a outros métodos de separação a HPLC exige um treinamento mais extenso para que o operador possa ser proficiente na técnica.

A **Figura 4** apresenta os componentes básicos de um instrumento para HPLC: reservatório do solvente, bomba para empurrar o solvente através da coluna, regulador de pressão, válvula de injeção, coluna, detector e integrador ou registrador.

Figura 4: Esquema de instrumentação para HPLC (McNAIR et al., 1985).

6.4 – Cromatografia acoplada a espectrometria de massas

Os estudos de cromatografia acoplada a espectrometria de massas (GC/MS e LC/MS), visam a identificação e confirmação dos principais componentes presentes nas frações de interesse.

7 – JUSTIFICATIVA

Diante da crescente utilização de agrotóxicos na agricultura, visando aumentar a produtividade agrícola, e dos efeitos dos mesmos sobre o ambiente aquático, provocando contaminação da água e gerando problemas de saúde pública nas populações que se utilizam dessa água, no presente trabalho propõe-se analisar as concentrações de multiresíduos de agrotóxicos empregados na lavoura da cana-de-açúcar, e organoclorados, potencialmente presentes nas águas dos rios que abastecem a cidade de Araraquara: Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól.

OBJETIVOS

GERAIS

Análise de multiresíduos de agrotóxicos empregados na cultura da cana-de-açúcar e de compostos organoclorados, na matriz água.

ESPECÍFICOS

- 1 – Estabelecer as melhores condições cromatográficas de análise para os agrotóxicos determinados por cromatografia gasosa;
- 2 - Estabelecer as melhores condições cromatográficas de análise para os agrotóxicos determinados por cromatografia líquida;
- 3 – Desenvolver metodologia analítica para a técnica extração líquido-líquido (LLE) de multiresíduos de agrotóxicos, na matriz água;
- 4 - Desenvolver metodologia analítica para a técnica extração em fase sólida (SPE) de multiresíduos de agrotóxicos, na matriz água;

5 - Desenvolver metodologia analítica para a técnica extração com fluido supercrítico (SFE) de multiresíduos de agrotóxicos, na matriz água;

6 – Avaliar a metodologia mais eficiente na extração de multiresíduos de agrotóxicos em matrizes aquosas;

7 – Análise de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól;

8 – Avaliar (se presentes) se as concentrações dos agrotóxicos determinadas em amostras selecionadas de águas estão ou não dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

EXPERIMENTAL

1 – DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

As amostras utilizadas no presente trabalho foram provenientes do município de Araraquara, região centro leste do Estado de São Paulo, localizado entre os paralelos de $48^{\circ} 00' - 48^{\circ} 15' W$ de longitude e $21^{\circ} 40' - 21^{\circ} 55' S$ de latitude. Foram analisadas águas superficiais dos três rios que abastecem a cidade de Araraquara, denominados Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól os quais, juntos, são responsáveis por aproximadamente 50% do abastecimento do município, sendo o restante captado de poços artesianos (**Figura 5**).

As **Figuras 6, 7 e 8** apresentam as represas de captação de água dos rios que abastecem a cidade de Araraquara: Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, respectivamente. A região onde está localizada a represa de captação do Ribeirão das Anhumas apresenta-se rodeada por extensa plantação de cana.

Na região de estudo a estação chuvosa vai de outubro a março, com clima super úmido/super tropical e a estação seca de abril a setembro, com clima subúmido/temperado.

O clima tropical é caracterizado por elevadas temperaturas e quantidade de precipitação, o que pode facilitar a dissipação de substâncias tóxicas pelo ar e água.

Figura 5: Áreas de estudo, destacando-se o Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiol.

Os solos da região de Araraquara são ocupados por campo e agricultura, merecendo grande destaque a cultura de cana-de-açúcar ocupando extensas áreas, chegando bem próxima às margens dos rios.

Figura 6: Vista da represa de captação de água do Ribeirão das Cruzes.

Figura 7: Vista da represa de captação de água do Ribeirão das Anhumas.

Figura 8: Vista da represa de captação de água do Córrego do Paiól.

2 – AGROTÓXICOS ANALISADOS

No presente trabalho foram analisados os principais agrotóxicos amplamente empregados na lavoura da cana-de-açúcar, destacando-se os herbicidas tebuthiuron; hexazinona; ametrina; 2,4 D; diuron e o inseticida fipronil, e a classe de compostos organoclorados BHC; aldrin; endossulfan; dieldrin; endrin e DDT. Levantamento dos agrotóxicos mais empregados na lavoura da cana-de-açúcar conseguiu-se através do agrônomo da Usina Santa Cruz (Araraquara), usina esta próxima à represa de captação de água do Ribeirão das Anhumas, assim como com o agrônomo da Associação de Fornecedores de Cana de Araraquara.

Os padrões analíticos foram obtidos de várias empresas, dentre elas HOECHST, POLYSCIENCE, todos com pureza em torno de 99%.

As soluções estoque e as soluções de trabalho dos compostos analisados por cromatografia gasosa foram preparadas no solvente acetato de etila (Merck p. a.), e os compostos analisados por cromatografia líquida foram preparados no solvente acetonitrila (Merck p. a.).

Os agrotóxicos ametrina; 2,4 D; hexazinona; tebuthiuron e diuron, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Empregou-se as técnicas de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e extração com fluido supercrítico (SFE) para o isolamento do analito da matriz.

Os compostos organoclorados BHC (α , β e γ); aldrin; endossulfan (α e β); endrin; dieldrin e DDT e o inseticida fipronil, foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). Empregou-se as técnicas de extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluido supercrítico.

Dados a respeito dos compostos utilizados no presente projeto encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5: Descrição dos padrões estudados (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1987).

Princípio	Nome	Classe	Fórmula bruta	Massa	Classe	Grupo
ativo	comercial			Molecular	toxicológica	
X Ametrina	Gesapax	Herbicida	$C_9H_{17}N_5S$	227,5	III	triazina
X Ácido 2,4 D	2,4 D	Herbicida	$C_8H_6Cl_2O$	221,0	II	ácido fenoxi
X Tebuthiuron	Combine	Herbicida	$C_9H_{16}N_4OS$	228,30	II	derivado da uréia
Hexazinona	Velpar	Herbicida	$C_{12}H_{20}N_4O_2$	252,3	III	triazina
X Diuron	Karmex	Herbicida	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	233,2	III	derivado da uréia
Fipronil	Regent	Inseticida	$C_{12}H_4Cl_2F_8N_4OS$	437,2	IV	*
Aldrin	Aldrin	Inseticida	$C_{12}H_8Cl_6$	364,9	II	organoclorado
DDT	Neocid	Inseticida	$C_{14}H_9Cl_5$	354,5	II	organoclorado
Dieldrin	Dieldrin	Inseticida	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,9	II	organoclorado
Endossulfan	Thiodan	Inseticida	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406,9	I	organoclorado
Endrin	Endrin	Inseticida	$C_{12}O_8Cl_6O$	380,93	I	organoclorado
BHC	BHC	Inseticida	$C_6H_6Cl_6$	290,8	I	organoclorado

* Não pertence a nenhuma destas classes

Classe toxicológica: I extremamente tóxica

II medianamente tóxica

III pouco tóxica

IV levemente tóxica

3 – COLETA DAS AMOSTRAS “REAIS” DE ÁGUA

A qualidade da água varia com o tempo, exigindo para o seu controle a realização de análises em diferentes épocas do ano, e só sua repetição poderá reduzir o efeito da variação dos resultados (CETESB, 1987).

Após a determinação do melhor procedimento para a extração dos agrotóxicos de interesse (Tabela 5), realizou-se coleta de amostras reais de água, nas represas de captação de água que abastecem a cidade de Araraquara. O termo “amostra real” é aqui empregado para designar uma amostra de campo, diferenciando de uma amostra preparada no laboratório com água Milli - Q e o padrão analítico. Assim, a amostra “real” é aquela que será empregada no abastecimento de água da cidade.

Em função da sazonalidade existente na região, ou seja, típica de região tropical, onde tem-se bem marcado a estação seca (abril a setembro), que corresponde ao período de inverno, e estação chuvosa (outubro a março), caracterizando o verão, realizou-se coletas denominadas de inverno e verão.

Realizou-se a coleta de inverno no mês de setembro; o tempo estava bom, ensolarado, com poucas nuvens, ausência de vento, mas no dia anterior havia chovido, carreando material em suspensão para dentro da coluna d'água, apresentando a mesma uma coloração marron.

A coleta de verão foi no mês de fevereiro, com tempo bom, ensolarado, ausência de vento, com a ocorrência de muita chuva na semana anterior a da coleta.

As amostras de água foram coletadas em frasco ambar, na superfície da represa, à jusante, realizando-se, de imediato, medidas de alguns parâmetros

químicos da água tais como, temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido. Estes parâmetros foram medidos com aparelho multisonda, modelo 10, Horiba.

Em seguida, as amostras de água foram levadas para o laboratório onde, através de filtração a vácuo, utilizando papel de filtro com porosidade de 42 μ m, diâmetro 125 mm, removeu-se grande parte do material em suspensão, o qual poderia dificultar as extrações (isto para as amostras de inverno). Após, diminuiu-se o pH utilizando ácido clorídrico 2 molar para um valor em torno de 2, inibindo com isso a atividade dos microorganismos. Durante o período de análise as mesmas foram guardadas em geladeira (WORKSHOP, 1999).

4 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Após a determinação do melhor procedimento para a extração quantitativa dos agrotóxicos de interesse, através do uso de padrões analíticos, os compostos de interesse foram avaliados em amostras reais de água dos rios Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól. Para o desenvolvimento do método analítico, amostras de água isentas de compostos orgânicos e com baixa condutividade foram utilizadas e enriquecidas com concentrações conhecidas dos agrotóxicos de interesse.

Avaliou-se neste trabalho os métodos de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e extração com fluido supercrítico (SFE).

Muitos analitos podem ser determinados por GC ou LC entretanto, a GC tem como vantagens a grande eficiência de separação, alta velocidade de análise e disponibilidade de uma ampla faixa de detectores altamente sensíveis e seletivos, aumentando a capacidade de separação de compostos com a introdução de colunas capilares. A LC é um método escolhido quando os compostos a serem analisados são polares, não voláteis ou termolábeis (LISKA & SLOBODNIK, op cit.). As vantagens da GC citadas, permitem a medição de baixas concentrações de diferentes componentes em amostras de matrizes complexas, por exemplo a água (MOL; JANSSEN; CRAMERS; VREULS & BRINKMAN, 1995).

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) utiliza a GC para compostos orgânicos voláteis, empregando extensivamente ECD para agrotóxicos, e a HPLC para compostos não voláteis, termicamente lábeis e polares. Com a tendência do uso de agrotóxicos biodegradáveis, a HPLC está se tornando o método analítico preferido, permitindo grandes volumes de injeção de amostras aquosas (GROSSER; RYAN & DONG, 1993).

As amostras enriquecidas e as reais, foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A identificação dos compostos analisados por cromatografia gasosa em amostras reais de água foi feita através do acoplamento entre métodos cromatográficos e espectrometria de massas – GC/MS.

Todos os solventes utilizados neste trabalho – acetato de etila, acetonitrila, hexano, diclorometano, acetona e metanol foram da marca Merck, grau de pureza analítica. Os solventes utilizados como fase móvel foram da marca Merck, grau de pureza HPLC.

5 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

Esta técnica apresenta como principal característica a simplicidade de operação e de uso de materiais. Regra geral, consiste em adicionar à solução contendo água e os agrotóxicos de interesse um solvente orgânico imiscível com água e capaz de remover os analitos. Após agitação as camadas são separadas mecanicamente, o solvente orgânico é eliminado (total ou parcialmente) e o analito concentrado (ou re-dissolvido em uma quantidade conhecida de solvente) injetado no cromatógrafo (**Figura 9**).

A seguir descreve-se as principais etapas utilizadas no presente trabalho para a análise de BHC; aldrin; dieldrin; endrin; endossulfan; DDT e fipronil e posterior determinação por cromatografia gasosa e para os analitos ametrina; 2,4D; hexazinona; tebuthiuron e diuron, determinados por cromatografia líquida.

- 1- adicionou-se, em um becker, 100 mL de água preparada em sistema milli-Q (Millipore),
- 2- enriqueceu-se essa água com 1 mL da mistura de padrões, na concentração de 1µg/mL,
- 3- diminuiu-se o pH para 2 com ácido clorídrico 2 molar,
- 4- transferiu-se essa solução para um funil de separação de 250 mL,

Extração da amostra aquosa com solvente orgânico. Agitação

Separação das fases: orgânica e aquosa

Filtrar e secar o solvente e extrato orgânicos combinados

Evaporar o solvente orgânico

Reconstituir em solvente adequado

Figura 9: Etapas utilizadas na extração líquido-líquido (LANÇAS, 1997).

- 5- adicionou-se a essa solução 60 mL de solvente, o qual não é miscível em água, mas capaz de dissolver seletivamente os analitos,
- 6- agitou-se por dois minutos,
- 7- separou-se a fase orgânica (que contém o solvente + analitos) em um becker e repetiu-se o processo mais duas vezes com a fase aquosa,
- 8- percolou-se a fase orgânica por uma bureta contendo 15,0 g de sulfato de sódio anidro (Merck p. a.), com a finalidade de eliminar resíduos de água,
- 9- coletou-se a fase orgânica em um balão de fundo redondo e secou-se em rotaevaporador,
- 10- dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetato de etila e injetou-se 1 μ L no cromatógrafo, para os compostos analisados por cromatografia gasosa ou dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetonitrila e injetou-se 20 μ L no cromatógrafo, para os compostos analisados por cromatografia líquida.

Testou-se os solventes hexano e diclorometano, solventes estes bastante citados na literatura para este tipo de extração.

Nas análises de amostras reais, utilizou-se volume de 1000mL de água.

A **Figura 10** ilustra o esquema global utilizado na extração líquido-líquido (LLE) de uma amostra de água enriquecida com os padrões, para posterior análise por cromatografia gasosa.

Figura 10: Diagrama esquemático da extração líquido-líquido (LLE) de resíduos de agrotóxicos em amostra de água.

6 - EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) consiste na partição do analito de interesse entre duas fases. No caso de amostras de água, uma fase será a própria amostra (água) contendo os analitos de interesse e impurezas, e a outra será uma fase sólida a qual irá reter estes analitos e, preferencialmente não reter as impurezas e a matriz.

A **Figura 11** ilustra um esquema típico empregado em SPE (LANÇAS, 1997).

Figura 11: Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto ou classe de compostos (LANÇAS, 1997).

Descreve-se, a seguir, as etapas utilizadas no presente trabalho para a análise de BHC; aldrin; dieldrin; endrin; endossulfan; DDT e fipronil e posterior determinação por cromatografia gasosa e para os analitos ametrina; 2,4D; hexazinona; tebuthiuron e diuron, determinados por cromatografia líquida, na matriz água.

- 1- adicionou-se, em um becker, 100 mL de água preparada em sistema milli-Q,
- 2- enriqueceu-se essa água com 1 mL da mistura de padrões (BHC; aldrin; dieldrin; endrin; endossulfan; DDT; fipronil ou ametrina; 2,4 D; tebuthiuron; hexazinona; diuron), na concentração de 1 µg/mL,
- 3- abaixou-se o pH para 2 com ácido clorídrico 2 molar,
- 4- percolou-se 10 mL de solvente seguido de 10 mL de água em uma coluna contendo um adsorvente, a vácuo, para condicionar a coluna,
- 5- adicionou-se a amostra de água a ser analisada à coluna condicionada e descartou-se o filtrado,
- 6- eluiu-se os agrotóxicos passando pela coluna 20 mL de solvente,
- 7- coletou-se o filtrado e evaporou-se à secura no rotaevaporador,
- 8- dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetato de etila e injetou-se 1 µL no cromatógrafo, para os compostos analisados por cromatografia gasosa ou dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetonitrila e injetou-se 20 µL no comatógrafo, para os compostos analisados por cromatografia líquida.

Para os compostos organoclorados testou-se as fases sólidas C₁₈ (octadecil silano quimicamente ligado à sílica, “Alltech”, 35 – 75 mesh), Chromossorb (“Johns – Manville”, 100 – 120 mesh), florisil (“Riedel”, 100 – 200 mesh), alumina (“Merck”, 70 – 230 mesh), sílica gel 60 (“Merck”, 70 – 230 mesh) e XAD 7 (“Rohm

and Haas”, 20 – 60 mesh), as quais variam em polaridade, desde apolar até polar. No condicionamento da fase e eluição dos agrotóxicos de interesse utilizou-se os solventes hexano (apolar), acetato de etila (moderadamente polar) e metanol (polar).

Com relação aos compostos analisados por cromatografia líquida, empregou-se as fases sólidas C₁₈, florisil, alumina e sílica, e os solventes hexano (apolar), acetonitrila (moderadamente polar) e metanol (polar) no condicionamento da fase e eluição dos analitos.

Para todas as fases testadas utilizou-se massa de 1000mg, uma vez que testes realizados com a fase C₁₈, nos quais variou-se a massa em 100, 500 e 1000mg, os melhores resultados foram obtidos com 1000mg. No condicionamento da fase variou-se também o volume de solvente em 5 mL e 10 mL, bem como, o volume de solvente para eluição dos analitos, 10 mL e 20 mL.

Nas análises de amostras reais, utilizou-se volume de 1000mL de água.

A **Figura 12** ilustra o esquema global utilizado na extração em fase sólida (SPE) de 100 mL de água enriquecida com padrões, analisados por cromatografia gasosa.

Figura 12: Esquema utilizado na extração em fase sólida (SPE) de resíduos de agrotóxicos em amostra de água.

7 – EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

A SFE é realizada acondicionando-se a amostra em uma cela de extração e empregando-se um solvente apropriado (nas condições supercríticas) para extração do analito. Utilizou-se dois modos diferentes de extração. No primeiro caso realizou-se uma adsorção prévia dos analitos presentes na água em uma matriz sólida, evitando a remoção da água com os analitos durante a extração. No segundo caso efetuou-se a extração dos analitos diretamente da matriz água.

A seguir descreve-se as principais etapas utilizadas na extração com fluido supercrítico (SFE) para os padrões BHC; aldrin; dieldrin; endrin; endossulfan; DDT e fipronil, determinados por cromatografia gasosa e para os analitos ametrina; 2,4D; hexazinona; tebuthiuron e diuron, determinados por cromatografia líquida, na matriz água.

1- adicionou-se, em um becker, 100 mL de água preparado em sistema Milli-Q;

2- enriqueceu-se essa água com 1 mL da mistura de padrões na concentração de 1 µg/mL;

3- diminuiu-se pH para 2 com ácido clorídrico 2 molar;

PRIMEIRO CASO (extração indireta)

4- preencheu-se a cela extratora com um suporte sólido. Testou-se as fases florisil e C₁₈;

5- percolou-se 10 mL de solvente acetato de etila + 10 mL de água na cela extratora, sob vácuo, para condicionar;

- 6- adicionou-se 100 mL de água enriquecida com 1 mL da mistura de padrões, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, na cela extratora condicionada, descartando o filtrado;
- 7- transferiu-se a cela de extração para um forno de aquecimento, a uma temperatura de 60°C,
- 8- manteve-se o sistema a uma pressão de 300 atm;
- 9- extraiu-se os agrotóxicos utilizando dióxido de carbono (CO_2) no estado supercrítico, adicionando ou não modificador;
- 10- manteve-se o sistema por 12 minutos no modo dinâmico;
- 11- recolheu-se o extrato em um tubo de ensaio contendo acetato de etila e evaporou-se à secua em rotaevaporador;
- 12- dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetato de etila e injetou-se 1 μL no cromatógrafo.

A **Figura 13** ilustra o equipamento utilizado na extração com fluido supercrítico (SFE), utilizando suporte sólido para adsorção dos analitos.

SEGUNDO CASO (extração direta)

- 4- preencheu-se a cela extratora com 100 mL de água enriquecida com 1 mL da mistura de padrões, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, adicionou-se 5,0g de sulfato de sódio anidro para aumentar a força iônica, acrescentando ou não modificador;
- 5- transferiu-se a cela de extração para um forno de aquecimento, a uma temperatura de 60°C,
- 6- manteve-se o sistema a uma pressão de 300 atm;
- 7- extraiu-se os agrotóxicos utilizando dióxido de carbono (CO_2) no estado supercrítico;

Figura 13: Sistema de extração com fluido supercrítico, utilizando adorrvente (GALHIANE, 1996).

1. cilindro de CO₂; 2. banho de gelo; 3. bomba de circulação; 4. bomba de HPLC; 5. reservatório de solvente; 6. válvula; 7. forno; 8. vaso de extração; 9. restritor; 10. vaso coletor; 11. banho de gelo (criogenia).

- 8- manteve-se o sistema por 30 minutos no modo estático e 60 minutos no modo dinâmico;
- 9- recolheu-se o extrato em um tubo de ensaio contendo acetato de etila e evaporar à secura em rotaevaporador;
- 10- dissolveu-se o resíduo em 1 mL de acetato de etila e injetar 1 μ L no cromatógrafo.

A **Figura 14** ilustra o equipamento utilizado na extração com fluido supercrítico (SFE), onde os analitos foram extraídos diretamente da matriz água.

Nos dois casos, adicionou-se junto à cela de extração 1 mL de modificador para ajudar na eluição dos analitos. Para os compostos analisados por cromatografia gasosa utilizou-se como modificador os solventes acetato de etila, metanol ou acetona; já para os analisados por cromatografia líquida utilizou-se acetonitrila.

Nas análises das amostras reais, utilizou-se volume de 1000mL de água.

A **Figura 15** ilustra o esquema global da extração com fluido supercrítico (SFE) de 100 mL de água enriquecida com padrões, utilizando suporte sólido na adsorção dos analitos, analisados por cromatografia gasosa.

Figura 14: Sistema de extração com fluido supercrítico direto de matriz aquosa (ALVES, 1998)

1. dióxido de carbono; 2. bomba de alta pressão; 3. adaptador; 4. sistema de refrigeração; 5. forno; 6. cela de extração; 7. controlador de temperatura; 8. sistema coletor.

Figura 15: Esquema para a extração com fluido supercrítico (SFE) de resíduos de agrotóxicos em amostras de água.

8 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

8.1 – Análise de padrões por cromatografia gasosa

Os padrões de agrotóxicos organoclorados – BHC, aldrin, dieldrin, endrin, endossulfan e DDT, e o inseticida fipronil, foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando acetato de etila como solvente.

Os padrões foram injetados nas concentrações de 1,0 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,1 µg/mL, sendo que para cada concentração injetou-se 5 vezes o padrão.

Utilizou-se as seguintes condições cromatográficas:

- ⊖ cromatógrafo a gás modelo HP 5890 série II,
- ⊖ coluna capilar de sílica fundida (25m x 0,25mm x 0,33µm), fase estacionária 5% fenil dimetil polisiloxano (LM-5),
- ⊖ fase móvel hidrogênio,
- detector por captura de elétrons (ECD-Ni),
- sistema de injeção split ou seja, injeção com divisão da amostra
- ⊖ fluxo de 20 mL/min,
- “make-up”- nitrogênio - fluxo de 66 mL/min,
- temperatura do injetor de 250 °C,
- temperatura do detector de 300 °C,
- volume injetado de 1 µL,
- temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

8.2 – Análise de padrões por cromatografia líquida

Os padrões de agrotóxicos empregados na cultura da cana-de-açúcar – ametrina; hexazinona; tebuthiuron; 2,4 D e diuron, foram analisados por cromatografia líquida, utilizando como solvente da amostra acetonitrila.

Condições cromatográficas de análise para os analitos estudados:

- Cromatógrafo líquido Shimadzu
- coluna: RP-8 Supelco (250mm x 4mm x 5 μ m)
- detector: U.V. (Diodearray) – SPD – M10A
- bomba: LC 10 AD
- forno: CTO – 10A
- sistemas de dados: LC – Work Station Class LC-10
- fluxo: 1 mL/min
- fase móvel: 28% acetonitrila + 72 água, modo isocrático
- volume injetado: 20 μ L

λ = 238 nm para os padrões 2,4 D e ametrina

λ = 254 nm para os padrões tebuthiuron, hexazinona e diuron

Condições cromatográficas de análise para os extratos dos compostos estudados, utilizando detector com comprimento de onda fixo, o qual apresenta maior sensibilidade:

- Cromatógrafo líquido Shimadzu
- coluna: RP-8 Supelco (250mm x 4mm x 5 μ m)
- detector: U.V- VIS – SPD – 10AV
- bomba: LC – 10AD
- forno: CTO – 6A
- registrador: C – R6A - Chromatopac
- fluxo: 1 mL/min
- fase móvel: 28% acetonitrila + 72% água, modo isocrático
- volume injetado: 20 μ L

λ = 238 nm para os padrões 2,4 D e ametrina

λ = 254 nm para os padrões tebuthiuron, hexazinona e diuron

8.3 – Análise por espectrometria de massas

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC/MS QP 5000, equipado com detector seletivo de massa (MSD).

A confirmação dos padrões analisados por cromatografia gasosa bem como, os extratos das amostras reais de água, foram feitas por cromatografia acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).

Utilizou-se as seguintes condições cromatográficas:

- cromatógrafo a gás Shimadzu GC/MS QP 5000,
- coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm x 0,25 μ m), fase estacionária 5% fenil polisiloxano (LM – 5),
- detector de espectrometria de massas (MSD),
- gás de arraste hélio,
- razão de “split” 1:12,
- temperatura do injetor de 250 °C,
- temperatura da interface de 280 °C,
- temperatura da coluna: 140 °C (3min) – 6 °C/min – 280 °C (1min),
- volume injetado de 1 μ L,
- modos de injeção SCAN e SIM (monitoramento do íon seletivo),
- varredura entre m/z 45 a m/z 475 daltons.

9 – TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Um conjunto de variáveis como por exemplo concentrações de diversas soluções de analito injetadas no cromatógrafo e o respectivo conjunto de variáveis que depende das concentrações injetadas, como exemplo as áreas dos picos eluídos, necessita do auxílio de métodos estatísticos a fim de avaliar-se a qualidade dos dados, segundo critérios padronizados.

Para dar-se credibilidade aos dados nas análises quantitativas, deve-se estar atento a determinadas características do método empregado, uma vez que estas vão determinar a validação analítica do método em questão. Para validar-se um método, alguns fatores devem ser considerados: exatidão, precisão, fidelidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, estabilidade e robustez, dentre outros.

No presente trabalho calculou-se o desvio padrão (S), coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo, coeficiente de correlação (r), linearidade, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

9.1 – Desvio padrão (S)

A avaliação da dispersão dos valores experimentais em torno da média aritmética é dada frequentemente pelo desvio padrão (S).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$\bar{x}$ = Valor médio

x_i = Valor medido

n = Número de repetições

9.2 – Coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (CV)

O coeficiente de variação (CV) é calculado dividindo-se o valor do desvio padrão (S) pelo valor médio ($\bar{X}$) e multiplicando-se o resultado por 100. Este parâmetro é muito utilizado para comparar as precisões de resultados que possuem magnitudes ou unidades diferentes.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

S = Desvio padrão

$\bar{X}$ = Valor médio

9.3 – Coeficiente de correlação (r)

Quando se deseja um número para avaliar a qualidade dos dados, e não apenas a interpretação de uma representação gráfica em escala conveniente, pode-se utilizar o coeficiente de correlação r . Quanto mais próximo de 1, mais a correlação entre as variáveis x (concentração) e y (área).

$$r = \frac{n * \sum_1^n x * y - \sum_1^n x * \sum_1^n y}{\sqrt{\left(n * \sum x^2 - \left(\sum x\right)^2\right) * \left(n * \sum y^2 - \left(\sum y\right)^2\right)}}$$

n = Número de repetições

x = Concentração

y = Área

9.4 – Limite de detecção (LOD)

É a menor quantidade de analito a qual pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, não necessariamente quantificada como um valor exato. Corresponde à concentração que produziria um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido, com a solução de controle ou branco (LEITE, 1996).

$$LOD = 3 * N$$

N = Ruído

9.5 – Linearidade

Um método é linear se há uma relação linear entre a “resposta analítica” e a concentração do analito na amostra sobre uma determinada faixa de concentração do analito (LEITE, op cit.). A linearidade é determinada através de gráficos de calibração, seguido de tratamento estatístico.

9.6 – Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de um analito a qual pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada.

Pode ser definido em relação ao ruído empregando-se o branco como referência (CHASIN et al., 1998).

$$LOQ = 10 * N$$

$$N = \text{Ruído}$$

9.7 - Recuperação

A recuperação expressa a quantidade de uma determinada substância recuperada em um processo analítico em relação à quantidade real presente na amostra (CHASIN et al., 1994).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração extraída}}{\text{concentração teórica}} * 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PADRÕES ANALÍTICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Os compostos analisados pertencem à classe dos inseticidas organoclorados, juntamente com o inseticida fipronil, o qual é bastante empregado na cultura da cana-de-açúcar e, por este motivo, foi incluído neste estudo. A partir do cromatograma apresentado (**Figura 16**), pode-se notar que os compostos encontram-se separados, sendo a programação de temperatura e condições cromatográficas utilizadas adequadas para os compostos, e a resposta dos mesmos ao detector de captura de elétrons (ECD) satisfatória à análise de traços. A **Tabela 6** ilustra o tempo de retenção típico dos padrões estudados.

Figura 16: Cromatograma dos padrões BHC (α , β e γ), aldrin; fipronil; endossulfan (α e β); dieldrin; endrin e DDT, na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

Tabela 6: Tempo de retenção típico dos padrões estudados.

Agrotóxico	Tempo de Retenção (minutos)
α BHC	5,79
β BHC	6,82
γ BHC	7,62
Aldrin	10,77
α Endossulfan	13,89
β Endossulfan	16,28
Dieldrin	15,01
Endrin	15,87
DDT	18,63
Fipronil	13,35

1.1 – Recuperação dos agrotóxicos através da extração líquido-líquido (LLE)

Na extração líquido-líquido (LLE) utilizou-se os solventes hexano e diclorometano na eluição dos compostos, solventes estes bastante empregados na literatura para este tipo de matriz. Os dois solventes apresentaram para cada analito valores próximos de recuperação (Tabela 7). Os valores salientados em azul representam aqueles dentro do intervalo proposto pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) para recuperação -70 a 130% (TOLOSA et al., op cit.). Quando utilizou-se o solvente hexano as recuperações variaram de 32,03% para aldrin a 77,83% para γ BHC, com valores aceitáveis de recuperação para os compostos β BHC (70,89%), γ BHC (77,83%), β endossulfan (71,23%) e fipronil (72,49%). Com relação ao solvente diclorometano, os valores obtidos variaram de 25,55% para aldrin a 102,78% para fipronil, com valores aceitáveis de recuperação para os compostos α BHC (74,46%), β BHC (81,48%), γ BHC (82,55%) e fipronil (102,78%).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) analisando compostos organoclorados, os quais incluem endossulfan α e β , lindano (γ BHC) e DDT, obteve na extração líquido-líquido utilizando diclorometano, valores de recuperação de 78,10; 51,70; 85,60 e 45,00% respectivamente, valores estes próximos aos obtidos nestas análises.

TAN (1992) empregando a extração líquido-líquido e extração em fase sólida na análise de compostos organoclorados os quais incluem BHC, DDT, endossulfan, endrin, dieldrin e aldrin, obteve médias de recuperação em torno de 90% para

Tabela 7: Recuperação dos agrotóxicos organoclorados e fipronil em água, através da extração líquido – líquido (LLE).

Agrotóxico	Recuperação (%)	
	Hexano	Diclorometano
α BHC	60,29	74,46
β BHC	70,89	81,48
γ BHC	77,83	82,55
aldrin	32,03	25,55
α endossulfan	61,38	52,29
β endossulfan	71,23	57,59
dieldrin	68,03	61,43
endrin	63,19	52,85
DDT	51,55	45,80
fipronil	72,49	102,78

extração líquido-líquido e 80% para extração em fase sólida, concluindo que a extração líquido-líquido é o método mais apropriado para análise de clorados.

Segundo VIDAL (1991) valores mais baixos de recuperação na extração líquido-líquido, devem-se a perdas de soluto por adsorção nas paredes dos balões utilizados para concentração, durante as transferências de recipientes e na etapa de evaporação do solvente.

Estudos realizados no Ribeirão São Bartolomeu, manancial que é usado para abastecimento da cidade de Viçosa – MG, região tradicionalmente agrícola, foi encontrado através da extração líquido-líquido, resíduos de compostos organoclorados (aldrin, heptacloro, endrin e DDT), todos com valores acima do máximo estabelecido pela legislação. Esta contaminação pode estar relacionada com o uso atual destes pesticidas nas culturas (CHAGAS et al., 1999).

A **Figura 17** apresenta o cromatograma do extrato obtido através da LLE para os compostos analisados por cromatografia gasosa.

Figura 17: Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, na concentração de $1\mu\text{g/mL}$, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se a extração líquido-líquido (LLE), com solvente diclorometano.

Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: $140^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C/min} - 290^\circ\text{C}$.

1.2 – Recuperação dos agrotóxicos através da extração em fase sólida (SPE)

Na extração em fase sólida (SPE), testou-se vários suportes sólidos para adsorção dos analitos de interesse, os quais variam na polaridade. Apolar: C₁₈ e chromossorb; moderadamente polar: XAD, alumina e sílica. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Tabela 8**. Para condicionar a fase sólida e eluir os analitos de interesse, utilizou-se os solventes hexano (apolar), acetato de etila (moderadamente polar) e metanol (polar), nas seguintes combinações:

Condicionamento	Eluição
10 mL hexano + 10 mL água	20 mL hexano
10 mL acetato de etila + 10 mL água	20 mL acetato de etila
10 mL metanol + 10 mL água	20 mL de metanol
10 mL metanol + 10 mL água	20 mL de acetato de etila

Os melhores valores de recuperação obteve-se quando utilizou a fase sólida C₁₈, acetato de etila ou metanol no condicionamento da fase e acetato de etila na eluição dos analitos. Segundo BENGTTSSON & RAMBERG (1995) a maioria das moléculas orgânicas usadas como agrotóxicos tem uma estrutura não polar, sendo que C₁₈ e C₈ são adsorventes bem sucedidos para compostos não polares e semipolares. LANÇAS (1997) recomenda utilizar RP₁₈ (C₁₈) para isolar analitos apolares em água. O uso de C₁₈ na extração em fase sólida tem sido também proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), na análise de compostos orgânicos básicos e neutros presentes na água potável (TOLOSA et al., 1996).

Tabela 8: Recuperação dos agrotóxicos organoclorados e fipronil em água, através da extração em fase sólida (SPE).

Agrotóxico	Recuperação (%)										
	C18				Florisil			Alumina	Sílica	XAD-7	Chromos
	C-E hexano	C-E acetato	C-E metanol	C-metanol E-acetato	C-E hexano	C-E acetato	C-E metanol	C-E acetato	C-E acetato	C-E acetato	C-E acetato
α BHC	56,17	90,00	06,33	93,80	14,12	40,80	-	-	01,38	48,26	85,00
β BHC	65,63	96,75	22,72	98,74	15,98	45,24	-	-	01,70	58,13	85,58
γ BHC	55,49	95,32	08,44	102,74	14,93	59,58	-	-	-	51,90	96,59
Aldrin	02,30	14,14	01,04	11,55	01,96	13,22	-	10,04	02,81	10,61	10,19
α endossulfan	20,06	75,86	-	70,19	10,00	64,96	-	03,50	06,06	32,64	43,63
β endossulfan	13,74	71,74	-	71,76	12,78	68,00	-	04,91	06,54	37,56	46,03
dieldrin	12,92	62,69	27,21	71,00	09,88	52,57	01,38	04,71	06,18	25,76	29,76
endrin	15,27	85,74	37,68	76,50	09,54	68,05	02,90	04,79	06,60	33,03	38,66
DDT	06,61	19,57	07,56	34,07	06,17	21,30	01,14	08,03	05,84	13,76	14,82
fipronil	53,80	102,12	92,00	93,45	49,06	82,89	40,00	6,01	4,18	55,00	85,00

C = condicionamento da fase

E = eluição dos analitos

- = não recuperou

Para os compostos α , β e γ BHC, β endossulfan e dieldrin, os melhores rendimentos com C_{18} foram obtidos utilizando o solvente metanol no condicionamento da fase e acetato de etila na eluição, com recuperações de 93,80; 98,74; 102,74; 71,76 e 71,00 %, respectivamente; já para os analitos α endossulfan, endrin e fipronil, os melhores resultados obteve-se utilizando acetato de etila no condicionamento da fase e eluição dos analitos, com recuperações de 75,86; 85,74 e 102,72 %, respectivamente.

Com relação aos compostos aldrin e DDT, as recuperações foram baixas para todos os suportes sólidos testados, obtendo valores máximos de recuperação de 14,14% e 34,07%, respectivamente. Segundo GRAY (op cit.) aldrin é convertido em dieldrin, sendo a forma encontrada na água. VIDAL (op cit.) obteve baixas recuperações para aldrin e heptacloro quando estão presentes em concentrações inferiores a 2000 ng/L, devido talvez a alguma solubilidade destes compostos em água.

WENDY et al. (1997) analisando dezesseis pesticidas organoclorados em água, os quais incluem BHC, aldrin, dieldrin, endrin, endossulfan e DDT, utilizou C_{18} como suporte sólido, condicionado com metanol e água, e eluição com acetato e diclorometano, obtendo recuperações que variaram de 77 a 95%. VIDAL (op cit.) analisando os mesmos compostos organoclorados, verificou vantagens na utilização da fase sólida C_{18} , tais como: altas percentagens de recuperação com pequena massa, eluição quantitativa de solutos retidos em uma banda estreita de concentração e a não necessidade de tempo de equilíbrio com o solvente de eluição. Obteve recuperações que variaram de 72,00% para DDT a 94,00% para BHC.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) analisando BHC, aldrin, endossulfan e DDT, obteve para a extração em fase sólida valores de

recuperação superiores em relação a extração líquido-líquido, apresentando vantagens tais como, simplicidade, rapidez de análise, extratos mais puros e mais secos, livres de interferentes, melhor recuperação e reprodutibilidade, mais barato, extração e eluição seletivas, capacidade para extração e amostragem no campo, transporte e armazenamento. MAJORS (1998) também comparou a LLE com a SPE, e concluiu que a SPE apresenta vantagens, uma vez que reduz o consumo de solventes, tem menos etapas, menos laboriosa, mais eficiente, evita emulsões e é mais apropriada para automação.

A **Figura 18** apresenta o cromatograma do extrato obtido através da SPE para os compostos analisados por cromatografia gasosa.

Figura 18: Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se a extração em fase sólida (SPE), suporte sólido C_{18} , acetato de etila no condicionamento da fase e eluição dos analitos.

Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

1.3 – Recuperação dos agrotóxicos através da extração com fluido supercrítico (SFE)

As recuperações dos analitos na extração com fluido supercrítico obtidos por extração direta da matriz água ou utilizando um suporte sólido (C₁₈ ou florisil), à temperatura de 60 °C e pressão de 300 atm, são apresentadas na **Tabela 9**.

Na extração direta da matriz água, utilizou-se na eluição: CO₂; CO₂ + sal (sulfato de sódio); CO₂ + sal + modificador acetona; CO₂ + sal + modificador metanol. Os valores de recuperação foram baixos para todas as combinações, provavelmente devido a vazamentos na válvula do equipamento, levando a perdas do analito, uma vez que ALVES (comunicação pessoal) analisando compostos organofosforados direto da matriz água, obteve valores de recuperação aceitáveis.

BARNABAS et al. (1994) usaram discos de extração em fase sólida como primeiro caminho para determinação de pesticidas organoclorados e organofosforados em água, para posterior extração com fluido supercrítico, devido a alta solubilidade do dióxido de carbono supercrítico na água.

Quando utilizou-se suporte sólido na adsorção dos agrotóxicos (C₁₈ ou florisil), empregou-se como eluente: CO₂; CO₂ + modificador acetato de etila; CO₂ + modificador acetona. As melhores recuperações foram obtidas quando utilizou-se C₁₈ como suporte sólido e CO₂ + modificador acetona como eluente, variando de 14,75% para DDT a 97,92% para fipronil. Os melhores valores de recuperação foram obtidos para os compostos BHC (α , β , γ) e fipronil, 85,26%; 97,01%; 95,26% e 97,92%, respectivamente. Segundo VANNOORT et al. (1990) a eficiência da extração depende em grande parte das condições de extração, ou seja, pressão e

Tabela 9: Recuperação dos agrotóxicos organoclorados e fipronil através da extração com fluido supercrítico (SFE), direto da matriz água ou utilizando um suporte sólido.

Agrotóxico	Recuperação (%)									
	Extração direta				Adsorção em C18			Adsorção em Florisil		
	CO ₂	CO ₂ + sal	CO ₂ + sal + Acetona	CO ₂ + sal + metanol	CO ₂	CO ₂ + acetona	CO ₂ + acetato	CO ₂	CO ₂ + acetato	CO ₂ + metanol
α BHC	14,02	19,81	5,40	16,05	72,32	85,26	47,10	47,29	41,47	41,40
β BHC	15,52	22,35	5,14	16,05	82,74	97,01	54,76	45,78	51,66	46,84
γ BHC	9,88	16,64	5,60	13,34	79,31	95,26	52,25	46,91	60,95	55,01
Aldrin	0,71	3,58	7,70	11,37	14,57	19,07	13,45	23,80	21,21	19,76
Fipronil	-	-	10,79	5,18	102,91	97,92	66,21	52,48	84,16	95,35
α endos.	3,91	6,51	6,40	8,85	41,03	47,55	28,90	38,52	48,87	33,00
β endos.	3,76	8,02	7,28	6,77	45,23	61,83	37,74	43,91	52,47	39,81
Dieldrin	2,60	4,94	6,68	7,35	27,80	33,29	22,76	32,10	40,18	38,04
Endrin	3,44	4,85	6,74	7,14	44,19	48,05	29,29	36,70	47,25	48,55
DDT	0,48	3,66	5,96	3,46	8,61	14,75	12,72	19,79	21,43	19,16

temperatura, sendo muitas vezes necessário a adição de um modificador, para ajudar na eluição dos analitos, principalmente para compostos mais polares. BARNABAS et al. (op cit.) analisando compostos organoclorados obteve para lindano (γ BHC) recuperações variando de 65,3% a 88,5%, utilizando CO₂ na eluição dos analitos, temperatura de 50 °C e pressão de 250 Kg/cm, com valores de recuperação inferiores aos obtidos.

Segundo CHESTER; PINKSTON & RAYNIE (1996) o dióxido de carbono é o solvente preferido na extração com fluido supercrítico, mas este pode apresentar limitações de polaridade, necessitando a adição de co-solventes orgânicos (modificadores). ANDRADE (1995) aplicando a SFE na análise dos herbicidas ametrina, simazina, atrazina e trifluralina, observou que a adição de modificador aumenta os índices de recuperação, existindo uma porcentagem ideal.

As recuperações para os demais compostos foram baixas, necessitando alterar alguns parâmetros, tais como, temperatura, pressão, tempo de extração, para uma possível melhora, uma vez que trabalhos desenvolvidos no grupo, aplicando a extração com fluido supercrítico em diferentes matrizes, apresentaram excelentes resultados de recuperação. LEVY (op cit.) observou que um aumento de pressão a uma temperatura constante, ou um aumento da temperatura a uma pressão constante, melhora a extração.

Segundo PERES (1997) para melhorar a extração com fluido supercrítico, devemos considerar os parâmetros pressão, temperatura e tempo de extração. Quando aplicou a SFE – CO₂ modo estático, as recuperações foram baixas, variando de 9 a 30 %, indicando ineficiência do processo nas condições utilizadas, quando aplicou SFE – CO₂ modo dinâmico obteve bons valores de recuperação, variando de 63% para BHC a 98% para β endossulfan.

ANDRADE (op cit.) analisando produtos derivados da cana-de-açúcar (caldo, aguardente e açúcar), observou que a SFE superou a extração convencional, em relação aos índices de recuperação, precisão das recuperações, rapidez do processo, e principalmente diminuição do descarte de solvente, gerando economia e colaborando na conservação do meio ambiente.

DÓREA (1999) aplicando LLE, SPE e SFE na análise de compostos organofosforados em frutas, obteve para SPE e SFE resultados de recuperação na faixa de 80 a 120%. Concluiu que SFE é o método com menos etapas de extração, implicando em maior simplicidade, maior rapidez, menor contaminação/erros, consome menos reagentes, menor custo por amostra.

SARGENTI & McNAIR (1998) comparando diferentes técnicas de extração na análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na água potável, observaram que a SFE apresenta menor exposição a solventes, menos etapas e tempo para preparo da amostra, quando a matriz é colocada diretamente na cela de extração.

A **Figura 19** apresenta o cromatograma do extrato obtido através da SFE para os compostos analisados por cromatografia gasosa.

Figura 19: Cromatograma de uma mistura de agrotóxicos em água, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, analisados por cromatografia gasosa, empregando-se a extração com fluido supercrítico (SFE), suporte sólido C_{18} e CO_2 como eluente. Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

1.4 – Tratamento estatístico dos resultados

1.4.1 – Linearidade

O método do padrão externo foi usado para quantificar os analitos, com uma curva analítica de quatro pontos para cada pesticida, calculados nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$, injetando 5 vezes a mistura de padrões para cada concentração e, aplicando-se o Método de Regressão Linear. A equação da reta para a calibração usando os compostos estudados é apresentada na **Tabela 10**. Os coeficientes de correlação r foram todos superiores a 0,99 (próximo de um), indicando que o detector responde bem às concentrações analisadas, sendo linear na faixa de interesse.

Tabela 10: Resultados obtidos na calibração dos padrões e análise de regressão linear para os compostos analisados por cromatografia gasosa.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da reta*	Coefficiente de correlação (r)
α BHC	0,1 – 1,0	$6,49 \cdot 10^5 \cdot X - 9,79 \cdot 10^3$	0,99978
β BHC	0,1 – 1,0	$2,06 \cdot 10^6 \cdot X - 1,95 \cdot 10^4$	0,99949
γ BHC	0,1 – 1,0	$7,25 \cdot 10^5 \cdot X - 1,27 \cdot 10^4$	0,99985
Aldrin	0,1 – 1,0	$4,44 \cdot 10^6 \cdot X + 4,13 \cdot 10^4$	0,99850
α endossulfan	0,1 – 1,0	$3,76 \cdot X + 1,29 \cdot 10^5$	0,99757
β endossulfan	0,1 – 1,0	$2,66 \cdot X + 6,43 \cdot 10^4$	0,99864
Dieldrin	0,1 – 1,0	$3,86 \cdot 10^6 \cdot X + 3,06 \cdot 10^5$	0,99862
Endrin	0,1 – 1,0	$2,46 \cdot 10^6 \cdot X + 2,30 \cdot 10^5$	0,99153
DDT	0,1 – 1,0	$2,15 \cdot 10^5 \cdot X + 5,18 \cdot 10^4$	0,99530
Fipronil	0,1 – 1,0	$1,86 \cdot X + 8,14 \cdot 10^4$	0,99877

* $Y = A + B \cdot X$ (Y = área do pico; X = concentração em $\mu\text{g/mL}$)

1.4.2 – Cálculo do desvio padrão (S) e do coeficiente de variação (CV)

Após estabelecer as melhores condições de extração para os compostos estudados, calculou-se o desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) para o método desenvolvido.

Na extração líquido-líquido (LLE) calculou-se S e CV empregando-se os solventes: hexano e diclorometano; na extração em fase sólida utilizando o adsorvente C18, condicionado com acetato de etila ou metanol, e na extração com fluido supercrítico utilizando o adsorvente C18, e CO₂ no estado supercrítico mais modificador acetona na eluição dos analitos (**Tabela 11**).

Segundo o GARP – Grupo de Analista de Resíduos de Pesticidas e a ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal (1997), os valores aceitáveis de coeficiente de variação estão em torno de $\pm 15\%$. Os melhores resultados foram obtidos com a SPE, com valores compreendidos entre 1,85 e 16,08%, com exceção para os compostos aldrin e DDT, com valores de coeficiente de variação acima de 30%. Já para a USEPA (2000), os valores aceitáveis de coeficiente de variação estão em torno de $\pm 30\%$.

Tabela 11: Valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e extração com fluido supercrítico (SFE), n = 4.

Agrotóxico	LLE				SPE				SFE	
	Hexano		Diclorometano		C18		C18		C18	
					C- acetato E - acetato		C - metanol E - acetato		C - acetato E-CO ₂ +acetona	
	S	CV (%)	S	CV (%)	S	CV (%)	S	CV (%)	S	CV (%)
α BHC	0,83	1,38	9,05	12,15	10,64	11,85	2,84	3,03	16,29	19,09
β BHC	6,38	9,00	14,57	17,88	7,80	8,06	1,83	1,85	15,50	15,98
γ BHC	3,59	4,61	14,51	17,58	3,13	3,28	4,29	4,13	16,79	17,63
aldrin	7,12	22,22	8,30	32,50	4,30	30,41	5,10	44,24	5,37	28,18
α endossulfan	14,86	21,03	17,64	18,00	11,62	15,00	14,85	16,08	8,11	17,05
β endossulfan	9,03	12,68	15,38	17,32	12,00	14,00	13,42	15,20	2,11	3,42
dieldrin	14,25	20,94	16,99	18,09	5,38	8,59	15,11	16,00	4,75	14,30
endrin	7,64	12,10	17,02	19,4	9,66	11,27	11,00	13,50	5,13	10,68
DDT	11,31	23,68	19,57	36,27	6,29	32,13	13,67	40,13	3,04	20,61
fipronil	5,31	6,92	8,72	7,71	7,94	7,77	2,19	2,34	0,53	0,54

C – condicionamento

E - eluição

1.4.3 – Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Calculou-se o limite de detecção (LOD) multiplicando-se o valor médio do ruído por três (LEITE, op cit.).

altura média do ruído = 1,4 mm

limite de detecção = $3 \times 1,4 = 4,2$ mm

O valor do limite de quantificação (LOQ) corresponde a dez vezes o valor médio do ruído (CHASIN et al., op cit.).

limite de quantificação = $10 \times 1,4 = 14$ mm

A **Tabela 12** apresenta os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para os compostos estudados.

Tabela 12 : Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), para os compostos estudados.

Agrotóxico	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
α BHC	20	65
β BHC	5	16
γ BHC	15	50
aldrin	0,5	1,7
α endossulfan	1	3,5
β endossulfan	5	16
dieldrin	1	3,5
endrin	5	16
DDT	5	16
fipronil	1	3,5

2- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PADRÕES ANALÍTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Os compostos analisados por cromatografia líquida pertencem à classe herbicida, sendo amplamente empregados na cultura da cana-de-açúcar. A **Figura 20** apresenta o cromatograma obtido através da injeção dos padrões tebuthiuron, hexazinona e diuron, na concentração de 1 µg/mL. A análise foi feita utilizando como fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de água, fluxo de 1 mL/min e detecção em comprimento de onda de 254 nm. Já para os padrões 2,4 D e ametrina (**Figura 21**) utilizou-se as mesmas condições acima citadas, sendo os compostos detectados no comprimento de onda de 238 nm. A **Tabela 13** ilustra o tempo de retenção típico dos padrões estudados.

Figura 20: Cromatograma dos padrões tebuthiuron, hexazinona e diuron em água, na concentração de $1\mu\text{g/mL}$. $\lambda = 254\text{ nm}$, fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min. , coluna RP-8 Supelco ($250\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$).

Figura 21: Cromatograma dos padrões 2,4 D e ametryn em água, concentração de 1 µg/mL. $\lambda = 238$ nm, fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H₂O, fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 µm).

Tabela 13: Tempo de retenção típico dos padrões estudados.

Agrotóxico	Tempo de retenção (minutos)
2,4 D	2,19
Tebuthiuron	5,37
Hexazinona	6,04
Diuron	11,22
Ametrina	24,66

2.1 – Recuperação dos agrotóxicos analisados por HPLC através da extração em fase sólida (SPE)

Na extração em fase sólida (SPE) testou-se vários suportes sólidos incluindo, C₁₈, florisil, alumina e sílica, os quais variam na polaridade. Também avaliou-se vários solventes para condicionamento e eluição dos analitos, hexano (apolar), acetonitrila (moderadamente polar) e metanol (polar), nas seguintes combinações:

condicionamento	eluição
10 mL hexano + 10 mL água	20 mL hexano
10 mL acetonitrila + 10 mL água	20 mL acetonitrila
10 mL metanol + 10 mL água	20 mL metanol

A **Tabela 14** apresenta os valores de recuperação obtidos quando aplicou-se a extração em fase sólida para os compostos analisados por cromatografia líquida.

A **Figura 22** apresenta o cromatograma obtido através da extração em fase sólida, para os compostos tebuthiuron, hexazinona e diuron, e a **Figura 23** apresenta o cromatograma para os compostos 2,4 D e ametrina.

Tabela 14 : Recuperação dos agrotóxicos analisados por cromatografia líquida, através da extração em fase sólida.

Agrotóxico	Recuperação (%)							
	C18			Florisil			sílica	alumina
	C-E hexano	C-E acetonitrila	C-E metanol	C-E hexano	C-E acetonitrila	C-E metanol		
Ametrina	45,00	102,80	98,00	47,00	80,59	82,00	08,78	01,96
Tebuthiuron	22,29	103,97	100,07	57,08	84,85	80,78	05,98	-
Hexazinona	64,87	98,09	92,24	187,71	77,36	68,87	07,79	-
Diuron	38,79	102,68	95,61	132,00	88,47	76,86	05,18	-
Ácido 2,4D	22,00	101,20	91,60	-	-	-	02,30	-

- = não recuperou

C = condicionamento

E=eluição

Figura 22: Cromatograma do extrato obtido por extração em fase sólida (SPE), para os compostos tebuthiuron, hexazinona e diuron, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, em água. $\lambda = 254 \text{ nm}$, fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min. , coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 μm).

Figura 23: Cromatograma do extrato obtido por extração em fase sólida (SPE), para os compostos 2,4 D e ametrina, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, em água. $\lambda = 238 \text{ nm}$, fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 μm).

Os melhores valores de recuperação para os compostos ametrina, tebuthiuron, hexazinona, diuron e 2,4 D foram obtidos quando utilizou-se C₁₈ como suporte sólido, empregando-se acetonitrila ou metanol no condicionamento da fase estacionária e eluição dos compostos, valores próximos a 100%. As recuperações variaram de 98,09% para hexazinona a 103,97% para tebuthiuron, utilizando o solvente acetonitrila, e de 91,60% para 2,4 D a 100,07% para tebuthiuron, empregando o solvente metanol.

BALINOVA (1993) utilizando C₁₈ como suporte sólido, obteve para 2,4 D valores de recuperação compreendidos entre 72,30 a 102,80%.

A maior parte da literatura a respeito da análise do composto 2,4 D é empregando a técnica cromatografia gasosa, mas o mesmo necessita ser derivatizado, aumentando os riscos de perdas e contaminação. GÖKMEN & ACAR (1996) ao analisar 2,4 D em amostras de tomate através da HPLC, encontrou problemas na separação do composto devido a presença de interferentes, mas concluiu que para matrizes mais simples, tal como a água, a HPLC pode ser muito conveniente.

2.2 – Recuperação dos agrotóxicos analisados por HPLC através da extração líquido-líquido (LLE)

Na extração líquido-líquido testou-se os solventes hexano e diclorometano na eluição dos analitos da matriz água. As melhores recuperações obteve-se empregando o solvente diclorometano, com rendimentos compreendidos entre 94,32% para ametrina a 95,84% para hexazinona (**Tabela 15**).

Tabela 15: Recuperação dos compostos analisados por cromatografia líquida, através da extração líquido-líquido.

Agrotóxico	Recuperação (%)	
	Hexano	Diclorometano
Tebuthiuron	29,35	95,70
Hexazinona	-	95,84
Diuron	57,51	94,51
2,4 D	20,27	95,11
Ametrina	79,25	94,32

- não recuperou

2.3 - Recuperação dos agrotóxicos através da extração com fluido supercrítico (SFE)

Na extração com fluido supercrítico (SFE) testou-se os suportes sólidos C₁₈ e florisil na adsorção dos analitos, CO₂ no estado supercrítico mais modificador acetonitrila na eluição. Os valores de recuperação foram baixos para os dois suportes sólidos testados, mesmo com a adição de modificador (**Tabela 16**), necessitando otimizar a metodologia de extração.

Tabela 16: Recuperação dos compostos analisados por cromatografia líquida, através da extração com fluido supercrítico (SFE), utilizando adsorvente.

Agrotóxico	Recuperação (%)		
	C ₁₈ CO ₂	C ₁₈ CO ₂ + acetonitrila	Florisil CO ₂
Tebuthiuron	8,18	39,93	29,11
Hexazinona	-	27,95	-
Diuron	55,06	56,88	49,75
2,4 D	16,48	58,14	10,71
Ametrina	5,72	-	150,19

- não recuperou

2.4 – Tratamento estatístico dos resultados

2.4.1 – Linearidade

O método do padrão externo foi usado para quantificar os analitos, com uma curva analítica de quatro pontos para cada pesticida, calculados nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$, injetando 5 vezes a mistura de padrões para cada concentração, aplicando o Método de Regressão Linear. A equação da reta para a calibração usando os compostos estudados é apresentada na **Tabela 17**. Os coeficientes de correlação r foram todos superiores a 0,99; indicando que o detector responde bem às concentrações injetadas.

Tabela 17: Curvas de calibração com análise de regressão linear para os compostos analisados por cromatografia líquida.

Agrotóxico	Concentração (µg/mL)	Equação da reta*	Coefficiente de correlação (r)
Tebuthiuron	0,1 – 1,0	$3,03.10^5.X + 1,45.10^4$	0,99934
Hexazinona	0,1 – 1,0	$2,17.10^5.X + 5,99.10^3$	0,99841
Diuron	0,1 – 1,0	$2,39.10^5.X - 4,01.10^3$	0,99971
2,4 D	0,1 – 1,0	$2,50.10^5.X - 8,71.10^3$	0,99897
Ametrina	0,1 – 1,0	$2,28.10^5.X + 6,32.10^3$	0,99702

* $Y = A + B.X$ (Y = área do pico; X = concentração em µg/mL)

2.4.2 – Cálculo do desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV)

Após estabelecer as melhores condições de extração para os compostos estudados, calculou-se o desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) para o método desenvolvido.

Na extração líquido-líquido (LLE) calculou-se S e CV empregando-se o solvente diclorometano e na extração em fase sólida utilizando o adsorvente C18, condicionado com acetonitrila (Tabela 18). Os valores de desvio padrão e coeficiente de variação foram bons para todos os compostos estudados, os valores abaixo de 15% (GARP & ANDEF, 1997).

Tabela 18: Valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE), n = 4.

Agrotóxico	LLE		SPE	
	Diclorometano		C18	
			C – E acetonitrila	
	S	CV (%)	S	CV (%)
Ametrina	4,02	4,26	0,26	0,25
Ácido 2,4 D	4,34	4,57	13,30	13,14
Tebuthiuron	0,72	0,75	6,26	6,02
Hexazinona	0,44	0,46	4,58	4,67
Diuron	0,82	0,86	1,41	1,37

2.4.3 – Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Calculou-se o limite de detecção (LOD) multiplicando-se o valor médio do ruído por três (LEITE, op cit.).

altura média do ruído = 4 mm

limite de detecção = $3 \times 4 = 12$ mm

O valor do limite de quantificação (LOQ) corresponde a dez vezes o valor médio do ruído (CHASIN et al., op cit.).

limite de quantificação = $10 \times 4 = 40$ mm

A **Tabela 19** apresenta os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para os compostos estudados.

Tabela 19: Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Agrotóxico	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Ametrina	30	100
Ácido 2,4 D	25	85
Tebuthiuron	10	35
Hexazinona	15	50
Diuron	20	65

3 – CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.1 – Confirmação da identidade dos padrões de agrotóxicos por espectrometria de massas

Os analitos estudados pertencem à classe dos compostos organoclorados, BHC (α , β e γ); aldrin; endossulfan (α e β); dieldrin; endrin; DDT, sendo incluído na análise o inseticida fipronil.

Foram injetados os padrões de agrotóxicos no CGC – MSD, e os espectros de massas obtidos foram comparados com a biblioteca do sistema GC/MS QP 5000, que contém o banco de dados NIST, o qual coincide com a literatura (Ministry of Public Health, 1996).

Operou-se o detector seletivo de massas no modo SCAN, o qual permite a detecção dos referidos compostos até o limite de 1 $\mu\text{g/mL}$ (ppm), injetando os padrões individualmente. Pode-se detectar quantidades inferiores a esta, selecionando-se os íons característicos de cada um dos compostos, os quais são apresentados na **Tabela 20**.

O cromatograma do íon selecionado (SIM) para a mistura de padrões é apresentado na **Figura 24**, na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 20 : Ions selecionados para cada analito analisado (m/z), com o respectivo tempo de retenção (tr), obtidos através do fragmentograma de cada composto.

Agrotóxico	tr (min)	m/z
BHC	13,75	147; 181* ; 219
aldrin	17,68	263* ; 265; 293
endossulfan	20,27	237; 337; 339*
dieldrin	21,15	263; 277* ; 380
endrin	21,89	243; 263; 345*
DDT	23,63	165; 199; 235*
fipronil	19,20	351; 367* ; 420

* íons selecionados para o modo SIM

Figura 24: Cromatograma do íon total (aquisição em SIM) por CGC – MSD para os compostos: 1 = α BHC ($m/z = 181$); 2 = β BHC ($m/z = 181$); 3 = γ BHC ($m/z = 181$); 4 = aldrin ($m/z = 263$); 5 = fipronil ($m/z = 367$); 6 = α endossulfan ($m/z = 339$); 7 = dieldrin ($m/z = 277$); 8 = endrin ($m/z = 345$); 9 = β endossulfan ($m/z = 339$); 10 = DDT ($m/z = 235$).

4 – ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA

As amostras de água foram coletadas nas represas de captação de água dos rios que abastecem a cidade de Araraquara, Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól.

A **Tabela 21** apresenta os parâmetros químicos, medidos nas três represas de captação de água: temperatura (°C), pH, condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), turbidez (ntu) e oxigênio dissolvido (mg/L), para estação seca (inverno) e chuvosa (verão).

Os três ambientes estudados apresentaram temperaturas mais altas no período de chuva; valores de pHs ácido (características dos rios da região) e altos valores de oxigênio dissolvido, principalmente no período de seca (acima de $8,0 \text{ mg}/\text{L}$), provavelmente pela ocorrência de chuva e vento no dia anterior, levando à oxigenação da coluna d'água. Valores elevados de condutividade elétrica e turbidez foram observados no Ribeirão das Cruzes devido, provavelmente, a grande quantidade de material carreado para o rio pela chuva, apresentando a água coloração bastante avermelhada, principalmente no período de seca.

Para os compostos analisados tanto por cromatografia líquida quanto gasosa, aplicou-se as técnicas de extração líquido-líquido (LLE) e em fase sólida (SPE), empregando-se o método desenvolvido.

As **Figuras 25 e 26** apresentam os cromatogramas obtidos através da extração em fase sólida, para os compostos analisados por cromatografia gasosa, nos períodos de seca e chuva, respectivamente.

A **Figura 27** apresenta os cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa, através da extração em fase sólida, de amostra real de água do Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os agrotóxicos BHC, aldrin, fipronil, endossulfan,

Tabela 21: Parâmetros químicos medidos nas represas de captação de água, no período de seca e de chuva.

Represa	Temperatura		pH		Condutividade		Turbidez		Oxigênio dissolvido	
	seca	chuva	seca	chuva	seca	chuva	seca	chuva	seca	chuva
Rib. Cruzes	20,8	25,0	6,5	6,1	43	49	52	26	10,4	7,6
Rib. Anhumas	21,4	24,1	6,3	6,0	36	34	10	3	8,2	6,7
Cor. Paiól	20,4	24,2	5,9	5,9	34	31	10	13	8,5	5,6

dieldrin, endrin e DDT, e água preparada em sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos.

As **Figuras 28 e 29** apresentam os cromatogramas obtidos através da extração em fase sólida, para os compostos analisados por cromatografia líquida, comprimento de onda de 254 nm, nos períodos de seca e de chuva, respectivamente, e as **Figuras 30 e 31** mostram os cromatogramas obtidos através da extração em fase sólida, comprimento de onda de 238 nm, período de seca e chuva, respectivamente.

A **Figura 32** apresenta os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida, através da extração em fase sólida, de amostra real de água do Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os padrões 2,4 D; tebuthiuron, hexazinona; diuron e ametrina, comprimento de onda de 254 nm e 238 nm, e água preparada em sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos, comprimento de onda de 238 nm.

Visto que os extratos obtidos através da extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, período de seca (inverno), apresentaram compostos com tempo de retenção similar

aos agrotóxicos β BHC, aldrin e DDT (**Figura 25**), fez-se necessário a identificação dos mesmos.

A **Figura 33** apresenta os cromatogramas obtidos por GC – MSD, modo SIM, dos extratos de amostras reais de água, monitorando-se os íons selecionados dos padrões β BHC, aldrin e DDT, concluindo que não se trata dos referidos compostos.

Figura 25 : Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de seca. S = acetato de etila; 1 = composto com tempo de retenção (tr) = β BHC; 2 = composto com tr = aldrin; 3 = composto com tr = DDT. Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

Figura 26 : Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de chuva. S = acetato de etila.

Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 ° C - 4 ° C/min - 290 ° C.

Figura 27: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, através da técnica de extração em fase sólida, de amostra real de água do Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os padrões analíticos (A), e água peparada em sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos (B).

Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), detector por captura de elétrons (ECD), temperatura do forno: 140 °C - 4 °C/min - 290 °C.

Figura 28 : Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento de onda de 254 nm, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de seca. S = acetonitrila. Fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H₂O, fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 µm).

Figura 29: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento de onda de 254 nm, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de chuva. S = acetonitrila. Fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 μm).

Figura 30: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento de onda de 238 nm, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de seca. S = acetonitrila. Fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H₂O, fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 µm).

Figura 31: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, comprimento de onda de 238 nm, através da técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), no período de chuva. S = acetonitrila. Fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 μm).

Figura 32: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, através da técnica de extração em fase sólida, de amostra real de água do Ribeirão das Anhumas, enriquecida com os padrões analíticos, $\lambda = 254$ nm (A) e $\lambda = 238$ nm (B), e água preparada em sistema milli-Q, na ausência de agrotóxicos (C). S = acetonitrila; 1 = 2,4 D; 2 = tebuthiuron; 3 = hexazinona; 4 = diuron; 5 = ametrina. Fase móvel 28% de acetonitrila + 72% de H_2O , fluxo de 1 mL/min., coluna RP – 8 Supelco (250 mm x 4 mm x 5 μm).

Figura 33: Cromatograma dos extratos obtidos através da extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão das Cruzes (A), Ribeirão das Anhumas (B) e Córrego do Paiól (C), analisadas por GC – MSD, no período de seca. Coluna capilar de sílica fundida (LM-5), temperatura do forno: 140 ° C (3min) - 6° C/min – 280 ° C (1 min)

CONCLUSÕES

1 - COMPOSTOS ANALISADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

- Na extração líquido-líquido (LLE) não houve grandes diferenças nos valores de recuperação empregando-se os solventes hexano ou diclorometano;
- Melhores rendimentos na extração em fase sólida (SPE) obteve-se empregando C18 como suporte sólido, e acetato de etila ou metanol no condicionamento da fase e acetato de etila na eluição dos analitos;
- Necessidade em otimizar a técnica de extração com fluido supercrítico, utilizando adsorvente ou direto da matriz água, visto que os rendimentos foram baixos, mesmo com a adição de modificador. Esta técnica apresenta vantagens sobre as demais, uma que consome menos reagentes, reduzindo portanto os custos por amostra, apresenta menos etapa de extração, levando a uma maior simplicidade e rapidez.

- Dentre as três técnicas de extração avaliadas, melhores resultados foram conseguidos com a extração em fase sólida (SPE), apresentando vantagens sobre a técnica convencional, por ser menos laboriosa e mais eficiente.
- Não foram detectados nenhum dos compostos analisados por cromatografia gasosa (BHC, aldrin, endossulfan, dieldrin, endrin, DDT e fipronil), nas amostras de água coletadas no Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, no período de seca e de chuva. O uso de GC/MS mostrou-se de extrema importância na confirmação de que os suspeitos com características e tempo de retenção dos compostos-alvo eram outros compostos.

2 - COMPOSTOS ANALISADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

- Na extração líquido-líquido (LLE) os melhores valores de recuperação foram obtidos utilizando o solvente diclorometano;
- Os melhores rendimentos na extração em fase sólida (SPE) foram obtidos empregando-se C₁₈ como suporte sólido, e o solvente acetonitrila no condicionamento da fase e eluição dos analitos;

- Na extração com fluido supercrítico (SFE) os rendimentos foram baixos para os dois suportes sólidos testados (C18 ou florisil), mesmo adicionando-se modificador, necessitando a otimização da técnica de extração;
- Dentre as três técnicas avaliadas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com fluido supercrítico, as melhores recuperações foram obtidas com as extrações líquido-líquido e em fase sólida;
- Não foram detectados nenhum dos compostos analisados por cromatografia líquida (tebuthiuron, hexazinona, diuron, ácido 2,4 D e ametrina), nas amostras de água coletadas no Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól, nos períodos de seca e de chuva.

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimização da técnica de extração com fluido supercrítico direta de amostras aquosas ou utilizando um adsorvente, para agrotóxicos empregados na lavoura da cana-de-açúcar e organoclorados;
- Aplicar a microextração em fase sólida para os compostos analisados por cromatografia gasosa;
- Ampliar a classe de compostos organoclorados estudados;
- Aplicar a outros mananciais a metodologia de análise estabelecida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANIS, T. A. & HELA, D. G. (1995) Multi-residue pesticide analysis in environmental water samples using solid-phase extraction discs and gas chromatography with flame thermionic and mass-selective detection. J. Chromatogr. A, 707, 283-292.
- ALDERS, L. (1992) Liquid – liquid extraction - Theory and laboratory and experiments Amsterdam, Elsevier Publishing Company.
- ALVES, C. (1998) Extração com fluido supercrítico de amostras aquosas de interesse ambiental. Monografia, Laboratório de Cromatografia, IQSC – USP. 56p.
- ANDRADE, R. M. B. (1995) Determinação de resíduos de herbicidas em derivados da cana-de-açúcar através de métodos analíticos de alta resolução (SFE, HRGC, GC/MS). São Carlos, tese de doutorado, IQSC – USP. 151p.
- BALINOVA, A. (1993) Solid-phase estraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. J. Chromatogr., 643, 203-207.
- BATISTA, G. C. (1996) Agricultural uses of pesticides in Latin america, IUPAC – GARP, workshop on pesticides, uses and environmental safety in Latin America (book of abstracts), São Paulo – SP. 15p.

- BARNABAS, I. J.; DEAN, J. R.; HITCHEN, S. M. & OWEN, S. P. (1994) Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides from an aqueous matrix. J. Chromatogr. A, 665, 307- 315.
- BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A A ; HAWTHORNE, S. B.; LANGENFELD, J. J.; MILLER, D. J. & ROBINSON, R. J. (1990) Supercritical Fluids, 3 (3): 143-149.
- BARTLE, K. D.; BODDINGTON, T.; PORTER, N. L. & COTTON, N. J. (1991) Supercritical fluid extraction and chromatography for the determination of oligomers in Poly (ethylene terephthalate) films. Anal. Chem., 63, 2371-2377.
- BENGTSSON, S. & RAMBERG, A. (1995) Solid-phase extraction of pesticides from surface water using bulk sorbents. J. Chromatogr. Sci, 33, 554-556.
- BIZIUK, M. & PRZYJAZNY, A. (1996) Methods of isolation and determination of volatile organohalogen compounds in natural and treated waters. J. Chromatography A, 733, 417-448.
- BOTT, T. R. (1982) Chem. and Ind., 12, 394-396.
- BROUWER, E. R.; KOFMAN, S. & BRINKMAN, U. A. Th. (1995) Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. J. Chromatogr. A, 703, 167-190.
- CAMEL, V.; TAMBUTÉ, A. & CLAUDEL, M. (1992) Analisis, 20 (9), 503-528.
- CAIRNS, Jr. J. ; DICKSON, K. L. & MAKI, A. W. (1978) Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life. Philadelphia, American Society for Testing and Materials. 471p.
- CAIRNS, Jr. J. (1980) Estimating hazard. Bioscience, 30 (2), 101-107.

- CATI (2000) – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral . Distribuição da cultura da cana – de – açúcar.
<http://www.cati.sp.gov.br/lupa/culturas/cana.html>.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1987) Técnica de abastecimento e tratamento de água. V. 1 – Abastecimento de água, São Paulo.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1993) Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Série documentos, São Paulo. 225p.
- CHAGAS, C. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. ; OLIVEIRA, T. T. & NAGEM, T. J. (1999) Determinação de resíduos de organoclorados em águas fluviais do município de Viçosa – MG. Quim. nova, 22 (4), 506-508.
- CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M. & SALVADOR, M. C. (1994) Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. Rev. Farm. Bioquim., 30, (2), 49 – 53.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R. & SALCEDO, S. (1998) Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Rev. Bras. Toxicol. 11, 1-6.
- CHAU, S. Y. & AFGHAN, B. K. (1977) Analysis of pesticides in water. Vol. I. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida.
- CHEE, K. K.; WONG, M. K. & LEE, H. K. (1996) Determination of organochlorine pesticides in water by membranous solid-phase extraction, and in sediment by

- microwave – assisted solvent extraction with gas chromatography and electron – capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **736**, 211-218.
- CHESTER, T. L.; PINKSTON, J. D. & RAYNE, D. E. (1996) Supercritical fluid chromatography and extraction. *Anal. Chem.*, **68**, 487-514.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. (1990) Introdução a métodos cromatográficos. Editora Unicamp.
- DE SÁ, O. R. (1993) O peixe como bio-indicador da contaminação ambiental: Avaliação da toxicidade de agrotóxicos. São Carlos, dissertação de mestrado. EESC – USP. 187p.
- Di BERNARDO, L. (1993) Métodos e técnicas de tratamento de água. V. I. Rio de Janeiro – ABES. 496p.
- DÓREA, H. S. (1999) Análise multirresíduo de pesticidas organofosforados e piretróides em frutas por CGC, após extração com fluido supercrítico, comparação com LLE, SPE e MSPD. São Carlos, tese de doutorado, IQSC – USP. 214p.
- EMBRAPA (2000) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Impacto ambiental das atividades agrícolas. <http://www.cnpm.embrapa.br/projetos/cana/espec.html>.
- EPA – Agência de Proteção Ambiental. 608 method. Application notes rapid extraction of organochlorine pesticides from potable water. Phillipsburg, J. T. Baker Chemical Corporation, s. a. 1- 13 (apostila).
- FONT, G.; MAÑES, J.; MOLTÓ, J. C. & PICÓ, Y. (1993) Solid-phase extraction in multiresidue pesticide analysis of water. *J. Chromatogr.*, **642**, 135-161.

- GALHIANE, M. S. (1996) Cromatografia líquida em micro escala (μ -LC) teoria, instrumentação e aplicações. São Carlos, tese de doutorado, IQSC – USP. 131p.
- GARP & ANDEF (1997) Roteiro para validação de metodologia analítica visando a determinação de resíduos de pesticidas. Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura, versão 1.
- GÖKMEN, V. & ACAR, J. (1996) A study on the possibility of using HPLC for the determination of 2,4 D in tomatoes. J. liq. chrom. & rel. technol., 19 (12), 1917 – 1926.
- GONÇALVES, D.; WAL, E. & ALMEIDA, R. R. (1985) Química orgânica experimental. Curitiba – PR, Barddal Ltda, 255p.
- GONÇALVES, J. A. (1995) JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO. Agrotóxicos.
- GRAY, N. F. (1994) Drinking water quality. Problems and solutions. Trinity College, University of Dublin, Ireland, John Wiley & Sons. 315p.
- GREEN, R. E. (1974) Pesticide clay-water interactions. In: Pesticides in soil & water. GVENZI, W. D. (editor). Madison, SSSA, 3-37.
- GROSSER, Z. A.; RYAN, J. F. & DONG, M. W. (1993) Environmental chromatographic methods and regulations in the United States of America. J. Chromatogr., 642: 75 – 87.
- HATRÍK, S. & TEKEL, J. (1996) Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. J. Chromatography A, 733, 217-233.
- HAWTHORNE, S. B. (1990) Analytical – scale supercritical fluid extraction. Anal. chem., 62, (11), 633 – 642.

HEDNICK, J. L.; MULCAHEY, L. J. & TAYLOR, L. J. (1992) Supercritical fluid extraction. Mikrochim Acta, 108, 115-32.

JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO (2000) Quanto o país gasta com agrotóxicos. SINDAG.

LANÇAS, F. M.; GALHIANE, M. S. & BARBIRATO, M.A. (1994) Supercritical fluid extraction of oxadixyl from food crops. Chromatographia, 39, 11-14.

LANÇAS, F. M. (1986) Rev. Quim. Ind., 55 (646), 37.

LANÇAS, F. M. (1993) Cromatografia em fase gasosa. São Carlos - SP, Acta, 240p

LANÇAS, F. M. (1997) Extração em fase sólida. São Carlos, Monografia, Laboratório de Cromatografia, IQSC / USP. 53p.

LARA, W. H. & BATISTA, G. C. (1992) Pesticidas. Quim. nova, 15 (2), 161-166.

LEE, C. M. (1980) Aquatic toxicity seminar: curso. São Paulo. Cetesb.

LEITE, F. (1996) Validação em análise química. Campinas, editora átomo LTDA. 64p.

LEVY, J. M. (1995) Supercritical fluid extraction of phenoxy acids from water. J. High Resol. Chromatogr., 18, 446-448.

LISKA, I.; KRUPCIK, J. & LECLERQ, P. A. (1989) The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices – a review of solid – phase extraction techniques. J. High Resolution Chromatography, 12(9), 577-590.

LISKA, I. & SLOBODNÍK, J. (1996) Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. J. Chromatogr. A, 733, 235-258.

- LUCHINI, L. C. (1995) Degradação do inseticida paration etílico em diversas matrizes ambientais ("GAMA") do cobalto 60. São Carlos, Dissertação de mestrado, IQSC – USP. 124p.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. & TENA, M. T. (1994) Analytical supercritical fluid extraction. Berlin, Springer – Verlag, 321p.
- MAJORS, R. E. (1986) Sample preparation for HPLC and Gas Chromatography using solid-phase extraction. LC - GC, 4, 972-984.
- ✓ MAJORS, R. E. (1998) A review of modern solid-phase extraction. LC - GC, S8 – S15.
- MARQUIS, J. K. (1986) Contemporary issues in pesticide toxicology and pharmacology. Boston, Mass, V. 2. Series editor: F. Homburger, Cambridge, Mass. 108p.
- McNAIR, H. M.; GALHIANE, M. S. & LANÇAS, F. M. (1985) Rev. Quim. Ind., 54 (643) 301-306.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1987) Métodos de análise e informações técnicas. Centro de Pesquisa e Processamento de alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, V. 1 e 2.
- MINISTRY OF PUBLIC HEALTH (1996) Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs. Welfare and sport. The Netherlands. Part I, 8p.
- MOL, H. G. J.; JANSSEN, H. G.; CRAMERS, C. A.; VREULS, J. J. & BRINKMAN, U. A. T. (1995) Tracer level analysis of micropollutants in aqueous samples using gas chromatography with on-line sample enrichment and large volume injection. J. Chromatogr. A, 703: 277-307.

- MULLISON, R. W. (1970) Effects of herbicides on water and its inhabitants. Weed Sci., 18 (6).
- PAULING, L. (1960) The nature of the chemical bond. New York, Cornell University Press, Ithaca.
- PEREIRA, D. N.; GOLDSTEIN, E. G.; ZAGATTO, P. A. & SASSI, R. (1987) Bioensaios: um programa a serviço do controle da poluição. Resultados iniciais. Ambiente, 1(1): 32-36.
- PERES, R. G. (1997) Extração (LLE, SPE, SFE) e análise cromatográfica de pesticidas organoclorados em água. São Carlos, dissertação de mestrado, IQSC – USP. 99p.
- POLTRONIERI, L. C. (2000) O mapa paulista dos agrotóxicos. <http://www.unesp.br/noticia/main15.html>.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. (1985) Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications. Washington USA, Hemisphere Publishing. 666p.
- RAO, P. S. C.; MANSELL, R. S.; BALDWIN, L. B. & LAURENT, M. F. (1983) Pesticides and their behaviour in soil and water. Soil Sci Fact. Sheet, SL 40.
- RICHARDS, M. & CAMPELL (1991) LC-GC Intl, 4 (7), 33-36.
- SARGENTI, S. R. & McNAIR, H. M. (1998) Comparasion of solid-phase extraction and supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water. J. Microcol. Sep., 10, (1), 125-131.
- TAN, G. H. (1992) Comparison of solvent extraction and solid-phase extraction for the determination of organochlorine pesticide residues in water. Analyst, 117, 1129-1132.

- TOLOSA, I.; READMAN, J. W. & MEE, L. D. (1996) Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. J. Chromatogr. A, 725, 93-106.
- US-EPA (2000). J. Microcol. Sep., 12 (3) 125.
- VANOORT, R. W.; CHERVET, J. P.; LINGEMAN, H.; JONG, G. J. & BRINKMAN, U. A.T. (1990) Coupling of supercritical fluid extraction with chromatographic techines. J. Chromatogr., 505, 45-77.
- VIDAL, L. H. (1991) Otimização da análise de pesticidas clorados na presença de PCBs em sistemas aquáticos. São Carlos, tese de mestrado, IQSC/USP. 110p.
- WENDY, C. Q.; JEPSON, I. & FOWLIS, I. A. (1997) Simultaneous quantitation of sixteen organochlorine pesticides in drinking waters using automated solid-phase extraction, high-volume injection, high-resolution gas chromatography. J. Chromatogr. A, 773, 271-276.
- WILLIANS, Jr. F. P. & AKIN, E. W. (1986) Waterborne viral gastroenteritis. JAWWA, V. 78, nº1: 34-39.
- WORKSHOP (1999) Controle de resíduos de pesticidas em alimentos – modelo europeu, GARP, Workshop (book of abstracts), Araraquara, SP.
- ZAMBRONE, F. A. D. (1986) Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Ciência Hoje, 4 (22): 42 – 48.
- ZAGATTO, P.A.(1993)Avaliação de risco para homologar agrotóxicos. Ambiente, 7 (1):23-28.
- ZIEF, M. & KISER, R. - J. T. (1982) Baker Inc -. Solid phase extraction sample preparation.

ZWEIG, G. & SHERMA, J. (1972) Handbook of chromatography. Cleveland CRC Press, vol. II. 191p.