Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos

**Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e
fipronil em amostras de água do Ribeirão do Feijão –
São Carlos – SP**

Luciana Teresa Dias Cappelini

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte dos quesitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica).

Orientador (a): Eny Maria Vieira

**São Carlos
2008**

*Dificuldades são prêmios de
Deus a nossa inteligência.*

*Como vencer o sofrimento
Paiva Neto*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Lúcia pela minha formação intelectual e moral; ao Rodrigo, meu marido, pelo incentivo, paciência e carinho constante em todos os momentos e a minha filha, que ainda nem nasceu, mas já me traz muita alegria.

Agradecimentos

A Deus pela força e a coragem que me deu para vencer os obstáculos.

A professora Eny, pela orientação, estímulo e principalmente confiança.

A Silvia Brondi pela amizade e co-orientação

As secretárias Vanessa e Veroneide, as secretárias da pós-graduação Andréia e Silvia, as bibliotecárias, as atendentes da portaria e as faxineiras do prédio de laboratórios.

Aos colegas de grupo: Daniela, Eliane, Guilherme, Renata, Ricardo que participaram do desenvolvimento do meu trabalho.

Aos colegas do ex grupo: Alexandre (Itapira), Carlos (Carlão), Eduardo (Du), Fernanda (Fer), Felipe, Ivonete, Silmara (Syl), Wendel (Wando).

Aos colegas que participaram de minha vida: Kátia, Olívia, Roni.

A Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	3
2.1 Método utilizado para as análises de pesticidas em água.....	13
2.1.1 Extração em fase sólida (SPE)	14
2.2 Técnica analítica para a determinação de pesticidas	16
2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	16
2.3 Validação do método analítico	19
2.3.1 Precisão	20
2.3.2 Coeficiente de correlação (r)	21
2.3.3 Limite de detecção (LOD)	22
2.3.4 Limite de quantificação (LOQ)	22
2.3.5 Linearidade	23
2.3.6 Exatidão	23
2.3.7 Recuperação	24
3 Objetivos	25
4 Materiais e Métodos	26
4.1 Área de estudo	26
4.1.1 Amostragem	29
4.2 Pesticidas Analisados	33
4.3 Preparo das amostras	36

SUMÁRIO

4.3.1 Padrões e Soluções Estoque	36
4.3.2 Extração em fase sólida (SPE).....	36
4.4 Condições cromatográficas	39
5 Resultados e Discussão	40
5.1 Análise cromatográfica dos padrões analíticos	40
5.2 Validação do Equipamento HPLC – DAD.....	44
5.2.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	44
5.2.2 Precisão.....	45
5.2.3 Linearidade	47
5.3 Aplicação da Extração em Fase Sólida (SPE)	49
5.3.1 Linearidade	50
5.4 Análise de Amostras de Água	54
6 Conclusões	60
7. Referências Bibliográficas.....	61

Lista de Figuras

Figura 1: Percentual das diferentes Classes de pesticidas	11
Figura 2: Distribuição da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo	12
Figura 3: Esquema de um cartucho de SPE	15
Figura 4: Esquema de instrumentação para HPLC.	17
Figura 5: Mapa com ênfase ao Ribeirão do Feijão	28
Figura 6: Coleta de amostra no ponto 1 do Ribeirão do Feijão	30
Figura 7: Coleta de amostra no ponto 2 do Ribeirão do Feijão	31
Figura 8: Coleta de amostra no ponto 3 do Ribeirão do Feijão	32
Figura 9: Esquema utilizado na extração em fase sólida (SPE)....	38
Figura 10: Cromatograma da atrazina $\lambda = 254$ nm.	41
Figura 11: Cromatograma do diuron $\lambda = 254$ nm.....	41
Figura 12: Cromatograma da ametrina $\lambda = 238$ nm.....	42
Figura 13: Cromatograma do fipronil $\lambda = 230$ nm.	42
Figura 14: Curva analítica dos compostos estudados, aplicando o método HPLC – DAD.....	48
Figura 15: Curva analítica dos compostos analisados, aplicando o método SPE – HPLC – DAD	52

- Figura 16:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1). 55
- Figura 17:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2). 56
- Figura 18:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3). 56
- Figura 19:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1). 57
- Figura 20:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2). 57
- Figura 21:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3). 58
- Figura 22:** Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1). 58

Figura 23: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2). 59

Figura 24: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3). 59

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação entre os limites de pesticidas em água potável segundo a legislação brasileira, OMS e legislação de vários países do Continente Americano.....	5
Tabela 2: Pesticidas analisados com os respectivos tempos de retenção.....	43
Tabela 3: Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), para os compostos estudados.....	45
Tabela 4: Precisão do equipamento HPLC – DAD, para os compostos analisados.	46
Tabela 5: Equação da reta e coeficiente da correlação obtidos ao aplicar o método de regressão linear.	47
Tabela 6: Valores de recuperação (%) para os pesticidas aplicando a metodologia SPE HPLC- DAD.....	50
Tabela 7: Resultados obtidos no cálculo da linearidade do método analítico SPE – HPLC – DAD, compostos analisados.	51
Tabela 8: Exatidão do método SPE – HPLC – DAD, para os compostos analisados	53

Tabela 9: Valores de temperatura (T), pH, condutividade elétrica (C.E.) e oxigênio dissolvido (O. D.), para os três pontos de amostragem do Ribeirão do Feijão.....	54
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTC – Capacidade de troca de cátions

CV – Coeficiente de variação

HPLC – Hight performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência.

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

OMS – Organização Mundial de Saúde

r – Coeficiente de correlação

S – Desvio padrão

SPE – Extração em fase sólida

Resumo

Visando aumentar produtividade das lavouras de cana-de-açúcar, devido á interesses econômicos está havendo uma utilização cada vez maior de pesticidas. A água utilizada neste estudo foi proveniente do Ribeirão do Feijão, responsável pelo abastecimento da cidade de São Carlos – SP. A principal cultura no entorno da bacia do Ribeirão do Feijão é a da cana-de-açúcar, por este motivo os pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil foram selecionados para este estudo, pois segundo pesquisa, estes compostos são muito utilizados nesta cultura. Os pontos de amostragem foram três, na nascente, ao longo do rio próximo a uma cultura de cana-de-açúcar e próximo à estação de tratamento de água. Por este motivo, esta pesquisa teve como objetivo a aplicação da extração em fase sólida (SPE) e otimização da técnica de cromatografia líquida utilizando um detector de diodos (HPLC – DAD) para a determinação de multiresíduos de pesticidas em amostras de água. As técnicas utilizadas apresentaram bons resultados. A validação do método foi feita para o equipamento (HPLC – DAD) e para o método (SPE – HPLC- DAD). Os limites de detecção e quantificação do equipamento variaram de 0,02 a 0,05 mgL⁻¹ e 0,07 a 0,17 mgL⁻¹ respectivamente. A linearidade foi de 0,99 e a precisão foi em torno de 0,41 a 2,56%. Calculou-se a recuperação do método de extração que variou entre 90 e 95%, a linearidade foi de 0,99 e exatidão que foi próximo a 100%. Todos os resultados de validação do método estão de acordo com a Legislação brasileira e internacional.

Palavras chave: pesticidas, água, extração, cromatografia.

Abstract

Seeking to increase productivity of the sugarcane farmings, due to an economical interests, it has been used pesticides each more. The water used in this study is from Ribeirão do Feijão, responsible for the provisioning of the city of São Carlos, in their state of São Paulo. The main culture around Ribeirão do Feijão is sugarcane, and for this reason the pesticides ametrine, atrazine, diuron and fipronil were selected for this study, because according to researches, these compounds are very used in this culture. The sample points were three: in the source, along the river, near to a sugarcane culture and near to the station of treatment of water. For aim this, research had an objective the application of the solid phase extraction (SPE) and optimization of the liquid chromatography technique using a detector of diodearray (HPLC. DAD) for the determination of multiresíduos of pesticides in samples of water. The validation of the method was made for the equipment (HPLC. DAD) and for the method (SPE. HPLC - DAD). The detection limits and quantification of the equipment varied from 0.02 to 0.05 mgL⁻¹ and 0.07 to 0.17 mgL⁻¹ respectively. The linearity was of 0.99 and the precision was around 0.41 to 2.56%. It was calculated the recovery of the extraction method that varied between 90 and 95%, the linearity was of 0.99 and the accuracy was close to 100%. All the results of validation of the method are in agreement with the Brazilian and international Legislation.

Words key: pesticides, water, extraction, chromatography.

1 Introdução

A Bacia do Ribeirão do Feijão, localizado na região centro-leste do Estado de São Paulo, faz divisa com diversos municípios da região, sendo o mesmo, considerado, o principal manancial de captação de água para cidade São Carlos ⁽¹⁾. Esse rio, além de ter suas águas utilizadas para o abastecimento público, também são usadas para proteção de comunidades aquáticas, recreação e a agricultura.

Atualmente, a principal cultura agrícola situada às margens desse rio, é a cana-de-açúcar, a qual vem crescendo a cada ano no interior paulista.

O setor sucroalcooleiro vem despertando cada vez mais interesse nas nações de primeiro mundo, devido ao baixo custo de produção de açúcar e álcool e, principalmente porque estes pretendem reduzir a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência de combustíveis fósseis. Visando cada vez mais o mercado externo, o interesse em reduzir suas perdas durante a produção também aumentou. Esse fato alavancou as vendas de pesticidas principalmente no Estado de São Paulo ⁽²⁾.

O fato de ter ocorrido aumento do consumo de pesticidas, despertou o interesse de cientistas em verificar se há a ocorrência de contaminação de ambientes aquáticos, pois segundo a literatura, os pesticidas em contato com o sistema aquático podem associar-se aos materiais em suspensão e, eventualmente, migrar para os sedimentos, eles podem ser liberados na água ou serem absorvidos, alterados ou degradados por microrganismos ⁽³⁾.

Segundo a literatura ⁽⁴⁾, os recursos hídricos agem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região. Sendo assim, quando os pesticidas são introduzidos no ambiente, os recursos hídricos sejam superficiais ou subterrâneos são seu principal destino.

Mesmo com essa informação, os estados brasileiros não possuem conhecimento satisfatório sobre suas reservas de água subterrânea, de maneira, que possam garantir sua utilização e conservação ^(5,6,7).

Diante da contaminação do ambiente aquático por pesticidas, há uma necessidade de monitorar corpos d'água, especialmente os destinados ao abastecimento público, quanto à presença destes compostos.

A presente pesquisa tem por finalidade empregar a extração em fase sólida (SPE), otimizar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – DAD) e validar o método (SPE – HPLC – DAD). Aplicar o método validado nas análises de resíduos dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil, em amostras de água procedentes do Rio Ribeirão do Feijão, rio este que abastece a cidade de São Carlos, para avaliação do corpo d'água quanto à presença desses compostos. Os pesticidas selecionados para este estudo, são amplamente empregados na lavoura de cana-de-açúcar, e podem contaminar corpos d'água.

2 Revisão de Literatura

A água é considerada um solvente universal, portanto é impossível encontrá-la em estado de absoluta pureza. Dessa forma pode-se dizer que a água é constituída por gases, compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos ou em suspensão, inclusive microorganismos e colóides ⁽⁸⁾. A quantidade e qualidade desses constituintes ou impurezas presentes na água dependem das condições climáticas, hidrológicas, geológicas, pedológicas, morfológicas e do grau de poluição, os quais caracterizam e condicionam as águas aos usos mais diversificados, como abastecimento, recreação, irrigação, navegação, entre outros⁽⁸⁾.

Os seres humanos, não são os únicos a consumirem água, outras formas de vida existentes na Terra dependem da mesma para sua sobrevivência. No entanto, 97% da água do mundo é salgada, sendo imprópria para consumo humano, para a maioria dos usos agrícolas e industriais. Nas geleiras e calotas polares encontra-se 1% de toda a água doce do mundo. Lagos, rios e águas subterrâneas são as principais fontes de água potável, e constituem em seu conjunto apenas 2% do suprimento total de água⁽⁹⁾. Apesar do Brasil ser detentor de aproximadamente 17% das águas doces do planeta (6,2 bilhões de m³), a maior parte dessa água (70%) está na bacia Amazônica, onde vivem apenas 7% da população ⁽¹⁰⁾.

A água destinada ao consumo humano, após seu tratamento, deve seguir alguns padrões, para que possa ser ingerida e também utilizada para fins de higiene, sem causar danos à saúde humana a curto e longo prazo ⁽¹¹⁾.

No Brasil o controle da qualidade da água para o abastecimento público é regulamentado pela portaria 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde⁽¹²⁾ e, estabelece procedimentos e responsabilidades relativas ao controle da qualidade da água para o consumo humano, além de seu padrão de potabilidade, limites para a qualidade microbiológica, turbidez da água filtrada, presença de substâncias químicas, e constituintes radioativos, que representam risco à saúde, além do padrão de aceitação para o consumo humano ⁽¹¹⁾. Nesta mesma portaria, são estabelecidos valores máximos permissíveis para alguns grupos de pesticidas, apesar disso, o número de ingredientes ativos monitorados pela legislação brasileira ainda é muito pequeno, comparado com a quantidade dos mesmos que atualmente se encontram em uso⁽¹²⁾.

Na Europa, a legislação monitora a contaminação da água segundo a Diretiva nº. 98/83/ECC, de 03 de novembro de 1998, que estabelece teores máximos para a presença de pesticidas em água de 0,1 µg L⁻¹ para a concentração individual, e de 0,5 µg L⁻¹ para a soma total de pesticidas em água⁽¹³⁾.

Além do Brasil, países do Continente Americano adotam limites para a presença de pesticidas em água potável, esses países baseiam-se nas normas da OMS ⁽¹⁴⁾, como valores para suas normas nacionais.

A Tabela 1 apresenta os valores limites para alguns pesticidas em água potável, segundo o Ministério da Saúde ⁽¹²⁾, pela OMS (Organização Mundial de Saúde) ⁽¹⁴⁾, para vários países do Continente Americano ⁽¹⁵⁾. Os pesticidas que não contam os limites, não apresentam controle pelas legislações em questão.

Tabela 1: Comparação entre os limites de pesticidas em água potável segundo a legislação brasileira, OMS e legislação de vários países do Continente Americano

Pesticidas	OMS VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BRA VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EUA VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BOL VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MEX VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VEN VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NIC VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ARG VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CAN VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Atrazina	2	2	3	-	-	-	2	-	-
Carbofurano	5	-	40	-	-	-	5	-	90
Endsulfam	-	20	-	-	-	-	-	-	-
Permetrina	20	20	-	-	-	-	20	-	-
Propanil	-	20	-	-	-	-	-	-	-
Trifuralina	-	20	-	-	-	-	-	-	-

OMS – Organização Mundial Saúde ⁽¹²⁾; BRA – Brasil; EUA – Estados Unidos da América; BOL – Bolívia; Mex – México; VEM – Venezuela; ARG – Argentina; CAN – Canadá; VMP – valor máximo permissível. Fonte: modificado de Centro Panamericano de Ingenieria Sanitária y Ciencias Del Ambiente ⁽¹⁵⁾.

Pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias que tem a finalidade de prevenir a ação ou destruir direta ou indiretamente insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal, que prejudicam a lavoura ⁽¹⁶⁾.

Os pesticidas podem ser classificados de diversas maneiras como por exemplo, quanto a sua finalidade, inseticida, herbicida, acaricida, ao seu modo de ação, ingestão, contato, fumegante, à origem, compostos orgânicos e inorgânicos ^(17,18,19).

Os pesticidas orgânicos são os mais utilizados, os quais apresentam átomos de carbono em sua estrutura. Os principais representantes deste grupo são os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, etc ⁽¹⁶⁾.

Os organoclorados são caracterizados por apresentar em sua estrutura átomos de carbono e cloro. Esses compostos causam danos ao ambiente e aos seres vivos, devido a sua grande estabilidade física e química, além de serem resistentes à hidrólise ⁽¹⁶⁾.

Os pesticidas organofosforados apresentam átomos de carbono e fósforo em sua estrutura⁽¹⁸⁾. Apresentam como vantagem a fácil degradação no ambiente, mas a desvantagem é sua alta toxicidade⁽¹⁶⁾.

Os inseticidas carbamatos são ésteres dos ácidos N-metil e N,N – dimetilcarbâmico, $RO.CONHCH_3$ e $RO.CO.N(CH_3)_2$, respectivamente, sendo R o grupo esterificante. Além destes existem ainda os metil carbamatos de oximas ($R=NO.N(CH_3)_2$). Os herbicidas carbamatos, por outro lado, incluem uma grande variedade de N-fenil e N-alkil derivados, além do metil, bem como, os correspondentes tiocarbamatos ⁽¹⁷⁾.

As triazinas são grupos de compostos derivados de anéis aromáticos tri – substituídos por átomos de nitrogênio, e são utilizadas como herbicidas. As mais utilizadas apresentam anel simétrico (1,3,5 – triazinas), sendo que as de primeira geração, representadas pela atrazina, simazina e cianazina, entre outras, são formadas pela introdução de um átomo de cloro no anel (6-cloro – 1,3,5 – triazinas ou clorotriazinas). Já as triazinas de segunda geração são formadas pela introdução dos grupos metoxila (6-metoxi-1,3,5-triazinas, ou metoxitriazinas ou triatonas), e tiometila (6-tiometil-1,3,5-triazinas ou tiometiltriazinas ou triatrinas), respectivamente, como um terceiro substituinte. Ametrina, simetrina, prometona, turbometona, são alguns representantes das triazinas de segunda geração ⁽²⁰⁾.

Os compostos derivados da uréia, pela substituição dos átomos de hidrogênio, são utilizados como herbicidas. Os derivados tri-substituídos são os que representam a mais alta atividade herbicida. O sub-grupo mais conhecido é o das feniluréias e inclui os derivados N'-aril – N,N-dimetiluréia (Diurom) e N'-aril-N-metoxi-N-metiluréia (Linurom). Estes últimos apresentam seletividade e atividade herbicida maiores que os primeiros ⁽²⁰⁾.

A intensidade do uso de pesticidas, levando em consideração os efeitos que eles causam ao ambiente e à saúde humana, requer o conhecimento de suas principais propriedades físicas e químicas, para que se possam prever interações com o solo e a possibilidade de contaminação e transporte, quando dissolvidos em águas ou associados aos sedimentos ⁽¹⁶⁾.

Para se avaliar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, deve-se levar em consideração diversos fatores tais como, as propriedades dos agentes químicos aplicados, as variáveis ambientais, os tipos de solo, a declividade do terreno e o clima. Além desses, deve-se considerar também os fatores diretos, como, percolação da água, erosão dos solos, deriva das pulverizações, descarte e lavagem de tanques e embalagens, entre outros ^(21, 22).

Uma das principais formas de chegada dos pesticidas ao meio aquático é por carreamento superficial ⁽²³⁾, o qual pode ocorrer de duas formas: o pesticida dissolvido na água, associado ao material em suspensão ou em ambos os processos ⁽²⁴⁾. Esse fato foi observado quando, encontraram-se resíduos de atrazina e acetolaclof em águas superficiais em concentrações maiores do que os limites permitidos pela Comunidade Européia e pela legislação brasileira ^(12, 13, 25).

Ainda análises feitas nas águas do Rio Shimano (Japão), no período de maio a setembro de 1996, os autores estudaram os pesticidas atrazina, simazina, trifluralina e metolacoloro, tendo sido detectada somente simazina e na concentração de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, inferior ao limite estabelecido pela Legislação Brasileira ^(12, 26).

A Atrazina, simazina e ametrina foram monitoradas na sub-bacia do Córrego Espreado na região de Ribeirão Preto (SP) no período de outubro de 1995 á julho de 1996. De um total de 250 amostras a atrazina estava presente em 17, mas em apenas duas amostras a concentração deste pesticida excedeu o limite permitido pela Comunidade Econômica Européia e pela legislação Brasileira ^(12, 13, 27).

Existem algumas práticas que podem ser realizadas para minimizar os efeitos da contaminação dos ambientes aquáticos próximos dentre elas pode-se citar a conservação do solo, que pode ser de acordo com o tipo de solo do local ou pesticida que esta sendo utilizado. Em estudos feitos com a prática de plantio direto, observou-se uma diminuição na concentração dos pesticidas atrazina, metacoloro, cinazina em águas de escoamento superficial ⁽²⁸⁾.

Outro procedimento feito, e que pode-se observar resultado semelhante foi a utilização de uma faixa de vegetação disposta transversalmente ao sentido do escoamento superficial. Os autores observaram uma redução nas taxas de concentração de glifosato, propiconazol e fenpropimorfe quando analisadas amostras de água resultantes do escoamento superficial ⁽²⁹⁾.

Os pesticidas que são aplicados no solo, podem também atingir as águas subterrâneas. Apesar de o solo funcionar como um filtro, purificando a água que percola por seu perfil, foram encontrados diversos poluentes orgânicos, dentre eles os pesticidas, em águas subterrâneas em diversos países ⁽³⁰⁾. Isto acontece devido a

alguns fatores como, substâncias que não se degradam facilmente, solos com baixos teores de matéria orgânica, baixa umidade e alta taxa de drenagem, são condições propícias para ocorrer à contaminação de águas subterrâneas.

Esse fato foi comprovado quando, observou-se o potencial de lixiviação de dezenove pesticidas, dentre eles o diuron. O estudo ocorreu em Latossolo Vermelho da região de Guairá–SP, o qual se concluiu que o diuron apresentou baixa mobilidade neste tipo de solo e um menor risco de contaminação do lençol freático ⁽³¹⁾.

Um outro pesticida que vem despertando interesse nos pesquisadores é o fipronil, pois segundo dados da literatura ⁽³²⁾, a degradação deste composto no meio aquático, ocorre pela sua transformação em outra substância, o disulfenil. De acordo com o autor, a fotólise é o caminho principal para a degradação do fipronil em meio aquoso, e a hidrólise só ocorre se o meio estiver em pH entre 8 e 9.

Apesar deste fato, o fipronil é um pesticida novo no mercado o que resulta em poucos estudos avaliando a sua presença em corpos aquáticos. No Sul da Flórida, nos anos de 2002 a 2004, avaliou-se a presença de diversos pesticidas naquela região, entre eles o fipronil. Das 88 amostras analisadas, fipronil esteve presente em sete, em concentrações que variaram de 0,6 a 8,6 ng L⁻¹. ⁽³³⁾

Segundo a literatura ⁽³⁴⁾, as concentrações dos pesticidas encontradas em água são baixas, esse fato deve ocorrer por estes serem pouco solúvel em água ou pelo efeito da diluição.

Mesmo em baixas concentrações, os pesticidas representam um perigo não só para vida humana, mas também para diversas espécies de microorganismos, tanto aquáticos como terrestres.

Devido ao crescente interesse em preservar os mananciais, está ocorrendo um aumento no número de publicações com essa finalidade. Diversos pesquisadores fazem experimentos em áreas de climas tropicais e subtropicais próximas a áreas agriculturáveis, buscando avaliar a contaminação dos pesticidas em ambientes aquáticos. No Brasil, apesar de possuir um dos maiores mananciais de água potável do mundo, o número de estudos com essa finalidade ainda é pequeno.

Além do monitoramento, há necessidade de estudos mais detalhados sobre as propriedades físicas e químicas dos pesticidas, características dos solos cultivados, do ambiente e da inter-relação dessas propriedades, para que se possa avaliar melhor o risco de contaminação das áreas agrícolas e assim adotar medidas que possam minimizar os riscos de contaminação da água.

O aumento do uso de pesticidas tem como principal objetivo aumentar a quantidade e a qualidade dos produtos agrícolas, fato este que pode ser observado com o passar dos anos. O Brasil em 1998 ocupava o segundo lugar no ranking mundial de consumo de insumos fitossanitários ^(35*). Segundo dados do SINDAG ^(35**) em 2003, o país gastou 3,1 bilhões de dólares no consumo de pesticidas, sendo que 18,64% desse valor foi gasto no Estado de São Paulo. Esse dado se repete em 2006, em que o consumo de pesticidas foi de 21,7%, destacando novamente o Estado de São Paulo como o maior consumidor de pesticidas ⁽³⁶⁾ (Figura 1).

^(35*) Manzano, N.; *Agroanalysis* **1999**, 19, 11

^(35**) Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), comunicação pessoal realizada por ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORRÊA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n.6, 975 – 982, 2005

Figura 1: Participação Percentual das diferentes Classes de pesticidas vendidos no Estado de São Paulo, ano de 2006 ⁽³⁶⁾

A cultura responsável pela liderança do Estado de São Paulo no uso de pesticidas é a da cana-de-açúcar, pois a mesma elevou em 36,6% o valor das vendas de pesticidas. Dados mostram que o cultivo desta cultura aumentou 7,4% em 2007 em comparação à safra de 2006. Esse fato se deve ao aumento das exportações de açúcar e a maior procura interna por álcool, devido ao aumento nas vendas dos carros bicomcombustível ⁽³⁶⁾.

A cana-de-açúcar é uma herbácea, originária da Ásia Meridional, pertencente à família das gramíneas e ao gênero *Saccharum*. Há pelo menos seis espécies pertencentes a este gênero, mas a espécie cultivada é o híbrido de nome *Saccharum officinarum* ^(37,38).

Este híbrido é muito cultivado principalmente em países tropicais, onde se alternam as estações secas e úmidas. Sua floração se inicia no outono, e a colheita acontece na estação seca, durante um período de três a seis meses ⁽³⁸⁾.

A principal finalidade de se cultivar cana-de-açúcar é obter seus derivados, que são, o açúcar, a aguardente e o álcool ⁽³⁷⁾. Esses produtos são obtidos a partir da sacarose contida no caule da planta ⁽³⁸⁾.

A cana-de-açúcar é considerada, uma cultura importante para países de clima tropical ⁽³⁹⁾. Atualmente o interior paulista é o principal produtor de cana-de-açúcar do mundo (Figura 2) ^(38,39).

Figura 2: Distribuição da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo ⁽⁴⁰⁾

O Estado de São Paulo é responsável por 58,8% do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, houve um aumento de 6,5% na área cultivada e 5,6% na colheita. A produtividade média é de 81,9 ton/ha, enquanto que a média nacional é de 74,4

ton/ha. Dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2006, mostraram um rendimento de R\$3,8 bilhões a mais do que no ano anterior, este fato se deve a alta de preços dos seus derivados no mercado interno e externo ^(41, 42).

O setor sucroalcooleiro brasileiro vem despertando interesse em diversos países do primeiro mundo, devido ao baixo custo de produção de açúcar e álcool, e também pelo fato do álcool ser utilizado como fonte de energia, reduzindo a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência por combustíveis fósseis ⁽³⁷⁾.

2.1 Método utilizado para as análises de pesticidas em amostras água

A contaminação da água por pesticidas tem sido alvo de diversas pesquisas. Por isso são de grande importância estudos para atender as exigências da legislação ou mesmo para investigar a contaminação dos recursos hídricos superficiais ou subterrâneos ⁽⁴³⁾.

O primeiro passo na determinação de multiresíduos de pesticidas recai sobre a escolha do método de extração a ser utilizado. A extração é geralmente feita utilizando-se solventes orgânicos, sendo que a eficiência deste depende de outros fatores como, pH, massa ou volume da amostra ⁽⁴⁴⁾.

As culturas agrícolas empregam uma grande variedade de pesticidas, com polaridades muito diferentes e, esse fator pode inviabilizar um único método de extração capaz de extrair todos os pesticidas da amostra. Sendo assim, existem

diversos métodos de extração que podem ser empregados, tais como, a extração líquido-líquido (LEE), microextração em fase sólida (SPME), extração em fase sólida (SPE), entre outros ⁽⁴⁴⁾.

Nesta pesquisa foi utilizado o método de extração em fase sólida (SPE), devido às vantagens, tais como, eficiência, economia de solvente, reprodutibilidade, rapidez, segurança e seletividade ⁽⁴⁵⁾.

2.1.1 Extração em fase sólida (SPE)

A primeira vez em que os cartuchos de SPE contendo como adsorvente C18 e outros, foram utilizados foi em 1978, com formato de seringa, e em 1979 como pré-coluna para acoplamento *on-line* com cromatografia líquida ⁽⁴⁶⁾. Nos últimos anos houve um crescimento do uso da técnica, bem como, um melhor aprimoramento, como por exemplo, melhorias no formato, automação e a introdução de novos adsorventes, com capacidade de melhorar a extração de analitos polares ⁽⁴⁷⁾.

A popularidade da SPE se deu devido ao uso de uma variedade de adsorventes sólidos, no entanto, o adsorvente mais popular para a extração de pesticidas de amostras de água é o grupo octadecil ligado à sílica. O principal mecanismo de retenção é a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito ⁽⁴⁸⁾.

A SPE é um método de separação líquido – sólido semelhante à cromatografia líquida de baixa pressão, que emprega uma pequena coluna aberta,

usualmente denominada cartucho de extração, o qual contém a fase sólida. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo superior do cartucho e aspirada à pressão reduzida. Logo após o analito é eluído com um volume de aproximadamente 20 mL de solvente ⁽⁴⁵⁾. As principais etapas do processo de extração em fase sólida encontram-se na Figura 3:

Figura 3: Esquema de um cartucho de SPE, operando no modo de pré-concentração, seguida de clean-up de amostra. A) ativação e condicionamento do cartucho; B) aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; C) troca de solvente e eluição dos interferentes; D) troca de solvente e eluição do(s) analito(s) ⁽⁴⁹⁾

2.2 Técnica analítica para a determinação de pesticidas

A cromatografia consiste em uma técnica de análise química, que separa, identifica e quantifica as espécies químicas. A cromatografia baseia-se na distribuição da amostra entre duas fases, uma móvel e outra estacionária ⁽⁴⁵⁾.

Considerando o estado físico da fase móvel, distingui-se a cromatografia gasosa, que a fase móvel é um gás; a cromatografia líquida, em que a fase móvel é um líquido, a cromatografia supercrítica em que se usa como fase móvel um vapor pressurizado, em temperatura acima de sua temperatura crítica ⁽⁵⁰⁾.

Ultimamente a cromatografia vem sendo empregada em grande parte das análises de pesticidas em água, seus metabólitos e produtos de transformação, destacando principalmente a cromatografia líquida e a gasosa.

2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) denomina-se assim, pois a utilização de colunas de tamanho reduzido, preenchidas com materiais finamente pulverizados oferece grande resistência ao fluxo da fase móvel, o que resultou no uso de bombas que oferecessem alta pressão ao sistema. Esse fato foi comprovado no início da década de 70, e concluiu-se que a alta pressão no interior da mesma é um fator importante na separação cromatográfica.

A detecção por cromatografia líquida é geralmente por ultravioleta (UV), em um único comprimento de onda, ou em vários, neste caso utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD) ou ainda um detector de fluorescência.

A Figura 4 apresenta os componentes básicos de um instrumento de HPLC⁽⁴⁹⁾.

Figura 4: Esquema de instrumentação para HPLC⁽⁴⁹⁾

- ✓ **Bomba:** A bomba tem a finalidade de impulsionar a fase móvel⁽⁵¹⁾.
- ✓ **Injeção da amostra:** A introdução da amostra é realizada por meio de uma válvula de amostragem ou por meio de uma seringa de injeção⁽⁵¹⁾.
- ✓ **Coluna:** As colunas são feitas de aço inoxidável polido, com comprimentos que podem variar de 10 a 30 cm, e os diâmetros internos dependem do tipo de coluna, podendo ser ≤ 1 mm para colunas capilares e chegando até 10 mm para colunas preparativas⁽⁵¹⁾.
- ✓ **Detector:** Monitora a fase móvel à medida que elui da coluna⁽⁵¹⁾.

Os limites de detecção alcançados pela cromatografia líquida são a níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, usualmente comparados aos obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ⁽⁵²⁾.

A cromatografia líquida, geralmente apresenta algumas desvantagens quando as amostras ambientais contêm ácidos (ácidos húmicos e fúlvicos). A presença destas substâncias, pode ser observada no início da análise cromatográfica devido a larga assimetria dos picos, tornando difícil a quantificação dos analitos de interesse que eluem nesta região. Por esse motivo, na análise de compostos muito polares, em amostras ambientais, há a necessidade de um procedimento de “clean – up” antes da análise por HPLC ^(52, 53, 54).

Atualmente a literatura apresenta uma discussão comparativa e detalhada dos procedimentos cromatográficos para análise de pesticidas e seus produtos de degradação em água ⁽⁵⁵⁾.

As triazinas, ametrina e atrazina, são geralmente melhor detectadas por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (DNF), devido à presença de átomos de nitrogênio na molécula, mas essas moléculas podem ser detectadas por HPLC – DAD, mas com uma detectabilidade menor ⁽⁵⁶⁾.

Já grande parte dos herbicidas pertencentes à classe dos feniluréicos, como por exemplo, o diuron, é em sua maioria determinados por CLAE – UV ou DAD, como citado na literatura ⁽⁵⁷⁾.

Segundo a literatura, a determinação do fipronil ocorre por cromatografia gasosa, mas há relatos de que o composto pode ser determinado por HPLC–DAD ⁽⁵⁸⁾.

2.3 Validação do método analítico para a determinação de pesticidas em amostras de água

Um conjunto de variáveis como, concentração do analito, que dependem da concentração empregada, como por exemplo, as áreas dos picos, necessitam do auxílio de métodos estatísticos a fim de avaliar-se a qualidade dos dados, segundo critérios padronizados ⁽¹⁾.

O objetivo de se validar um método é demonstrar que ele é adequado para aplicação analítica desejada ⁽⁵⁹⁾.

A validação de um método é um processo a ser considerado em um programa de segurança da qualidade (QA), isso pressupõe que dados relacionados à aferição e calibração do instrumento envolvido estão de conformidade com boas práticas de laboratório (BPL). Quaisquer que sejam as técnicas a serem utilizadas, deve-se preconizar um protocolo de validação da metodologia a ser desenvolvida ⁽⁶⁰⁾.

Neste estudo empregou-se na validação o desvio padrão (S), coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo, coeficiente de correlação (r), linearidade, recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

2.3.1 Precisão (coeficiente de variação ou desvio padrão relativo)

A precisão tem sido medida por meio do desvio padrão ou coeficiente de variação. O Coeficiente de variação (CV) é calculado dividindo-se o valor do desvio padrão (S) pelo valor médio ($\bar{x}$) e multiplicando-se o resultado por 100 ⁽⁶¹⁾.

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

S = Desvio padrão

$\bar{x}$ = Valor médio

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

$\bar{x}$ = Valor médio

x_i = Valor medido

n = Número de repetições

2.3.2 Coeficiente de correlação (r)

Quando se deseja um número para avaliar a qualidade dos dados, e não apenas a interpretação de uma representação gráfica em escala conveniente, pode-se utilizar o coeficiente de correlação r . Quanto mais próximo de 1, maior é a correlação entre as variáveis x (concentração) e y (área)⁽⁶²⁾.

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

n = Número de repetições

x = Concentração

y = Área

2.3.3 Limite de detecção (LOD)

É a menor quantidade de analito a qual pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, não necessariamente quantificadas como um valor exato. Corresponde à concentração que produziria um valor de sinal médio três vezes maior que o nível de ruído medido com a solução de controle ou branco ^(61, 62).

$$LOD = 3 * N$$

$$N = \text{Ruído}$$

2.3.4 Limite de quantificação (LOQ)

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

Este parâmetro pode ser definido em relação ao ruído, empregando-se o branco como referência ^(61, 62, 63).

$$LOQ = 10 * N$$

$$N = \text{Ruído}$$

2.3.5 Linearidade

Um método é considerado linear se há uma relação linear entre a “resposta analítica” e a concentração do analito na amostra, sobre uma determinada faixa de concentração do analito ⁽⁶²⁾. A linearidade é determinada através de gráficos de calibração seguindo o tratamento estatístico.

2.3.6 Exatidão

A exatidão expressa a concentração entre o valor encontrado e o valor aceito ⁽⁶¹⁾.

$$Exatidão = \left[1 - \left(\frac{V_r - V_d}{V_r} \right) \right] * 100$$

V_r = valor real esperado

V_d = valor médio injetado

2.3.7 Recuperação

A recuperação expressa a quantidade de uma determinada substância recuperada em um processo analítico, em relação a quantidade real presente na amostra ^(60, 61).

$$Recuperação = \frac{C.E}{C.T} * 100$$

$C.E$ = Concentração extraída

$C.T$ = Concentração Teórica

3 Objetivos

- ✓ Aplicação do método de extração em fase sólida (SPE), seguida pela otimização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na análise de resíduos dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil.
- ✓ Validação do método de extração e determinação dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil.
- ✓ Empregar o método de SPE e a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de pesticidas em amostras de água coletadas no rio Ribeirão do Feijão, São Carlos – SP.

4 Materiais e Métodos

4.1 Área de estudo

A Bacia do Ribeirão do Feijão (Figura 5) abrange uma área de aproximadamente 227 Km². Localizada na região centro-leste do Estado de São Paulo, entre os paralelos 47° 45' – 47° 55' W de longitude e 22° 00' – 22° 15' S de latitude, faz a divisa dos municípios de São Carlos, Analândia e Itirapina, sendo esta de grande importância para os mesmos, principalmente para São Carlos, o qual faz desse rio o principal manancial de captação de água para abastecimento da cidade ^(64,1).

O principal rio formador dessa bacia tem suas nascentes no alto da Serra do Cuscuzeiro e drena o planalto de Itirapina, correndo sobre o solo de formação Botucatu no seu curso médio e alto, e na parte mais baixa, corre sobre os solos de origem basáltica ⁽¹⁾.

A bacia do Ribeirão do Feijão está localizada na Área de Proteção Ambiental (APA de Corumbataí), classificado na classe 2, destinado ao abastecimento doméstico, à proteção de comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e à agricultura ⁽⁶⁵⁾.

Segundo a literatura, a região de São Carlos apresenta clima tropical de altitude com verão chuvoso (umidade relativa do ar em torno de 76%), e inverno

seco (umidade relativa do ar de 54%). A temperatura média anual é de 21,5°C, sendo o mês de fevereiro o mais quente e o de junho mais frio ⁽⁶⁷⁾.

Figura 5: Mapa com ênfase ao Ribeirão do Feijão^(68*)

^(68*) CARDOSO JUNIOR, A. W. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por ltcd.sc@iqsc.usp.br em junho de 2008.

4.1.1 Amostragem

Foram selecionados três pontos de amostragem ao longo do rio: ponto 1 próximo a nascente (Figuras 5 e 6) o ponto 2 ao longo do rio (Figuras 5 e 7), e ponto 3 no local de captação de água para abastecimento da cidade de São Carlos (Figuras 5 e 8).

A coleta foi feita no inverno, 27 de junho de 2008, com tempo bom, ensolarado, poucas nuvens, pouco vento e temperatura em torno dos 17° C.

As amostras de água foram coletadas em frasco de vidro âmbar, na superfície, e de imediato foram feitas medidas dos parâmetros químicos: temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido.

Após a coleta as amostras foram conduzidas ao laboratório, onde foi feita a filtração a vácuo, utilizando papel de filtro, com massa de 0,9 µg, diâmetro 12,5 cm, removendo-se assim o material que se encontrava em suspensão.

Após a filtragem, acidificou-se as amostras para pH 2, utilizando ácido clorídrico 2 molL⁻¹, com a finalidade de evitar a atividade de microorganismos.

O mesmo procedimento foi feito para a coleta da amostra de água da nascente, considerada isenta de contaminação por resíduos de pesticidas, procedente da nascente do Córrego Tijuco Preto, a qual foi fortificada para avaliar a recuperação do método.

A coleta no ponto 1 (Figuras 5 e 6) de amostragem, correspondente à nascente, foi feita às 9h18min, sendo que neste trecho do rio a vegetação é de cerrado e ausência de mata ciliar. A coleta de água da nascente foi feita para que a mesma fosse empregada como testemunha do estudo. Segundo o SAAE, próximo às nascentes de nosso município não pode haver cultivo. As coordenadas medidas por GPS neste ponto são: 23K0209066 / UTM 75 52 318.

Figura 6: Coleta de amostra no ponto 1 do Ribeirão do Feijão

A coleta no ponto 2 (Figuras 5 e 7) foi feita às 10h24min. Foi observada a presença de poucas árvores às margens do rio e em torno do mesmo, atividade agrícola predominando cultivo de cana-de-açúcar e eucalipto, o que justifica a coleta neste ponto. As coordenadas medidas por GPS neste ponto são GPS: 23K0206596 / UTM 7547277.

Figura 7: Coleta de amostra no ponto 2 do Ribeirão do Feijão

A coleta do ponto 3 (Figuras 5 e 8) foi feita às 11h27min, próximo à captação de água. A vegetação próxima é de pastagem e cultivo de cana-de-açúcar. A coleta nesse ponto ocorreu com a finalidade de observar a ocorrência da contaminação das águas destinadas ao abastecimento público. As coordenadas medidas por GPS neste ponto são GPS: 23K0202409 / UTM 7547440.

Figura 8: Coleta de amostra no ponto 3 do Ribeirão do Feijão

4.2 Pesticidas Analisados

Nesta pesquisa foram analisados quatro pesticidas, os quais foram selecionados após informações fornecidas pelo Engenheiro Agrônomo da Terra Agropecuária Engenharia e Comércio, São Carlos - SP. Essa pesquisa teve como finalidade focar os principais produtos utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

Os pesticidas selecionados estão descritos a seguir:

Ametrina ⁽⁶⁹⁾

- ✓ Classe: Herbicida
- ✓ Grupo: triazina
- ✓ Fórmula Bruta: C₉H₁₇N₅S
- ✓ Massa molecular: 227,5
- ✓ Classe toxicológica: III (pouco tóxica)

A ametrina é um herbicida de pré e pós – emergência e causa poucos danos a cultura da cana-de-açúcar quando aplicado de maneira correta. O período efetivo de controle das plantas daninhas no solo varia de 50 a 70 dias, controlando de forma eficiente a *Brachiaria decumbens* e a *Brachiaria plantaginea* (capim – marmelada). A quantidade a ser aplicada na cultura, é de acordo com CTC, pH, teor de matéria orgânica de cada tipo de solo ⁽⁷⁰⁾. Este herbicida em contato com o solo, fica sujeito primeiramente à degradação microbiana.

Atrazina ⁽⁶⁸⁾

- ✓ Classe: Herbicida
- ✓ Grupo: Triazinas
- ✓ Fórmula Bruta: $C_8H_{14}ClN_5$
- ✓ Massa molecular: 215,7
- ✓ Classe toxicológica: III
(pouco tóxica)

A atrazina vem sendo empregada na agricultura para o controle de plantas daninhas, devido à capacidade deste composto em inibir a fotossíntese. Este composto é um contaminante potencial da água, em virtude de suas características: elevada persistência em solos, hidrólise lenta, solubilidade baixa para moderada em água, absorção moderada à matéria orgânica e argila ⁽⁶⁹⁾.

Diuron ⁽⁶⁸⁾

- ✓ Classe: Herbicida
- ✓ Grupo: Derivados da Uréia
- ✓ Fórmula Bruta: $C_9H_{10}N_2O$
- ✓ Massa molecular: 233,2
- ✓ Classe toxicológica: III (pouco tóxica)

O diuron é um herbicida aplicado em pré e pós – emergência normalmente aplicado em mistura com outros herbicidas, dentre eles a ametrina. Causa

poucos danos a cultura da cana-de-açúcar e apresenta período efetivo de controle médio (residual) de 40 a 70 dias e sua degradação é principalmente microbiana. Deve ser aplicado em solo úmido para se obter um bom rendimento do produto e sua concentração de aplicação varia com as características do solo⁽⁶⁹⁾.

Fipronil⁽⁶⁸⁾

- ✓ Classe: Inseticida
- ✓ Grupo: Fenil pirazol
- ✓ Fórmula Bruta: C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS
- ✓ Massa molecular: 437,2
- ✓ Classe toxicológica: IV
(levemente tóxica)

O fipronil é um inseticida de contato, aplicado no solo em diversas culturas, dentre elas a da cana-de-açúcar. Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo de insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides, carbamatos e ciclodienos⁽⁷¹⁾.

Este composto degrada-se lentamente em água e sedimentos em condições anaeróbias, com tempo de meia-vida variando entre 116 e 130 dias. Os resíduos de fipronil tendem a permanecer na camada superior do solo e exibem baixo potencial de lixiviação para águas de profundidade. Em ambientes aquáticos, os resíduos de fipronil rapidamente se movem da água para os sedimentos⁽⁷¹⁾.

4.3 Preparo das amostras

4.3.1 Padrões e Soluções Estoque

Os padrões analíticos dos pesticidas foram obtidos da empresa Sigma – Aldrich, com 99% de pureza.

As soluções estoque, foram preparadas nas concentrações de 10, 100 e 500 mgL⁻¹ e as de trabalho, nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,03 e 0,02 mgL⁻¹, em solvente acetato de etila (Merck p.a.).

Para a validação do equipamento foram feitos limite de detecção de quantificação, linearidade e precisão. Para o método analítico fez-se recuperação, exatidão e linearidade.

4.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

Os cartuchos utilizados neste estudo foram com fase C18 de 500 mg, e volume de 3 mL da marca Agilent Technologies. As etapas usadas na extração em fase sólida estão descritas a seguir.

1. A água utilizada método de extração foi procedente de uma nascente do Córrego Tijuco Preto, sem contaminação.

2. Enriqueceu-se a amostra de água com os pesticidas atrazina, ametrina, diuron e fipronil, na concentração de $0,03 \text{ mgL}^{-1}$.
3. Percolou-se 10 mL de acetato de etila e em seguida 10 mL de água em uma coluna contendo adsorvente, a vácuo C18, para condicionar a coluna.
4. Adicionou-se 50 mL da amostra de água a ser analisada à coluna condicionada e descartou-se o filtrado.
5. Eluiu-se os pesticidas retidos na coluna com 20mL de acetato de etila.
6. Coletou-se o filtrado e evaporou até a secura com nitrogênio.
7. Ressuspendeu-se com 1 mL de acetato de etila e analisou-se em cromatógrafo em fase líquida.

A **Figura 9** apresenta o esquema das etapas na aplicação deste método.

Figura 9: Esquema utilizado na extração em fase sólida (SPE) de resíduos de pesticidas em água

4.4 Condições cromatográficas para análise dos pesticidas em amostras de água

As condições cromatográficas para a análise dos pesticidas foram:

Cromatógrafo líquido da marca Agilent Technologies 1200 séries

Coluna: Zorbax SB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m)

Detector: UV – DAD (Diodearray) G 1315 D

Bomba: G 1311A Quaternary

Fluxo: 1,2 mL/ mim

Composição da fase móvel: 30% acetonitrila + 70% água (5 mim) - 100% acetonitrila (10 mim) - 15% acetonitrila + 85% água (5 mim).

Volume injetado: 20 μ L

Os comprimentos de onda foram selecionados injetando os padrões analíticos no HPLC, na concentração de 1mgL⁻¹, obtendo o espectro de cada composto. Os comprimentos de onda selecionados foram: λ = 230 nm para o fipronil, λ = 238 nm para a ametrina, λ = 254 nm para atrazina e diuron.

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise cromatográfica dos padrões analíticos

Os compostos analisados neste trabalho, ametrina, atrazina, diuron e fipronil, são pesticidas muito utilizados na cultura de cana-de-açúcar.

O primeiro parâmetro considerado na otimização do método analítico foram os comprimentos de onda dos compostos, o qual foi estabelecido a partir de revisão da literatura ^(73, 74, 75). Os comprimentos de onda selecionados foram: $\lambda = 230$ nm para o fipronil, $\lambda = 238$ nm para ametrina, $\lambda = 254$ nm para atrazina e diuron, cujos cromatogramas estão representados nas Figuras 10 a 14. Observa-se nestes cromatogramas que existe boa resolução dos picos e pouca interferência do ruído.

Figura 10: Cromatograma da atrazina $\lambda = 254 \text{ nm}$, na concentração de 1 mgL^{-1} , nas condições cromatográficas estabelecidas no item 4.4

Figura 11: Cromatograma do diuron $\lambda = 254 \text{ nm}$, na concentração de 1 mgL^{-1} , nas condições cromatográficas estabelecidas no item 4.4

Figura 12: Cromatograma da ametrina $\lambda = 238$ nm na concentração de 1mgL⁻¹, nas condições cromatográficas estabelecidas no item 4.4

Figura 13: Cromatograma do fipronil $\lambda = 230$ nm na concentração de 1mgL⁻¹, nas condições cromatográficas estabelecidas no item 4.4

Outro parâmetro considerado no desenvolvimento do método foi o tempo de retenção de cada composto, sendo obtido analisando três concentrações diferentes dos padrões analíticos no HPLC – DAD, com a finalidade de confirmar cada tempo de retenção, os quais estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Pesticidas analisados com os respectivos tempos de retenção

Pesticidas	Tempo de retenção (minutos)
Ametrina	11,04
Atrazina	2,77
Diuron	10,33
Fipronil	11,83

5.2 Validação do Equipamento HPLC – DAD para determinação dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil

5.2.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação, foram obtidos diminuindo-se as concentrações dos pesticidas ametrina, atrazina diuron e fipronil compreendidas na faixa de 1mgL^{-1} a $0,02\text{mgL}^{-1}$, gradativamente, considerando o sinal analítico obtido no HPLC – DAD, para cada composto em estudo.

O limite de detecção da atrazina foi determinado conforme descrito nos itens 2.6.3 e 2.6.4, já para os compostos ametrina, diuron e fipronil, devido à ausência de ruído nos cromatogramas obtidos, adotou-se o seguinte procedimento: para o limite de detecção, diminui-se as concentrações dos analitos até que o equipamento não pudesse mais integrar o pico do composto em questão. Para o limite de quantificação multiplicou-se o valor da concentração encontrada no LOD por 3,3, cujos valores obtidos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), para os compostos estudados

Pesticidas	LOD (mgL ⁻¹)	LOQ (mgL ⁻¹) ± DPR
Ametrina	0,02	0,07 ± 5,2
Atrazina	0,05	0,17 ± 4,3
Diuron	0,03	0,01 ± 6,4
Fipronil	0,03	0,01 ± 5,8

Os LOD ficaram entre 0,02 e 0,05 mgL⁻¹ e os valores de LOQ obtidos entre 0,07 e 0,17 mgL⁻¹. Observa-se que estes valores não foram muito baixos comparados aos encontrados na literatura, no entanto na literatura, a atrazina é o único pesticida controlado pela legislação brasileira, americana e europeia, nenhum outro pesticida analisado neste estudo é controlado por nenhuma legislação ^(12, 76).

5.2.2 Precisão

A precisão do equipamento foi avaliada a partir da análise cromatográfica de duas soluções dos padrões analíticos, na concentração de 1mgL⁻¹, sendo que cada uma das amostras foram analisadas em quintuplicata. O cálculo deste parâmetro foi feito a partir dos desvios padrões relativos dos resultados obtidos para cada solução (Tabela 4).

Tabela 4: Precisão do equipamento HPLC – DAD, para os compostos analisados

Pesticidas	Precisão (%)
Ametrina	0,41
Atrazina	0,69
Diuron	0,10
Fipronil	2,56

Os valores de precisão encontrados para os pesticidas estudados variaram de 0,41 a 2,56 %, indicando uma boa precisão do método cromatográfico, estando dentro do intervalo proposto pela EPA (inferiores a 30%) ⁽⁷⁶⁾ e pela ANVISA, a qual se admite valores menores ou iguais a 20% ⁽⁷⁷⁾.

5.2.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade foi utilizado o método do padrão externo, obtida pela análise da mistura dos padrões analíticos, avaliando 4 concentrações diferentes (Tabela 5), obtendo-se uma curva analítica para cada composto.

Cada concentração considerada na construção da curva analítica foi analisada em triplicata, calculado-se a média, e em seguida aplicado o método de regressão linear.

Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram superiores a 0,99, o que indica que o detector responde bem às concentrações analisadas, sendo um método linear na faixa de concentração estudada, como pode se observar na Tabela 5 e Figura 14.

Tabela 5: Equação da reta e coeficiente da correlação obtidos ao aplicar o método de regressão linear, para os pesticidas em estudo

Pesticida	Concentração (mgL ⁻¹)	Equação da reta ($y = a x + b$)*	Coeficiente de correlação (r)
Ametrina	0,03 – 0,25	$y = (-2,89) x + 103,96$	0,99
Atrazina	0,10 – 0,50	$y = (4,63) x + 48,70$	0,99
Diuron	0,05 – 0,50	$y = (0,34) x + 65,23$	0,99
Fipronil	0,05 – 0,50	$y = (0,89) x + 19,42$	0,99

* $y = a x + b$ (y = área do pico; x = concentração em mgL⁻¹)

Além dos fatores apresentados, os coeficientes de correlação encontrados, estão de acordo com a legislação da ANVISA, que estabelece que os valores de linearidade não podem ser inferiores a 0,99 ⁽⁷⁷⁾.

Figura 14: Curva analítica dos compostos estudados, aplicando o método HPLC – DAD, avaliando as concentrações 0,03 a 0,05 mgL⁻¹

5.3 Aplicação da Extração em Fase Sólida (SPE) na análise de resíduos de pesticidas em água

As condições utilizadas na extração em fase sólida foram obtidas através de revisão da literatura ^(1,78), conforme descrita no item 3.3.2, avaliando a concentração de 0, 05; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹. Os resultados de recuperação obtidos para os compostos em estudo, ao aplicar o método SPE – HPLC – DAD variaram de 95 a 102% (Tabela 6), com desvio padrão relativo de $\pm 4,4$, valores esses dentro do intervalo estabelecido pela EPA, o qual varia de 70 a 130%, com coeficiente de variação até 30% ⁽⁷⁹⁾ e a ANVISA que fixa este valor entre 75 e 90% para a maior concentração da curva analítica ⁽⁷⁷⁾.

Testou-se também na avaliação da recuperação dos pesticidas o solvente metanol no condicionamento e eluição dos compostos, visto que estudos ⁽⁷⁸⁾ utilizando este solvente obtiveram valores aceitáveis de recuperação. No entanto para este estudo, os resultados encontrados não foram satisfatórios, com valores de recuperação inferiores a 50% .

Tabela 6: Valores de recuperação (%) para os pesticidas em estudo, na matriz água, aplicando a metodologia SPE HPLC- DAD

Pesticidas	Recuperação (%) $\pm$ DPR
Ametrina	95 $\pm$ 4,3
Atrazina	97 $\pm$ 3,5
Diuron	99 $\pm$ 4,5
Fipronil	102 $\pm$ 5,2

As concentrações empregadas no estudo foram de 0, 05; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹

5.3.1 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas, empregando -se o método analítico SPE – HPLC – DAD, avaliando as concentrações de 0,03 a 0,05 mgL⁻¹. Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram superiores a 0,99, semelhantes aos do item 4.2.3 o que indica boa resposta do detector as concentrações analisadas, sendo um método linear na faixa de concentração estudada, é estão de acordo com a legislação da ANVISA, que estabelece que os valores de linearidade não podem ser inferiores a 0,99⁽⁷⁷⁾. Como pode se observar na Tabela 7 e Figura 15.

Tabela 7: Resultados obtidos no cálculo da linearidade do método analítico SPE – HPLC – DAD, para os analitos em estudo. Calibração dos padrões e análise de regressão linear para os compostos analisados com a extração por SPE

Pesticida	Concentração (mgL ⁻¹)	Equação da reta (y= a x+b)*	Coefficiente de correlação (r)
Ametrina	0,03 – 0,25	y = (0,88) x + 84,15	0,99
Atrazina	0,10 – 0,5	y = (3,76) x + 46,68	0,99
Diuron	0,05 – 0,5	y = (- 0,82) x + 67,00	0,99
Fipronil	0,05 – 0,5	y = (1,43) x + 15,67	0,99

*y= a x+b (y = área do pico; x = concentração em mgL⁻¹)

As concentrações empregadas no estudo foram de 0,03 a 0,05 mgL⁻¹

Figura 15: Curva analítica dos compostos analisados, aplicando o método SPE – HPLC – DAD, avaliando as concentrações 0,03 a 0,05 mgL⁻¹

5.3.2 Exatidão

Para os ensaios de exatidão, foram usadas amostras de água da nascente, descrita no item 4.1.1. Fortificou-se a amostra com adição de pequenos volumes de uma solução estoque contendo os pesticidas avaliados no estudo, a fim de se obter os níveis de fortificação desejados. As amostras fortificadas foram submetidas ao método SPE – HPLC – DAD, analisando três soluções dos padrões, 0,05; 0,1 e 0,5 mgL⁻¹ para ametrina, diuron e fipronil, e 0,1; 0,5; 1,0 mgL⁻¹ para atrazina. As análises foram feitas em triplicata, cujos resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

A exatidão foi calculada a partir da fórmula descrita no item 3.5.6

Tabela 8: Exatidão do método SPE – HPLC – DAD, para os compostos analisados

Pesticidas	Exatidão (%)
Ametrina	92,4
Atrazina	95,3
Diuron	90,3
Fipronil	93,2

Os valores de exatidão para os pesticidas estudados foram superiores a 90%, variando de 90 a 95 %, indicando boa exatidão do método utilizado, com resultados próximos aos encontrados na literatura e aos valores apresentados pela ANVISA variando entre 70 e 130% ^(77, 80)

5.4 Análise de Amostras Reais de Água Coletadas no Ribeirão do Feijão

As amostras de água foram coletadas em três diferentes pontos do Ribeirão do Feijão, o qual é o principal responsável pelo abastecimento de água da cidade de São Carlos.

A **Tabela 9** apresenta os parâmetros químicos determinados nos três pontos de amostragem destacando: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, condutividade elétrica (μScm^{-1}), oxigênio dissolvido (mgL^{-1})

Tabela 9: Valores de temperatura (T), pH, condutividade elétrica (C.E.) e oxigênio dissolvido (O. D.), para os três pontos de amostragem do Ribeirão do Feijão. Parâmetros químicos estabelecidos para água no dia da coleta

	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	C.E. ($\mu\text{S/cm}$)	O. D. (mgL^{-1})
Ponto 1	4,8	17	22	6,8
Ponto 2	4,6	16	9	8,7
Ponto 3	5,0	17	0,13	10,0

A temperatura variou de 16 a 17, pelo fato, da coleta ter sido feita na estação de inverno, que corresponde ao período de seca na região de estudo. Os valores de pH foram próximos de 5, caracterizando águas ácidas, sendo esta uma característica dos rios da região em estudo. A concentração de oxigênio dissolvido foi de 6,8 a 10,0 mgL^{-1} , esses valores estão de acordo com os estabelecidos pela

resolução CONAMA 357/05 ⁽⁸¹⁾, a qual estabelece limite igual ou superior a 5mgL^{-1} para este parâmetro para águas doce classe 2.

Os valores de condutividade elétrica variaram de 0,13 a $22\ \mu\text{Scm}^{-1}$, os quais estão dentro do limite máximo estabelecido pela CETESB ⁽⁸²⁾, não devendo ultrapassar $50\ \mu\text{Scm}^{-1}$ para águas naturais.

As amostras de água, coletadas no Ribeirão do Feijão, foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) e analisadas por cromatografia líquida, para avaliar a possível presença de ametrina, atrazina, diuron e fipronil.

A ametrina não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas nos três pontos amostrados, como se pode observar nas Figuras 16, 17, 18. O tempo de retenção deste composto é de 11,0 mim e nos cromatogramas não se notou nenhum pico no referido tempo.

Figura 16: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1)

Figura 17: Cromatograma obtido por cromatografia liquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2)

Figura 18: Cromatograma obtido por cromatografia liquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3)

Os pesticidas atrazina e diuron não foram detectados nestas amostras, como se pode observar nas Figuras 19, 20 e 21, pois em seus respectivos tempos de retenção 2,8 e 10,3 min não se observou nenhum indicio destes compostos.

Figura 19: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1)

Figura 20: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2)

Figura 21: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3)

Resultados semelhantes também foram encontrados nas análises realizadas para a determinação de fipronil, não sendo registrada a ocorrência de nenhum pico cromatográfico no tempo de retenção de 11, 8 mim e Figuras 22, 23 e 24.

Figura 22: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 1)

Figura 23: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 2)

Figura 24: Cromatograma obtido por cromatografia líquida, em extratos obtidos ao aplicar a técnica de extração em fase sólida, de amostras reais de água do Ribeirão do Feijão (Ponto 3)

6 Conclusões

- ✓ Os resultados obtidos com o método de extração em fase sólida (SPE) seguida pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodos (HPLC – DAD) foram satisfatórios na análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil, pelo fato destes estarem quase todos dentro dos limites estabelecidos por órgãos internacionais e nacionais de validação de métodos analíticos.
- ✓ Não foram encontrados os pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil, nas amostras de água do rio Ribeirão do Feijão, São Carlos - SP.

7. Referências Bibliográficas

1. SOUZA, D. A. **Desenvolvimeto de metodologia analítica para determinação de multiresíduos de pesticidas em águas de abastecimento de São Carlos – SP**. 2000. 120f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
2. AGÊNCIA Brasil. Produção de cana-de-açúcar rendeu 29% a mais no Brasil em 2006, aponta o IBGE. Disponível em: <www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/10/16/materia.2007-10-16.6988075593/view>. Acesso em: 08 jan.2008.
3. HASSET, P.T.; LEE, F.G. Modeling of pesticide in aqueous environment. In: HAQUE, R., FREED, WH., (Eds.). **Environmental dynamic of pesticides**. New York: Plenum, 1975. p.173–184.
4. FERRAZ, E. S. B. A bacia hidrográfica como unidade de estudo, estrutura e processos. In: WORKSHOP DO PROJETO PIRACENA, 2., 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CENA, 1996. p. 7.
5. HIRATA, R. C. A. Os recursos hídricos subterrâneos e as novas exigências ambientais. **Revista do IG**, v. 14, n. 1, p. 39-62, 1993.
6. BOUWER, H. Integrated water management for the 21st century: problems and solutions. **Food, Agriculture and Environment**, v. 1, n.1, p. 118-127, 2003.
7. DANIELOPOL, D. L.; GRIEBLER, C.; GUNATILAKA, A.; NOTENBOOM, J. Present state and future prospects for groundwater ecosystems. **Environmental Conservation**, v. 30, n. 2, p. 104-130, 2003.
8. KURODA, E. K. **Remoção de células de subprodutos de microcyitus spp por dupla filtração, oxidação e adsorção**. 2006. 233f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
9. BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.313-400

10. ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004. p. 44 – 47.
11. OLIVEIRA, W. E.; GAGLIANONE, S.; YASSUDA, E. R.; NOGAMI, P. S.; PEREIRA, B. E. B.; MARTINS, J. M. **Técnicas de abastecimento e tratamento de água**. 2 ed. São Paulo: CETESB, 1978.v.1.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e da procedência, 2004. Disponível em:
<http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2008.
13. EUR – LEX. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Union L330, 5th December 1998, p. 32. Disponível em:
<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>> . Acesso em 09 set. 2008.
14. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guías para la calidad del agua potable**. 2. ed. Genebra: Recomendaciones, 1995. v. 1.
15. CENTRO PANAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y CIENCIAS DEL AMBIENTE. **Normas internacionales para calidad del agua de bebida**. Disponível em: <<http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacg/e/normas.html>>. Acesso em: 5 jan. 2008.
16. SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53 -58, 2003.
17. GREEN, M.B.; HARTLEY, G.S.; WEST, T. F. **Chemicals for crop improvement and pest management**. New York: Pergamon, 1987. 370p.
18. HASKELL, P.T. **Pesticide application: principles and practice**. New York: Oxford, 1985. 494p.

19. MARQUIS, J. K. **Contemporary issues in pesticide toxicology and pharmacology**. New York: Academic Press, 1977. 638p.
20. MIDIO, A. F.; MARTINS, D.I. **Herbicidas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 109p.
21. SOMASUNDARAM,L.; COATS,J. R. Pesticide transformation products in the environment. In: SOMASUNDARAM,L.; COATS,J. R. (Eds.). **Transformation products fate and significance in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 2-9.
22. FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659 – 667, 2002.
23. BROWN, C. D.; HODGKINSON, R. A.; ROSE, D. A.; SYERS, J. K.; WILCOCKSON,S. J. Movement of pesticides to surface water from a heavy clay a soil. **Journal of Pest Science**, v.43, n. 2, p.131-140, 1995.
24. LEONARD, R. A. Herbicides in surface waters. In: GROVER, R. **Environmental chemistry of herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v. 1, p. 45-87.
25. KONDA, L. N.; PÁSZTOR, Z. Environmental distribution of acetochlor, atrazine, chlorpyrifos and propisochlor under field conditoins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3859-3863, 2001.
26. TANABE, A.; MITORE, H.; KAWATA, K.; SAKAI, M. New monitoring system for ninety pesticides and related compounds in river water by solid-phase extraction with determination by gás chromatography/mass spectrometry. **The Journal of AOAC International**, v. 83, n. 1, p. 61-77, 2000
- 27.LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S.; CERDEIRA, A. L.; SANTOS, N. A. G.; CARVALHO, D.; GOMES, M. A. HPLC screening an GC – MS confirmation Of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.118, p. 329–337, 2000

28. MICKELSON, S. K.; BOYD, P.; BAKER, J. L.; AHMED, S. I. Tillage and herbicide incorporation effects on residue cover, runoff, erosion, and herbicide loss. **Soil and Tillage Research**, v. 60, n. 1/2, p. 55-66, 2001.
29. SYVERSEN, N.; BECHMANN, M. Vegetative buffer zone as pesticide filters for simulated surface runoff. **Ecological Engineering**, v. 22, n. 3, p. 175-184, 2004.
30. WALLS, D.; SMITH, P. G.; MANSELL, M. G. Pesticides in groundwater in Britain. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 6, n. 1, p. 55-62, 1996.
31. SPADOTTO, C. A.; FILIZOLA, H.; GOMES, M. A. F. Avaliação do potencial de lixiviação de pesticidas em Latossolo da região de Guairá, SP. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 127-136, 2001.
32. CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil. California Environmental Protection Agency. Department of Pesticide Regulation Disponível em: <<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2008
33. HARMAN-FETCHO, J. A.; HAPEMAN, C. J.; MCCONNELL, L. L.; POTTER, T. L.; RICE, C. P.; SADEGHI, A. M.; SMITH, R. D.; BIALEK, K.; SEFTON, K. A.; SCHAFFER, B. A.; CURRY, R. Pesticide occurrence in selected South Florida canals and Biscayne Bay during high agricultural activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6040 – 6048, 2005.
34. FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P.; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da Região de Petrolina(PE) e Juazeiro(BA). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 1-16, 2001.
35. ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORRÊA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975 – 982, 2005.
36. EUROFINS. **Defensivos agrícolas**: expectativa de aumento da demanda em 2007. Disponível em: <www.eurofins.com.br/pesticidas>. Acesso em: 10 jan. 2008.
37. CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

38. CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em:
<<http://br.geocities.com/atine50/cana/cana.htm>>. Acesso em: 20 jan.2008.
- 39.FOLHA de São Paulo. Disponível em:
<<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi2904200702.htm>> . Acesso em: 01 fev. 2008
40. COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL (CATI).**Distribuição da cultura da cana-de-açúcar**. Disponível em:
<<http://www.cati.sp.gov.br/lupa/culturas/cana.html>>. Acesso em: 17 abr. 2004
41. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE,1998. v. 58, p. 3 – 27.
42. AGÊNCIA Brasil. Disponível em:
<www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/10/16/materia.2007-10-16.6988075593/view>. Acesso em: 10 jan. 2007.
43. SOUZA, V. **Avaliação da contaminação de águas por resíduos de pesticidas em área de cultura de algodão: Região de Primavera do Leste – MT**. 2006.125f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
44. SOUZA, D. A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de multiresíduos de pesticidas em águas de abastecimento de São Carlos – SP**. 2000. 120 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
45. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)** . São Carlos: RiMa, 2004. 93p.
- 46.HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.
47. PICHON, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 195-215, 2000.

48. JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 67-74, 1996.
49. CENTRO NACIONAL DE AGRONOMIA (CENA). Disponível em: <[http://web.cena.usp.br/apostilas/Regina/PG/CEN%205738%20Ecotoxicologia/aula_CENA_agosto2007%20sONIA.ppt#289,1,Determinação Cromatográfica de Resíduos de Pesticidas em Água](http://web.cena.usp.br/apostilas/Regina/PG/CEN%205738%20Ecotoxicologia/aula_CENA_agosto2007%20sONIA.ppt#289,1,Determinação%20Cromatográfica%20de%20Resíduos%20de%20Pesticidas%20em%20Água)>. Acesso em: 16 jul. 2008.
50. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 1987. 297 p.
51. AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Intercedência, 2003. p.187.
52. WELLS, M. J. M.; YU, L. Z. Solid-phase extraction of acids herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 237 - 250, 2000.
53. JÁUREGUI, O.; GALCERAN, M. T. Determination of phenols in water by on-line solid-phase disk extraction and liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 340, p. 191 - 199, 1997.
54. CRESCENZI, C.; CORSIA, A.; PASSARIELLO, G.; SAMPERI, R.; CAROU, M. I. T. Evaluation of two new examples of graphitized carbon blacks for use in solid-phase extraction cartridges. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 41 - 45, 1996.
55. GEERDINK, R. B.; NIESSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. TH. Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 65-93, 2002.
56. DURAND, G.; BOUVOT, V.; BARCELÓ, D. Determination of trace levels of herbicides in estuarine waters by gas and liquid chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 607, p. 319 - 327, 1992.

57. BOUSSENADJI, R., DUFEK, P., PORTHAULT, M. Determination of Phenylurea Herbicides in Water Using Microcolumn High Performance Liquid Chromatography with UV and Electrochemical Detection. **LC GC international**, v. 11 n. 6, p.450 – 456, 1993.
58. PIASAROLO, L. **Influência da polaridade dos pesticidas não – iônicos sobre sua sorção em um latossolo**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
59. FRANCO, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77 - 83, 1996.
60. CHASIN, A. A.; CHASIN, M.; SALVADOR, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 30, n.2, p. 49 – 53, 1994.
61. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 46p.
62. LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. 64p.
63. CHASIN, A. A. M.; MASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO – NETO, L. M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, p. 1- 6, 1998.
64. PRADO, H.; OLIVEIRA, J. B.; ALMEIDA, C. L. F. **Levantamento pedológico semi- detalhado do Estado de São Paulo**: Quadrícula de São Carlos. 1 carta de solo. Campinas: Instituto Agrônomo, 2000. 1 mapa. Escala 1:100000.

65. - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Estudo preliminar**. Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 1977. 88p.

67.SÃO CARLOS (SÃO PAULO) – SP. Disponível em:
<[http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Carlos_\(S%C3%A3o_Paulo\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Carlos_(S%C3%A3o_Paulo))>. Acesso em: 08 jan.2008

68. TOMLIN,C. (Ed.). **The pesticide manual**: a world compendium Surrey. 10. ed. Farnham: Crop Protection, 1995. 1341 p.

69.PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A. A.; VARGAS, L.; FERREIRA, F. A. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**.Viçosa: Editora Genesis, 2003. 150p.

70. HALLBERG,G.R. Pesticide pollution of groundwater in the humid American States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 26, p. 299-367, 1989.

71. RAYTON, M.; AAJOUD, A.; WILLISON, J. C.; AOUADI, H.; TISSUT, M.; RAYANEL, P.; Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n.13, p. 4151-4157, 2006.

72. FENET, H.; BELTRAN, E.; GADJI, B.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M. Fate of a phenylpyrazole in vegetation and soil under tropical field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.1293-1297, 2001.

73.CALIFÓRNIA DEPARTAMENTO OF FOOD & AGRICULTURE. Center for Analytical Chemistry. Enviromental Monitoring Section. Determination of atrazine, simazine, diuron, prometon, bromacil, prometryn, hexazinone, cyanazine, metribuzin in river water. Disponível em:
<<http://www.cdpr.ca.gov/docs/specproj/tribal/method151.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2008.

74. BAEZ, M. E.; ZINCKER, J. Parametros de calidad analitica de un metodo de determinacion multiresíduos de plaguicidas por HPLC – DAD. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 44, n. 3, p. 1-13, 1999.

75. KOTRIKLA, A.; GATIDOU, G.; LEKKAS, T. Monitoring of triazine and phenylurea herbicides in surface waters of Greece. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 41, p. 135–144, 2006.
76. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Standards**. março 2001. Disponível em: <www.epa.gov/safewater>. Acesso em: 23 nov. 2006.
77. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>, Acesso em: 12 fev. 2008.
78. BRONDI, S.H. G. **Determinação de multiresíduos de agrotóxicos em águas de abastecimento do município de Araraquara: Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiol**. 2000. 131f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
79. POLETTINI, A.; MONTAGNA, M.; HOGENDOORN, E. A.; DIJKMAN, E.; VAN ZOONEN, P.; VAN GINKEL, L. A. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of β -agonists in urine by direct sample injection I. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 696, p. 19–31, 1995
80. FREITAS, S. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação multiresíduo de pesticidas em frutas brasileiras**. 2005. 181f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
81. BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA.. Resolução nº 357/05 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2008.
82. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL CETESB. **Qualidade da água**. São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/curiosidades.asp>>. Acesso em 23 jun. 2008.