UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Grazielle de Campos Anaia

**Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC
no contexto de exposição ocupacional**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

06/03/2014

Grazielle de Campos Anaia

DETERMINAÇÃO MULTIRRESIDUAL DE PESTICIDAS POR
HPLC NO CONTEXTO DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2014

Grazielle de Campos Anaia

Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC no contexto de exposição ocupacional

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de doutor em
Química Analítica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Aos meus pais, irmãos e avós dedico.

Agradecimentos

À professora Marina pela recepção, orientação e projeto de pesquisa desenvolvido em seu laboratório.

Ao professor João P. S. Farah pela convivência e discussão em assuntos importantes desta tese.

A todos, Aline Klassen, Aline Vitor, Claudinei, Daniel Polesel, Daniel Rossado, Edgar, Gisele, Karina, Lucas, Maryane e Tatiane por estes anos de convivência pacífica. E aos recém-chegados ao laboratório, Maicon, Pedro, Fábio, Andrea e Lorraine. Aos amigos Érica, Harold, Ricardo e Mariana.

Ao Dr. Amadeu Hoshi Iglesias da Waters pelo treinamento no UPLC-MS/MS.

Ao Dr. Rafael Lanaro e ao Prof. Dr. Ângelo Zanaga Trape pelo fornecimento de amostras do laboratório de Análises Toxicológicas da UNICAMP.

Ao professor Dr. Claudio Di Vitta pela orientação equilibrada e formativa no PAE.

Aos funcionários do Instituto de Química da USP.

À Fapesp pela bolsa concedida.

Resumo

Anaia, G. C., **Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC no contexto de exposição ocupacional**. 2014. 104 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós – Graduação em Química Analítica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um método para determinação de praguicidas das classes organofosforados, carbamatos, triazinas e ureias por HPLC-MS/MS em urina de pessoas expostas em decorrência de atividades agrícolas é proposto neste trabalho. O modo de eluição isocrática e gradiente em cromatografia líquida de fase reversa com a coluna Synergi Max RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m) foram experimentados para a separação dos componentes da amostra. O modo isocrático de eluição nas condições 45:55, 60:40 e 70:30 de ACN/água foram insuficientes para eluição dos componentes da amostra com fatores de retenção aceitáveis entre 0,5 e 20. Em modo gradiente, os efeitos do tempo de gradiente (30 a 100 min), a concentração inicial de ACN (8 a 14%), vazão da fase móvel (0,5 a 1,0 mL min⁻¹) e temperatura (30 a 40 °C) foram verificados para aumento de resolução e diminuição do tempo de análise. Em composições distintas de fase móvel (ACN/água), o logaritmo dos fatores de retenção foi colocado em gráfico em função da acidez (α) e a basicidade (β) da ligação de H, constante dielétrica (ϵ) e parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ_H). Dimetoato e metomil tiveram comportamentos diferenciados, ambos explicados pelas ligações de H intramoleculares. Através de um planejamento fatorial completo de dois níveis, usando-se as funções COF e CRS como resposta, variáveis como vazão da fase móvel, tempo de gradiente, concentração inicial de ACN e temperatura foram investigados. A melhor resposta experimental forneceu como condições de análise: 0,5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min e 5% de ACN, para vazão, temperatura, tempo de gradiente e concentração inicial de ACN, respectivamente. Em um sistema LC-MS/MS usando o *ion trap* como analizador de massas, a infusão direta dos padrões de praguicidas, para conhecimento

do pico do íon molecular e das transições MS/MS, foi estudada. Experimentos de quantificação em UPLC-MS/MS foram baseados na separação em fase reversa com a coluna ACQUITY UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 μm), espectrômetro de massas equipado com analisador de massas triplo quadrupolo e modo positivo de ionização. Transições MRM de quantificação e de confirmação foram monitoradas para cada praguicida. O método apresentou respostas lineares no intervalo de 0,25 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os praguicidas com coeficiente de determinação maiores que 0,999. O LD do método variou de 0,192 a 3,19 $\mu\text{g L}^{-1}$. O LQ do método variou entre 0,582 e 13,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de variação inferior a 20% CV. As recuperações em amostras fortificadas em 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 55,7 e 72,6% e a precisão em termos de %CV entre 1,94 e 19,1%. As recuperações em amostras fortificadas em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 99,1 a 105% e a precisão entre 0,751 e 8,98% CV. As recuperações em amostras fortificadas em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 99,5 a 101% e a precisão entre 0,877 e 5,94% CV. Das 25 amostras quantificadas, 13 apresentaram concentrações dos praguicidas na faixa linear da curva de calibração. Estes valores de concentração variaram entre 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras chaves: praguicidas, multirresíduo, exposição ocupacional, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massas (MS)

Abstract

Anaia, G. C., **Multiresidue pesticide analysis by HPLC in the occupational exposure context**. 2014. 104 p. PhD Thesis – PostGraduate Program in Analytical Chemistry. Institute of Chemistry. University of Sao Paulo, Sao Paulo.

In this work a method for determination of different chemical groups of pesticides (organophosphorus, carbamates, triazines, organochlorine and ureas) is proposed using HPLC-MS/MS in samples from occupational exposed agriculture workers. Isocratic and gradient elution in reversed-phase chromatography using a Synergi Max RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m) column were investigated for separation proposal. Isocratic elution conditions 45:55, 60:40, 70:30 ACN/water provided unsatisfactory results with retention factor from 0.5 to 20. In gradient elution, effects of gradient time (30 to 100 min), initial concentration of ACN (8 to 14%), flow rate (0.5 to 1 mL min⁻¹) and temperature (30 to 40 °C) were studied for increasing resolution and decreasing analysis time. For different proportion of ACN in the mobile phase, the logarithm of retention factor has been plotted against solvent hydrogen-bond donor (α), solvent hydrogen-bond acceptor (β), dielectric constant (ϵ) and Hildebrand solubility (δ_H). Dimethoate and methomyl presented different behaviour in relation to others, explained by H intramolecular bond. Applying a two level experimental design having as response functions COF and CRS, combined factors such as flow rate, gradient time, ACN initial concentration and temperature were investigated. Optimal conditions were obtained in 0.5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min e 5% CAN, for flow rate, temperature, gradient time and ACN initial concentration, respectively. Applying a LC-MS/MS system equipped with an ion trap mass analyzer, direct infusion of standard solutions of pesticides for knowledge of ion molecular peak and their MRM transitions was obtained. Quantitative experiments using UPLC-MS/MS were based in reversed-phase separation with a Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 μ m) column, mass spectrometry instrument equipped with

triple quadrupole mass analyzer at positive ion polarity. Quantifying and confirming ion transitions were monitored for each pesticide compound. Linearity in range of 0.25 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ was established for all pesticides with high coefficients determination R^2 0.999 were obtained. The method LOD varied between 0.192 to 3.19 $\mu\text{g L}^{-1}$. LOQ varied from 0.582 to 13.6 $\mu\text{g L}^{-1}$, with coefficient variation below 20% CV. Recoveries for samples spiked at 0.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration level varied from 55.7 to 72.6% and precision in terms of CV between 1.94 and 19.1% CV. Spiked samples at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration level varied from 99.1 to 105% and precision between 0.751 and 8.98% CV. Recoveries for samples spiked at 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration level varied from 99.5 to 101% and precision from 0.877 to 5.94% CV. From 25 samples quantified, 13 presented concentration values in linear range of the calibration curve. These values varied from 10 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Key words: pesticides, occupational exposure, high performance liquid chromatography (HPLC), multiresidual, mass spectrometry (MS)

Sumário

1. Introdução	11
1.1 História dos praguicidas	11
1.1.1 <i>Classificação dos praguicidas</i>	13
1.2 A realidade brasileira frente aos agrotóxicos e lavouras	20
1.2.1 <i>Exposição ocupacional</i>	24
1.3 Métodos de análise	25
1.4 QSRR.....	31
1.5 O planejamento experimental aplicado em HPLC.....	33
2. Objetivos	37
3. Materiais e métodos	38
3.1 Soluções analíticas	38
3.2 Amostra	38
3.3 Método LC-MS/MS	39
3.4 Método UHPLC-MS/MS.....	40
3.5 Validação do método	40
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1 Eluição no modo isocrático	43
4.2 Efeito do solvente	48
4.3 Modo gradiente de eluição	57
4.3.1 <i>Efeito da vazão</i>	57
4.3.2 <i>Efeito da temperatura</i>	59
4.3.3 <i>Efeito do tempo de gradiente</i>	60
4.3.4 <i>Efeito da concentração inicial</i>	64
4.4 Planejamento Fatorial	66
4.5 Espectrometria de massas	76
4.5.1 <i>Método HPLC-MS/MS</i>	76
4.5.2 <i>Método UHPLC-MS/MS</i>	85
4.6 Validação do método	89
5. Conclusões	95
6. Referências bibliográficas	98

1. Introdução

1.1 História dos praguicidas

Seja pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)¹ ou pela *Environmental Protection Agency* (EPA)², o termo praguicida é definido como uma substância usada para controlar, matar ou prevenir qualquer praga animal, microbiológica ou herbal. A legislação brasileira segundo a lei federal nº 7802/89 de uma maneira mais elaborada, considera o termo praguicidas ou agrotóxicos e afins como agentes físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos, e substâncias como também os produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.³

A linha do tempo histórica de utilização de praguicidas iniciou-se na antiguidade, com as civilizações que registraram o uso de substâncias capazes de impedirem danos às atividades agrícolas. Há aproximadamente 3000 anos a.C., os povos antigos gregos e romanos exploraram o uso dos elementos enxofre e arsênio como praguicidas, pela percepção de suas potencialidade no combate a ervas daninhas e insetos em suas colheitas. Outros elementos tóxicos como o Hg e Pb tiveram a sua importância no decorrer da evolução agrícola a fim de prevenir pragas.⁴ Com as mesmas potencialidades dos elementos químicos e igualmente aplicados, os praguicidas de origem natural como a piretrina, presente nas folhas do crisântemo (*Chrysanthemum cinerarifolium*) e a nicotina, encontrada nas folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*), portadoras do sulfato de nicotina, foram satisfatoriamente aplicadas aos interesses da

sociedade da época.⁵ De grande relevância no passado, e ainda hoje, os praguicidas naturais vem atraindo a atenção dos pesquisadores como um substituto aos agrotóxicos sintéticos.⁶

O grande salto histórico na utilização de praguicidas ocorreu no século XIX, com o compostos inorgânicos verde de Paris (acetoarsenito de cobre)⁷ e o fungicida calda bordaleza nos Estados Unidos e Europa. Inicialmente utilizado como pigmento em formulações de tintas, o verde de Paris foi banido devido ao efeito tóxico causado aos pintores da época. Mais tarde, foi então revelada a propriedade inseticida deste composto. Foi intensamente utilizado no combate ao escaravelho da batata.⁸

Um dos primeiros praguicidas na classificação de substâncias orgânicas sintéticas ocorreu com o advento do DDT (diclorodifeniltricloroetano), com os experimentos do bioquímico alemão Othmar Zeidler em 1874, no primeiro momento sem propriedade claramente elucidada. O suíço Paul Müller, em 1930, provou a eficácia do DDT, como potente praguicida para diversos insetos. As primeiras aplicações deste praguicida se iniciaram na Segunda Guerra Mundial para a erradicação do mosquito transmissor da malária, tifo e febre amarela. Sem qualquer cuidado, a substância era pulverizada direta e descontroladamente em diversos lugares e até sobre as pessoas com vistas ao impedimento da proliferação do mosquito transmissor. Com o uso desmedido, os primeiros sintomas de intoxicação começaram a se manifestar no final da década de 60. Apareciam então as primeiras complicações congênitas, de infertilidade e de doenças hepáticas. Os graves problemas apontavam as propriedades cumulativas deste composto no ambiente, em função de sua lipossolubilidade. A preocupação em relação aos danos causados pelo DDT levou à sua substituição. Um novo pensamento mundial é concebido com a publicação em 1969 do famoso livro *Silent Spring*, da pesquisadora americana Rachel Carson. O livro denunciava, com fortes depoimentos, o uso abusivo e a periculosidade do

organoclorado DDT. As autoridades acataram as denúncias e em 1970, os clorados DDT, lindano e BHC (hexabenzeno de cloro) foram imediatamente proibidos. Os primeiros países a se posicionarem mediante esta decisão foram a Noruega e a Suécia, seguidas dos Estados Unidos em 1972. Embora fosse tamanha a preocupação com a sua aplicação, os organoclorados tiveram papel relevante na melhoria da qualidade de vida da população, em razão de campanhas divulgadas de combate à malária e controle de outras 50 pragas nocivas à saúde.⁹

A utilização de praguicidas no Brasil ocorreu no período entre guerras. Os organoclorados BHC e DDT e o fosforado Parathion foram introduzidos em campanhas de saúde pública, para controle de pragas transmissoras de doenças e mosquitos. A demanda crescente do uso destes agentes consolidou a indústria nacional de formulação no início dos anos 50. Na década de 70 visando o aumento de produtividade agrícola e a melhoria da qualidade do produto, o governo brasileiro incentivava, através do Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), o uso de agrotóxicos, o que resultou na larga utilização destes agentes. Enquanto nos Estados Unidos e na comunidade europeia a medida proibitiva fora tomada na década de 70, o posicionamento brasileiro de proibição ao uso do DDT aconteceu tardiamente, em 1992.

1.1.1 Classificação dos praguicidas

Em termos gerais, praguicida é classificado de acordo com o tipo de praga o qual se deseja o controle. O termo compreende a classificação de herbicidas, fungicidas, inseticidas, e classes menores, como os acaricidas, algicidas, nematocidas, molusquicidas, fumigantes, rodenticidas, entre outros.^{10,11} O Ministério da Saúde faz a classificação em relação à toxicidade com base na DL50 oral (mg kg⁻¹), nas formulações líquidas e sólidas. Por exigência legal, a indicação da toxicidade está

associada à cor do rótulo ilustrada na embalagem do produto.¹² A Tabela 1 apresenta a classificação.

Tabela 1: Classificação dos praguicidas quanto à toxicidade.

Classe	Toxicidade	Cor da faixa
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente tóxico	Amarela
III	Medianamente tóxico	Azul
IV	Praticamente não-tóxico	Verde

- Organofosforados

O aparecimento dos compostos organofosforados ocorreu em 1820 quando Lassaigne realizou a esterificação do ácido fosfórico. A sucessão na investigação destes compostos ao longo do tempo prossegue com Thnard, Michaelis e Arbuzov, e alcança o ápice com o descobrimento de suas propriedades inseticidas, em 1930. O uso efetivo dos compostos de fósforo ocorreu em razão de campanhas de proibição de alguns organoclorados, substituindo-os. Os organofosforados, de degradação mais rápida em relação aos compostos de cloro, tiveram importância como inseticida alternativo em diversas aplicações.

Dentro desta classe química, estes compostos se distribuem em subclassificações, dependendo dos átomos que estão diretamente ligados ao fósforo. Dentre estas subclasses estão os fosforotioatos (P duplamente ligado ao S), representados pela diazinona e pirazofós. Os fosforoditioato (uma ligação simples e uma dupla entre P e S) representados pelo azinfos-metil, fosalona e dimetoato. Os fosforoamidotioato (ligação simples entre S ou N e o átomo de P), representados estruturalmente pelo metamidofós e acefato.¹³

A magnitude da persistência depende das características estruturais dos compostos. O espectro de atuação dos organofosforados é amplo e seus efeitos

nocivos não se limitam apenas aos insetos, mas igualmente aos mamíferos. A toxicidade se relaciona aos mamíferos por causa da interferência na atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina, em colina e ácido acético. Mecanicamente, a inibição ocorre pela fosforilação da enzima acetilcolinesterase. A acetilcolina é a substância neurotransmissora que controla a transmissão dos impulsos nervosos. A inibição da acetilcolinesterase ocasiona a acumulação excessiva da acetilcolina na sinapse nervosa e neuromuscular. A repetição desse desequilíbrio descontrola a transmissão dos impulsos elétricos resultando na forte contração muscular e paralisia. Embora a inibição da acetilcolinesterase seja o efeito toxicológico mais pronunciado dos fosforados, outros sistemas de enzimas e tecidos são igualmente alvos locais de ação destes inseticidas.¹⁴

Os organofosforados são agentes absorvidos pela pele, mucosas orais, conjuntiva e vias gastrointestinal e respiratória. A severidade e duração do envenenamento são determinadas por fatores como dosagem, via de exposição, propriedades físico-químicas do organofosforado, metabolismo e velocidade do mecanismo de ação.¹⁵ Os organofosforados alvos deste trabalho são pirazofós, azinfos-metil, metamidofós, acefato, dimetoato, fosadona e diazinona, cujas estruturas estão organizadas na Figura 1.

Pirazofós

Azinfos-metil

Metamidofós

Figura 1: Praguicidas organofosforados.

- Organoclorados

Os organoclorados são tipicamente compostos orgânicos densamente substituídos por átomos de Cl, em estruturas alifáticas ou em anéis aromáticos. Com este arranjo estrutural, os organoclorados destacam-se nas características de lipossolubilidade, pressão de vapor significativa e elevada estabilidade. Esse quadro reflete na dificuldade de degradação convergindo para a persistência ambiental e propagação da contaminação para outros locais distantes de onde efetivamente se iniciou a aplicação.¹⁶ A eficiência como inseticida está associada à estrutura molecular que, por sua vez, determinarão os efeitos biológicos e toxicológicos.¹⁷

Os organoclorados atuam no sistema nervoso central alterando a normalidade da transmissão nervosa, através da alteração das propriedades da membrana das células nervosas. As desregulações na cinética do transporte de K^+ e Na^+ resultam em interferência na transmissão dos impulsos elétricos, mudanças na atividade muscular, distúrbios sensoriais e respiratórios. Em contato com o organismo, os praguicidas clorados se acumulam nos tecidos adiposos do corpo, tais como o cérebro, abdômen e

fígado. Assim, efeitos neurotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos são desencadeados pelas exposições aos organoclorados.^{18,19} Apresentam-se neste trabalho os praguicidas dicofol, endrim, aldrim e 4,4-DDE, organizados na Figura 2.

Figura 2: Praguicidas organoclorados.

- Ureias

Linurom e diurom são herbicidas da classe das fenilureias, desenvolvidas logo após a Segunda Guerra Mundial.²⁰ Dentre as fenilureias aplicadas neste trabalho, estruturalmente apresentam-se as N-metoxi-N-metil substituídas (linurom) e as N,N-dimetil substituídas (diurom), ambas na Figura 3.

As ureias atuam no bloqueio do transporte de elétrons, inibindo a fotossíntese. No ciclo fotossintético atuam na primeira membrana dos tecidos vegetais (plasmalema) onde acontece todo o processo.²¹

Diurom

linurom

Figura 3: Praguicidas ureias.

- Triazinas

Os herbicidas triazinas são compostos estruturalmente formados por anéis heterocíclicos de 6 membros, com átomos de N dispostos simetricamente. A estabilidade química e a persistência das triazinas ou de seus produtos de degradação contribuem para a contaminação ambiental.²² As propriedades físico-químicas e nomenclaturas das triazinas se distinguem de acordo com a substituição na posição 2 do anel. Os compostos simazina e propazina possuem a nomenclatura com a terminação azina, pela substituição do átomo de cloro na posição 2. A mesma posição de substituição ocorre com a ametrina, pelo grupo tiometil (SCH_3) no anel heterocíclico, daí a terminação da nomenclatura em trina.²³ Os herbicidas triazinas atuam inibindo o transporte eletrônico fotossintético. O processo de inicia na raiz da planta através da absorção, se liga à aceptora plastoquinona, transportadora da cadeia eletrônica.²³ O resultado da interrupção do processo fotossintético é o amarelamento, precedido da morte das folhas. As triazinas são não carcinogênicas, são de toxicidade baixa a moderada, porém são indutoras de efeitos tóxicos no fígado, em exposições extremas ou prolongadas. Neste trabalho, as triazinas estão representadas pela simazina, propazina e ametrina (Figura 4).

Figura 4: Praguicidas triazinas.

- Carbamatos

Os carbamatos são praguicidas derivados do ácido N-metilcarbâmico, estruturalmente possuindo em comum o grupo -NH(CO)O- . Segundo Santos²⁴, a primeira menção de um carbamato, popularmente conhecido como eserina, ocorreu em 1925, com a descoberta deste princípio ativo presentes nas sementes de Calabar (*Physostigma venenosum*). Funcionalmente, apresentam amplo espectro de atuação como inseticidas, fungicidas e herbicidas. O mecanismo de ação é semelhante ao dos organofosforados, diferenciando-se pela inibição reversível da acetilcolinesterase.²⁵ A

Figura 5 apresenta os carbamatos considerados neste trabalho.

Figura 5: Praguicidas carbamatos.

1.1 A realidade brasileira frente aos agrotóxicos e lavouras

O Brasil possui um dos maiores mercados de agrotóxicos do mundo. Na classificação mundial, o país ocupa a 6^a posição como importador de formulações.²⁶ O mercado lucrativo movimenta um montante de R\$11 bilhões de reais ao ano.²⁷ Estima-se a existência de cerca de 300 princípios ativos e 2000 formulações comerciais diferentes no mercado nacional.²⁸ A ocupação brasileira no uso e comercialização de praguicidas se deve às extensas áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da agricultura.

Atualmente, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) reavalia, do ponto de vista toxicológico, a utilização de alguns ingredientes ativos em agrotóxicos, no que se refere aos riscos à saúde. Estão nesta lista o acefato, carbofurano e metamidofós, inclusos neste trabalho.

Em 2009, a ANVISA publicou nota apontando a proibição imediata de acefato nas culturas de amendoim, batata, brócolis, citros, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, feijão, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa e tomate. O acefato só se aplicará às culturas de algodão e soja até outubro de 2013. A ANVISA recomendou a proibição do acefato para fins domésticos e em jardinagem. A preocupação do uso do carbofurano ocorre por problemas de toxicidade aguda e desregulação endócrina. É definitivamente proibido na comunidade europeia e Estados Unidos. Em janeiro de

2011, a ANVISA publicou a retirada do metamidofós do mercado brasileiro e, em julho de 2012 a agência decidiu resolutamente pela proibição da comercialização da substância. Os estudos toxicológicos revelam que o metamidofós é um agente de toxicidade aguda, causador de problemas no sistema reprodutor, endócrino e neurológico do corpo humano.²⁹ Utilizado como inseticida nas culturas de algodão, batata, feijão e tomate, o metamidofós já é proibido na China, Japão e Comunidade Europeia.³⁰

Em outubro de 2012, a ANVISA anunciou a proibição da comercialização do carbamato aldicarbe, o principal princípio ativo do raticida popularmente conhecido como chumbinho, vendido ilegalmente. O motivo da proibição do aldicarbe no mercado brasileiro se deve ao elevado índice de intoxicações humanas (quase 60% dos 8 mil casos de intoxicações, segundo as estimativas da ANVISA). Até então, este carbamato estava entre os ingredientes ativos mais tóxicos permitidos no Brasil. Com os cancelamentos na ANVISA e no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) estão proibidas a comercialização, produção e aplicação de qualquer agrotóxico constituindo de aldicarbe.³¹

O consumo de agrotóxicos nos estados brasileiros difere quanto ao tipo e extensão das práticas agrícolas. As regiões sudeste e sul são as que mais aplicam agrotóxicos em todo o país.³² A Tabela 2 relaciona a cultura ao praguicida autorizado de aplicação. As informações foram encontradas nas monografias autorizadas no portal da ANVISA.

Continuação da Tabela 2.

Metomil	Pirazofós	Fosalona	Simazina
			Abacaxi
tomate			
			Seringueira
trigo	Trigo		
	Abóbora		
algodão			
			Banana
batata			
brócolis			
			Café
			Cana
			Citros
	crisântemo	jardinagem amadora	
	Maçã		Maçã
	Melão		
milho			Milho
repolho			
	Rosa		
	Pepino		

Fonte: Monografias autorizadas. Portal da ANVISA. Acesso em janeiro de 2013.

1.2.1 Exposição ocupacional

Em razão da lucratividade da atividade agrícola e do consumo da sociedade, exigências de qualidade e quantidade na produtividade agrícola de alimentos e matérias-primas obrigam o uso de praguicidas no controle de agentes nocivos que possam interferir no desenvolvimento das atividades humanas. A demanda elevada e o uso desorientado destes agentes de impacto negativo resultam na poluição ambiental³³ e riscos potenciais à saúde humana^{34,35}. A forma de exposição humana a praguicidas ocorre por vários caminhos: contato com o ambiente contaminado (ar^{36,37}, águas^{38,39}, solo^{40,41}) e ingestão de alimentos contaminados^{42,43}. Entretanto, se a exposição ocorre pelo manuseio destes agentes, em decorrência de atividades realizadas no ambiente de trabalho, esta exposição é especialmente denominada de ocupacional. A exposição ocupacional a praguicidas é direta, clara e evidente em trabalhadores do meio rural além de atingirem as populações circunvizinhas às áreas onde se praticam as atividades agrícolas. Há relatos de que a exposição a agrotóxicos e risco de intoxicação se agravam pela desinformação de trabalhadores, inocentes a respeito da periculosidade destas substâncias, manuseio das formulações, sem ou uso parcial de equipamentos de proteção individual (EPI), e a carência de orientação quanto ao uso dos equipamentos.⁴⁴ O risco de contaminação por praguicidas depende da toxicidade da substância, sua concentração, extensão da exposição e uso correto do tipo de equipamento utilizado no momento da aplicação⁴⁵.

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), em 2009, registrou 100391 casos de intoxicações humanas, sendo que 5,18% dos casos representam intoxicações ocorridas por agrotóxico. Segundo as informações fornecidas pelo SINITOX, 22,45% dos 5204 eventos ocorridos em 2009 são registros de casos de

intoxicações por circunstâncias ocupacionais. Em relação aos óbitos, 1,7% dos eventos ocorridos atribuem-se ao uso de agrotóxicos em circunstâncias ocupacionais⁴⁶.

O Ministério da Saúde no Brasil recomenda alguns cuidados de proteção individual para trabalhadores que manuseiam formulações de praguicidas⁴⁷.

Aconselham-se:

- ler e seguir rigorosamente as instruções dos rótulos
- não utilizar embalagens vazias
- não utilizar utensílios domésticos na mistura de produtos
- não fumar, beber ou comer enquanto estiver manuseando agrotóxicos
- após o trabalho, tomar banho com água corrente e sabão
- lavar diariamente as roupas e equipamentos utilizados durante o trabalho
- utilizar equipamentos de proteção individual (máscara, óculos, luvas, chapéu, botas, avental, calça e camisa de mangas compridas)

1.2 Métodos de análise

A determinação de diversas classes de praguicidas no contexto ocupacional tem sido extensamente explorada por Dana Barr *et al.*⁴⁸ A literatura técnica apresenta a determinação multirresidual de praguicidas por diferentes técnicas de separação, como a cromatografia a gás⁴⁹, eletroforese capilar^{50,51} e cromatografia a líquido⁵² equipadas com técnicas de detecção simples, como ultravioleta (UV) até os sofisticados espectrômetros de massas.

Aplicando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), Ueyama *et al.*⁵³ publicaram um método de análise de rotina de metabólitos de organofosforados, os dialquilfosfatos em amostras de urina humana. No método proposto foram alcançados LD baixos, entre 0,05 e 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$, adequados tanto para a

aplicações do ponto de vista ocupacional e não-ocupacional. Para eficiência do método, os autores incluíram uma etapa de derivatização com o clássico reagente pentafluorobenzilbrometo (PFBB_r). Etapas de derivatização comprometem a simplicidade do procedimento em aplicações de rotina. Raepfel *et al.*⁵⁴ derivatizaram 27 praguicidas termicamente instáveis de 20 diferentes classes químicas, com o agente N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluorocetamide (BSTFA). A esta derivatização ainda foi necessária a aplicação de outro agente derivatizante com etapas de aquecimento de duração de 3 h e agitação, para a medida apropriada dos 27 analitos por GC. As longas e tediosas etapas de derivatização necessárias em GC são as grandes desvantagens de empregar a técnica no desenvolvimento do método analítico de muitos praguicidas. Estas etapas devem fazer parte do procedimento experimental para tornar possível a análise por GC.

Com base nos relatos dos procedimentos experimentais dos artigos discutidos e outros encontrados na base de dados *Web of Science* (www.webofknowledge.com), a análise de praguicidas por GC embora bem difundida pelas inerentes características analíticas de sensibilidade e seletividade, limita-se em função das propriedades físico-químicas de muitos praguicidas, por possuírem volatilidade insuficiente para vaporização no injetor ou instabilidade térmica.

Em razão das limitações de GC, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é amplamente aplicada na determinação de praguicidas. Pela natureza não-específica do UV, poucos trabalhos são encontrados para a determinação multirresidual em amostras complexas como a urina. Hernández *et al.*⁵⁵ desenvolveram um método de extração em fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE), adsorvente do tipo ADS C₄, em linha com HPLC-arranjo de diodos (PDA) - detecção em 214 e 244 nm - para a determinação de herbicidas ureias e triazinas, inseticidas carbamatos e metabólitos, em amostras de urina humana. Os sistemas de pré-concentração em linha

agregam ao método características de mínimo manuseio da amostra, maiores seletividades, repetibilidade e a remoção eficiente de certos interferentes da matriz. A aplicação do sistema otimizado em linha utilizou um volume de amostra de 1500 μL . Limites de detecção na faixa de 1 e 10 ng mL^{-1} , precisão menor que 10% de coeficiente de variação no nível de 20 ng mL^{-1} e recuperações maiores que 85% foram obtidos para o método estabelecido.

Rosado-Consales *et al.*⁵⁶ elaboraram um método multirresidual em HPLC-PDA (detecção em 232 nm), para determinação de 6 herbicidas clorofenoxiacidos derivados em amostras de urina de voluntários ocupacionalmente expostos. Para a extração em fase sólida (SPE), os autores avaliaram os materiais RAM (*restricted-access material*) e as resinas troca iônica Oasis MCX e MAX, com recuperação entre 88 e 104% para os três materiais. O método apresentou LD baixo, de 3,5 a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para os herbicidas estudados. Nestes casos, o sucesso da análise de praguicidas por HPLC-PDA está vinculado ao procedimento de SPE com materiais altamente seletivos.

A análise direta de amostras sem tratamento prévio diminui a eficácia do método, quando a matriz contém interferentes. Diversas técnicas de tratamento de amostra com características distintas de desempenho são encontradas nos artigos científicos. Como exemplo, Lâchatre *et al.*⁵⁷ realizaram a extração líquido-líquido (LLE) como tratamento de amostra (urina humana) para a determinação de metabólitos de organofosforados (dialquilfosfatos). Neste procedimento, NaCl foi adicionado a 5 mL de amostra para efeito de *salting out*, o pH ajustado com HCl 6 mol L^{-1} e dietiléter foi usado como solvente extrator. Uma segunda extração com acetato de etila foi necessária para a análise cromatográfica. É comum caracterizar a LLE pelas desvantagens de consumo de solventes tóxicos, dificuldade de repetibilidade dos resultados, despendimento de tempo, formação de emulsão, como ineficiente para compostos que apresentam alguma solubilidade em água, entre outras. No entanto,

Lachâtre *et al.* superaram as limitações da LLE e otimizaram um procedimento que forneceu resultados confiáveis.

Extração em fase sólida foi definida por Tippins⁵⁸ como uma técnica de tratamento de amostra que utiliza colunas preenchidas com materiais de sílica funcionalizada, a fim de extrair espécies de interesse de amostras complexas. O tratamento de SPE fornece um extrato mais concentrado e limpo para a fase de análise instrumental. A seletividade e o tipo de mecanismo de extração da coluna diferem quanto à natureza do material de recheio. O material escolhido deve ter interações mais favoráveis com o analito, que será adsorvido em relação aos interferentes presentes na amostra, de modo a eliminá-los. Desta forma, o procedimento de extração é ajustado seletivamente considerando as propriedades inerentes dos analitos de interesse e dos outros componentes desinteressantes da amostra. A aplicação de SPE em análise multirresidual de praguicidas em amostras de urina está presente em diversos procedimentos experimentais na literatura. Em muitas delas, a tradicional sílica funcionalizada com C₁₈ extrai satisfatoriamente os componentes apolares presentes na urina. Utilizando uma coluna de SPE de 500 mg de C₁₈, Hernández *et al.*⁵⁹ avaliou a eficácia da acetonitrila, diclorometano, acetato de etila, metanol e metil-tert-butil-éter (MTBE) como eluentes extratores para 10 organofosforados, entre os quais se incluem o dimetoato, diazinona e azinfos-metil, todos em matriz de urina. Os resultados indicaram que MTBE forneceu as maiores recuperações. Experimentos de fortificação em dois níveis de concentração 10 e 200 ng mL⁻¹ forneceram recuperações entre 80 e 109%, com coeficientes de variação abaixo de 10%.

A SPE dos herbicidas triazinas atrazina, simazina, ametrina, prometrina e metabólitos foi realizada em matriz polimérica estireno divinil-benzeno (cartucho empacotado com SDB-1), por Drevenkar *et al.*⁶⁰ O cartucho foi condicionado com acetona e água e percolado com um volume de 5 mL de amostra pela coluna. A

acetona foi empregada como eluente. O extrato obtido foi evaporado sob corrente de N₂, e ressuspenso em água para a análise por HPLC-PDA. Cromatogramas de difícil interpretação resultaram da aplicação de água pura deionizada na etapa de lavagem do cartucho. A adição de 1% de acetonitrila em água otimizou a lavagem do material. Esta medida auxiliou a remoção de interferentes polares urinários e a aquisição de cromatogramas mais limpos de interferências e com picos melhor resolvidos. Recuperações de 78 a 101%, com coeficientes de variação de 10%, foram estimados para os experimentos.

A combinação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e da espectrometria de massas confere ao método níveis desejáveis de sensibilidade, seletividade, especificidade, rapidez de análise e possível eliminação de etapas prévias de tratamento da amostra. Um espectrômetro de massas é composto basicamente por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. Diferentes fontes de ionização na espectrometria de massas estão disponíveis e são baseadas no impacto de elétrons (EI), ionização química (CI), dessorção/ionização com laser auxiliado por matriz (MALDI), dessorção/ionização por *electrospray* (DESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), eletronebulização (ESI) entre outras. No entanto, para algumas fontes a incompatibilidade na transição dos analitos da fase líquida (HPLC) para a fase gasosa (MS) impedia o acoplamento entre os dois equipamentos.⁶¹ Tal incompatibilidade foi superada graças aos estudos de John Fenn *et al.* em 1989, que revolucionou o acoplamento com a ionização *electrospray* (ESI).⁶² Descrevendo simplistamente o mecanismo ESI, este transfere íons da solução para a fase gasosa. O capilar ao qual está aplicado um potencial elevado permite nebulizar a solução da amostra a uma névoa finamente dividida e carregada eletricamente. O solvente da gota evapora-se até atingir o limite de estabilidade de Rayleigh. Neste ponto, a repulsão eletrostática supera a tensão superficial e as gotas dividem-se em gotas cada vez

menores. De uma gotícula densamente carregada, íons são ejetados da solução da amostra para a fase gasosa.⁶³

No analisador de massas os íons são separados com base na relação massa carga, m/z . Estão disponíveis os analisadores de setor magnético, triplo quadrupolo, quadrupolo *ion trap*, tempo de voo (*time-of-flight*, TOF), ressonância de íon ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR) e os híbridos destes analisadores. Caracteristicamente variam em resolução e intervalo de massas. O arranjo destas características reflete no preço e dimensão dos equipamentos.

Métodos confiáveis, sensíveis e confirmatórios são requeridos para monitorar praguicidas em análises complexas. A determinação multirresidual de praguicidas em amostras biológicas ganha em seletividade e especificidade pela adição de dois estágios de filtros de massa MS/MS. No primeiro estágio, ocorre o isolamento de uma m/z do íon precursor entre os vários provenientes da fonte. O íon precursor é conduzido à câmara de colisão para a fragmentação, o que resulta nos íons produtos. O íon produto é analisado no segundo estágio MS do equipamento. As formas de aquisição do espectro de massas são o modo *full scan*, SIM (*single ion monitoring*) em um único estágio MS e MRM (*multiple reaction monitoring*) para dois estágios MS/MS. Um método em LC/MS no modo MRM é altamente seletivo porque a transição entre íon precursor e íon produto é registrada especificamente. Barr *et al.*⁶⁴ desenvolveram um método para a determinação de 6 metabólitos de herbicidas em amostras de urina de pessoas intensamente expostas, mas também com seletividade e sensibilidade suficientes para determiná-los em pessoas pouco expostas. O método HPLC-MS/MS foi desenvolvido utilizando o procedimento de extração em fase sólida com sorvente polimérico combinado com fases polares e apolares (Oasis HLB) e calibração por diluição isotópica para quantificação. Os limites de detecção variaram entre 0,036 a 0,075 $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.3 QSRR

O conhecimento das interações responsáveis por sua separação cromatográfica é uma informação quimiométrica pouco explorada na literatura. Estas interações ocorrentes entre soluto-solvente⁶⁵ são descritos pela relação quantitativa retenção-estrutura (QSRR, do inglês *quantitative structure-retention relationship*)⁶⁶ que estabelece uma relação linear entre uma constante de equilíbrio e um parâmetro solvatocrômico de Kamlet-Taft⁶⁷, descritores de solvente (α , V_x , ϵ , δ_H , β , π^*). Estes descritores consideram as diferentes interações entre um soluto e a fase móvel, estabelecidas no interior de uma coluna cromatográfica. Estas interações são determinantes na caracterização de retenção e seletividade da separação cromatográfica. Em cromatografia líquida, a extensão da retenção de um analito é medida em condições isocráticas através do fator de retenção (k), descrito pela Equação 1⁶⁸.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

onde k é o fator de retenção do analito, t_R (min) é o tempo de retenção do analito e t_M (min) o tempo de retardamento da fase móvel. O fator de retenção está relacionado com a constante de equilíbrio através da Equação 2⁶⁹.

$$k = K_0 \varphi \quad \text{Equação 2}$$

onde K_0 é o coeficiente de partição do soluto entre FM e FS, e φ , a razão entre os volumes de fases estacionária e móvel na cromatografia líquido-líquido.

No mecanismo de retenção, o coeficiente de partição do soluto, que representa sua transferência entre a fase móvel para a fase estacionária, está associada com a variação de energia livre de Gibbs (Equação 3)⁶⁹ que semelhantemente correlaciona-se aos descritores do solvente⁷⁰, como:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_0 \quad \text{Equação 3}$$

onde ΔG^0 é a energia livre de Gibbs, R , a constante universal dos gases, e T , a temperatura.

Uma das mais importantes QSRR é a proposta por Abraham baseado nos parâmetros solvatocrômicos de Kamlet-Taft (Equação 4)^{71,72}.

$$\log k = \log k_0 + m\delta_H + s\pi^* + a\alpha + b\beta \quad \text{Equação 4}$$

onde $\log k_0$ é o intercepto, m , s , a e b são os coeficientes obtidos pela regressão multivariada, δ_H , é o parâmetro de solubilidade de Hildebrand relacionado à cavitação do soluto no solvente, π^* , polaridade/polarizabilidade do soluto, α , acidez da ligação de H, e β , a basicidade da ligação de H.

1.4 O planejamento experimental aplicado em HPLC

O planejamento experimental consiste no uso de técnicas matemáticas e estatísticas para a modelagem de um experimento. Através do planejamento, um número pré-determinado de experimentos limitados a um espaço experimental é selecionado para a correlação entre uma resposta e variáveis. A realização de experimentos envolve de certa forma o conhecimento de diversas variáveis (ou fatores), de maior ou menor importância para o plano de estudo em questão. Em química analítica, em razão do rápido avanço tecnológico das técnicas instrumentais é possível a realização de experimentos com maior frequência analítica e um volume considerável de resultados. No entanto, o modo pelo qual ainda se realizam experimentos prossegue pelo caminho tradicional, de alterar uma variável por vez (método univariado, do fator único) até que um valor ótimo seja encontrado. Por sua vez, este valor é mantido fixo e a próxima variável é alterada, até que um novo valor ótimo de resposta seja encontrado. O grande problema na realização de experimentos pelo procedimento univariado é o desconhecimento a respeito da interação entre as variáveis, e de que o efeito de uma variável pode não ser independente do nível da(s) outra(s) variável(eis). O desenvolvimento do método pelo fator único não garante que a região ótima do método seja encontrada, podendo produzir resultados distantes do verdadeiro ótimo, pelo fato das variáveis serem analisadas separadamente, considerando que sempre tenham um comportamento independente uma das outras. Além disso, o grande número de experimentos efetuado em uma região pequena ou ampla demais de exploração das variáveis pode produzir resultados distantes do que seria ótimo considerado ótimo, além de uma perda significativa de tempo.

Alternativamente, uma maneira mais efetiva e científica de realizar experimentos é alcançada através dos planejamentos experimentais (método multivariado), pela

possibilidade de avaliação conjunta das variáveis. Desta maneira, o curso experimental que deverá ser seguido é concluído segura e efetivamente. De acordo com Singh *et al.*⁷³ os métodos multivariados fornecem informações sobre o comportamento do sistema e requerem poucos experimentos para se encontrar o ótimo; além disso, o conhecimento da importância de cada variável e suas interações entre si é esclarecido; é possível a avaliação da significância dos modelos ajustados pelos resultados de análise de variância, a previsão de resultados através dos modelos matemáticos ajustados, e também, uma redução significativa do tempo, custo de materiais, principalmente se reagentes caros ou de quantidade limitada são aplicados no procedimento experimental.

Em cromatografia líquida de alta eficiência pelo menos 15 variáveis podem ser listadas no processo de separação, podendo chegar a 50 se todas as etapas do procedimento experimental forem incluídas no planejamento.⁷⁴ A Figura 6⁷⁵, adaptada da literatura, ilustra a interação complexa que há entre variáveis cromatográficas e suas influências sobre as possíveis respostas do registro gráfico chamado cromatograma, em maior ou menor grau⁷⁶.

As variáveis experimentais são classificadas em contínuas (quantitativas) e discretas (qualitativas). As variáveis discretas estão associadas com decisões relacionadas ao desenvolvimento do método, enquanto que as contínuas são consideradas as relacionadas com as etapas de desenvolvimento da separação e otimização da separação em si.⁷⁷ Entre as variáveis discretas citam-se dimensões da coluna (comprimento, diâmetro), a natureza da fase estacionária (propriedades do suporte, tamanho de partícula, química da superfície), componentes da fase móvel e aditivos.

Figura 6: Diagrama de interação entre variáveis relacionadas à fase estacionária, fase móvel e respostas em HPLC. L-comprimento da coluna; d_p -diâmetro de partícula; u-vazão; T-temperatura; Φ_m -agentes modificadores, Φ_B -solvente orgânico, α_a -atividade do adsorvente, C-FE; N-eficiência da coluna; k-fator de retenção; η -viscosidade; R_s -resolução; ΔP -pressão; S-sensibilidade e t_a -tempo de análise. Adaptada da referência 75.

O desenvolvimento do método pela aplicação de técnicas multivariadas é dividido em etapas de triagem e de otimização. A etapa de triagem é avaliada por planejamentos fatoriais para verificação da significância de diversas variáveis.⁷⁸

Os planejamentos fatoriais completos e fracionários compreendem esta classe de modelos. Experimentos de triagem são efetuados para verificação da influência de todas as variáveis experimentais e suas interações sobre a resposta de interesse. No planejamento fatorial devem-se determinar quantas k variáveis são estudadas e em quantos n níveis serão alteradas as variáveis (n igual a 2 ou 3, para dois ou três níveis, respectivamente). Desta forma, o número de experimentos é obtido pelo resultado de n^k . Se os experimentos forem efetuados em 2 níveis (níveis alto (+) e nível baixo (-)), 2^k experimentos serão executados.^{79,80}

O modelo polinomial matemático $f(x)$ representa a relação entre a resposta e os fatores. Em planejamentos fatoriais, polinômios simples de primeira ordem são obtidos como apresentado na Equação 5.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \cdots + b_{N-1}x_{N-1} + b_Nx_N + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \cdots + b_{23}x_2x_3 + \cdots + b_{(N-1)}x_{N-1}x_N$$

Equação 5

onde y representa a resposta experimental estimada, b_0 é a resposta experimental média, os coeficientes b_1 a b_N são os efeitos principais dos fatores e a extensão a que estes afetam a resposta do método e os coeficientes b_{12} a $b_{(N-1)N}$ representam os termos de interação. Nos planejamentos de triagem, as replicatas no ponto central podem ser adicionadas à matriz de contrastes, como nível intermediário (0), para estimativa do erro e a significância dos coeficientes da equação modelada.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico em cromatógrafo a líquido para a separação de praguicidas de classes diferentes. O método foi desenvolvido utilizando detector convencional PDA para estudo do comportamento de retenção e influência de parâmetros cromatográficos na separação multirresíduo. Outro método foi desenvolvido em LC-MS/MS equipado com analisador de massa *ion trap* e triplo quadrupolo para fins de quantificação de amostras de urina de pessoas ocupacionalmente expostas da região de Campinas.

3. Materiais e métodos

3.1 Soluções analíticas

Padrões de praguicidas de aldicarbe-sulfona, aldicarbe, ametrina, azinfos-metil, carbaril, carbofurano, diazinona, dimetoato, diurom, linurom, mercaptodimetur, metomil, propazina, fosadona, dicofol, pirazofós, fosmete, 4,4-DDE, acefato, simazina, endrin e aldrin e metamidofós foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e isopropanol, todos grau HPLC foram adquiridos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). Água foi deionizada em um sistema Milli Q da Millipore (Bedford, EUA). A acetona foi obtida da Synth e os ácido fórmico e formiato de amônio foram obtidos da Fluka (Buchs, Suíça).

Soluções de trabalho a 1000 mg L⁻¹ foram preparadas pela pesagem de massas de 0,0100 g de padrões de cada praguicida e diluídas em metanol em balão volumétrico de 10 mL.

Balança analítica da Sartorius, deionizador Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA), vidrarias em geral e centrífuga foram os materiais necessários para preparação dos experimentos e soluções.

3.2 Amostra

As amostras de urina isentas de praguicidas foram coletadas de voluntários. Cerca de 25 amostras reais foram obtidas, a partir das coletas periódicas coordenadas pelo Prof. Dr. Ângelo Zanaga Trapé, de voluntários expostos ocupacionalmente a praguicidas. A precipitação de proteínas das amostras foi realizada com a mistura de solventes isopropanol/metanol (1:1, v/v) gelada. A mistura de solvente foi adicionada à amostra na proporção amostra/solvente (1:2, v/v). A mistura foi agitada em vórtex por 2

min, mantida a baixas temperaturas por 3 h, e seguida de centrifugação por 15 min. O sobrenadante foi removido e evaporado sob corrente de N₂.

3.3 Método LC-MS/MS

Os primeiros experimentos de separação cromatográfica foram conduzidos em cromatógrafo a líquido modelo Finnigan Surveyor da Thermo Scientific (San Jose, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos, amostrador automático e bombas quaternárias modelo Pump Plus. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna de fase reversa Synergi Max RP (150 x 4,6 mm, 4 µm) da Phenomenex (Torrance, EUA). As separações cromatográficas foram desenvolvidas em modos isocrático e gradiente, usando água e ACN como fase móvel, sendo o volume de injeção de 10 µL e vazão de 1 mL min⁻¹. A infusão direta foi realizada em um espectrômetro de massas *ion trap* LCQ Deca XP MAX da Thermo Scientific (San Jose, EUA). O instrumento foi operado em modo positivo utilizando a técnica de ionização *eletrospray*, ESI. As condições dos parâmetros de *tune* foram selecionadas pela infusão direta dos analitos a 1000 µg L⁻¹. Foram obtidas as transições MS/MS para todos os analitos em concentração de 1000 µg L⁻¹. Os experimentos de ajustes das condições resultaram em tensão do capilar 3 kV, temperatura do capilar de 300 °C, tensão no cone de 15 V e nitrogênio como gás de nebulização a 30 Arb. A pressão do gás de colisão He foi de 1 mTorr. As zonas de eluição do cromatograma foram divididas em janelas monitoradas usando a aquisição em *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Cada transição foi monitorada por 300 ms. A aquisição de dados foi realizada pelo *software* de operação Xcalibur 2.1.

3.4 Método UHPLC-MS/MS

Os experimentos de separação foram realizados em um sistema UPLC Xevo TSQ (Waters, EUA), usando uma coluna de fase reversa Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 μ m) (Waters, EUA). A eluição foi conduzida em modo gradiente com fase móvel A (formiato de amônio 5 mM/ácido fórmico 0,1%) e fase móvel B (MeOH + formiato de amônio 5 mM/ácido fórmico 0,1%). A rampa do gradiente foi de 5 a 95% B de 0 a 8,5 min, 95% B de 8,5 a 9 min, 95 a 5% B de 9 a 9,01 min e 5% B de 9,01 a 9,50 min. A separação ocorreu em 8,5 min e um tempo adicional de 1 min foi necessário para a limpeza e recondicionamento da coluna. Vazão de 0,490 mL min⁻¹, temperatura 40 °C e volume de injeção de 10 μ L foram as condições do método UPLC. Parâmetros da fonte ESI, transições MS/MS, energia de colisão e tensão no cone foram adquiridos para cada analito. Tensão do capilar 0,5 kV, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 550 °C, vazão de gás no cone 150 Lh⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação 900 Lh⁻¹ foram ajustados. Argônio na vazão de 0,18 mL min⁻¹ foi utilizado como gás de colisão. As zonas de eluição do cromatograma foram divididas em segmentos, sendo cada um monitorado para a transição MS/MS no modo MRM com *dwell time* de 0,02 s. Os dados foram adquiridos no *software* Mass Lynx 4.1.

3.5 Validação do método

O método foi validado de acordo com o protocolo de validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA. Para a curva analítica, as amostras de urina dos voluntários foram fortificadas a partir das soluções estoques dos padrões de praguicidas nas concentrações de 0,25, 0,75, 1,00, 5,00, 10,0, 25,0 e 50,0 μ g L⁻¹. A linearidade do método foi investigada com 7 concentrações diferentes no intervalo (0,25 a 50 μ g L⁻¹). O coeficiente de determinação (R^2), intercepto, coeficiente angular e

estatística F foram todos estimados pela regressão linear. As amostras reais foram diluídas 20 vezes em água deionizada. As injeções das soluções de calibração e amostras reais diluídas foram realizadas em sextuplicatas e duplicatas, respectivamente.

A seletividade do método foi avaliada por 2 transições MRM de cada composto e do tempo de retenção.

A precisão do método, como medida da proximidade dos resultados, foi estimada em 3 níveis de concentração, com alíquotas fortificadas e injetadas em sextuplicatas. As concentrações de 0,75, 10,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram os níveis baixo, médio e alto, respectivamente. A precisão foi estimada pelo coeficiente de variação (CV %), segundo a fórmula:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

O limite de detecção (LD) segundo o protocolo é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Foi estimado pelo desvio padrão do intercepto (0,25 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) e pelo coeficiente angular das seis curvas analíticas, de acordo com a equação:

$$LD = \frac{DP_a}{IC} \times 3$$

onde DP_a é o desvio padrão do intercepto da curva analítica e IC é a inclinação da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificado, com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Foi estimado pelo desvio padrão do intercepto

das seis curvas analíticas no intervalo 0,25 a 50 µg L⁻¹ e pelo coeficiente angular das curvas analíticas, de acordo com a equação:

$$LQ = \frac{DP_a}{IC} \times 10$$

onde DP_a e IC tem a mesma definição descrita em LD.

A exatidão de um método foi estimada em 3 níveis de concentração, com alíquotas fortificadas e injetadas em sextuplicatas. As concentrações de 0,75, 10,0 e 50,0 µg L⁻¹ foram os níveis baixo, médio e alto, respectivamente. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a fórmula:

$$exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

O efeito de matriz foi avaliado pela razão entre o coeficiente angular da curva analítica obtida pela fortificação em níveis de concentração conhecidos das soluções padrão dos praguicidas na matriz e em água. O efeito de matriz é isento quando o resultado da razão tem valor de 1.

4. Resultados e Discussão

4.1 Eluição no modo isocrático

As avaliações preliminares da separação dos praguicidas visaram o aprendizado e uma investigação qualitativa dos efeitos que modificam o perfil da separação, em modos de eluição isocrática e gradiente. Nos cromatogramas a seguir (Figura 7a e 7b) estão ilustrados os experimentos obtidos isocraticamente com composições binárias de fase móvel ACN:H₂O (70:30 e 60:40, v/v). Uma vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 30 °C foram fixados, em ambas as condições de fase móvel.

(a)

Figura 7: Cromatogramas em modo isocrático de eluição usando ACN:H₂O em (a) 70:30 e (b) 60:40.

A partir dos resultados de tempo de retenção de cada composto, usando composição de fase móvel ACN:H₂O de 70:30, 60:40, 53:47 e 45:55, foram calculados os fatores de retenção de acordo com a Equação 1, usando 1,55 como tempo de retardamento da fase móvel⁸¹.

A Tabela 3 apresenta os resultados do cálculo do fator de retenção para a 70, 60, 53 e 45% de ACN na fase móvel.

Tabela 3: Fator de retenção dos analitos em 70, 60, 53 e 45% de ACN.

	k			
	70% ACN	60% ACN	53% ACN	45% ACN
Metomil	0,13	0,25	0,25	0,32
Dimetoato	0,27	0,28	0,40	0,70
Aldicarbe	0,32	0,56	0,84	1,40
Simazina	0,47	0,76	1,11	1,81
Carbofurano	0,50	0,89	1,40	2,46
Carbaril	0,55	1,00	1,59	2,86
Diurum	0,65	1,14	1,80	3,26
Ametrina	1,10	1,93	2,92	5,23
Propazina	1,16	2,07	3,15	5,71
Mercaptodimetur	1,11	2,07	3,31	6,39
Azinfos-metil	1,03	2,07	3,46	7,05
Linurom	1,24	2,32	3,70	7,14
Pirazofós	2,97	5,32	11,6	27,
Diazinona	3,46	6,90	12,6	27,9
Fosalona	3,61	7,10	16,2	41,9
Endrim	6,91	14,2	29,6	74,7
Dicofol	7,16	16,3	37,5	108

Os resultados indicam que a eluição em composição de fase móvel fixa em 70, 60, 53 e 45% de ACN não favorece a eluição de todos os componentes da amostra com fatores de retenção recomendados na literatura entre 0,5 a 20⁸². A retenção dos analitos aumenta com a diminuição da proporção do componente orgânico na fase móvel, no intervalo de 70 a 45% de ACN. Condições abaixo de 45% não foram exploradas por causa da dificuldade de eluição dos compostos mais hidrofóbicos. Os primeiros solutos (metamidofós, acefato, aldicarbe-sulfona), de elevada polaridade, tiveram o fator de retenção abaixo de 0,5 em todas as combinações de frações de volume. Estes praticamente eluem no tempo morto da coluna e, por isso foram desconsiderados nos resultados da Tabela 3. Essa condição resulta em dificuldades de separação entre os componentes da amostra em questão. As dificuldades de separação dos compostos permanecem em todas as condições, mesmo na proporção mais baixa de solvente orgânico da fase móvel.

O processo cromatográfico em modo isocrático é inadequado para eluição dos organoclorados apolares 4,4-DDE e aldrin na mistura e, assim, foram desconsiderados das medidas (não apresentados na Tabela 3). Para o analito dicofol, eluindo em proporção elevada de ACN de 70 e 60% na fase móvel, os valores do fator de retenção são 7,16 e 16,3, respectivamente. Retenções maiores caracterizam o comportamento de retenção do aldrin e 4,4-DDE na fase estacionária podendo resultar em redução do tempo de vida da coluna. Outros procedimentos cromatográficos podem ser considerados para reduzir estes inconvenientes. Para fins de quantificação, se observa a redução severa da sensibilidade (picos baixos e largos) da análise dos últimos analitos a eluírem. Picos neste formato são comumente encontrados para analitos com fator de retenção elevados.

A equação fundamental da retenção que relaciona a retenção e fração de solvente orgânico na fase móvel é dada pela Equação 6⁸³:

$$\log k = a - SB \quad \text{Equação 6}$$

onde k é o fator de retenção do analito, a é o $\log k$ em água pura como fase móvel, quando $B = 0$, S é a constante relacionada às características do soluto (4 é o valor considerado para compostos cuja massa molecular esteja entre 100 e 400 u.m.a⁸⁴), φ é a fração do solvente orgânico na fase móvel de composição binária (água e acetonitrila).

A Tabela 4 apresenta os resultados da aplicação da Equação 6 aos resultados do fator de retenção obtido das condições isocráticas de eluição na composição 70, 60, 53 e 45%.

Tabela 4: Logaritmo do fator de retenção em 70, 60, 53 e 45% de ACN e o coeficiente de determinação (R^2) das curvas log k em função da %B.

	log k				R^2
	70% ACN	60% ACN	53% ACN	45% ACN	
Metomil	-0,868	-0,599	-0,60	-0,50	0,866
Dimetoato	-0,557	-0,556	-0,40	-0,16	0,815
Aldicarbe	-0,483	-0,245	-0,0763	0,15	0,998
Simazina	-0,327	-0,118	0,0451	0,26	0,996
Carbofurano	-0,298	-0,0473	0,15	0,39	0,997
Carbaril	-0,255	0,0279	0,20	0,46	0,997
Diurum	-0,186	0,0576	0,255	0,512	0,995
Ametrina	0,0451	0,286	0,465	0,718	0,995
Propazina	0,0649	0,316	0,498	0,756	0,996
Mercaptodimetur	0,0451	0,317	0,519	0,805	0,995
Azinfos-metil	0,0137	0,316	0,538	0,847	0,996
Linurom	0,0929	0,365	0,568	0,853	0,995
Pirazofós	0,473	0,726	1,06	1,44	0,976
Diazinona	0,539	0,839	1,10	1,44	0,992
Fosalona	0,558	0,851	1,21	1,62	0,981
Endrim	0,839	1,15	1,47	1,87	0,987
Dicofol	0,854	1,21	1,57	2,03	0,987

A partir dos resultados da Tabela 4 foram construídas as curvas dos fatores de retenção em função da proporção de ACN na fase móvel (Figura 8).

Figura 8: Logaritmo do fator de retenção k em função da fração de ACN para os padrões de praguicidas indicados na legenda.

De acordo com a Equação 6, o aumento da concentração do solvente corresponde linearmente à diminuição do logaritmo do fator de retenção ($\log k$). Os resultados indicaram a existência da relação linear para os compostos que eluem no intervalo entre metomil e diazinona, constatado o valor de R^2 (Tabela 4). Não foram incluídos no gráfico da Figura 8 os compostos que eluem antes do metomil ou após a diazinona pelas dificuldades de calcular $\log k$ por baixa ou elevada retenção, respectivamente. A abrangência nas variedades estruturais é uma característica desta amostra, situação esta desfavorável à separação no modo de eluição isocrática.

4.2 Efeito do solvente

Os descritores acidez da ligação de H (α), basicidade da ligação de H (β), constante dielétrica (ϵ) constante de Hildebrand (δ_H) para solventes puros da literatura estão apresentados na Tabela 5.⁶⁷ Os descritores foram escolhidos por causa das interações intermoleculares que ocorrem no equilíbrio soluto-solvente.⁸⁵

Tabela 5: Descritores α , β , ϵ , e δ_H para ACN e água, ambos puros.

	A	B	E	δ_H
ACN	0,07	0,32	35,9	24,3
H ₂ O	0,82	0,35	78	47,9

O descritor do solvente na escala α caracteriza a habilidade do solvente em doar um H ativo para o soluto⁸⁶; e β , a habilidade do solvente em aceitar um H ativo do soluto⁸⁷. O valor elevado de α da água (polar e prótico) revela a tendência da água em doar H para o soluto. A constante é próxima de zero para o solvente ACN (polar e aprótico). Isso ocorre porque a estrutura química da ACN apresenta H de alcano de hibridização sp^3 , caracteristicamente não ácidos. A constante β tem valor significativo para ACN e água, ou seja, ambos os solventes possuem capacidades de receber H de um soluto. O caráter moderadamente básico ocorre pela presença de pares de elétrons isolados no átomo de O e N da água e ACN, respectivamente. Outra escala descritora é o parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ_H), definido pela energia requerida para separar moléculas de solvente entre si; as interações solvente/solvente são interrompidas pela criação de uma cavidade do tamanho do soluto feita no solvente.⁸⁸ O valor elevado de δ_H para a água é justificado pela forte coesão existente entre suas moléculas. Pelo fato das associações entre as moléculas de água serem mais intensas em relação às de ACN-ACN, a energia necessária para o soluto retido na fase estacionária cavar o solvente é maior quando o solvente empregado é a água. A constante dielétrica (ϵ) é a capacidade do solvente em separar íons, refletindo a tendência que um solvente tem em proteger ou blindar uma carga da outra. Quando a constante dielétrica é alta, a atração dos íons presentes em solução é pequena e a dissolução é favorecida. A água é o solvente com a maior constante dielétrica.

Os descritores da Tabela 6 foram obtidos nas 70, 60, 53 e 45% de ACN usando os dados da Tabela 5.⁸⁹

Tabela 6: Valores dos descritores do solvente na composição de fase móvel indicada.

	70% ACN	60% ACN	53% ACN	45% ACN
A	0,295	0,370	0,423	0,483
B	0,328	0,331	0,334	0,336
E	49,5	54,3	57,5	61,2
δ_H	31,4	38,4	35,4	37,3

Os valores da Tabela 6 são resultados de uma média ponderada segundo a proporção de cada componente na fase móvel. Um exemplo do cálculo efetuado é apresentado para α em 70% de ACN.

$$\alpha_{70\%} = 0.3\alpha_{H_2O} + 0.7\alpha_{ACN}$$

O valor de α para a composição aumenta na medida em que o conteúdo de água aumenta na mistura com ACN (solvente não-ácido). Este comportamento ocorre porque a água (solvente polar e prótico) é um forte doador de ligação de H. Nas proporções indicadas, os valores de α sofrem uma grande variação. Em sistemas onde o particionamento ocorre em fase aquosa, é importante observar os valores de β para um determinado solvente. Os valores de β sofrem um aumento pouco significativo com o aumento da proporção de água na fase móvel, nas condições delineadas experimentalmente. Ambos os solventes têm capacidade de receber um átomo de H, por isso a variação é pouco significativa com ligeiro aumento da constante para 0,336, em 45% de ACN. Na mistura apresentada na Tabela 6, a constante dielétrica aumenta à medida que a fração de água aumenta na fase móvel. O valor de ϵ de 61,2 para 45% de ACN indica que uma densa camada de solvatação é favoravelmente formada quando a concentração de água no meio é alta. A constante de Hildebrand (δ_H) aumenta com a diminuição de ACN, ou seja, dificuldade de cavitação do soluto na mistura ACN/água é responsável pelas forças intensas de coesão entre moléculas de água.

Os valores dos descritores do solvente da Tabela 6 poderiam ser obtidos através da interpolação de dados experimentais da literatura. Tavares e colaboradores⁹⁰ explicaram os motivos da separação eletroforética de esteróides utilizando o conceito dos descritores dos solventes ACN, EtOH (etanol) e THF (tetrahidrofurano) puros e em misturas aquosas. Naquele trabalho⁹⁰, os descritores foram calculados pela interpolação das concentrações de solventes indicados em dados experimentais apresentados por Marcus⁸⁹.

Semelhantemente, os descritores foram calculados por equações polinomiais de ordens superiores, que relacionam os descritores α (Equação 7), β (Equação 8), ε (Equação 9) com a fração x de ACN no meio.⁸⁹ Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

$$\alpha = 1.12 - 1.648x_{ACN} + 3.560x_{ACN}^2 - 2.030x_{ACN}^3 - 0.670x_{ACN}^4 \quad \text{Equação 7}$$

$$\beta = 0.53 + 1.009x_{ACN} - 3.724x_{ACN}^2 + 5.218x_{ACN}^3 - 2.564x_{ACN}^4 \quad \text{Equação 8}$$

$$\varepsilon = -0.0009x_{ACN}^2 - 0.3629x_{ACN} + 79.328 \quad \text{Equação 9}$$

onde x_{ACN} é a fração de ACN na mistura aquosa.

Tabela 7: Valores dos descritores calculados com as equações na mistura indicada.

	70% ACN	60% ACN	53% ACN	45% ACN
A	0,854	0,887	0,891	0,887
B	0,586	0,590	0,593	0,600
E	79,1	79,1	79,1	79,2
δ_H	31,4	38,5	35,4	37,3

Os dados da Tabela 7 estão graficamente apresentados na Figura 9.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 9: Gráfico de (a) α , (b) β , (c) ϵ , e (d) δ_H calculados pelos polinômios para a mistura ACN/água.

Os resultados apresentados na Tabela 7 são ligeiramente diferentes dos apresentados na Tabela 6. A partir destas observações é possível afirmar que os processos de interações físico-químicas da mistura não possuem comportamento aditivo. Diferentemente da Tabela 6, onde os descritores sofrem aumento de seus valores com o aumento da fração de água; na Tabela 7 e Figura 9, indicam que a não aditividade dos valores dos parâmetros solvatocrômicos é um fato que acontece nas interações solvente-solvente.

Para compreender a estrutura da solvatação, Wakisaka *et al.*⁹¹ estudaram em espectrometria de massas a formação de agrupamentos de ACN/água entre 0 e 100% de ACN, usando o fenol como soluto hidrofóbico. O intervalo citado compreende desde

ACN monomérica (fração de zero de ACN) até água monomérica (fração de 1 de ACN). Nas frações intermediárias, semelhantemente investigadas neste relatório (45 a 70% de ACN), por causa da estrutura de agrupamentos solvente-solvente, a mistura complexa ACN/água microscopicamente heterogênea não deve apresentar uma relação linear crescente dos parâmetros com variações na proporção do solvente como na Tabela 6. Nesta região investigada, as interações entre agrupamentos de moléculas de ACN são mais fortes que entre as de ACN/água, portanto mantendo a água monomérica.

Nos gráficos da Figura 10a a 10d, a retenção expressa como $\log k$ foi estabelecida como função dos descritores do solvente de Kamlet-Taft (α , β , ϵ) e δ_H na mistura binária.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 10: Gráficos do $\log k$ em função dos descritores (a) acidez da ligação de H, (b) basicidade da ligação de H, (c) constante dielétrica, e (d) parâmetro de solubilidade de Hildebrand, calculados para as misturas de 70, 60, 53 e 45% de ACN.

De acordo com Figura 10a a acidez da mistura se mantém praticamente constante entre 60 e 45% de ACN, diminuindo bruscamente na proporção de 70%. O gráfico da Figura 10a apresenta para todos os compostos o aumento da retenção mesmo com acidez da fase móvel em números consideráveis. Este comportamento pode ser um indicativo de que as forças hidrofóbicas de interação com a fase estacionária apolar sejam mais favoráveis que as interações com a fase móvel. Independente da composição de fase móvel, as retenções são sempre mais baixas para os compostos que eluem sequencialmente desde o metomil até o diurom. Estes praguicidas eluem mais rapidamente por causa das interações do tipo van der Waals com a fase móvel, e assim, estarão pouco retidas na fase estacionária da coluna. A polaridade destas substâncias, presença de átomos eletronegativos capazes de fazer ligação de H justifica a afinidade com a fase móvel, afinidade esta menor para os

compostos que eluem sequencialmente de pirazofós a dicofol. Semelhantemente, o descritor β , embora investigado em uma faixa restrita de valores, apresenta pouca influência na retenção dos praguicidas. Para o descritor β , no intervalo avaliado (Figura 10b), a variação da basicidade na mistura é pouco significativa, assumindo o valor menor para 70% de ACN. Em relação a este descritor, os praguicidas apresentam comportamento de retenção na coluna semelhante ao atribuído ao descritor α . Com o aumento de β , a retenção é aumentada para todos os compostos em todas as proporções de ACN, sendo também de baixa retenção os mesmos praguicidas que apresentaram esta condição na avaliação da escala de interação específica α da fase móvel.

A constante dielétrica (Figura 10c) apresenta um comportamento semelhante a α e β . A presença de maior quantidade de água na fase móvel proporciona que a solvatação seja efetivamente realizada e a separação favorecida. De acordo com os resultados, os compostos de maiores $\log k$ é favorecida pelo aumento da quantidade de água na fase móvel. Na condição de 45% de ACN, pirazofós a dicofol separam-se, no entanto, os mesmos compostos não estão separados na condição de 70%. A água na fase móvel causa alguma perturbação no campo elétrico destas estruturas e, por isso, as solvatam mais.

O parâmetro de Hildebrand (Figura 10d) no primeiro conjunto de pontos (70% ACN), onde a constante assume o valor mais baixo, ocorre o favorecimento da eluição dos compostos pela fase móvel. Aplicando o conceito de δ_H , a retenção dos praguicidas pela coluna é baixa pela facilidade de cavitação dos compostos na mistura da fase móvel. Isto melhora a solubilização deles, eluindo-os rapidamente. Concordantemente, a retenção aumenta para as separações realizadas com 60 e 53% de ACN pela dificuldade de cavitação em mistura onde a proporção de água na fase móvel é maior. Os resultados indicam que em 45% ou 70% de ACN na fase móvel, a

cavitação ocorre mais facilmente que em relação às demais condições com a diminuição da retenção.

4.3 Modo gradiente de eluição

Um gradiente linear de intervalo amplo (5 a 95%) para separação de todos os praguicidas está apresentado na Figura 11.

Figura 11: Modo gradiente de eluição para todos os praguicidas. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m). Gradiente linear 5 a 95% de ACN, vazão 1 mL min⁻¹ e temperatura 30 °C. Soluções padrão: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) aldicarbe-sulfona, (4) metomil, (5) dimetoato, (6) aldicarbe, (7) simazina, (8) carbofurano, (9) carbaril, (10) diurom, (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil, (15) linurom, (16) pirazofós, (17) diazinona, (18) fosadona, (19) endrin, (20) dicofol, (21) 4,4-DDE e (22) aldrin.

4.3.1 Efeito da vazão

Algumas variáveis foram investigadas para verificação de efeito no perfil de separação em gradiente. O efeito da vazão em 0,5, 0,7 e 1,0 mL min⁻¹ na separação cromatográfica foi avaliado com 60 minutos de gradiente linear de 5 a 98% ACN. O resultado está registrado na Figura 12.

Figura 12: Efeito da vazão sobre a resolução em: (a) $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, (b) $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e (c) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Condições: Coluna Synergi MAX-RP ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$) e 30°C . Soluções padrão: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) aldicarbe-sulfona, (4) metomil, (5) dimetoato, (6) aldicarbe, (7) simazina, (8) carbofurano, (9) carbaril, (10) diurom, (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil, (15) linurom, (16) pirazofós, (17) diazinona, (18) fosadona, (19) endrin, (20) dicofol, (21) 4,4-DDE e (22) aldrin.

A observação dos resultados da Figura 12 permite prever que a vazão influencia a retenção e, assim, a duração da corrida cromatográfica. Em vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, a eluição do último componente da mistura, aldrin, ocorre com 62,3 min de corrida, enquanto que, em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o tempo de retenção eluição do mesmo analito é de 53,7 min, uma diferença de quase 10 min de análise. Na vazão de 1 mL min^{-1} , observam-se picos um pouco mais finos e maior separação em linha de base. O par crítico 19 e 20 tem resolução completa com o aumento da vazão. O espaçamento entre os picos 16 a 18 ocorre com o aumento da vazão. Na condição de vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, os três picos estão igualmente espaçados. A vazão não influencia a resolução do co-eluentes 14 e 15.

4.3.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura da coluna foi avaliado em 30, 35 e 40 °C, empregando gradiente linear de 60 minutos com intervalo de variação de ACN de 5 a 98%. A Figura 13 apresenta os resultados experimentais.

Figura 13: Efeito da temperatura em (a) 30 °C, (b) 35 °C e (c) 40 °C. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm) e 1 mL min⁻¹. Soluções padrão: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) aldicarbe-sulfona, (4) metomil, (5) dimetoato, (6) aldicarbe, (7) simazina, (8) carbofurano, (9) carbaril, (10) diurom, (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil, (15) linurom, (16) pirazofós, (17) diazinona, (18) fosadona, (19) endrin, (20) dicofol, (21) 4,4-DDE e (22) aldrin.

Os resultados indicaram que a temperatura produz pouco efeito sobre a retenção dos praguicidas em estudo. O aumento da temperatura de 30 a 40 °C ocasiona uma diminuição pouco pronunciada da retenção para as bandas cromatográficas. Isso pode ser atribuído à influência da temperatura na constante de equilíbrio do analito com a fase móvel e a fase estacionária. Nenhum efeito direto sobre resolução é verificado nestes resultados. Os mesmos espaçamentos entre bandas e o par crítico 14 e 15 permanecem nas temperaturas investigadas. Não foram verificadas temperaturas maiores por causa das limitações de segurança de uso da coluna, recomendadas pelo fabricante, que a estabelece no máximo de 60 °C.

4.3.3 Efeito do tempo de gradiente

O efeito do tempo de gradiente (t_G) foi investigado variando-o de 30 a 100 min. Um intervalo amplo e constante de fase móvel ($\Delta B = 98 - 8 = 90\%$ ACN) e vazão de 1 mL min^{-1} foram as condições estabelecidas para realização do experimento. Os cromatogramas da Figura 14a a 14e ilustram os resultados. A Figura 14f apresenta uma ampliação do intervalo de tempo entre 43 e 47 min para verificação do efeito do tempo de gradiente na eluição do par crítico 14 e 15. Cuidados foram tomados para que na concentração final do componente orgânico todos os analitos da mistura eluíssem.

Figura 14: Efeito do tempo de gradiente (a) 30 min, (b) 40 min, (c) 60 min, (d) 70 min, (e) 100 min e (f) 100 min (visualização ampliada). Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m), 1 mL min⁻¹ e 30 °C. Soluções padrão: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) aldicarbe-sulfona, (4) metomil, (5) dimetoato, (6) aldicarbe, (7) simazina, (8) carbofurano, (9) carbaril, (10) diurom, (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil, (15) linurom, (17) diazinona, (18) fosadona, (19) endrin, (20) dicofol, (21) 4,4-DDE e (22) aldrin.

A declividade do gradiente é obtida a partir da Equação 10.

$$\frac{\% \Delta B}{t_G} \quad \text{Equação 10}$$

onde $\% \Delta B$ é o intervalo de variação constante entre a composição inicial 8% e a final 98% de ACN, $\% \Delta B$ é de 90% e t_G (min) é o tempo de gradiente.

Os cromatogramas da Figura 14a, 14b, 14c, 14d e 14e possuem declividades de 3,00, 2,25, 1,50, 1,28 e 0,90 min⁻¹, respectivamente. A avaliação e comparação dos cromatogramas revelam que a resolução cromatográfica aumenta para os gradientes menos íngrimes. A variação menos acentuada da porcentagem de ACN por minuto favorece a resolução completa, em linha de base, dos pares 17, 18 e 19, 20. No gradiente de 30 min há intensa co-eluição entre as bandas 11 a 15, e entre as citadas 17, 18 e 19, 20. Neste gradiente, cinco analitos (11-15) eluem e a resolução é parcial. No gradiente de 40 min (2,25 min⁻¹), os picos 17 e 18 não são par crítico. O favorecimento da rampa do gradiente é mais pronunciado para as bandas 17 e 18, enquanto que para os outros picos (11 a 15, 19 e 20) a separação é pouco afetada. O

cromatograma 14c (60 min) apresenta aumento da resolução em todo intervalo da separação, principalmente entre 23 e 32 min. Nesta região ainda permanecem como par crítico azinfos-metil e linurom (14, 15). A condição de gradiente não resultou em diferenças significativas comparando cromatogramas de 70 e 60 min, provavelmente pela proximidade dos valores das declividades, 1,50 e 1,28 min⁻¹, respectivamente. A região que elui o par 14, 15 no gradiente de 100 min está ampliada na Figura 14f. No menor valor de declividade (100 min), a resolução aumenta para o par 14 e 15, indicando que a declividade baixa favorece a resolução do par crítico, no entanto a separação piora para o par 16 e 17.

Uma análise geral do perfil dos cromatogramas da Figura 14a a 14e, apenas com a variação da declividade é possível resolver as porções mais críticas, porém a manipulação da rampa do gradiente ainda é insuficiente para resolver em linha de base o par 14, 15.

Um conceito que pode ser explorado a partir destes resultados é o valor de k efetivo (k^*). O valor de k^* é definido pelas condições experimentais do gradiente de acordo com a Equação 11⁹².

$$k^* = \frac{F t_G}{1,15 \Delta B S V_m} \quad \text{Equação 11}$$

onde F (mL min⁻¹) é a vazão, t_G (min) o tempo de gradiente, ΔB é a concentração volumétrica do solvente de maior força de eluição, S é uma constante característica do soluto (mesma definição da Equação 6) e V_m (mL) é o volume morto da coluna.

Com a Equação 11 os valores de k^* foram calculados para o tempo de gradiente aplicado. Os resultados estão na Tabela 8.

Tabela 8: Valores dos fatores de retenção efetivo para os tempos de gradiente da Figura 14.

tempo de gradiente (min)	30	40	60	70	100
k^*	5,3	7,1	10,6	12,4	17,7

O aumento dos valores do tempo de gradiente ocasiona aumento dos valores do fator de retenção efetivo. Como na eluição isocrática, à medida que se diminui a porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, os valores do fator de retenção aumentarão. Analogamente, as menores declividades da rampa de gradiente proporcionam o aumento da retenção das bandas cromatográficas.

O fato das bandas eluírem com os mesmos valores de k^* reflete nas larguras de base dos picos. Em gradiente (Figura 14), a largura da banda de eluição dos compostos permanece praticamente inalterada em toda porção do cromatograma por possuírem valores semelhantes de k^* .

Investigando a separação entre 14, 15, foi realizada a mudança da seletividade pela modificação do solvente constituinte da fase móvel para metanol (MeOH). Para MeOH, o intervalo de gradiente teve variação de 13 a 100% de MeOH. Esses valores correspondem à mesma força de eluição de ACN do intervalo de variação 8 a 98%. A correspondência entre os valores foi baseada no uso do nomógrafo.⁹³ A Equação 12 descreve esta conversão.⁸³

$$\varphi_{ACN} = 0.32\varphi_{MeOH}^2 + 0.57\varphi_{MeOH} \quad \text{Equação 12}$$

onde φ_{ACN} é a concentração volumétrica de ACN e φ_{MeOH} é a concentração volumétrica de metanol.

Após a mudança do solvente, o resultado da separação entre o linurom e o azinfos-metil está apresentado na Figura 15.

Figura 15: Efeito da mudança do solvente na separação de (a) linurom, (b) azinfos-metil e (c) linurom e azinfos-metil.

4.3.4 Efeito da concentração inicial

O efeito do intervalo do gradiente sobre a separação foi avaliado pela variação da concentração inicial de ACN entre 5 e 14%. A concentração final foi mantida em 98% de ACN. Os resultados estão na Figura 16.

Figura 16: Efeito da concentração inicial do componente orgânico ACN: (a) 6%, (b) 10%, (c) 12% e (d) 14%. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m), 1 mL min^{-1} e 30 $^{\circ}\text{C}$. Padrões: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) aldicarbe-sulfona, (4) metomil, (5) dimetoato, (6) aldicarbe, (7) simazina, (8) carbofurano, (9) carbaril, (10) diurom, (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil, (15) linurom, (16) pirazofós, (17) diazinona, (18) fosadona, (19) endrin, (20) dicofol, (21) 4,4-DDE, (22) aldrin.

A concentração onde se inicia o gradiente tem efeito pronunciado para os primeiros picos (1 a 4) dos cromatogramas da Figura 16a a 16d. O aumento de 5 a 14 % ACN melhora a forma dos primeiros picos, estes eluem como picos mais altos e finos, porém o par 1, 2 se aproxima. A concentração inicial de 14% foi considerada limite para esta composição de fase móvel, pois houve compressão da porção inicial do cromatograma 16d e possivelmente metamidofós (1) e acefato (2) seriam perdidos no volume morto da coluna. O aumento da concentração inicial não apresentou nenhum efeito onde a resolução é crítica entre os pares críticos, 14, 15 e 19, 20, ou na região de eluição dos picos 11 a 15. A porcentagem inicial mais baixa de ACN resulta em atraso na retenção dos picos ou corridas mais longas, resultando em 44,3 e 40,3 min para 5 e 14% ACN, respectivamente.

4.4 Planejamento Fatorial

Todo o planejamento experimental foi conduzido com o suporte do *software* Design Expert. Foi realizado o planejamento para avaliar algumas variáveis da separação cromatográfica. Um planejamento de dois níveis alto e baixo (2^k) e quatro variáveis ($k=4$) foi aplicado às variáveis: tempo do gradiente, vazão, temperatura e concentração inicial do modificador orgânico. O planejamento resultou em 16 combinações de variáveis e 4 repetições no ponto central ou nível intermediário (0), totalizando 20 experimentos. A Tabela 9 apresenta as variáveis examinadas segundo o planejamento fatorial completo de dois níveis.

Tabela 9: Variáveis examinadas no fatorial completo de dois níveis.

	nível baixo (-1)	nível interm. (0)	nível alto (+1)
vazão (mL min ⁻¹)	0,5	0,75	1,0
temperatura (° C)	30	35	40
tempo de gradiente (min)	60	67,5	75
concentração de ACN (%)	5	7,5	10

A resposta experimental foi avaliada com a função *COF* (Equação 13), fixando-se os valores de R_s e t_m .

$$COF = \sum_{i=1}^k A_i \ln \left(\frac{R_{s_i}}{R_s} \right) + B(t_m - t_z) \quad \text{Equação 13}$$

onde A e B são os pesos da função (valor de 1), R_s é a resolução desejada (1,5), R_{s_i} é a resolução de cada par de pico adjacente, t_m é o tempo de eluição desejado para o último composto (aldrim) (ajustado em 60 min) e t_z é o tempo de eluição experimental do último composto.

A Equação 14 apresenta a função da resolução.

$$R_{i,j} = 2 \left(\frac{t_j - t_i}{w_i + w_j} \right) \quad \text{Equação 14}$$

onde t_i representa o tempo de retenção de um analito, t_j é o tempo do analito adjacente, w_i e w_j são as larguras de base das bandas do analito e de seu adjacente, respectivamente.

A função cromatográfica *CRS* (Equação 15) também foi investigada como função resposta para o planejamento experimental.

$$CRS = \left(\sum_{i=1}^{np} \left(\frac{R_{i,i+1} - R_{opt}}{R_{i,i+1} - R_{min}} \right) \frac{1}{R_{i,i+1}} + \sum_{i=1}^{np} \frac{R_{i,i+1}^2}{np R_{avg}^2} \right) \frac{t_f}{n} \quad \text{Equação 15}$$

onde $R_{i,i+1}$, representa a resolução entre picos adjacentes, R_{opt} é o valor considerado ótimo de resolução (1,5), R_{min} é o valor mínimo de resolução (ajustado como 0,4), R_{avg} é o valor da média das resoluções, t_f é o tempo de eluição do último composto, n é o número de analitos na corrida cromatográfica (22 praguicidas).

A Tabela 10 apresenta a matriz de contraste de todos os experimentos e as respostas experimentais observadas *COF* e *CRS* em cada combinação experimental.

Tabela 10: Matriz de contraste e respostas COF e CRS para o fatorial completo com 4 repetições no ponto central.

exp.	A-vazão	B-temp.	C-t grad.	D-conc. ACN	COF	CRS
1	-1	-1	-1	-1	12	587
2	+1	-1	-1	-1	20	508
3	-1	+1	-1	-1	8,7	1201
4	+1	+1	-1	-1	28	497
5	-1	-1	+1	-1	0,60	726
6	+1	-1	+1	-1	12	610
7	-1	+1	+1	-1	0,46	39
8	+1	+1	+1	-1	14	594
9	-1	-1	-1	+1	10	1832
10	+1	-1	-1	+1	24	500
11	-1	+1	-1	+1	16	601
12	+1	+1	-1	+1	24	488
13	-1	-1	+1	+1	-0,51	692
14	+1	-1	+1	+1	16	600
15	-1	+1	+1	+1	4,3	30
16	+1	+1	+1	+1	15	9,2
17	0	0	0	0	14	581
18	0	0	0	0	13	581
19	0	0	0	0	17	579
20	0	0	0	0	12	581

Os registros cromatográficos dos 20 experimentos resultantes das combinações de variáveis estão ilustrados na Figura 17.

Figura 17: Cromatogramas dos 20 experimentos do planejamento fatorial. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m). Fase móvel: ACN:H₂O. (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7, (h) 8, (i) 9, (j) 10, (l) 11, (m) 13, (n) 14, (o) 15, (p) 16 e (q) 17, (r) 18, (s) 19, (t) 20 e (u) 12.

De acordo com os resultados da Tabela 10, o experimento 7 tem um *COF* que mais se aproxima do zero. O valor ótimo de *COF*, mais próximo das condições pré-estabelecidas, se aproxima de zero. As condições experimentais de vazão, temperatura, tempo de gradiente e concentração inicial de ACN para o sétimo experimento são 0,5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min e 5%, respectivamente. Neste cromatograma, inicia-se a separação entre o par 14, 15.

A Tabela 11 apresenta a análise de variância das variáveis do planejamento fatorial.

Tabela 11: Análise de variância para COF.

	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Modelo	1205	15	80,3	15,6	0,0219
A-vazão	694	1	694	135	0,0014
B-temperatura	19,8	1	19,9	3,86	0,1441
C-t. gradiente	417	1	417	81,2	0,0029
D-ACN _{inicial}	11,8	1	11,8	2,30	0,2265
AB	0,61	1	0,61	0,12	0,7542
AC	1,48	1	1,48	0,29	0,6288
AD	0,67	1	0,67	0,13	0,7415
BC	1,48	1	1,48	0,29	0,6291
BD	1,22	1	1,22	0,24	0,6601
CD	0,004997	1	0,00499	0,000972	0,9771
ABC	4,76	1	4,76	0,93	0,4071
ABD	41,3	1	41,3	8,04	0,0659
ACD	2,71	1	2,71	0,53	0,5204
BCD	0,014	1	0,014	0,00269	0,9619
ABCD	7,51	1	7,51	1,46	0,3134
Curvatura	5,31	1	5,31	1,03	0,3841
erro puro	15,4	3	5,14		
cor. Total	1226	19			

A análise de variância do modelo revela que o modelo ajustado é significativo, ou seja, o modelo explica o comportamento do sistema experimental em relação à resposta *COF*. As variáveis vazão e concentração inicial de solvente orgânico são estatisticamente significativas com valor de p menor que 0,005. Nenhuma das interações é significativa, pela verificação de altos valores de p valores, maiores que 0,005. As variáveis que mais influenciam a resposta são a vazão e o tempo do gradiente. Estas variáveis poderiam ser otimizadas univariadamente já que suas interações não são significativas. De acordo com os resultados, nem as variáveis principais B-temperatura e D-ACN inicial ou suas interações são significativas. O parâmetro curvatura não é significativo com valor de p de 0,3841. A Figura 18 apresenta o comportamento da vazão e tempo de gradiente em relação à resposta *COF*, mantendo a temperatura e ACN inicial no nível intermediário. Verifica-se que a

resposta observada é mais próxima dos valores ótimos nos níveis baixos e altos de vazão e tempo de gradiente, respectivamente. Os coeficientes do modelo matemático foram estimados com 95% de confiança. A equação modelada prevista apresenta coeficiente de correlação de 0,9874.

$$\begin{aligned} COF = & +580,47 - 733,46vaz\tilde{a}o - 16,28temperatura - 7,231tgradiente - 60,352Binicial + 22,736vaz\tilde{a}o * temperatura \\ & + 9,212vaz\tilde{a}o * tgradiente + 80,803vaz\tilde{a}o * Binicial + 0,1975temperatura * tgradiente + 1,866temperatura * Binicial + \\ & + 0,6914tgradiente * Binicial - 0,2774vaz\tilde{a}o * temperatura * tgradiente - 2,4873vaz\tilde{a}o * temperatura * Binicial - \\ & - 0,9353vaz\tilde{a}o * tgradiente * Binicial - 0,02161temperatura * tgradiente * Binicial + 0,029231vaz\tilde{a}o * temperatura * tgradiente \\ & * Binicial \end{aligned}$$

Design-Expert® Software

COF

X1 = A: vazão

X2 = C: t-gradiente

Actual Factors

B: temperatura = 35.00

D: B inicial = 7.50

Figura 18: Superfície de resposta de COF para C-tgradiente e A-vazão mantendo B-temperatura e D-concentração ACN inicial constantes.

Comparando os valores de CRS e COF, estes foram concordantes entre si (Tabela 10). Os menores valores de CRS 39, 30 e 9,2 referem-se aos experimentos 7, 15 e 16, respectivamente. A resolução os experimentos 7 e 15 apresentaram separação parcial entre o par 14 e 15 (azinfos-metil e linurom), porém o menor tempo

de análise é caracterizado para o experimento 16 (63 min). Baseando-se em resultados prévios, as condições experimentais do sétimo experimento (0,5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min de gradiente e 5% ACN inicial) foram estabelecidas para o método.

Experimentos adicionais de segmentação do sétimo gradiente foram realizados como tentativa de aumento da resolução entre o par 14 e 15 e a diminuição dos espaçamentos entre os picos. A Equação 16 rege a variação da concentração de ACN no gradiente 7. A segmentação do gradiente ocorreu no intervalo entre 30 e 46 min, correspondentes às concentrações 42 e 62% de ACN, respectivamente.

$$\%ACN = 5 + 1,24t \quad \text{Equação 16}$$

A Figura 19 apresenta o gradiente 7 com variação de 1,24 min⁻¹. Variações próximas a 1,24 foram efetuadas com a intenção de melhorar a separação da região de picos 11 a 15. A Figura 20 apresenta os resultados.

Figura 19: Parte crítica do cromatograma do experimento 7. Picos: (11) ametrina, (12) propazina, (13) mercaptodimetur, (14) azinfos-metil e (15) linurom. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm), 0,5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min de gradiente e 5% ACN inicial.

Figura 20: Variação da declividade do gradiente entre 0,71 min⁻¹ a 2,5 min⁻¹. Condições: Coluna Synergi MAX-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm), 0,5 mL min⁻¹, 40 °C, 75 min de gradiente e 5% ACN inicial.

Maiores ou menores que 1,24, as variações nas inclinações do gradiente não foram favoráveis dentro do intervalo proposto, verificada as proximidades entre os picos 11 a 15. O segmento de 1,33 min⁻¹ apresenta aumento da resolução entre 14 e 15, porém o pico 14 migra e co-elui com o 13 (mercaptodimetur). Nenhuma condição solucionou o problema da co-eluição.

4.5 Espectrometria de massas

4.5.1 Método HPLC-MS/MS

As Figura 21 a Figura 24 apresentam os espectros de massas das transições MS/MS dos praguicidas. Os resultados foram obtidos no analisador de massas *ion trap* LCQ Deca XP MAX da Thermo Scientific. Os analitos aldrim, dicofol, fosadona e endrim foram excluídos pela dificuldade de identificação do pico do íon molecular no modo de infusão direta. As condições experimentais ajustadas no instrumento estão descritas no item 3.3.

O pico do íon molecular das triazinas propazina, simazina e ametrina são detectadas no espectro na forma protonada $[M+H]^+$. Propazina e ametrina, ambos perdem o fragmento de m/z de 42 (C_3H_6) resultando nos fragmentos de m/z de 188 e 186 das Figura 21a a Figura 21c, respectivamente. A fragmentação MS/MS da simazina (Figura 21b) resultou em dois picos de intensidade relativa elevada no espectro. O fragmento 123 é resultado da perda de 202 - 44 ($CH_3-CH_2-NH_2$) - 35 (Cl) e o pico do íon m/z 131 resulta da perda de 202 - 70 ($N\equiv C-NH-CH_2-CH_3$) devido à abertura do anel aromático pirimidina.

(a)

file_120818040346 #35 RT: 0.26 AV: 1 NL: 3.39E7
T: + c ESI Full ms2 202.20@36.00 [55.00-400.00]

(b)

File_120819024545 #71 RT: 0.57 AV: 1 NL: 2.69E8
F: + c ESI Full ms2 228.20@35.00 [60.00-450.00]

(c)

Figura 21: Espectros de massas de íons produtos ESI-MS/MS das triazinas (a) propazina, (b) simazina e (c) ametrina. Condições: *ion trap* LCQ Deca XP MAX.

A estrutura química geral dos herbicidas feniluréias é a substituição do anel aromático fenil por -NH-C(=O)-NR_2 . Os espectros de massa de diurom e linurom estão na Figura 22a e Figura 22b, respectivamente.

Figura 22: Espectros de massas de íons produtos ESI-MS/MS das ureias (a) diurom e (b) linurom. Condições: *ion trap* LCQ Deca XP MAX.

O praguicida diurom tem o pico do íon molecular protonado identificado como $[M+H]^+$ m/z 233. O fragmento gerado com m/z de 72 $[(CH_3)_2N-C=O]^+$ identificado no espectro da transição MS/MS (Figura 22a) corresponde à perda 233-162 (fragmento p-dicloroanilina). O linurom apresenta o pico do íon molecular protonado m/z 249 (Figura 22b). A observação dos fragmentos com m/z 188 e m/z 160 ocorre perda de dimetilamina e N-dimetil formamida, respectivamente.

As Figura 23a a 23f apresentam os espectros de massas dos praguicidas da classe dos carbamatos. Carbamatos podem apresentar o pico do íon molecular como adutos de sódio ou amônio.

T: + c ESI Full ms2 202.00@27.00 [55.00-400.00]

(c)

F: + c ESI Full ms2 163.20@28.00 [50.00-400.00]

(d)

T: + c ESI SIM ms [207.30-208.30, 212.50-213.50]

(e)

Figura 23: Espectros de massas de íons produtos dos carbamatos (a) mercaptodimetur, (b) carbofurano e (c) carbaril, (d) metomil, (e) aldicarbe, (f) aldicarbe-sulfona. Condições: *ion trap* LCQ Deca XP MAX.

O pico do íon molecular protonado do mercaptodimetur (Figura 23a) apresenta m/z 226 correspondente à forma protonada $[M+H]^+$ e um pico de intensidade mais baixa com m/z 248 do aduto $[M+Na]$. O pico m/z 169 é justificado pela perda de 57 Da ($CH_3-NH-C=O$) ligado ao anel. O mesmo fragmento (57 Da) é perdido pelo carbofurano (Figura 23b) e carbaril (Figura 23c) resultando nos picos MS/MS com m/z 165 e m/z 145, respectivamente. O metomil (Figura 23d) tem pico do íon molecular m/z 163 e transições MS/MS com m/z 88 e m/z 106. A perda específica neutra de 57 Da é característica para a subclasse dos metil carbamatos. No espectro MS/MS do aldicarbe (Figura 23e), o pico do íon molecular sodiado $[M+Na]^+$ com m/z 213. A perda neutra de $CH_3NHCOOH$ gera $[CH_3SC(CH_3)C\equiv N]^+$ com m/z 116 e $CH_3SC(CH_3)_2^+$ com m/z 89. O aldicarbe-sulfona (Figura 23f) possui pico do íon molecular de 233 e as transições MS/MS com m/z de 86 e m/z 148.

As Figura 24a a 24h apresentam os espectros MS/MS dos praguicidas da classe dos organofosforados.

T: + c ESI Full ms2 368.00@28.00 [100.00-400.00]

(a)

T: + c ESI Full ms2 305.00@31.00 [80.00-450.00]

(b)

T: + c ESI Full ms2 374.00@31.00 [100.00-450.00]

(c)

T: + c ESI Full ms2 317.80@35.00 [85.00-450.00]

(d)

T: + c ESI Full ms2 230.00@21.00 [60.00-450.00]

(e)

T: + c ESI Full ms2 142.20@28.00 [50.00-400.00]

(f)

Figura 24: Espectros de massas de íons produtos ESI-MS/MS dos organosfosforados (a) fosfalona, (b) diazinona, (c) pirazofós, (d) azinfos-metil, (e) dimetoato, (f) metamidofós, (g) acefato, (h) fosmete. Condições: *ion trap* LCQ Deca XP MAX.

O espectro de massa da fosfalona (Figura 24a) apresenta o pico do íon molecular protonado $[M+H]^+$ de m/z 368. Dois picos resultantes da fragmentação são observados nos resultados em m/z 182 e m/z 321. O mais abundante com m/z 321 resulta da perda de uma molécula de etanol (CH_3-CH_2-OH). O pico com m/z 182 resulta da perda de 186 Da através do grupo $[(CH_3-CH_2-O)_2(H-S)P=S]$. O organosfosforado diazinona (Figura 24b) apresenta íon molecular $[M+H]^+$ m/z 305 e os picos MS/MS com m/z 169 e m/z 153. A interpretação destes picos é justificada pelo rearranjo tiolo-tiono estudado por Barr *et al.*⁹⁴ Segundo as conclusões dos autores, o rearranjo é observado para os

compostos da subclasse dietilfosforotioato dos organofosforados. O pico com m/z 169 ocorre pelo rearranjo de SH no anel pirimidina e o com m/z 153 pelo rearranjo de OH no anel. Em ambas as situações a molécula permanece protonada no quarto N em relação ao grupo funcional da classe organofosforada. De acordo com o estudo de Barr *et al.*⁹⁴, o pirazofós da subclasse dietilfosforotioato (Figura 24c), o rearranjo novamente é responsável pela substituição do grupo característico da classe fosforada e ligação do HS ao anel de cinco membros. Isto está representado pela formação do íon com m/z 238 devido à perda de 136 Da. Outro resultado do rearranjo é o fragmento m/z 222, identificado pela ligação de OH no anel. A perda de uma molécula de etileno (28 Da) gera o íon produto intenso com m/z 345. O íon molecular protonado e produto do azinfos-metil (Figura 24d) são identificados no espectro como m/z 318 e 256, respectivamente. Os íons produtos com m/z 256 e m/z 300 são explicados pela perda de 2 moléculas de metanol (64 Da) e uma molécula de água (18 Da), respectivamente. O pico do íon molecular protonado do dimetoato m/z 230 perde um molécula de metanol (32 Da) para formar o íon produto de m/z 198 (Figura 24e). O metamidofós (Figura 24f) apresenta pico do íon molecular protonado com m/z 143 e fragmento MS/MS com m/z 112. O acefato (Figura 24g) apresenta pico do íon molecular protonado com m/z 184 e fragmento MS/MS com m/z 143. O fosforado fosmete (Figura 24h) apresenta pico do íon molecular protonado com m/z 390 e fragmento MS/MS com pico base m/z 317.

4.5.2 Método UHPLC-MS/MS

O método desenvolvido utilizando o analisador de massa *ion trap* não teve sensibilidade suficiente para a detecção dos compostos praguicidas em urina em níveis abaixo de 100 ppb. Desta forma, um método pré-estabelecido para análise de 400

praguicidas no sistema triplo quadrupolo Xevo TSQ da Waters foi adaptado para análise dos praguicidas deste trabalho. As condições de ajuste do instrumento estão descritas no item 3.4. O método de 400 praguicidas empregava composição binária de fase móvel A (H_2O + 0,1% ácido fórmico) e fase móvel B (MeOH + 0,1% ácido fórmico). Os primeiros experimentos foram adquiridos ainda usando a ACN como fase móvel, mantendo o método desenvolvido no ion trap. Uma corrida cromatográfica foi realizada na condição inicialmente proposta. Nesta condição houve dificuldade na ionização do metomil, acefato, aldicarbe e de seu metabólito, aldicarbe-sulfona. Desta forma, uma nova condição de fase móvel empregando metanol e outro aditivo de ionização foram avaliados. A nova condição experimental empregava fase móvel A (H_2O + 5 mM acetato de amônio) e fase móvel B (MeOH + 0,1% ácido fórmico). A modificação das condições de fase móvel resultou melhora na ionização dos compostos citados e no formato do pico cromatográfico. As janelas de visualização da banda cromatográfica foram reduzidas para aumento de sensibilidade. Um valor de 2 ms foi empregado como *dwell time*. Os íons precursores e os íons produtos para as transições de quantificação (Q1) e de confirmação (Q2), as respectivas energias de colisão e a tensão do cone utilizadas estão apresentadas na Tabela 12. Com exceção do aldicarbe, detectado na forma sodiada $[\text{M}+\text{Na}]^+$, os outros íons precursores se ionizaram na forma protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabela 12: Íon precursor, tempo de retenção, tensão do cone, íon quantificador e confirmador com a respectiva energia de colisão entre parênteses.

Analito	[M+H] ⁺	t _R	CV (V)	Q1	Q2 ^b
Metamidofós	142	0,74	30	94 (13)	124 (13)
Aldicarbe-sulfona	223	1,62	30	86 (14)	148 (10)
Metomil	163	1,91	10	88 (10)	106 (10)
Dimetoato	230	2,82	30	125 (20)	199 (10)
Aldicarbe ^a	213	3,61	30	89 (15)	116 (10)
Simazina	202	4,26	32	96 (22)	124 (17)
Carbofurano	222	4,36	30	123(21)	165 (16)
Carbaril	202	4,55	30	127 (26)	145 (10)
Diurum	233	5,14	30	46 (14)	72 (30)
Ametrina	228	5,18	32	68 (36)	186 (18)
Propazina	230	5,68	30	146 (24)	188 (18)
Mercaptodimetur	226	5,64	30	121 (20)	169 (10)
Azinfos-metil	318	5,47	10	125 (15)	260 (8)
Linurom	249	5,60	30	160 (18)	182 (16)
Pirazofós	374	7,00	33	194 (32)	222 (22)
Diazinona	305	6,81	30	97 (35)	169 (22)
Fosmete	318	5,53	30	77 (50)	160 (15)

a detectado como aduto de sódio [M+Na]⁺

A Figura 25 apresenta os cromatogramas dos praguicidas obtidos no sistema UPLC-MS/MS segundo as condições apresentadas na Tabela 12.

(a) aldicarbe-sulfona

(b) aldicarbe

(c) azinfos-metil

(d) carbaril

(e) ametrina

(f) carbofurano

(g) diazinona

(h) dimetoato

(i) diurom

(j) linurom

(l) metamidofós

(m) metomil

(n) mercaptodimetur

(o) fosmete

(p) propazina

(q) pirazofós

(r) simazina

Figura 25: Cromatogramas dos praguicidas em UPLC sistema Xevo TSQ. Coluna de fase reversa Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 μ m). Fase móvel A (formiato de amônio 5mM/ácido fórmico 0,1%) e fase móvel B (MeOH + formiato de amônio 5mM/ácido fórmico 0,1%). Gradiente de 5 a 95% B de 0 a 8,5 min, 95% B de 8,5 a 9 min, 95 a 5% B de 9 a 9,01 min e 5% B de 9,01 a 9,50 min.

4.6 Validação do método

O método analítico desenvolvido no sistema UPLC-MS/MS Xevo TSQ foi validado com base na linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), recuperação, exatidão e recuperação (Tabela 13) descritos no item 3.5. Os dados necessários para avaliar o efeito de matriz está apresentado na Tabela 14.

Tabela 13: Parâmetros da validação do método LC-MS/MS.

Analito	Inclinação	intercepto	R ²	F	LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)	% CV			Recuperação (%)		
							0,75 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	0,75 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹
Metamidofós	5630±29	576±552	0,9998	37498	0,323	0,981	7,76	0,751	0,971	57,5±4,5	105±1	99,7±0,9
Aldicarbe-sulfona	409±2	-16,8±45,0	0,9998	38543	0,362	1,10	7,59	2,27	1,52	72,6±5,5	102±2	100±1
Metomil	39,1±1,3	-49,3±37,8	0,9977	868	3,19	9,67	ND	8,40	1,04	ND	102±8	101±1
Dimetoato	3493±11	784±227	0,9999	85004	0,215	0,652	3,23	1,83	1,91	64,4±2,1	101±1	99,7±1,9
Aldicarbe	12,1±0,1	-25,3±2,2	0,9999	32738	0,597	1,81	ND	49,8	3,31	ND	112±35	99±3
Simazina	1711±5	-38,1±105,2	0,9999	107510	0,202	0,615	7,86	0,775	1,11	65,8±5,2	101±1	99,9±1,1
Carbofurano	7613±22	0,348±429,020	0,9999	113801	0,186	0,563	3,91	1,72	1,42	70,4±2,8	102±2	99,9±1,4
Carbaril	235±2	-80,4±74,1	0,9995	6570	1,04	3,14	ND	4,87	1,55	ND	99,1±4,8	101±1
Diurum	5301±21	1494±406	0,9998	61345	0,253	0,767	6,05	1,16	1,06	56,4±3,4	102±1	99,7±1,1
Ametrina	23022±113	46051±2156	0,9998	41197	0,309	0,937	4,78	1,13	0,877	55,7±2,7	103±1	99,6±0,9
Propazina	735±847	10847±44	0,9998	59221	0,258	0,781	5,92	1,25	1,09	66,0±3,9	102±1	99,7±1,1
Mercaptodimetur	1654±5	372±96	0,9999	106588	0,192	0,582	13,7	1,76	1,02	71,1±9,8	100±2	99,9±1,0
Azinfos-metil	63,6±2,6	-22,8±86,3	0,9965	583	4,48	13,6	ND	8,98	5,94	ND	105±9	100±6
Linurom	3902±12	-105±232	0,9999	101458	0,197	0,597	9,50	1,47	1,43	69,3±6,6	101±1	99,8±1,4
Pirazofós	4813±18	9263±347	0,9998	69514	0,238	0,721	19,1	2,51	1,91	64,5±12,3	102±3	99,8±1,9
Diazinona	9620±37	-315±708	0,9998	66574	0,243	0,737	1,94	1,31	1,30	69,6±1,4	102±1	99,8±1,3
Fosmete	218±2	187±75	0,9997	6795	1,14	3,45	ND	5,45	1,97	ND	101±6	99,6±2,0

Tabela 14: Comparação do coeficiente angular das curvas em água e fortificada em amostras.

	S _{água}	R ²	S _{amostra}	R ²	S _{amostra} /S _{água}
Metamidofós	7541	0,9991	5631	0,9998	0,74
Aldicarbe-sulfona	468	0,9998	409	0,9998	0,87
Metomil	115	0,9995	39,1	0,9977	3,39
Dimetoato	3593	0,9999	3496	0,9999	0,97
Aldicarbe	11,4	0,9919	12,1	0,9999	1,06
Simazina	1736	0,9998	1711	0,9999	0,98
Carbofurano	7415	0,9999	7620	0,9999	1,02
Carbaril	217	0,9993	235	0,9995	1,08
Diurum	5545	0,9995	3905	0,9998	0,70
Ametrina	20921	0,9998	23038	0,9998	1,10
Propazina	10570	0,9989	10853	0,9998	1,02
Mercaptodimetur	1556	0,9993	1556	0,9999	1,06
Azinfos-metil	56,6	0,9969	63,6	0,9965	1,12
Linurom	3666	0,9999	3905	0,9999	1,06
Pirazofós	3917	0,9998	4817	0,9998	1,22
Diazinona	7575	0,9989	9627	0,9998	1,27
Fosmete	560	0,9999	218	0,9997	0,389

As curvas analítica das amostras fortificada apresentaram coeficiente de determinação maiores que 0,9965 no intervalo de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 13). Os coeficientes angular e linear foram estimados pela regressão linear.

Estudos de recuperação foram efetuados para validar a exatidão do método proposto. O parâmetro foi estimado pela proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. As concentrações de 0,75, 10,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram os níveis baixo, médio e alto, respectivamente. A exatidão do método variou entre 55,7 e 72,6% para o nível mais baixo de concentração. Para 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, a exatidão se aproximou de 100%.

Avaliada em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), a precisão foi menor para o nível baixo de concentração variando de 1,94 a 19,1 %. No nível de 10,0

$\mu\text{g L}^{-1}$, a precisão variou entre 0,75% para metamidofós e 8,40% e 8,98% metomil e azinfos-metil, respectivamente. A precisão no nível de concentração mais alto apresentou valores de 0,87 e 5,94% para simazina e azinfos-metil, respectivamente. A precisão está entre os limites aceitáveis com valores menores que 20%.

O LD variou entre 4,48 e 0,192 $\mu\text{g L}^{-1}$ para azinfos-metil e mercaptodimetur, respectivamente. O LQ do método variou entre 0,582 e 13,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficiente de variação aceitável inferior a 20%.

A quantificação das 25 amostras cedidas pelo laboratório de Análises Toxicológicas está apresentada na Tabela 15. As amostras quantificadas detectaram a presença dos praguicidas aldicarbe-sulfona, simazina, carbofurano, diurom, mercaptodimetur, linurom, pirazofós, diazinona, metamidofós e propazina. As amostras apresentaram concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Alguns valores de concentração marcados com asterisco foram estimados acima do limite superior de quantificação, como por exemplo, com o indivíduo 3, onde a presença de simazina, diurom e ametrina está acima de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os indivíduos 4 e 5 apresentaram o maior número de praguicidas identificados e quantificados na faixa linear. Verifica-se para as amostras numeradas 24, 25, 23, 17, 1, 16, 8, 21, 9, 11, 2 e 10 a ausência ou a presença dos praguicidas abaixo do limite inferior de quantificação. A seleção das amostras abrangeu desde pessoas diretamente expostas aos praguicidas até às populações habitantes nas regiões das lavouras e funcionários de fazendas que não exerciam atividades ligadas às lavouras.

Tabela 15: Quantificação dos analitos nas amostras reais de exposição ocupacional.

	22	19	24	25	23	17	7	1	3	16	8	18	4	21	20	5	9
Metamidofós																	
Ald-sulfona							41,2±1,6						27,9±1,9			44,2±0,1	
Metomil																	
Dimetoato																	
Aldicarbe																	
Simazina	18,4±2,1	22,2±2,7							66,5±1,3*			52,5±0,5*	29,2±2,1		31,9±0,9	54,8±2,8*	
Carbofurano												22,1±0,2*	22,5±0,2		17,7±0,3	41,2±0,1	
Carbaril																	
Diurom		101±2*							100±1*			30,9±0,1			36,1±1	27,8±0,1	
Ametrina									78,2±2,3*								
Propazina	16,3±0,2	123±2*										54,1±0,1*	24,1±0,4			50,4±0,4	
Mercaptodimetur		104±1*										21,1±0,9				14,3±1,5	
Azinfos-metil																	
Linurom	24,2±0,9											41,8±0,6	28,5±0,2			38,2±0,1	
Pirazofós	46,4±3,2											56,6±1,9*	40,4±3,3			65,1±6,6*	
Diazinona	20,3±0,6											24,5±0,7	23,1±0,7			38,2±0,3	
Fosmete																	

Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$.

*estimativa da concentração

Tabela 15: Continuação.

Analitos	11	14	13	15	2	10	6	12
Metamidofós			44±3					
Ald-sulfona		21,5±2,2						
Metomil								
Dimetoato								
Aldicarbe								
Simazina		23,1±1,1		18,1±1,1			15,9±1,2	34,9±3,8
Carbofurano		36±1	33,4±0,7	14,8±0,4			11,8±0,1	32,9±0,1
Carbaril								
Diurum			34,5±0,2					31,8±0,1
Ametrina								
Propazina		17,9±0,1	42,2±1,2					43,2±0,4
Mercaptodimetur								
Azinfos-metil								
Linurom		13,6±1,1	35,8±0,1	17,5±0,5			22,1±0,1	33,4±0,4
Pirazofós		50,4±0,2	64,3±0,3*	22,1±1,6			46,7±4	61,1±1,4*
Diazinona								
Fosmete								

Concentração em µg L⁻¹.

*estimativa da concentração

5. Conclusões

Por causa da complexidade da amostra contendo diversas classes de praguicidas, a separação em modo de eluição isocrático não foi possível. Estas conclusões foram obtidas através de cálculos do fator de retenção e verificação do tempo de análise. A aplicação de eluição em gradiente foi satisfatória na separação multirresidual. Diversas modificações nas condições de gradiente (tempo de gradiente, concentração inicial), temperatura e vazão da fase móvel foram avaliadas para verificação de seus efeitos sobre a separação. A importância e os efeitos da composição da fase móvel foram avaliados pela aquisição dos parâmetros solvatocrômicos de Kamlet-Taft. A retenção na forma logarítmica ($\log k$) dos compostos em função dos parâmetros foi colocada na forma de gráfico para compreensão da separação cromatográfica. A variação da acidez (α) e basicidade (β) da mistura ACN/água na fase móvel influencia a separação por serem responsáveis pelas interações específicas, condizentes com o tipo de estrutura dos praguicidas. A constante dielétrica (ϵ) fornecendo informações sobre a água atuante na densidade de carga das moléculas, apresenta uma diferenciação na condição experimental de 45% ACN na separação dos últimos praguicidas a eluírem da coluna. Os resultados do parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ_H) indicam que a cavitação ocorre mais facilmente nos experimentos ricos e pobres de ACN na fase móvel, 70 e 45% de ACN, respectivamente. Um comportamento quase que insensível em relação à estruturação da mistura da fase móvel é observado para metomil e dimetoato, que poderia ser atribuído às ligações de H intramoleculares, dificultando a interação com o solvente. Uma explicação satisfatória das propriedades descritoras da mistura ACN/água na fase móvel e a retenção dos praguicidas foi encontrada.

A indicação de uma condição ótima a partir da avaliação das condições experimentais univariadamente é complexa. Tais resultados foram utilizados para uma

verificação de domínios experimentais definindo parâmetros para uma otimização multivariada e obtenção de um método final para análise de amostras reais. Um planeamento fatorial de 4 variáveis em dois níveis e duas respostas (COF e CRS) indicaram que o experimento 7 ($0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 75 min de gradiente e 5% ACN inicial) apresenta condições experimentais adequadas para a separação parcial do par crítico 14 e 15 (azinfos-metil e linurom). De acordo com a ANOVA (Tabela 11) para COF, o modelo matemático é significativo e a variável importante para alguma variação efetiva na resposta é vazão da fase móvel com F de 135,15 ($p < 0,005$). Uma avaliação qualitativa de CRS também indicou entre as possibilidades de resposta ótimas o experimento 7. A partir destes resultados, segmentações com declividades entre $0,71$ e $2,5 \text{ min}^{-1}$ não apresentaram melhoras na resolução entre o par de compostos 14, 15.

Com as transições MS/MS (Figura 21 a 24), obtidas com o analisador tipo *ion trap*, uma compreensão das fragmentações foi importante para a escolha dos íons precursor e produto para definição das transições de quantificação. Os experimentos obtidos pelo sistema UPLC-MS/MS triplo quadrupolo, definidos segundo a Tabela 12 foram ajustados para os experimentos de validação e quantificação das amostras reais. A caracterização através da validação do método indicou que, para a maioria dos compostos, o método é adequado para a quantificação de amostras de urina provenientes da exposição ocupacional, com variações dentro dos limites do protocolo de validação. A sensibilidade do sistema UHPLC-MS/MS permitiu que a amostra fosse diluída 20 vezes, minimizando assim, os efeitos de matriz. Foi possível a quantificação das amostras reais em níveis baixos de concentração com desvios baixos através do método proposto. A quantificação das 25 amostras detectou a presença dos praguicidas aldicarbe-sulfona, simazina, carbofurano, diurom, mercaptodimetur, linurom, pirazofós, diazinona, metamidofós e propazina. As amostras apresentaram

concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para algumas amostras não foi detectada a presença de qualquer praguicida acima do limite de quantificação.

6. Referências bibliográficas

- 1 IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry), **Compendium of Chemical Terminology**, 2^a edition, 1997, 65, 2081.
- 2 www.epa.gov/pesticides/about/index.htm. Acesso em 25 de maio de 2010.
- 3 Lei Federal nº 7802/89 de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto nº 98816, artigo 2º, inciso I.
- 4 Informativo Técnico Institucional da Anvisa, **Revista Saúde Pública**, 40 (2), 2006, 361-363
- 5 **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 20, 1994, 160
- 6 Cooping, L. G., Menn, J. J., Biopesticides: a review of their action, application and efficacy, **Pest Management. Science**, 56, 2000, 651.
- 7 Avery, S., The constitution of Paris green and its homologues, **Journal of the American Chemical Society**, 29, 5, 1906, 1155.
- 8 Pimentel, L. C. F., Chaves, C. R., Freire, L. A. A., Afonso, J. C., **Química Nova**, 29 (5), 2006, 1138-1149.
- 9 D'Amato, C., Torres, J. Contaminação ambiental – uma revisão, **Química Nova**, 25, 6, 2002, 995-1002.
- 9 Pozzebon, J. M., Queiroz, S. C. N., Melo, L. F. C., Kapor, M. A., Jardim, I. C. S. F., Application P. M., Malm, O., DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão, **Química Nova**, 25, 6, 2002, 995-1002.
- 10 EPA. **U. S. Environmental Protection Agency**. Types of Pesticides. Disponível em www.epa.gov/pesticides. Acesso em: 01 de abril de 2009.
- 11 **Compendium of Pesticides Common Names**. Disponível em www.alanwood.net/pesticides. Acesso em 01 de abril de 2009.
- 12 www.anvisa.gov.br. Acesso em 10 de dezembro de 2011
- 13 Marrs, T. C., Organophosphate poisoning. **Pharmacology and Therapeutics**, 58, 1993, 51-66.
- 14 Spencer, E. Y., O'Brien, R. D., Chemistry and mode of action of organophosphorus insecticides. **Annual Review of Entomology**, 2, 1957, 261-278.
- 15 Kananyire, R., Karalliedde, L., Organophosphate toxicity and occupational exposure. **Occupational Medicine**, 54, 2004, 69-75.
- 16 Shen, L., Wania, F., Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for organochlorine pesticides. **Journal of Chemical Engineering Data**, 50, 2005, 742-768.
- 17 McCarty, L. S., Borgert, C. J., Review of the toxicology of chemical containing at least one organochlorine. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 45, 2006, 104-118.

-
- 18 Deichmann, W. B., McDonald, W. E., Organochlorine and human health. **Food and Cosmetology Toxicology**, 9, 1971, 91-103.
 - 19 Anand, M., Singh, J., Mehrotra, P. K., Concentration of organochlorine pesticides in blood, tumor and adipose tissue and breast cancer risk: an Indian study. **Toxicological Letters**, 180, 2008, 78-85.
 - 20 Oturan, M. A., Edelahti, M. C., Oturan, N., Kacemi, K. E., Aaron, J. J., Kinetics of oxidative degradation/mineralization pathways of the phenylurea herbicides diuron, monuron and fenuron in water during application of the electro-Fenton process. **Applied Catalysis B: Environmental**, 97, 2010, 82-89.
 - 21 Schneider, P., Goodrow, M. H., Gee, S. J., Hammock, B. D., A highly sensitive and rapid ELISA for the arylurea herbicides diuron, linuron and monuron. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, 42, 1994, 413-422.
 - 22 Dean, J. R., Wade, G., Barnabas, I. J., Determination of triazines herbicides in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, 733, 1-2, 1996, 295-335.
 - 23 Pacáková, V., Stulík, K., Jiskra, J., High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. **Journal of Chromatography A**, 754, 1996, 17-31.
 - 24 Santos, S. P., A química dos inseticidas. http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_085_043_09.pdf. Acesso em janeiro de 2013.
 - 25 Soriano, J. M., Jiménez, B., Font, G., Moltó, J. C., Analysis of carbamate pesticides and their metabolites in water by solid-phase extraction and liquid chromatography: review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31, 2001, 19-52.
 - 26 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012>. Acesso em agosto de 2012.
 - 27 <http://www.oeco.com.br/reportagens/25276-como-andam-os-agrotoxicos-no-brasil>. Acesso em janeiro de 2013.
 - 28 <http://www.portaleducacao.com.br/enfermagem/artigos/810/definicao-e-classificacao-dos-agrotoxicos>. Acesso em 12 de dezembro de 2011.
 - 29 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>. Consulta em agosto de 2012.
 - 30 <http://noticias.terra.com.br/brasil/noticias/0,,OI5508278-EI306,00-Anvisa+agrotoxicos+serao+banidos+ate+por+risco+a+saude.html>. Consulta em dezembro de 2011.
 - 31 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/agrotoxico+utilizado+como+chumbinho+e+retirado+do+mercado+brasileiro>. Acesso em janeiro de 2013.
 - 32 www.agencia.cnptia.embrapa.br. Acesso em agosto de 2012.

33 Radka, M., Zbynek, P., Karel, S., Enzymatic reaction coupled with flow-injection analysis with charged aerosol, coulometric or amperometric detection for estimation of contamination of the environment by pesticides. **Chromatographia**, 67, 2008, s47-53.

34 Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B. D., Chandna, S., Rautila, R. S., Grover, S. S., Rawat, D. S., pasha, S. T., Jain, S K., Ichhpujani, R., Rai, A., DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 31, 2011, 278-285.

35 Schilman, A., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Gradoño, C., Salinas-Rodríguez, A., Flores-Aldana, M., Cebrián, M. E., Identifying pesticides use patterns among flowers growers to assess occupational exposure to mixtures. **Occupational and Environmental Medicine**, 67 (5), 2010, 323-329.

36 Quirós-Alcalá, L., Bradman, A., Nishioka, M., Harnly, M., Hubbard, A., Mckone, T. E., Febber, J., Esckenzi, B., Pesticides in house dusts from urban and farmerworker household in California: an observational measurement study. **Environmental Health**, 10 (19), 2011, 1-15.

37 Wang, J., Ludovic, T., Mercury, M., Millet, M., Briand, O., Montury., M., Sampling Atmospheric Pesticide with SPME: Laboratory Developments and Field Studies. **Environmental Pollution**, 157, 2009, 365-370.

38 Lazartigues, A., Fratta, C., Baudot, R., Wiest, L., Feidt, C., Thomas, M., Cren-Olivé, C., Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. **Talanta**, 85, 2011, 1500-1507.

39 Yang, W. C., Hunter, W., Spurlock, F., Gan, J., Bioavailability of Permethrin and Cyfluthrin in Surface Waters with Low Levels of Dissolved Organic Matter. **Journal of Environmental Quality**, 36 (6), 2009, 1678-1685.

40 Doyeli, S., Rani, A., Gujral, S., Gupta, R., Development, validation and uncertainty measurement of multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides using pressurized liquid extraction and dispersive SPE techniques. **Environmental Monitoring Assessment**, 182, 2011, 97-113.

41 Skrbic, B., Mladenovic, N. D., Principal Component Analysis for Soil Contamination with Organichlorine Compounds. **Chemosphere**, 68, 2007, 2144-2152.

42 Font, G., Ruiz, M. J., Fernández, M., Professor, Y. P., Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for determining organic food contaminants and residues. **Electrophoresis**, 29 (10), 2008, 2059-2078.

43 Radisic, M., Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M., Determination of Selected Pesticides in Fruit Juices by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Chemistry**, 113, 2009, 712-719.

44 Robazzi, M. L. C. C., Luis, M. A. V., Lavrador, M. A. S., Gobbo, A. F. F., Substâncias Químicas, Trabalho e Alterações Neurológicas: Possíveis Relações entre estas Variáveis. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 7 (1), 1999, 39-48.

45 Roldán-Tapia, L., Parrón, T., Sánchez-Santed, F., Neuropsychological Effects of Long-Term Exposure to Organophosphate Pesticides. **Neurotoxicology and Teratology**, 27, 2005, 259-266.

-
- 46 http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349. Acesso em 08 de dezembro de 2011.
- 47 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/108agrotox.html>. Consulta em 12 de dezembro de 2011.
- 48 Barr, D. B., Biomonitoring of Exposure to Pesticides. **Journal of Chemical Health & Safety**, 15 (6), 2008, 20-29.
- 49 Ueyama, J., Saito, I., Kamijima, M., Nakajima, T., Gotoh, M., Suzuki, T., Shibata, E., Kondo, T., Tajagi, K., Myamoto, K., Takamatsu, J., Hasegawa, T., Takagi, K., Simultaneous Determination of Urinary Dialkylphosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 832, 2006, 58-66.
- 50 Shakulashvili, N., Steiner, R., Engelhardt, H., Simultaneous Determination of Various Classes of Pesticides Using Micellar Electrokinetic Cappelary Chromatography in Combination with Solid-Phase Extraction. **Chromatographia**, 60, 2004, 145-150.
- 51 Mardones, C. Rios, A., Varcácel, M., Automatic On-line Coupling of Supercritical Fluid Extraction and Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, 72, 2006, 5736-5739.
- 52 Maldaner, L., Santana, C. C., Jardim, I. C. S. F., HPLC Determination of Pesticides in Soybeans Using Matrix Solid Phase Dispersion. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 32, 2008, 972-983.
- 53 Ueyama, J., Kamijima, M., Kondo, T., Takagi, K., Shibata, E., Hasegawa, T., Taki, T., Gotoh, M., Saito, I., Revised method for routine determination of urinary dialkyl phosphates using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 878, 17-18, 1257-1263.
- 54 Raepfel, C., Nief, M., Fabritius, M., Racault, L., Appenzeller, B. M., Millet, M., Simultaneous analysis of pesticides from different chemical classes by using a derivatisation step and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1218 (44), 2011, 8123-8129.
- 55 Rodríguez-Gonzálo, E., García-Gomez, D., Herrero-Hernández, E., Carabias-Martínez, R., Automated sample treatment with the injection of large sample volumes for the determination of contaminants and metabolites in urine. **Journal of Separation Science**, 33, 2010, 2240-2249.
- 56 Rosales-Corado, N., León-González, M. E., Pérez-Arribas, L. V., Pólo-Díez, L. M., Multiresidue determination of chlorophenoxy acid herbicides in human urine samples by use of solid-phase extraction and capillary LC-UV. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 390, 2008, 759-768.
- 57 Dulaurent, S., Saint-Marcoux, F., Marquet, P., Lâchatre, G., Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 831, 2006, 223-229.
- 58 Tippins, B., Solid Phase extraction fundamentals. **Nature**, 334, 1988, 273-274.
- 59 Pitarch, E., López, F. J., Serrano, R., Hernández, F., Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography. **Frenesius Journal of Analytical Chemistry**, 369, 2001, 502-509.

-
- 60 Mendas, G., Drevenkar, V., Kralikj, L., Solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene sorbent for high-performance liquid chromatography or gas chromatographic determination of urinary chloro- and methylthiotriazines. **Journal of Chromatography A**, 918, 2001, 351-359.
- 61 Mc Fadden, W. H., Schwartz, H. L., Direct analysis of liquid chromatography effluents. **Journal of Chromatography**, 122, 1976, 38-396.
- 62 Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., **Anal. Chem.**, 61, 1989, 1702.
- 63 Ardrey, R. E., **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction**. 1st edition, 2003, John Wiley, London. 291 p.
- 64 Norrgran, J., Bravo, R., Bishop, A. M., Restrepo, P., Whitehead, R. D., Needham, L. L., Barr, D. B., Quantification of six herbicides metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, 830, 2006, 185-195.
- 65 Sandi, A., Nagy, M., Szepes, L., Characterization of reversed-phase columns using the linear free relationship III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition. **Journal of Chromatography A**, 893, 2, 2000, 215-234.
- 66 Kaliszan, R., Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 656, 1993, 417-435.
- 67 Kamlet, M. J., Aboudd, J. L. M., Abraham, M. H., Taft, R. W., A comprehensive collection of the solvatochromic parameters. **Journal of Organic Chemistry**, 48, 1983, 2877-2888.
- 68 Katz, E., Eksteen, R., Shoenmakers, P., Miller, N., **Handbook of HPLC**, ed. Marcel Dekker, New York, 1998.
- 69 Vailaya, A., Fundamentals of reversed-phase chromatography: Thermodynamic and exothermodynamic treatment. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 28, 7-8, 2005, 965-1054.
- 70 Abraham, M.H., P. L., Grelier, McGill, R. A., A quantitative measure of solvophobic effect. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions II**, 1988, 339.
- 71 Abraham, M. H., Scales of solute hydrogen bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. **Chemical Society Reviews**, 22, 73-83, 1993.
- 72 Abraham, M. H., Ibrahim, A., Zissimos, A. M., Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. **Journal of Chromatography A**, 1037, 2004, 29-47.
- 73 Singh, B., Kumar, R., Ahuja, N., Optimizing drug delivery system using systematic "design of experiments". Part I: Fundamental aspects. **Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 22 (1), 2004, 27-105.
- 74 van Leeuwen, J. A., Buydens, L. M. C., Vandeginste, B. G. M., Kateman, G., Shoenmakers, P. J., Mulholland, M., RES, an expert system for the set-up and interpretation ruggedness test in HPLC method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory System**, 10, 1991, 337-347.
- 75 Bounine, J. P., Guiochon, G., Colin, H., A simple pragmatic optimization procedure for some parameter involved in high-performance liquid chromatography separations: column design, temperature, solvent flow-rate and composition. **Journal of Chromatography**, 298, 1984, 1-20.

-
- 76 Siouffi, A. M., Tan-Luu, R. P., Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 892, 2000, 75-106.
- 77 Berridge, J. C., Chemometric and method development in high-performance liquid chromatography. Part I: Introduction. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 3, 1998, 175-188
- 78 Goupy, J., What kind of experimental design for finding and checking robustness of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, 544, 2005, 184-190.
- 79 Araujo, P. W., Brereton, R. G., Experimental Design I. Screening. **Trends in Analytical Chemistry**, 15, 1, 1996, 26-31.
- 80 Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais. **Química Nova**, 29, 2, 2006, 338-350.
- 81 Katz, E., Eksteen, R., Shoenmakers, P., Miller, N., **Handbook of HPLC**, ed. Marcel Dekker, New York, 1998.
- 82 Lewis, J. A., Snyder, L. R., Dolan, J. W., Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development – Recommended approach and conditions for isocratic separation, **Journal of Chromatography A**, 721, 1996, 15-29.
- 83 Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., Galan, L., Use of gradient elution for rapid selection of isocratic conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography**, 205, 1981, 13-20.
- 84 Snyder, L. R., Dolan, J. W., Gant, J. R., Gradient elution in high-performance liquid chromatography – theoretical basis for reversed-phase systems, **Journal of Chromatography**, 165, 1979, 3-30.
- 85 Poole, C. F., Atapattu, S. N., Poole, S. K., Bell, A. K., Determination of solute descriptors by chromatographic methods. **Analytica Chimica Acta**, 652, 2009, 32-53.
- 86 Kamlet, M. J., Taft, R. W., The solvatochromic comparison method. The α scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities. **Journal of the American Chemical Society**, 98, 10, 1976, 2886-2894.
- 87 Kamlet, M. J., Taft, R. W., The solvatochromic comparison method. The β scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. **Journal of the American Chemical Society**, 98, 2, 1976, 377-383.
- 88 Belmares, M., Blanco, M., Goddard, W. A., Ross, R. B., Caldwell, G., Chou, S. -H., Pham, J., Olofsson, P. W., Thomas, C., Hildebrand and Hansen solubility parameters from molecular dynamics with applications with electronics nose polymer sensors. **Journal of Computational Chemistry**, 25, 15, 2004, 1814-1826.
- 89 Marcus, Y., Migron, Y., Polarity, hydrogen bonding, and structure of mixtures of water and cyanomethane. **Journal of Physical Chemistry**, 95, 1991, 400-406.
- 90 Tavares, M. F. M., Farah, J. P. S., Micke, G. A., Pereira, E. A., Silva, C. A., Mixture-designed electrolytes for the MEKC of natural and synthetic steroids. **Electrophoresis**, 2007, 28, 3722-3730.

91 Wakisaka, A., Takahashi, S., Nishi, N., Preferential solvation controlled by clustering conditions of ACN-water mixtures. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions**, 91, 22, 1995, 4063-4069.

92 Patnak, P., **Analytical Chemistry Handbook**, 2^a ed., Mc Graw-Hill, New Jersey, 2004.

93 Sadek, P. C., **The HPLC solvent guide**, 2^a ed., J. Willey, New York, 2002.

94 Barr, J. D., Bell, A. J., Burdy, M., Mundy, J. L., Murrell, J., Timperley, C. M., Watts, P., Ferrante, F., Fragmentation and reaction of the organophosphate insecticide diazinon and its oxygen analog diazinon studied by electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Journal American Society Mass Spectrometry**, 16, 2005, 515.