AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO
DE ÁGUA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
EM *TANDEM* (LC-MS/MS)**

LUIZ FERNANDO SOARES MORACCI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Dra. Maria Aparecida Faustino Pires

São Paulo

2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO
DE ÁGUA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
EM *TANDEM* (LC–MS/MS)**

LUIZ FERNANDO SOARES MORACCI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Dra. Maria Aparecida Faustino Pires

**São Paulo
2008**

*Dedico este trabalho
especialmente com todo
amor e gratidão às duas
pessoas mais importantes
na minha vida que são
meu Pai e minha Mãe.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais e minha família por acreditarem em mim e me apoiarem em todas as etapas da minha vida.

À Dra Maria Aparecida Faustino Pires pelo carinho e amizade e pela oportunidade concedida em realizar este importante trabalho.

Ao Dr. Helio Akira Furusawa por todos esses anos de valorosa dedicação, orientação, paciência, amizade e pelos ensinamentos que enriqueceram meu saber.

Ao CNPq pela bolsa de estudo e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

À SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo pela parceria e colaboração no projeto de pesquisa, principalmente aos funcionários Célio de Sousa e Luis Carlos Martins pela amizade e apoio nos dias de coleta das amostras de lodo.

À Marisa Corrêa e Silva do Grupo Regional de Vigilância Sanitária e Engº Gilmar Alves da Coordenadoria de Defesa Agropecuária, ambos da cidade de Registro pelas informações concedidas, discussões técnicas e agradável amizade.

À Applied Biosystems do Brasil pela parceria, suporte e discussões técnicas, especialmente aos colegas Hélio Martins Júnior e Anna Ferrari.

Aos companheiros do CQMA Elias, Marta, Elaine, Marycel, Beatriz, Beth, Luciana Pavanelli, Vanessa Lameira, Fabio (Binho), Angélica, Juliana Izidoro, Sabine e a todos os demais, não só pela amizade, mas que de alguma forma colaboraram com a realização do presente trabalho.

*“A ciência é uma dádiva da
sabedoria Divina ao alcance das
mãos dos homens”.*

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO
DE ÁGUA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
EM *TANDEM* (LC-MS/MS)**

Luiz Fernando Soares Moracci

RESUMO

O quadro evolutivo da agricultura brasileira resulta em benefícios à população exigindo crescentes avanços tecnológicos no setor. Constantemente, novos agrotóxicos são introduzidos estimulando estudos científicos com a finalidade de determinar e avaliar os impactos na população e no meio ambiente. No presente trabalho, a matriz avaliada foi o lodo gerado no processo de tratamento de água para consumo humano, coletado na região do Vale do Ribeira, SP. A técnica empregada foi a cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas triploquadrupolar em *tandem* com ionização por *electrospray*. Os compostos foram extraídos previamente da matriz. O desenvolvimento da metodologia exigiu tratamento dos dados para que esses pudessem ser utilizados e transformados em informações confiáveis. Os processos envolvidos foram avaliados usando o conceito da validação de ensaios químicos. Os indicadores avaliados foram seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Esses indicadores produziram valores quantitativos e qualitativos que foram estatisticamente evidenciados de forma objetiva. A metodologia desenvolvida e validade é simples. Como resultado, mesmo explorando a sensibilidade da técnica, os compostos estudados não foram encontrados no lodo da ETA de Registro. Isso leva a crer que esses compostos podem estar presentes em concentrações muito baixas, podem sofrer degradação durante o tratamento da água ou não são retidos completamente pela ETA.

**PESTICIDES RESIDUES IN WATER TREATMENT PLANT SLUDGE:
VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY USING
LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO
TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)**

Luiz Fernando Soares Moracci

ABSTRACT

The evolving scenario of Brazilian agriculture brings benefits to the population and demands technological advances to this field. Constantly, new pesticides are introduced encouraging scientific studies with the aim of determine and evaluate impacts on the population and on environment. In this work, the evaluated sample was the sludge resulted from water treatment plant located in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. The technique used was the reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Compounds were previously liquid extracted from the matrix. The development of the methodology demanded data processing in order to be transformed into reliable information. The processes involved concepts of validation of chemical analysis. The evaluated parameters were selectivity, linearity, range, sensitivity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification and robustness. The obtained qualitative and quantitative results were statistically treated and presented. The developed and validated methodology is simple. As results, even exploring the sensitivity of the analytical technique, the work compounds were not detected in the sludge of the WTP. One can explain that these compounds can be present in a very low concentration, can be degraded under the conditions of the water treatment process or are not completely retained by the WTP.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	6
3.1 Os agrotóxicos e o meio ambiente.....	6
3.2 Classificação dos agrotóxicos.....	8
3.3 Descrição e características dos compostos estudados.....	12
3.4 Legislação dos agrotóxicos.....	15
4 ÁREA DE ESTUDO.....	19
4.1 Um breve histórico econômico da região.....	20
4.2 A Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape.....	21
4.3 Uso e ocupação do solo.....	26
4.4 O uso de agrotóxicos no Vale do Ribeira.....	28
4.5 Formas de aplicação dos agrotóxicos na região.....	31
4.6 Estação de tratamento de água (ETA).....	33
4.6.1 Desinfecção.....	35
4.6.2 Coagulação.....	36
4.6.3 Floculação.....	36
4.6.4 Decantação.....	37
4.6.5 Filtração.....	38
4.6.6 Correção de pH.....	39
4.6.7 Fluoretação.....	40
4.6.8 Reservação e distribuição.....	40

4.7 Lodo de ETA.....	40
4.8 Características do lodo de ETA.....	41
4.9 Remoção dos agrotóxicos em água e lodo de (ETA).....	42
5 TÉCNICA ANALÍTICA.....	45
5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	45
5.2 A espectrometria de massas.....	46
5.3 O <i>Electrospray</i>	47
5.4 Espectrômetro de massas tipo <i>tandem</i>	49
5.5 Resolução de massas.....	50
5.6 Calibração de massas.....	50
5.7 Validação de metodologia analítica.....	52
5.7.1 Especificidade/Seletividade.....	52
5.7.2 Faixa linear e faixa linear de trabalho.....	53
5.7.3 Linearidade.....	54
5.7.4 Limite de detecção e quantificação.....	56
5.7.5 Exatidão.....	57
5.7.6 Precisão.....	57
5.7.7 Robustez.....	59
5.7.8 Incerteza de medição.....	59
6 REVISÃO DA LITERATURA.....	61
7 PARTE EXPERIMENTAL.....	69
7.1 Materiais e métodos.....	69
7.2 Soluções e reagentes.....	69
7.3 Amostragem.....	70
7.4 Preparo das amostras.....	70
7.5 Separação cromatográfica.....	72
7.6 Parâmetros e otimização do espectrômetro de massas.....	73
7.7 Validação da análise química.....	74
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
8.1 Validação da análise química.....	75
8.1.1 Seletividade.....	75
8.1.2 Linearidade.....	81
8.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	89
8.1.4 Estudo de recuperação das amostras de lodo.....	92

8.1.5 Robustez.....	95
8.1.6 Aplicação de metodologia validada em amostras de lodo.....	98
8.2 Destinação dos resíduos e materiais de laboratório utilizados nos experimentos.....	102
9 CONCLUSÃO.....	103
10 TRABALHOS FUTUROS.....	105
APÊNDICE A.....	106
APÊNDICE B.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação dos agrotóxicos quanto à peste alvo e grupo químico pertencente.....	10
TABELA 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	12
TABELA 3: Valor Máximo Permitido (VMP) de agrotóxicos na água.....	17
TABELA 4: Principais agrotóxicos comercializados no Vale do Ribeira na cultura da banana.....	30
TABELA 5: Dados dos floculadores da ETA de Registro.....	36
TABELA 6: Características dos decantadores da ETA de Registro.....	38
TABELA 7: Características dos filtros da ETA de Registro.....	39
TABELA 8: Características do meio filtrante da ETA de Registro.....	39
TABELA 9: Caracterização do lodo por Fluorescência de Raio X.....	42
TABELA 10: Programação isocrática de eluição por cromatografia líquida.....	73
TABELA 11: Parâmetros otimizados em modo MRM para análise de agrotóxicos.....	73
TABELA 12: Parâmetros otimizados da fonte de ionização por ESI e do gás de colisão.....	74
TABELA 13: Dados para o teste de seletividade (teste F, n = 7) da azoxistrobina, simazina, propoxur, atrazina e carbofurano. Adição de padrão na matriz e no solvente somente. Tabela completa somente para a azoxistrobina. Para os demais compostos, somente os valores calculados.....	78
TABELA 14: Comparação entre as concentrações da azoxistrobina obtidas pelas curvas analíticas com matriz e somente com solvente.....	81
TABELA 15: Teste de verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva sendo o valor crítico para n = 7 de 2,365 com 95% de confiança....	83

TABELA 16: Análise de variância (ANOVA) para a azoxistrobina na transição 404/372, na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 250 ng.L ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 1058x + 2121$	87
TABELA 17: Análise de variância (ANOVA) para a simazina na transição 202/132,1, na matriz. Modelo linear adotado $y = 166,03x + 242,8$..	87
TABELA 18: Análise de variância (ANOVA) para o propoxur na transição 210/111,2, na matriz. Modelo linear adotado $y = 121,95x + 451,43$	88
TABELA 19: Análise de variância (ANOVA) para a atrazina na transição 216/174,1, na matriz. Modelo linear adotado $y = 253,14x + 1735,1$	88
TABELA 20: Análise de variância (ANOVA) para o carbofurano na transição 222,1/165,2, na matriz. Modelo linear adotado $y = 225,27x + 88,112$	88
TABELA 21: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação calculado (LQ _{calc}) e Limite de Quantificação adotado (LQ _{adot}) para os compostos estudados. Número de replicatas do Branco, n = 7.....	89
TABELA 22: Valores do estudo de recuperação dos compostos agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água (ETA).....	93
TABELA 23: Testes dos efeitos de Robustez. Solução multirresíduo em concentração de 50 ng.L ⁻¹ para cada composto.....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fórmulas estruturais do carbofurano e do propoxur respectivamente.....	13
FIGURA 2: Fórmulas estruturais da atrazina e da simazina respectivamente.....	14
FIGURA 3: Fórmula estrutural da azoxistrobina.....	15
FIGURA 4: Municípios que compõem a região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.....	20
FIGURA 5: Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape.....	22
FIGURA 6: Visão espacial do rio Ribeira de Iguape na região da cidade de Registro.....	23
FIGURA 7: Relação demanda/disponibilidade dos rios na região da Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape.....	25
FIGURA 8: Fotografias de plantações de banana às margens do rio Ribeira de Iguape.....	27
FIGURA 9: Área de plantação da banana no Estado de São Paulo com destaque para a região do Vale do Ribeira.....	29
FIGURA 10: Pulverização aérea em plantação de banana no Vale do Ribeira.....	31
FIGURA 11: Foto do rio Ribeira de Iguape no município de Registro.....	32
FIGURA 12: Esquema de tratamento de água em ETA convencional.....	34
FIGURA 13: Concepção de tratamento de água em ETA convencional.....	35
FIGURA 14: Decantador com visão longitudinal das canaletas de coleta da água.....	37
FIGURA 15: Visão interna do decantador e da canaleta inferior com lodo depositado.....	38
FIGURA 16: Lodo de estação de tratamento de água.....	41
FIGURA 17: Desenho das unidades fundamentais de um espectrômetro de massas <i>tandem</i> triploquadrupolo.....	46
FIGURA 18: Esquema de nebulização de fonte por <i>Electrospray</i>	49

FIGURA 19: Esquema de um espectrômetro de massas <i>tandem</i> triploquadropolo.....	50
FIGURA 20: Resolução isotópica a FWHM de uma das massas do composto PPG.....	51
FIGURA 21: Fluxograma das etapas de preparação das amostras de lodo para análise de agrotóxicos por LC–ESI–MS/MS.....	72
FIGURA 22: Espectro de massas do carbofurano. O íon precursor aparece na m/z 222. O íon produto de quantificação aparece na m/z 165,0 e o íon de confirmação aparece na m/z 123,0.....	75
FIGURA 23: Cromatograma da solução multirresíduos (500 ng.L ⁻¹ de cada composto). Propoxur TR = 2,3; Carbofurano TR = 2,3; Simazina TR = 2,4; Atrazina TR = 2,9; Azoxistrobina TR = 3,4. TR é o tempo de retenção da corrida cromatográfica em minutos.....	76
FIGURA 24: Retas de regressão linear para o composto azoxistrobina. Com adição na matriz ($y = 1059x + 1867,4$) e somente no solvente ($y = 958,18x + 1994,2$).....	81
FIGURA 25: Linearidade para os compostos azoxistrobina (404/372), simazina (202/132,1), propoxur (210/111,2), atrazina (216/174,1) e carbofurano (222,1/165,2) com matriz. Intervalo de concentração: 10 a 500 ng.L ⁻¹	82
FIGURA 26: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto azoxistrobina na transição 404/372, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 1058x + 2121$, na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L ⁻¹	84
FIGURA 27: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto simazina na transição 202/132,1, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 83,747x + 844,05$ na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.L ⁻¹	85
FIGURA 28: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto propoxur na transição 210/111,2, adicionado na matriz, ajustado	

para o modelo linear $y = 121,95x + 451,43$ na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.L^{-1}	85
FIGURA 29: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto atrazina na transição 216/174,1, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 253,14x + 1735,1$ na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L^{-1}	86
FIGURA 30: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto carbofurano na transição 222/165,2, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 225,27x + 88,112$ na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L^{-1}	86
FIGURA 31: Cromatograma da atrazina na concentração de 25 ng.L^{-1}	90
FIGURA 32: Cromatograma da azoxistrobina na concentração de 10 ng.L^{-1}	90
FIGURA 33: Cromatograma do carbofurano na concentração de 10 ng.L^{-1}	91
FIGURA 34: Cromatograma do propoxur na concentração de 25 ng.L^{-1}	91
FIGURA 35: Cromatograma da simazina na concentração de 25 ng.L^{-1}	92
FIGURA 36: Gráfico das recuperações dos compostos agrotóxicos nos níveis baixo e alto.....	93
FIGURA 37: Picos cromatográficos da análise dos extratos do propoxur no nível baixo.....	95
FIGURA 38: Picos cromatográficos da análise dos extratos do propoxur no nível alto.....	95
FIGURA 39: Gráfico de meia-normal para o carbofurano (esquerda) e para a azoxistrobina (direita), a partir dos efeitos da TABELA 23.....	96
FIGURA 40: Gráfico de meia-normal para a simazina (esquerda) e para a atrazina (direita), a partir dos efeitos da TABELA 23.....	96
FIGURA 41: Gráfico de meia-normal para o propoxur, a partir dos efeitos da TABELA 23.....	97
FIGURA 42: Cromatogramas das amostras do branco indicando picos do composto azoxistrobina (vermelho).....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACN: Acetonitrila

ANA: Agência Nacional de Águas

ANOVA: *Analysis of Variance* – Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – Ionização Química à Pressão Atmosférica

API: *Atmospheric Pressure Ionization* – Ionização à Pressão Atmosférica

APPI: *Atmospheric Pressure Photo Ionization* – Fotoionização à Pressão Atmosférica

BHC: *Benzenehexachloride* – Hexaclorobenzeno

CATI: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral

CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada

CETEC: Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

CG: Cromatografia Gasosa

CI: *Chemical Ionization* – Ionização Química

CL50: Concentração Letal à 50%

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQMA: Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN)

CV: Coeficiente de Variação

DDT: *Dichlorodiphenyltrichloroethane* – Diclorodifeniltricloroetano

DIC: Dissociação Induzida por Colisão

DL50: Dose Letal à 50%

DPR: Desvio Padrão Relativo

DRX: Difractometria de Raios X

EEA: *European Environmental Agency* – Agência Europeia de Meio Ambiente

EEAT: Estação Elevatória de Água Tratada

EI: *Electron Impact* – Impacto de Elétrons

EP: Erro Puro

EPA: *Environmental Protection Agency* – Agência de Proteção Ambiental

ESI: *Electrospray Ionization*

ETA: Estação de Tratamento de Água

FAB: *Fast Atom Bombardment* – Ionização por Átomos Rápidos

FAPESP: Fundação para o Amparo da Pesquisa no Estado de São Paulo

FRX: Espectrometria de Fluorescência de Raios X

FWHM: *Full Width to Half Maximum* – Largura do Pico à Meia Altura

GUS: *Groundwater Ubiquity Score* – Índice de Vulnerabilidade de Água Subterrânea

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IAP: Índice da Qualidade da Água Bruta para fins de Abastecimento Público

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

K_d: Coeficiente de Distribuição

LC: *Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

LUPA: Levantamento das Unidades de Produção Agropecuária

NBR: Normas Brasileiras (ABNT)

MALDI: *Matrix-assited Laser Dessorption Ionization* - Ionização por Dessorção a Laser Assistida pela Matriz

MeOH: Metanol

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPP: *Office of Pesticide Programs*

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PNDU: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

PPG: Propilenoglicol

SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SPE: *Solid Phase Extraction* – Extração em Fase Sólida

SPME: *Solid Phase Micro Extraction* – Micro Extração em Fase Sólida

SQT: Soma Quadrática Total

TSP: *Thermospray* - Termospray

THM: Trihalometano

UNESCO: *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization* – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

VMP: Valor Máximo Permitido

WHO: *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde

WTP: *Water Treatment Plant* – Estação de Tratamento de Água

1. INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, as perspectivas de melhora na qualidade de vida da população vêm aumentando, a cada dia. A evolução do cenário agrícola tem contribuído para isso, não só trazendo benefícios financeiros à economia, como também, estimulando investimentos tecnológicos no setor. Um dos pilares que deram e dão suporte a essa condição é o uso massivo de agrotóxicos contra organismos indesejáveis como pragas, ervas daninhas e vetores de doenças. O eventual uso excessivo e inapropriado e, algumas vezes, de substâncias proibidas, propiciam condição favorável para casos de danos individuais, de saúde pública e ambiental, além do que já impacta a aplicação sob condições recomendadas. Esses impactos podem ser medidos em eventos pontuais ou agudos e em situações crônicas, quer seja numa área restrita ou espalhada numa escala mais abrangente.

No Brasil, a legislação federal vigente por meio da Resolução nº 357 do CONAMA (Brasil, 2005) e da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004) e na esfera do Estado de São Paulo, por meio do Decreto Estadual nº 8.468 (São Paulo, 1976), os limites máximos estabelecidos para contaminantes e a classificação das águas em função das suas características e do seu uso não contempla a maioria dos agrotóxicos geralmente aplicados (Dores, 2001). Isso porque a atividade agropecuária e o conhecimento sobre os aspectos toxicológicos são mais dinâmicos que o desenvolvimento e a atualização da legislação. Esses valores representam uma referência das autoridades competentes, visto que todos os anos, dos inúmeros compostos orgânicos sintetizados, muitos são agrotóxicos e têm como destino o meio ambiente, mais especificamente os corpos hídricos.

Na Europa e Estados Unidos os órgãos ambientais trabalham com a concentração máxima dos compostos em águas naturais e de abastecimento de uma forma mais restrita. A agência ambiental europeia (*European Environmental Agency*, EEA, Directivas 2007 e 1998), estabelece que, para cada agrotóxico, a

concentração máxima deva ser de 100 ng.L^{-1} e para a somatória de todos os compostos de 500 ng.L^{-1} . A agência de proteção ambiental americana (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) estabelece níveis máximos de concentração, em função da toxicidade de cada agrotóxico (Barceló, 1993; Lebre, 2000; USEPA, 2003).

Com base na legislação nacional em vigor e, na falta desta, na legislação de outros países e nos parâmetros toxicológicos, (DL50/CL50 para toxicidade aguda, por exemplo) muitos estudos científicos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de determinar e avaliar os impactos sofridos pelo meio ambiente, em função do uso dos agrotóxicos.

A matriz avaliada neste trabalho é o lodo oriundo nos tanques de decantação, que é resultado do processo de tratamento químico de água, para posterior consumo humano. O tratamento consiste nas etapas de coagulação, floculação, decantação e filtração que visam adequar a água bruta captada de mananciais e considerada imprópria ao consumo humano para um bem consumível atendendo aos parâmetros de potabilidade da Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde.

No Brasil, muitas regiões ainda não dispõem de infra-estrutura adequada para destinação final dos resíduos sólidos gerados. Na maioria das vezes, o lodo gerado acaba sendo descartado em corpos hídricos da região, até mesmo no próprio corpo d'água do qual foi retirada a água bruta, provocando impactos significativos mesmo que pontuais. A disposição adequada do lodo das estações de tratamento de água pode ser difícil (Reis, 2006), porém, com a devida atenção, pode ser realizada com baixos níveis de danos ambientais.

O local do estudo faz parte da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape onde se destaca a atividade agrícola. A presença de agrotóxicos na água tratada e superficial, confirmada em estudos anteriores, incentivou a realização do presente trabalho que está inserido no projeto FAPESP 03/01694-1: "Gerenciamento de Lodos de ETAs", realizado em parceria com a Companhia de

Saneamento Básico do Estado de São Paulo, SABESP, e com a escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Técnicas analíticas com grande sensibilidade tais como a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) associadas aos diversos detectores inclusive a espectrometria de massas, têm contribuído constantemente para a análise de amostras ambientais na determinação de compostos em baixas concentrações. No caso dos compostos mais voláteis, a preferência tem sido por técnicas de CG. Por outro lado, para compostos termolábeis, técnicas envolvendo LC são consideradas as mais adequadas (Péres-Ruiz et al., 2005; Barceló, 1993).

No presente trabalho utilizou-se a Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas triploquadrupolar com fonte de ionização por *electrospray* a pressão atmosférica, (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC–ESI–MS/MS), considerada uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade. Um dos motivos que resultou no bom desempenho dessa técnica foi o desenvolvimento que possibilitou a introdução no espectrômetro de massas da amostra líquida em pressão atmosférica resolvida no cromatógrafo líquido. Marques (2005) utilizou o LC–ESI–MS/MS e confirmou sua eficiência em função da sensibilidade e seletividade do método na determinação de compostos triazínicos e carbamatos em água tratada e superficial. Recentemente, Pizzuti et al. (2007), desenvolveram e validaram um método multirresíduo de 169 agrotóxicos utilizando LC–ESI–MS/MS, que mostrou ser rápido, robusto e eficiente.

O desenvolvimento de técnicas instrumentais e métodos mais sensíveis demandam tratamento dos dados para que esses possam ser utilizados e transformados em informações confiáveis. Essa é uma das razões pelas quais os laboratórios devem assegurar a qualidade das medições químicas. Quando os processos envolvidos nas análises são planejados, segundo os conceitos de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, resultam-se no que se conhece como validação de ensaios químicos (Ribani et al., 2004).

Validar um método analítico é estimar o seu desempenho e eficiência em função do desenvolvimento de processos e da produção de resultados, cujos indicadores são a seletividade/especificidade, linearidade, intervalo de trabalho, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e incerteza do processo. Porém, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo a obter os dados necessários (Ribani et al., 2004). Esses indicadores produzem valores qualitativos e quantitativos que devem ser estatisticamente evidenciados de forma clara e objetiva tornando-se requisitos básicos para a confiabilidade metrológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos (triazínicos, carbamatos e estrobilurina) em Estação de Tratamento de Água (ETA) da região do Vale do Ribeira, São Paulo, a partir da análise de amostras de lodo.

2.2 Objetivos específicos

a) Aplicar técnicas analíticas recentes para a determinação dos compostos explorando algumas de suas principais características, tais como a elevada sensibilidade (Espectrometria de Massas) e capacidade de discriminação dos compostos (Cromatografia e Espectrometria de Massas).

b) Validar metodologia para determinação de compostos agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água (ETA).

c) Demonstrar estatisticamente a qualidade dos dados gerados no processo analítico.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Os agrotóxicos e o meio ambiente

Há séculos o homem vem desfrutando cada vez mais dos benefícios oferecidos pelo meio ambiente, visando adquirir para si e futuras gerações, um maior conforto e bem estar, a partir da exploração e do extrativismo dos diversos recursos naturais renováveis ou não. Nesse contexto, os meios hídricos surgem como um dos mais suscetíveis ao esgotamento, e muitas vezes, como vítimas de ações predatórias que comprometem todo um equilíbrio destinado à proliferação e manutenção de uma variedade de seres vivos.

A preocupação da comunidade internacional com os limites de desenvolvimento do planeta data da década de 1960, quando começaram as discussões sobre os riscos de degradação no meio ambiente. No Brasil, o poder público tem acompanhado de perto as diversas ocorrências ambientais provenientes das atividades humanas, com o propósito a estabelecer diretrizes e impor sanções aos infratores. Os danos ao meio ambiente relacionados ao uso de agrotóxicos tornaram-se alvos primários desse processo de acompanhamento, em virtude da complexa interação entre ambos, evidenciando muitas vezes, o despreparo daqueles que deveriam controlar de forma segura e criteriosa o uso e aplicação desses produtos.

Dados estatísticos recentes indicam que as pragas são responsáveis por cerca de 20 a 30% das perdas anuais nas safras agrícolas no mundo (Pang et al., 2006) e fazem com que o consumo excessivo de agrotóxicos, principalmente no terceiro mundo, desencadeie uma série de preocupações relativas a impactos adversos no meio ambiente e à saúde humana.

Os impactos ambientais de um agrotóxico dependem, além do grau de exposição, de quatro fatores importantes: a quantidade de ingrediente ativo aplicado e seu local de aplicação; sua partição e concentração no ar, solo, água

superficial e subterrânea; sua taxa de degradação em cada compartimento e sua toxicidade nas espécies presentes nesses compartimentos (van der Werf, 1996). Esse perfil indica que as áreas agrícolas possuem uma parcela maior de responsabilidade em relação às contaminações ambientais, considerando todos os tipos e formas de aplicação dos agrotóxicos, porém existem também outras fontes e vias de contaminação que contribuem com a degradação ambiental e incluem (Hayes, 1997; Lebre, 2000):

- liberação de efluentes industriais;
- despejos de materiais de descarte;
- despejo direto na água;
- uso doméstico;
- contaminação de águas subterrâneas por percolação do solo;
- lixiviação do solo;
- transporte atmosférico;

A aplicação direta e a lixiviação do solo são as principais vias de contaminação nos ambientes aquáticos. No entanto, o problema se agrava quando aspersões são feitas sem controle de dosagem, quando galões de produtos são lavados e aumentam a frequência das descargas dos resíduos de produtos nas águas naturais. Plantações próximas as margens dos rios e a falta de sistemas de drenagem também permitem que os compostos alcancem facilmente os corpos d'água pela ação das chuvas, transportados pelo mecanismo conhecido como *"run-off"* (Queirós, 2001).

Um estudo realizado por Marques et al. (2007), investigou o risco potencial de contaminação das águas superficiais e subterrâneas pelos agrotóxicos mais usados na agricultura da bacia do rio Ribeira de Iguape. A avaliação revelou que a maioria dos compostos possui grande mobilidade no

meio ambiente, seja pelo mecanismo de transporte (*run-off*) em água ou em sedimento.

O transporte de agrotóxicos, além da área de aplicação, resulta no acúmulo e presença desses compostos em muitas partes da hidrosfera como rios, lagos, mares e mananciais (Vega, 2005). A estabilidade ou persistência dos agrotóxicos, tanto quanto dos seus produtos de degradação, determina um fator importante na avaliação do risco toxicológico devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial que ocorre ao longo da cadeia alimentar mesmo que em pequenas quantidades. Esse foi um dos motivos da proibição do uso dos compostos organoclorados, apolares e lipossolúveis (acumulam-se no organismo), que foram detectados no ar, água, solo, plantas, até mesmo na neve e em animais das regiões do Ártico e Antártica, locais onde não são empregados (Rissato et al., 2004).

Além disso, estudos revelam que as condições climáticas podem variar o comportamento dos agrotóxicos no ambiente. Segundo Castillo et al. (1997), alguns dados sugerem que nas regiões com climas temperado e tropical, as taxas de degradação sejam maiores devido à alta temperatura e radiação solar. No entanto, outros estudos indicam que o risco pode aumentar em função de temperaturas elevadas que facilitam a disponibilização.

3.2 Classificação dos agrotóxicos

O termo agrotóxico especifica todos os produtos usados exclusivamente na agricultura. O Decreto Federal nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 em seu artigo 1º, inciso IV define Agrotóxico como: *“produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos*

considerados nocivos; substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento”;

A indústria dos agrotóxicos ganhou força no século passado, a partir da descoberta das propriedades do DDT em 1939, inseticida organoclorado que foi sintetizado pelo químico alemão Othmar Zeidler em 1874. Após a Segunda Guerra Mundial, aqueles compostos, os quais eram usados como armas químicas, passaram a ser utilizados na agricultura, no combate às pragas e organismos indesejáveis prejudiciais às lavouras e no controle de vetores de doenças transmissíveis. Porém, a resistência biológica de muitas espécies e o surgimento de outros tipos de pestes, fizeram com que novas classes de praguicidas com princípios ativos diferentes fossem desenvolvidas, ampliando os riscos de degradação dos recursos naturais.

A classificação dos agrotóxicos pode ser expressa de acordo com alguns critérios estabelecidos (Lebre, 2000) e conforme é mostrado na TAB. 1:

- a peste alvo do controle, Ex: inseticida, herbicida, fungicida, nematicida, entre outros;
- ao grupo químico, Ex: carbamatos, piretróides, organoclorados, organofosforados, triazinas, entre outros;
- o grau ou tipo de prejuízo a saúde; (OMS, 1995)

Algumas classes se destacam devido ao seu alto grau de toxicidade. Os organoclorados são compostos inseticidas de estrutura cíclica formados por átomos de carbono, cloro, hidrogênio e algumas vezes oxigênio, com elevado potencial carcinogênico e causadores de distúrbios agudos no Homem como náuseas, vômitos, vertigens, hiperexcitabilidade, tremores e convulsões (Larini, 1999). Também foram muito utilizados como herbicidas e germicidas nos anos 1970 causando sérios danos à saúde como má formação do feto e problemas cerebrais. Exemplos: DDT, BHC, endossulfan, pentaclorofenol, aldrin, dieldrin, entre outros (Lebre, 2000).

TABELA 1: Classificação dos agrotóxicos quanto à peste alvo e grupo químico pertencente.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À PRAGA CONTROLADA	CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO GRUPO QUÍMICO	EXEMPLOS (produto nome comercial/substância/agente)
Inseticidas (controle de insetos)	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, Arseniato de cálcio
	Extratos vegetais	Óleos Hidrocarbonetos
	Organoclorados	Aldrin, DDT, BHC
	Organofosforados	Fenitrothion, Parathion, Malathion, Metilparathion
	Carbamatos	Carbofuranol, Aldicarb, Carbaril
	Piretróides Sintéticos	Deltamethrin, Permethrin
	Microbiais	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungicidas (combate aos fungos)	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril
	Organomercuriais	Acetato de fenil-mercúrio
	Antibióticos	Streptomycin, Cycloheximide
	Trifenil estânico	Dutrin, Brestan
	Compostos Formilamina Fenilamidas	Triphenylamine, Chloranilformylamine Captan
Herbicidas (combate a plantas invasoras)	Inorgânicos	Arsenite de sódio, Cloreto de sódio
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Fenoxiacéticos	CMPP, 2,4-D, 2,4,5-T
	Carbamatos	Profam, Chlorprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Diflufenican
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
	Benzonitrilas Glifosato	Bromoxinil, Diclobenil Round-up
Desfoliantes (combate folhas indesejadas)	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
	Dinitrofenóis	Dinoseb, DNOC
Fumigantes (combate às bactérias do solo)	Hidrocarbonetos halogenados Geradores de Metil-isocianato	Brometo de metila, Chloropicrin Dazomet, Metam
	-	Formaldeído
Rodenticidas/Raticidas (combate aos roedores/ratos)	Hidroxi-cumarinas	Cumafuralil, Difenacum
	Indationas	Fenil-metil-pirazolona, Pindone

Cont. TABELA 1

Moluscocidas	Inorgânicos (aquáticos)	Pentaclorofenato de sódio, Sulfato de Cobre
(combate aos moluscos)	Carbamatos (terrestres)	Aminocarbe, Metiocarbe, Mexacarbato
Nematicidas	Hidrocarbonetos halogenados	Dicloropropeno, DD
(combate a nematóides)	Organofosforados	Diclofentiona, Fensulfotiona
Acaricidas	Organoclorados	Dicofol, Tetradifon
(combate aos ácaros)	Dinitrofenóis	Dinocap, Quinometionato

Fonte: Perez, 1999 adaptado de WHO, 1990 e OPS/WHO, 1996

Os compostos organofosforados são ésteres dos ácidos fosfórico e fosfônico muito utilizados como inseticidas, acaricidas, nematicidas e fungicidas. São substâncias hidrofílicas e não persistentes, pois são facilmente degradadas e eliminadas do meio ambiente não acumulando em organismos nem na cadeia alimentar (Lebre, 2000). São altamente tóxicos por inibirem a enzima acetilcolinesterase, causando também distúrbios no sistema nervoso central como agitação, ansiedade, comprometimento de memória, tremores, convulsões, torpor, coma, entre outros, além de distúrbios no sistema nervoso autônomo e sistema somático. Exemplos: dimetoato, malation, paration, monocrotofós, dicrotofós, entre outros (Larini, 1999).

Os carbamatos são compostos inseticidas derivados do ácido N-metilcarbâmico. Agem inibindo a acetilcolinesterase, porém de forma reversível em função de sua estrutura química. São excretados rapidamente pela urina e não acumulam nos tecidos de mamíferos e humanos. Os sintomas de intoxicação aguda são: suor, salivação, tontura, fraqueza, lacrimejamento, dores abdominais, visão turva, vômitos, tremores e convulsões. Exemplos: carbaril, carbofurano, metomil, aldicarbe, entre outros (Larini, 1999).

No Brasil, a classificação toxicológica segue às diretrizes da Organização Mundial da Saúde, OMS, (*The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification*) aprovadas pela Assembléia

Mundial da Saúde em 1975, que são revisadas a cada dois anos (Kotaka & Zambrone, 2001). A toxicidade aguda de um agrotóxico é expressa pela quantidade, em mg.kg^{-1} de peso corpóreo, para provocar a morte de 50% dos organismos expostos, denominada DL50. Na TAB. 2 é apresentada a classificação toxicológica dos agrotóxicos (Brasil^a, 2008).

TABELA 2: Classificação Toxicológica dos agrotóxicos (Brasil^a, 2008).

Classificação	DL50 (via oral) mg.kg ⁻¹		DL50 (via dérmica) mg.kg ⁻¹		CL 50 (inalatória) mg.L ⁻¹ (*)
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	
Classe I “A”					
Extremamente	Todos os produtos cuja DL50 do constituinte ativo for igual ou inferior a 5 mg.kg ⁻¹ (via oral) ou 10 mg.kg ⁻¹ (via dérmica)				
Tóxicos	≤ 0,2				
Classe I “B”					
Extremamente	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	
Tóxicos					
Classe II					
Altamente	5 < x ≤ 50	20 < x ≤ 200	10 < x ≤ 100	40 < x ≤ 400	0,2 < x ≤ 2,0
Tóxicos					
Classe III					
Medianamente	50 < x ≤ 500	200 < x ≤ 2000	100 < x ≤ 1000	400 < x ≤ 4000	2,0 < x ≤ 20,0
Tóxicos					
Classe IV					
Pouco	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	> 20,0
Tóxicos					

(*) Concentração expressa em ar por 1 hora de exposição

3.3 Descrição e características dos compostos estudados

Os compostos utilizados no presente trabalho foram: os carbamatos (carbofurano e propoxur), os triazínicos (atrazina e simazina) e a estrobilurina (azoxistrobina).

A escolha dos agrotóxicos mencionados levou em consideração alguns fatores essenciais, como: cultura e aplicação na área de estudo; o atendimento

aos padrões de potabilidade de água; a compatibilidade com a técnica analítica empregada, além da disponibilidade de padrões analíticos.

- **Carbamatos**

O carbofurano, utilizado na área de estudo, é um inseticida e nematocida amplamente aplicado na cultura da banana. É um composto solúvel em água, possui grande potencial de contaminação em lençóis freáticos e tem alta mobilidade e lixiviação no solo. Possui persistência moderada (de 30 a 120 dias) e é facilmente degradado no meio ambiente por hidrólise e biodegradação formando o 3-hidroxicarbofurano (Larini, 1999).

O propoxur é um dos compostos mais encontrados nos estudos de monitoramento de qualidade da água. É um inseticida não-sistêmico utilizado no combate de insetos domésticos e controle do vetor da malária. Pouco solúvel em água e possui alta tendência de lixiviação no solo. Na agricultura é aplicado nas partes aéreas de culturas como: alho, cebola, ameixa, maçã, pêssigo, algodão, amendoim, soja, cacau, entre outras (Larini, 1999). Na FIG. 1 são apresentadas as fórmulas estruturais dos compostos carbofurano e propoxur.

FIGURA 1: Fórmulas estruturais do carbofurano e do propoxur respectivamente.

- **Triazínicos**

Das mais de 15 classes de herbicidas existentes os compostos triazínicos estão entre os mais consumidos no mundo. Atrazina e simazina são os

mais estudados e monitorados em águas superficiais, lençóis freáticos e solos (Lee, 2002). Na legislação brasileira, fazem parte da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, que estabelece qualidade e padrão de potabilidade de água e da Resolução nº 357 do CONAMA, que dispõe sobre a classificação de corpos hídricos. São utilizados em aplicações pré e pós-emergência, nas culturas de milho, sorgo, café, soja, cana-de-açúcar, entre outras. Na FIG. 2 são apresentadas as fórmulas estruturais dos compostos atrazina e simazina.

FIGURA 2: Fórmulas estruturais da atrazina e da simazina respectivamente.

- **Estrobilurina**

A azoxistrobina foi um dos primeiros compostos utilizados de uma das mais recentes classes de agrotóxicos desenvolvidas. É um fungicida sistêmico com aplicação foliar usado em diversas culturas, inclusive da banana que é a mais difundida na região de estudo. De forma geral, é um composto não tóxico aos seres humanos e não persistente no meio ambiente, porém bastante perigoso às espécies aquáticas (Lee, 2003). Na FIG. 3 é apresentada a fórmula estrutural do composto azoxistrobina.

FIGURA 3: Fórmula estrutural da azoxistrobina.

No Apêndice A encontram-se relacionadas as propriedades e monografias dos compostos utilizados no presente estudo.

3.4 Legislação dos agrotóxicos

Um dos pilares que sustenta o modelo de desenvolvimento agrícola brasileiro para a melhoria qualitativa e quantitativa da produção é o uso de agrotóxicos, principalmente, depois que estes passaram a ser intensamente utilizados após a segunda guerra mundial.

Segundo Tomita (2005), três fases marcaram a evolução das bases legais (decretos, leis, portarias, dentre outros) que orientam o uso e aplicação dos agrotóxicos. A primeira, cujo conceito de agrotóxico era de produto saneante, foi uma época que não se conhecia o risco toxicológico desses produtos e durou até meados da década de 1960. Na segunda, os produtos saneantes passaram a ser chamados de defensivos agrícolas, pois já se percebia uma conscientização da sua toxicidade, a qual permaneceu até o início dos anos 1980. A terceira, quando foram denominados agrotóxicos (termo restrito ao Brasil), foi caracterizada pelas preocupações dos seus efeitos tóxicos sobre a saúde humana e meio ambiente e geraram leis que dispõem de forma rigorosa e restritiva sobre o tema em questão.

A legislação referente aos agrotóxicos é contemplada mais de perto pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que foi regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990 e atualizada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de

janeiro de 2002, que juntamente com as Portarias do Ministério da Saúde nº 3, de 16 de janeiro de 1992 e nº 14, de 24 de janeiro de 1992, abrangem de uma forma geral o tema referente aos produtos químicos aplicados na agricultura. Como resultado dessas referências legais, pode-se, então, se posicionar quanto à pesquisa, experimentação, produção, embalagem, armazenamento, comercialização, importação, exportação, propaganda comercial, destino final de embalagens e resíduos, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização dos agrotóxicos, seus componentes e afins (Kotaka & Zambrone, 2001; Tomita, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS), é o órgão que regulamenta o registro de agrotóxicos no Brasil. O registro é garantido pela Lei nº 7.802 mediante avaliação toxicológica e de risco que comprovem que a ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente seja igual ou menor do que aqueles já registrados para o mesmo fim (Kotaka & Zambrone, 2001; Maciel, 2005).

Conforme o índice monográfico da ANVISA, dos quase 600 ingredientes ativos existentes, cerca de 470 estão autorizados para uso no Brasil, 87 não possuem autorização e 16, incluindo o carbofurano, serão reavaliados em 2008. A reavaliação é realizada sempre que surgirem indícios da ocorrência de riscos que desaconselhem o uso de produtos registrados ou quando o país for alertado nesse sentido, e está de acordo com o parágrafo 4º do Art. 3º da Lei nº 7.802 que diz: *“Quando organizações internacionais responsáveis pela **saúde, alimentação ou meio ambiente**, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos e convênios, alertarem para riscos ou **desaconselharem o uso de agrotóxicos, seus componentes e afins**, caberá à autoridade competente tomar imediatas providências, sob pena de responsabilidade.”* Dentre os compostos não autorizados alguns como: aldrin, endrin, BHC, DDT, heptacloro, lindano, metoxicloro, paration e pentaclorofenol ainda constam nas listas de órgãos públicos como o CONAMA, do Ministério do Meio Ambiente, por meio da Resolução nº 357 que dispõe sobre a classificação dos corpos d’água e do Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 518.

A Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, estabelece a qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade, admitindo o Valor Máximo Permitido (VMP) para agrotóxicos conforme indicado na TAB. 3.

TABELA 3: Valor Máximo Permitido (VMP) de agrotóxicos na água, segundo a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde.

Agrotóxico	VMP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Agrotóxico	VMP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Alaclor	20,0	Hexaclorobenzeno	1
Aldrin e Dieldrin	0,03	Lindano (γ -BHC)	2
Atrazina	2	Metolacoloro	10
Bentazona	300	Metoxicloro	20
Clordano (Isômeros)	0,2	Molinato	6
2,4 D	30	Pendimentalina	20
DDT (Isômeros)	2	Pentacolorofenol	9
Endossulfan	20	Permetrina	20
Endrin	0,6	Propanil	20
Glifosato	500	Simazina	2
Heptacoloro e Heptacoloro Epóxido	0,03	Trifluralina	20

No Estado de São Paulo a legislação atua por meio do Decreto nº 8.468 de 8 de setembro de 1976 que aprova o Regulamento da Lei nº 997 de 31 de maio de 1976 que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente.

Na esfera penal a Lei de Crimes Ambientais nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas lesivas ao meio ambiente descreve no artigo nº 54 que é crime “*Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em*

danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora.”

A própria Constituição Federal no parágrafo 3º do artigo nº 225 diz que *“As condutas e atividades consideradas lesivas ao meio ambiente sujeitarão aos infratores, pessoas físicas ou jurídicas, a sanções penais e administrativas, independentemente da obrigação de reparar os danos causados”* (Brasil, 1988).

4. ÁREA DE ESTUDO

As perspectivas de crescimento econômico e social são comuns nas regiões em que as políticas de desenvolvimento estabelecem estratégias dinâmicas entre os setores da indústria, comércio, serviço e agropecuária e são integradas com o meio físico. No entanto, as disparidades regionais existem e se destacam quando o desenvolvimento não ocorre em toda parte e da mesma maneira.

Assim é o Vale do Ribeira, localizado ao leste do Estado do Paraná se estendendo pelo extremo sul do Estado de São Paulo a menos de 100 km da capital paulista. A região é considerada uma das mais pobres e subdesenvolvidas do Estado de São Paulo, quando comparadas e analisadas algumas variáveis sociais e econômicas (IBGE, 2007; Braga, 1999).

Dados do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) de 2004 indicam que os Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) da região estão entre os mais baixos no *ranking* paulista. A dependência econômica e os baixos volumes de recursos gerados pelas finanças públicas dos municípios contribuem para essa condição, além de comprometer a realização de programas de infra-estrutura social como geração de empregos, abastecimento de água, coleta e tratamento de esgoto. (França, 2005; Hogan et al., 1998).

A atividade econômica é baseada na agricultura da banana e do chá, sendo que a primeira está distribuída entre aproximadamente 4000 propriedades rurais e representa 90% da produção da região. Mineração e extrativismo vegetal de palmito também são atividades desenvolvidas na região (Hogan et al., 1998).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007) a população do Vale do Ribeira está estimada em aproximadamente 740 mil habitantes, distribuídos nos 23 municípios ligados, na sua maioria, à Região Administrativa de Registro no Estado de São Paulo e em 16 municípios do Estado

do Paraná. Na FIG. 4 é mostrado o mapa político administrativo de todos os municípios que compõem a região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.

Fonte: Instituto Geográfico e Cartográfico – 2002.

FIGURA 4: Municípios que compõem a região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo (França, 2005).

4.1 Um breve histórico econômico da região

O Vale do Ribeira foi uma das primeiras regiões do Brasil a ser ocupada pelos portugueses, no início do século XVI. Desde a colonização, a região tem vivido isolada e às margens do desenvolvimento econômico em relação ao restante do Estado de São Paulo.

No início, com a fundação dos primeiros povoados de Iguape e Cananéia, a economia da região mostrou sinais de crescimento com a exploração do ouro e pedras preciosas, além do comércio de mão de obra escrava. Atraídos pelas riquezas naturais, os colonizadores migraram do planalto, na região de Sorocaba, e povoaram o interior do Vale do Ribeira formando os primeiros núcleos coloniais, dos quais o mais importante foi o de Xiririca, atual Eldorado

Paulista. Com a decadência do ciclo do ouro, no século XVII, outras fontes de sustentação como a construção naval, restrita ao litoral e a retomada da mineração, desta vez com o ouro de aluvião, em Apiaí, movimentaram a economia da região durante o século XVIII (Braga, 1999; França, 2005).

Após um período de estagnação econômica em razão dos declínios da construção naval e atividade mineradora, a economia voltou a crescer com o ciclo do arroz no começo do século XIX. Apesar de ter sido um período de muita prosperidade, a rizicultura enfrentou problemas como: a concorrência da agricultura cafeeira, que se expandia no oeste paulista, a proibição do tráfico negreiro que prejudicava a disponibilidade de mão de obra escrava e o sistema de transporte da região, cuja única e principal alternativa de escoamento da produção agrícola até o porto de Santos, era por via hidrográfica, através do Rio Ribeira de Iguape. Porém, o assoreamento do porto de Iguape, causado pela construção do Canal do Valo Grande, que impedia o acesso de navios de grande porte, fez com que o arroz produzido na região tivesse sua posição ainda mais dificultada no mercado de alimentos. Esses fatores provocaram a queda do ciclo do arroz na metade do século XIX (Braga, 1999).

A região passou então por um novo período de estagnação econômico-social, chamado de “caipirização”, (período em que a agricultura comercial foi substituída pela lavoura de subsistência) até a chegada dos colonos japoneses em 1940, incentivados pelo governo brasileiro, que implantaram as culturas de chá e banana, mantendo-se até os dias atuais (Braga, 1999).

4.2 A Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape

A Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape e o Complexo Estuarino Lagunar de Iguape, Cananéia e Paranaguá, estão situados na região sul do Estado de São Paulo e leste do Estado do Paraná entre as latitudes 23°30' e 25°30' Sul e longitude 46°50' e 50°00' Oeste, numa área total de aproximadamente 25.000 km², dos quais 61% encontram-se no estado paulista e os outros 39% no território paranaense (Hogan et al., 1998). Eles compõem um dos biomas mais ricos em biodiversidade do Estado por abranger uma das maiores áreas

remanescentes, ainda conservadas, de Mata Atlântica do Brasil. Esse fato permitiu ao Vale do Ribeira integrar a Reserva da Biosfera da Mata Atlântica a partir de 1992 e ser reconhecido pela Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) como patrimônio da humanidade.

O rio Ribeira nasce a mais de 1.000 metros de altitude, formado pelos rios Açungui e Ribeirão Grande, na vertente leste da serra de Paranapiacaba, em terras paranaenses e segue com o nome de Ribeira até a região de Eldorado Paulista (SP), onde passa a se chamar Ribeira de Iguape. Até essa região, a bacia hidrográfica se insere no chamado Alto e Médio Ribeira e se caracteriza por ser um dos relevos mais movimentados do país. Há altitudes que chegam a 1.300 metros e escarpas de até 700 metros de amplitude. A partir da confluência dos rios Ribeira de Iguape e Juquiá, aproximadamente na região central do Vale do Ribeira (Reis, 2006), a bacia do rio Ribeira de Iguape atinge terras baixas e planas.

Do total de 470 km do rio, antes retilíneo e com corredeiras, 350 km serpenteiam os planaltos e planícies formadas pelas encostas da Serra de Paranapiacaba e Serra do Mar até desaguar no oceano Atlântico. É a região do Baixo Ribeira, que abrange um conjunto de lagunas, braços de mar, estuários, restingas, ilhas e morros isolados. Na FIG. 5 é apresentado mapa da Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape e seus municípios e na FIG. 6, mapa espacial de toda a Bacia com destaque para a cidade de Registro.

Fonte: Instituto Socioambiental.

FIGURA 5: Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape.

Fonte: *Google Earth*.

FIGURA 6: Visão espacial do rio Ribeira de Iguape na região da cidade de Registro.

Segundo o Relatório “0” do Comitê da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul (SIGHR, 2000), que estabelece o diagnóstico da situação dos recursos hídricos na bacia hidrográfica, indica que a Bacia principal está dividida em outras 13 sub-bacias que compreende os seguintes municípios (CETEC, 2003):

- Alto Ribeira abrangendo os municípios de Barra do Chapéu, Itapirapuã Paulista, Apiaí, Itaóca, Iporanga e Ribeira;
- Baixo Ribeira abrangendo os municípios de Apiaí, Iporanga, Eldorado e Sete Barras;
- Rio Ribeira de Iguape abrangendo os municípios de Registro, Pariquera-Açú e Iguape;

- Alto Juquiá abrangendo os municípios de São Lourenço da Serra, Juquitiba e Tapiraí;
- Médio Juquiá abrangendo os municípios de Tapiraí, Juquiá e Miracatú;
- Baixo Juquiá abrangendo os municípios de Juquiá, Tapiraí, e Sete Barras;
- Rio São Lourenço abrangendo os municípios de Miracatu, Pedro de Toledo e Juquiá;
- Rio Itariri abrangendo os municípios de Itariri e Pedro de Toledo;
- Rio Una da Aldeia abrangendo o município de Iguape;
- Rio Pardo abrangendo o município de Barra do Turvo;
- Rio Jacupiranga abrangendo os municípios de Jacupiranga, Cajatí e Registro;
- Vertente Marítima Sul abrangendo os municípios de Cananéia e Ilha Comprida;
- Vertente Marítima Norte abrangendo o município de Iguape.

Quanto à demanda e disponibilidade dos recursos hídricos superficiais, o Relatório “0” indica que a região possui uma situação bastante favorável com disponibilidade satisfatória e uma relação demanda/disponibilidade de 3,4%, considerando a disponibilidade mínima de $179 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$. A informação dessa condição favorável também é dada pela ANA, (ANA, 2008), (FIG. 7). A sub-bacia do rio Jacupiranga apresenta a maior relação demanda/disponibilidades com 26,68% (CETEC, 2003).

Fonte: Agência Nacional de Águas (ANA, 2008).

FIGURA 7: Relação demanda/disponibilidade dos rios na região da Bacia Hidrográfica do rio Ribeira de Iguape.

Em toda região, a hidrografia é influenciada por fatores como: clima, relevo, pedologia e litologia. O clima pode ser classificado, de um modo geral, como tropical úmido com ligeira variação entre as zonas costeiras e a Serra de Paranapiacaba. É uma área de chuvas abundantes caracterizada por provocar transbordamento de rios e córregos, porém que favorece o desenvolvimento de vegetação nativa formada por matas ciliares, restingas, além das reservas de Mata Atlântica que corresponde à floresta ombrófila densa.

O relevo nas áreas serranas se caracteriza por litossóis que são formados por granitos, gnaisses, filitos e outras rochas que impedem a infiltração de água para as camadas mais profundas favorecendo um aumento no número

de cursos hídricos. Fazem parte deste grupo também, as rochas cataclásticas antigas e mais jovens (Paleozóicas). Todas estas rochas são dominantes na bacia, sendo encontradas principalmente nas áreas mais acidentadas (CETEC, 2003).

Os tipos de solos que predominam na região são os argilosos (grumosolos), alinos (solonetz), cambrissolos, litólicos, afloramentos rochosos e diversos aluviais. A litologia dominante é composta por granitos, migmáticos e micaxisto (CETEC, 2003).

A qualidade da água dos rios que fazem parte da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI-11) do Vale do Ribeira foi classificada como boa, conforme dados do Índice de qualidade da água bruta (IAP), para fins de abastecimento público, fornecidos pela CETESB (CETESB, 2007). A exceção foi o rio Jacupiranga que apresentou classificação regular, pois as análises da água indicaram elevados teores de alumínio, manganês, ferro e fósforo total, detectando-se toxicidade para alguns organismos aquáticos. Outros estudos, também revelaram a presença de agrotóxicos em águas superficiais, que, apesar das baixas concentrações, podem estar relacionados a fatores como sazonalidade e índice pluviométrico que comumente contribuem para a dispersão dos poluentes no meio ambiente, de forma a aumentar os riscos de contaminação (Marques, 2005).

4.3 Uso e ocupação do solo

O problema da contaminação das águas superficiais pelos agrotóxicos no Vale do Ribeira é explicado pela extensa e principal atividade na região que é a atividade agrícola. Conforme mencionado anteriormente, a bananicultura é cultivada em cerca de 4000 propriedades rurais e representa 90% do plantio da região. Em muitas áreas a mata ciliar nativa foi substituída pelas plantações de banana que margeiam o rio Ribeira de Iguape deixando-o desprotegido e susceptível às contaminações pelos agrotóxicos. Na FIG. 8 são mostradas fotografias de plantações de banana às margens do Ribeira de Iguape.

As áreas correspondentes às plantações de chá não apresentaram crescimento significativo em razão do baixo preço do produto no mercado e o cultivo de espécies puras ou mistas, temporárias ou permanentes, como arroz, pêssago, tomate, maracujá, feijão, gengibre e batata, constituem pequenas ou médias glebas na região. No entanto, a região do Alto vale do Ribeira vem se destacando com a produção de alimentos de climas temperados como a fruticultura, além da horticultura com produtos como: vagem, pimentão, ervilha e pepino. O extrativismo vegetal (palmito) e a pecuária com áreas que compreendem terras ocupadas por pastagens completam o mapa de uso do solo no âmbito agropecuário (CETEC, 2003).

Fonte: Brasil das águas.

FIGURA 8: Fotografias de plantações de banana às margens do rio Ribeira de Iguape.

A cobertura vegetal natural está representada por várias formações vegetais naturais, tais como: mata, mata degradada ou sem recuperação, séries iniciais de sucessão ou capoeira, várzea arbórea, várzea herbácea ou brejo, floresta de encosta, floresta de transição, mata paludosa em solo turfoso, floresta de restinga, brejo de restinga, escrube de restinga, floresta de restinga degradada e mangues. O reflorestamento compreende as formações florestais artificiais constituídas predominantemente por *Pinus* e *Eucalyptus* (CETEC, 2003).

No setor secundário regional destacam-se a mineração e a exploração do fosfato e do calcário, predominantemente em Cajati e Apiaí. Os municípios de Eldorado, Juquiá e Registro comportam pequenas indústrias em setores diversificados (CETEC, 2003).

4.4 O uso de agrotóxicos no Vale do Ribeira

Segundo o banco de dados do Levantamento das Unidades de Produção Agropecuária (LUPA), que é administrado pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), em 2007, a bananicultura no Vale do Ribeira ocupou uma área de aproximadamente 45.000 hectares, com uma produção estimada em 1000 toneladas representando cerca de 90% da produção de todo o estado de São Paulo. Da mesma forma, o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), informa que no mesmo ano, a produção da banana no Vale do Ribeira representou 20% da produção brasileira e abrangeu os municípios de Cajati, Registro, Jacupiranga, Sete Barras, Eldorado, Itariri, Miracatu, Juquiá e Pedro de Toledo. Na FIG. 9 é mostrado mapa da área plantada da banana (em ha) no Estado de São Paulo no ano de 2005, com destaque para a região do Vale do Ribeira.

Por essa razão, a banana foi responsável pelo consumo 90% dos agrotóxicos utilizados na região, na sua maioria, de compostos fungicidas sistêmicos destinados ao combate dos fungos causadores da Sigatoka Negra e Sigatoka Amarela, doenças que destroem as plantações provocando a morte prematura das folhas. Os inseticidas usados para combater organismos nematóides e alguns herbicidas também constam na lista dos produtos aplicados.

Fonte: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI, 2008.

FIGURA 9: Área de plantação da banana no Estado de São Paulo com destaque para a região do Vale do Ribeira.

A importância da banana como um dos alimentos essenciais na mesa do brasileiro é tão significativa, que esta passou a figurar na lista de produtos selecionados pela ANVISA para participação de um programa nacional de monitoramento de resíduos de agrotóxicos. Esse programa foi chamado Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), tendo início em 2001, com a finalidade mais ampla de avaliar a qualidade dos alimentos, *in natura*, em relação aos agrotóxicos (Brasil_c, 2008).

Os agrotóxicos mais usados nas lavouras de banana são os fungicidas triazóis, benzimidazóis, ditiocarbamatos e as estrobilurinas, os inseticidas carbamatos e os herbicidas bipiridílos, triazínicos e glicínicos, além do óleo mineral, que tem ação adjuvante e fungistática, conforme mostrados na TAB. 4.

TABELA 4: Principais agrotóxicos comercializados no Vale do Ribeira na cultura da banana (Corrêa e Silva, 2007; Marques, 2005).

Princípio Ativo	Nome Comercial	Classe ^(*) Toxicológica	Quantidade Comercializada na região (L.ano ⁻¹)	Tipo de Agrotóxico
Hidrocarboneto	Óleo Mineral	IV	1.800.000	Adjuvante
				Fungicida
Propiconazole	Tilt	III	10.000	Fungicida
Tebuconazole	Folicur	III	6.000	Fungicida
Tetraconazol	Domark	II	2.000	Fungicida
Tiofanato Metílico	Cercobin	IV	8.000	Fungicida
Azoxistrobina	Priori	III	1.000	Fungicida
Pirimetanil	Mithos	II	2.000	Fungicida
Difenoconazole	Score	II	5.000	Fungicida
Mancozebe	Manzate	III	15.000	Fungicida
Trifloxistrobina	Stratego	II	16.000	Fungicida
Carbofurano	Furadan	I	2.000	Inseticida
	Líquido			Nematicida
Carbofurano	Furadan	III	60.000 **	Inseticida
	Granulado			Nematicida
Carbaril	Sevin	II	5.000	Inseticida
				Nematicida
Terbufós	Counter 50G	I	10.000 **	Inseticida
				Nematicida
Imidaclopride	Provado	III	500	Inseticida
				Nematicida
Paraquate	Gramoxone	II	20.000	Herbicida
Paraquate+Diuron	Gramocil	II	40.000	Herbicida
Glifosato	Roundup	IV	30.000	Herbicida
Glufosinato	Finale	IV	25.000	Herbicida
Sulfosato	Zapp	IV	8.000	Herbicida

(*) Classe I – Extremamente Tóxico; Classe II – Altamente Tóxico; Classe III – Moderadamente Tóxico; Classe IV – Pouco Tóxico

(**) kg.ano⁻¹

Além dessa relação, existe ainda, grande possibilidade de produtos com os princípios ativos 2,4-D, atrazina, simazina, trifluralina, endossulfan, metoxicloro, pendimentalina serem amplamente utilizados nas demais culturas da região (Marques, 2005). Entretanto, tornou-se mais difícil a fiscalização do uso de agrotóxicos registrados ou não em todas as áreas de plantio, em razão da mudança no Art. 65 do Decreto Federal nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de junho de 1989, a qual isentou os estabelecimentos comerciais do envio obrigatório de uma cópia do receituário agrônomo ao órgão fiscalizador competente (Gelmini et al., 2004).

4.5 Formas de aplicação dos agrotóxicos na região

As estimativas de aplicação dos compostos fungicidas no combate à doença da Sigatoka nas folhas das bananeiras no Vale do Ribeira indicam que 90% dessas aplicações aconteçam por via aérea e o restante, via costal e tratorizada (Corrêa e Silva, 2007).

As pulverizações são realizadas de sete a oito vezes por ano na região (FIG. 10) sendo o preparado da substância a ser aspergida, denominada calda, uma mistura de adjuvantes como o óleo mineral e água que, adicionados ao fungicida, melhoram a eficácia do princípio ativo.

FIGURA 10: Pulverização aérea em plantação de banana no Vale do Ribeira (Corrêa e Silva, 2007).

A aplicação aérea é uma ferramenta valiosa na agricultura quando baseada em critérios técnicos bem definidos. Os riscos de intoxicação, aos quais os trabalhadores rurais são expostos, teoricamente, são considerados menores em relação às aplicações costais e tratorizadas. Porém, é um tipo de aplicação, cuja dimensão pode se tornar maior do que a extensão pretendida. O produto pulverizado muitas vezes fica sob a ação de um fenômeno chamado “deriva” (deslocamento de gotas) que é influenciado pelos ventos. As gotículas formadas deslocam-se e atingem toda a vizinhança ao redor do local de aplicação, contaminando moradores e trabalhadores, plantações mais sensíveis, além da fauna e flora.

Geralmente, essas regiões ficam próximas a mananciais, nascentes e rios que abastecem os centros urbanos e áreas rurais como é o caso, por exemplo, do Ribeira de Iguape (FIG. 11), rio classe 2, em que a água é captada e enviada para as estações de tratamento da SABESP, sendo posteriormente tratadas por processo químico convencional e fornecidas à população.

(Moracci, L.F.S., 2007)

FIGURA 11: Foto do rio Ribeira de Iguape no município de Registro.

Apesar de, na maior parte das vezes, obedecer aos padrões inorgânicos de potabilidade da Portaria nº 518, a qualidade dos corpos hídricos em relação à contaminação por agrotóxicos é sempre um problema grave. Além

da inobservância da lei de controle e, às vezes, da falta de cuidados no momento da aplicação dos produtos, a prática de descarte do resíduo sólido (lodo) gerado nos tanques de decantação das estações de tratamento no próprio corpo receptor em que a água é captada, também tem sido um motivo preocupante quanto a impactos nocivos, mesmo que pontuais, uma vez que o acesso desse material às atividades biológicas torna suscetível e pode comprometer o funcionamento dos sistemas celulares dos organismos aquáticos.

4.6 Estação de tratamento de água (ETA)

O crescimento urbano combinado à expectativa de uma qualidade de vida melhor, têm exigido dos órgãos responsáveis pelas políticas de saneamento básico, esforços cada vez maiores para assegurar a quantidade e a boa qualidade da água tratada.

No Brasil, existem cerca de 7500 estações de tratamento de água cujos objetivos são (Brasil, 2006):

- Transformar a água bruta captada de mananciais, considerada imprópria, em um bem com propriedades físicas, químicas e biológicas, adequado ao consumo humano;
- Atender ao padrão de potabilidade exigido pelo Ministério da Saúde, prevenindo a veiculação de doenças de origem microbiológica ou química;
- Prevenir a cárie dentária por meio de fluoretação;
- Proteger os sistemas de abastecimento dos efeitos da corrosão e da deposição/incrustação;

A ETA, em que foi coletado o material para o desenvolvimento do presente estudo, está localizada no município de Registro e atende a uma população urbana, que segundo o IBGE (2007), é de aproximadamente 43.000 habitantes.

A estação, administrada pela SABESP possui reservatórios de água tratada com capacidade de 6000m^3 e foi projetada para operar com um volume final de 212 L.s^{-1} , porém opera atualmente com 180 L.s^{-1} por período médio de 16 h/d. A operação é totalmente controlada pelo sistema AQUALOG[®], criado e desenvolvido inteiramente pela Unidade de Negócio Vale do Ribeira.

O AQUALOG[®] é um *software* desenvolvido pela SABESP para automação na área de saneamento ambiental e de tratamento de efluentes. Os sistemas possuem “inteligência” artificial que permite a tomada de decisões automaticamente no controle da dosagem de produtos, acionamento de válvulas e monitoramento de reservatórios, ajustando-se de acordo com as necessidades, para a obtenção de melhor desempenho e excelência em qualidade.

A ETA de Registro é uma estação do tipo convencional que utiliza processos de desinfecção, coagulação, floculação, decantação, filtração e correção de pH para a remoção de cor, turbidez, sabor, odor e diversos tipos de contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes na água, geralmente dissolvidos ou associados a partículas suspensas ou dissolvidas. Completam o sistema os processos de fluoretação, reservação e distribuição. Nas FIG. 12 e 13 são apresentados um esquema, bem como a concepção do processo de tratamento de água em uma ETA convencional.

FIGURA 12: Esquema de tratamento de água em ETA convencional.

FIGURA 13: Concepção de tratamento de água em ETA convencional.

Fonte: SABESP, 1999.

4.6.1 Desinfecção

Consiste de duas etapas: A pré-cloração e a pós-cloração.

Na pré-cloração a dosagem de cloro é fixa e com residual em torno de 0,1 a 0,2 mg.L⁻¹. Seu objetivo é combater os microorganismos patogênicos capazes de causar doenças, além da redução da cor, gosto e odor da água, redução do potencial para criação de condições sépticas que possam, de alguma forma, se desenvolver no lodo depositado, combate ao crescimento de matérias orgânicas no meio filtrante e nas paredes dos decantadores e auxílio na oxidação de ferro. A desvantagem associada ao uso de hipoclorito de sódio em relação aos compostos orgânicos existentes é a formação de produtos tóxicos como os trihalometanos (THM).

Na pós-cloração o cloro residual livre na água tratada é mantido em torno de 1,5 mg.L⁻¹ com o intuito de proteger a água contra possíveis contaminações no sistema de distribuição.

4.6.2 Coagulação

A coagulação é um processo de troca físico-química que está intimamente ligado ao fenômeno de redução ou neutralização das cargas das partículas coloidais pela ação de produtos coagulantes como o sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$. Consiste na aglutinação das partículas, para que as mesmas se tornem maiores e possam sedimentar rapidamente. É nessa etapa que ocorre a formação do hidróxido de alumínio oriundo da reação entre os íons hidroxila (OH^-) presentes e que conferem caráter alcalino à água bruta com os produtos coagulantes adicionados.

O produto utilizado na estação é uma solução cuja concentração é de 58% e a dosagem é controlada por um analisador conectado a uma central lógica programável (CLP).

4.6.3 Floculação

É o agrupamento das partículas coloidais pela força mecânica dos floculadores. O floculador transmite energia à água por turbilhonamento suave. As partículas de impurezas colidem com as partículas sólidas suspensas e, aderindo umas às outras, aumentam de tamanho e densidade e formando flocos sedimentáveis. Na TAB. 5 são mostrados os dados dos floculadores da ETA de Registro.

TABELA 5: Dados dos floculadores da ETA de Registro.

Detenção média	41 minutos
Capacidade de cada floculador	74,82 m ³
Área de cada floculador	16,85 m ²
Volume total	448,92 m ³
Altura média de água	4,44 m
Floculadores	6 unidades

4.6.4 Decantação

A separação entre o decantador e o floculador é realizada por uma cortina de madeira ou difusor, evitando que a turbulência criada no floculador se propague para o decantador. Obtém-se com isto um movimento laminar com baixa velocidade, permitindo que os flocos se assentem antes que a água seja coletada pelas canaletas, na parte superior, dos decantadores conforme mostrado na FIG. 14.

(Moracci, L.F.S., 2007)

FIGURA 14: Decantador com visão longitudinal das canaletas de coleta da água.

Na ETA de Registro a manutenção de limpeza dos decantadores é realizada a cada 30 ou 40 dias. Os flocos, ao se depositarem, formam uma camada de lodo que varia em quantidade conforme a turbidez da água bruta. Na manutenção, o resíduo é removido com jatos d'água que percorrem a canaleta inferior do decantador até o descarte final conforme mostrado na FIG. 15. As características dos decantadores encontram-se na TAB. 6.

TABELA 6: Características dos decantadores da ETA de Registro.

Detenção média	202 minutos
Velocidade horizontal média	6 cm.min ⁻¹
Taxa média de aplicação	44 m ³ .m ² dia
Tanques	2 unidades
Capacidade de cada tanque	771,15 m ³
Volume total	1542,30 m ³
Altura média de água	4,36 m
Largura de cada tanque	7,51 m
Comprimento de cada tanque	23,55 m
Área de cada Tanque	176,87 m ²
Volume de lodo retirado, com 1% em sólidos	12 m ³ .dia ⁻¹

(Moracci, L.F.S., 2007)

FIGURA 15: Visão interna do decantador e da canaleta inferior com lodo depositado.

4.6.5 Filtração

É o processo que permite a remoção das frações de partículas de impurezas e partículas sólidas suspensas na água que não foram removidas no decantador. Os filtros são constituídos por carvão antracito e areia, denominados meios filtrantes e camada suporte formada por pedregulhos de diferentes

granulometrias. Os filtros são lavados a cada 32 horas com fluxo de água contra corrente, consumindo uma média de 150 m³ de água. As características dos filtros e do meio filtrante se encontram na TAB. 7 e 8.

TABELA 7: Características dos filtros da ETA de Registro.

Rápido por gravidade de areia e carvão antracito	4 unidades
Taxa média de filtração	338 m ³ .m ⁻² . dia
Vazão de filtração por filtro	0,97 m ³ .s ⁻¹
Carreira de filtração	32 horas
Área superficial do meio filtrante pó filtro	16,57 m ²
Capacidade nominal de cada filtro	45 m ³ .s ⁻¹
Taxa de filtração contínua	234 m ³ .m ⁻² . dia
Total de todos os filtros	66,28 m ²
Quantidade de câmaras por filtro	4 unidades

TABELA 8: Características do meio filtrante da ETA de Registro.

Carvão antracito – altura	53 cm
Carvão antracito – tamanho efetivo	0,85 a 0,90 mm
Areia – altura	30 cm
Areia – tamanho efetivo	0,41 a 0,45 mm
Velocidade de lavagem contra corrente	70 cm.min ⁻¹
Velocidade de lavagem superficial	10 cm.min ⁻¹
Água necessária para lavagem	108 m ³

4.6.6 Correção de pH

A alcalinização na ETA de Registro é realizada com a utilização de cal hidratada, Ca(OH)₂. A função da alcalinização é corrigir o pH, alterado após a adição do cloro e do sulfato de alumínio, que são produtos de caráter ácido. A ETA não utiliza a pré-alcalinização por não se fazer necessário e a pós-alcalinização é realizada com aplicação da cal no terceiro floculador.

4.6.7 Fluoretação

A SABESP utiliza para essa etapa o ácido fluorsilícico como agente de fluoretação e mantém um residual de $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ do íon fluoreto colocado na água tratada da estação. Este teor varia de uma região a outra, de acordo com a temperatura média das máximas anuais. Para regiões mais quentes o residual determinado é menor do que em regiões mais frias, visto o consumo médio de água em lugares mais quentes ser maior.

4.6.8 Reservação e distribuição

Após a filtração, a água passa por uma unidade de mistura, denominada reservatório de contato, onde chicanas provocam um maior contato da água com o cloro (pós-cloração) e ácido fluorsilícico (fluoretação) da água filtrada. Em seguida, ocorre o armazenamento para estação elevatória de água tratada, (EEAT – ETA), num reservatório apoiado de 1.000 m^3 . A EEAT faz a adução para outros dois reservatórios elevados, apoiados e interligados de 4.500 m^3 . Os reservatórios operam conforme as pressões do sistema, podendo abastecer por gravidade ou pela EEAT – SEDE, e neste caso pressurizando a rede e gerando aproveitamento da sobra com o uso de um reservatório elevado de 500 m^3 .

4.7 Lodo de ETA

O resíduo sólido gerado nos decantadores das estações de tratamento de água é um material comumente conhecido como lodo de ETA. Só no Estado de São Paulo, o volume de lodo gerado é estimado em aproximadamente $30.000 \text{ ton.ano}^{-1}$ (Teixeira et al., 2006). A quantidade, assim como a qualidade do lodo produzido, depende das características das fontes utilizadas no abastecimento, da quantidade e tipos de coagulante e demais substâncias envolvidas no processo (Guerra, 2005).

Os coagulantes mais utilizados nas ETAs são: sulfato de alumínio, sulfato férrico, sulfato ferroso clorado e cloreto férrico. Esses compostos,

adicionados na água, em meio alcalino, reagem formando os hidróxidos de alumínio e hidróxidos de ferro. Os hidróxidos formados possuem carga superficial positiva que neutralizam as cargas negativas da matéria em suspensão, encapsulando-as dentro de uma estrutura floculenta. Normalmente, costuma-se usar também compostos polieletrólitos, que são polímeros sintéticos com alta massa molecular que produzem flocos maiores e de rápida sedimentação (Santos Filho, 1976).

4.8 Características do lodo de ETA

O lodo de ETA é considerado um fluido não-newtoniano, tixotrópico, volumoso e insolúvel. É constituído de resíduos orgânicos como substâncias húmicas, algas e bactérias e frações inorgânicas como areia, silte, argila, sulfatos, hidróxidos, óxidos e colóides, além de elementos como cálcio, ferro, magnésio, manganês e alumínio.

Nas estações de tratamento, como as de Registro, em que a água é tratada a base de sulfato de alumínio, a formação de hidróxidos faz com que o lodo de coloração marrom adquira uma forte consistência gelatinosa, tal como mostrado na FIG. 16.

(Moracci, L.F.S., 2007)

FIGURA 16: Lodo de estação de tratamento de água.

Em estudo recente, Reis (2006) apresentou a caracterização inorgânica semi-quantitativa do lodo por Espectrometria de Fluorescência de Raios X (FRX) em amostras coletadas na ETA de Registro nos meses de fevereiro e agosto de 2004, conforme apresentado na TAB 9. Os resultados indicaram que o lodo, após ser calcinado a 900°C, é composto, principalmente de sílica, alumina e ferrita, proveniente do material sedimentado e também pelo uso do sulfato de alumínio. Esses resíduos, quando dispostos mensalmente nos cursos d'água de Registro, demonstraram não causar riscos imediatos quanto à possibilidade de alteração da qualidade das amostras de água superficial quando comparados a valores estabelecidos na Resolução CONAMA nº 357. Porém, experimentos realizados em amostras de sedimento lixiviado no ponto de coleta logo após o descarte do lodo, revelaram que esses resíduos podem impactar o meio ambiente local, em longo prazo, em razão dos altos níveis de alumínio encontrado (Reis et al., 2007).

TABELA 9: Composição do lodo calcinado caracterizado por Espectrometria de Fluorescência de Raios X.

Composição Química	Concentração %	
	Fev/2004	Ago/2004
SiO ₂	31,5	32,5
Al ₂ O ₃	23,7	23,8
Fe ₂ O ₃	11,8	11,4
K ₂ O	2,6	2,7
TiO ₂	1,0	1,2
MgO	0,95	1,0
Cão	0,35	0,59
MnO	0,18	0,17
Perda ao Fogo	25,8	25,8

Fonte: Adaptado de Reis, 2006.

4.9 Remoção dos agrotóxicos em água e lodo de ETA

Conforme descrito por Hoppen et al. (2005), o resíduo sólido gerado nas estações de tratamento representa em volume somente 0,3 a 1,0% da água tratada, sendo a maior parte constituída de alumínio, ferro, silício e matéria orgânica. Os resíduos de agrotóxicos, quando presentes na água bruta, podem se

agregar a essa fração por meio de adsorção na matéria orgânica existente no mesmo. A capacidade de sorção de um composto em solo ou lodo é denominado de coeficiente de distribuição (K_d), que é definido como a razão entre a concentração adsorvida em matrizes sólidas (solo ou lodo) e a concentração adsorvida na solução após o equilíbrio (Beausse, 2004; Weber et al., 2004).

Segundo o *Office of Pesticide Programs* (OPP), (2001), órgão administrativo da Agência de Proteção Ambiental americana que revisa, aprova e classifica produtos agrotóxicos nos Estados Unidos, uma revisão preliminar da EPA indicou que o tratamento de água convencional à base de coagulação/floculação, sedimentação e filtração, tem pequeno ou nenhum efeito sobre a remoção de agrotóxicos hidrofílicos e lipofóbicos, porém fatores como desinfecção e abrandamento, que rotineiramente são aplicados em muitas estações de tratamento podem facilitar a alteração da estrutura química ou transformação dos compostos, e até mesmo sua degradação, em razão dos desinfetantes usados, tempo de contato e potencial de hidrólise alcalina de cada composto. Do mesmo modo, compostos hidrofóbicos e lipofílicos podem ser removidos com facilidade pelo tratamento convencional.

Em estudo recente, Ormad et al. (2008), pesquisaram a efetividade do tratamento de água para consumo humano na remoção de 44 agrotóxicos sistematicamente detectados na Bacia do rio Ebro, na Espanha. O grupo assumiu como critério para um tratamento eficiente a porcentagem de remoção dos compostos acima de 70% e concluiu que a pré-oxidação por ozônio combinado com adsorção de carbono ativado foi o mais eficaz alcançando em torno de 90% de remoção. A pré-oxidação com cloro obteve a média de 60% de degradação dos compostos, porém sua combinação com o processo de coagulação/floculação/decantação mostrou ser ainda mais efetivo na remoção da maioria dos agrotóxicos. Por outro lado, o processo de coagulação/floculação/decantação sozinho foi o menos eficiente e não produziu efeito na eliminação dos compostos.

Na Europa, as concentrações máximas dos agrotóxicos estabelecidas pela comunidade europeia nas águas naturais e de abastecimento são de 0,1

$\mu\text{g.L}^{-1}$ para qualquer composto individual $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a soma total dos compostos. Na Bacia do rio Ebro, local do estudo de Ormad et al. (2008), ocasionalmente, alguns compostos aparecem nas águas naturais em concentrações mais altas do que os limites estabelecidos, sendo eles: 3,4-dicloroanilina ($> 1.0 \mu\text{g.L}^{-1}$), molinato ($> 1.0 \mu\text{g.L}^{-1}$), cloropitífós ($> 0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$), atrazina ($> 0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$) e um dos seus principais metabólitos a desetilatrazina ($> 0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Por essa razão, o tratamento usado para produção de água potável deve garantir a remoção dos agrotóxicos ou, pelo menos, reduzir sua concentração abaixo dos limites estabelecidos.

No Brasil, a NBR 10004:2004 classifica o lodo de ETA como “resíduo sólido” de classe 2 (não-inerte) devendo este ser tratado conforme as exigências dos órgãos regulamentadores. A legislação brasileira atual não contempla limites máximos permitidos de traços de agrotóxicos em lodo, no entanto, os parâmetros de potabilidade da água nacionais e internacionais, representam um norte para a determinação desses compostos sendo necessárias técnicas analíticas sensíveis para essa finalidade.

5. TÉCNICA ANALÍTICA

5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC–MS/MS) é, sem dúvida, uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para a determinação de compostos orgânicos. Esta permite que compostos pré-separados sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade e sensibilidade. Os compostos presentes em matrizes complexas como fluídos biológicos, alimentos e amostras ambientais podem ser determinados livres de interferentes e com limites de detecção muito baixos, atendendo às exigências da legislação vigente sem, muitas vezes, lançar mão de procedimentos de concentração. Considerando-se configurações específicas, a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas permite desde a determinação de moléculas com baixas unidades de massas atômicas (<1000 u.m.a. ou Da) como fármacos, agrotóxicos e metabólitos até compostos biopolímeros com massas atômicas mais elevadas (>100.000 u.m.a.) (Ardrey, 2003).

Em função da capacidade de separação da cromatografia líquida e da capacidade de discriminação e monitoração de múltiplas massas da espectrometria de massas, esta técnica permite que a preparação das amostras seja rápida, podendo ser uma simples diluição. Em amostras de água, por exemplo, normalmente é necessária somente a filtração para a separação de sólidos. Isso, além de economizar tempo, reduz a quantidade de reagentes na preparação, minimizando a geração de resíduos. Outra de suas vantagens é que na cromatografia líquida, as colunas utilizadas, principalmente as de fase-reversa, resolvem 90% dos casos de separação de compostos orgânicos, cujos solventes como, metanol, acetonitrila e água, são compatíveis e essenciais para a formação dos íons nas fontes de ionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API).

fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), ionização por dessorção a *laser* assistida pela matriz (*Matrix-Assisted Laser Dessorption Ionization*, MALDI) e a ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization*, ESI) (Martins Júnior, 2005).

Os analisadores ou filtros de massa são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão m/z . No equipamento utilizado, como na maioria dos equipamentos recentes, os analisadores são do tipo quadrupolo formados por quatro hastes condutoras paralelas e eqüidistantes sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC), (*Direct Current*, DC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (Bustillos et al., 2003).

O sistema de detecção, formado por uma célula multiplicadora de elétrons, é sensível aos íons provenientes do analisador de massas. O detector irá multiplicar os elétrons arrancados da placa de colisão ao longo da sequência de placas em um gradiente de diferença de potencial (ddp), transformando a torrente de elétrons em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico é convertida em um espectro de massas onde aparecem os picos para cada íon selecionado, m/z . Esse mesmo sinal também é utilizado para a quantificação desses íons.

5.3 O *Electrospray*

O *electrospray* foi primeiramente sugerido por Dole em 1968, quando este estudava a determinação de espécies poliméricas não ionizadas em solução como o poliestireno (Dole, 1968 apud Martins Júnior, 2005). Porém, só em 1984, Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade do *electrospray* como uma fonte branda de ionização (Yamashita & Fenn, 1984 apud Martins Júnior, 2005). Essa nova concepção possibilitou que moléculas e macromoléculas orgânicas fossem determinadas sem que houvesse perda de informação estrutural, em razão da

fragmentação total ou parcial das moléculas permitindo também a determinação direta de biomoléculas polares e termolábeis sem a etapa de derivatização.

Embora seja denominado como fonte de ionização, o *electrospray* é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa (Moraes, 2003). Basicamente, o processo de *electrospray* compreende três etapas: a nebulização da amostra em gotículas eletricamente carregadas, a liberação dos íons das gotículas e o transporte dos íons da fonte à pressão atmosférica para dentro região de alto vácuo no espectrômetro de massas (Bruins, 1998). A solução é introduzida na fonte de ionização através de um tubo capilar e nebulizada com auxílio de um gás, normalmente o nitrogênio. As gotículas do *spray* formadas na ponta do tubo capilar são expostas a um campo elétrico de alta voltagem, aumentando a densidade de cargas positivas que são concentradas na superfície da gota. Com a evaporação constante do solvente, a repulsão eletrostática se torna mais forte que a tensão superficial da gota, levando à chamada “explosão coulombiana” com a formação de gotas menores ainda. Esse processo se repete até que os íons fiquem totalmente livres do solvente ou, dependendo do sistema nebulização/ionização, que essas gotículas eletricamente carregadas possam viajar para dentro de um contra-eletrodo (FIG. 18). Durante o vôo, as gotas sofrem redução de tamanho pela evaporação do solvente por meio de um gás secante à pressão atmosférica, formando os íons que posteriormente serão introduzidos no espectrômetro de massas (Bruins, 1998).

O *electrospray* se tornou a técnica de ionização mais importante em sistemas de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas, pois permitiu a formação de moléculas carregadas (íons) em pressão atmosférica e em altos fluxos, a partir de compostos polares e pouco voláteis presentes na fase líquida.

Fonte: Bustillos, 2006.

FIGURA 18: Esquema de nebulização de fonte por *Electrospray*

5.4 Espectrômetro de massas tipo *tandem*

O sistema quadrupolar utilizado no presente trabalho é do tipo MS/MS, ou seja, quadrupolos em seqüência, também conhecidos como *tandem* (FIG. 19). É constituído por um sistema triploquadrupolar formado por três quadrupolos dispostos em série. A operação de um sistema triploquadrupolo permite que os íons formados e seus fragmentos possam ser conduzidos em modos adequados para a monitoração durante a análise.

Dependendo do modo de análise, uma fragmentação inicial pode ser conduzida na região do orifício de entrada e do cone (*skimmer*) pelo mecanismo da dissociação induzida por colisão, DIC (*Collision Induced Dissociation*, CID).

Em outro modo de análise, um íon denominado íon precursor ou íon pai, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado na cela de colisão, localizada no segundo quadrupolo (Q2), por dissociação ativada por colisão, DAC, (*Collision Activated Dissociation*, CAD). A fragmentação da molécula é produzida a partir da colisão com gás nitrogênio (gás de DAC ou CAD gas). Os fragmentos gerados, denominados íons produto ou íons filho, são

selecionados pela razão m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção.

FIGURA 19: Esquema de um espectrômetro de massas *tandem* triploquadrupolo.

5.5 Resolução de massas

Os espectrômetros de massas são capazes de separar íons de diferentes razões m/z , comumente distinguindo-os por valores menores que 1,0 Dalton (Da), o que permite a discriminação entre isótopos de carbono 12 e 13, por exemplo. Íons em baixa velocidade são mais facilmente discriminados e vice-versa. Porém, íons em alta velocidade produzem sinais mais intensos. A capacidade de separação de massas é dada pela definição de resolução R , em que: $R = m/\Delta m$, sendo Δm a diferença de massa entre dois picos adjacentes que estão plenamente resolvidos e m a massa nominal do primeiro pico. Dois picos são considerados separados quando a altura do vale que os separa não for maior que 10% da altura total dos mesmos. Essa definição é conhecida como resolução a FWHM (*Full Width at Half Maximum*).

5.6 Calibração das massas

A calibração das massas é necessária para que o sistema realize medições nas massas corretas. Como qualquer equipamento, um espectrômetro de massas está sujeito a flutuações no funcionamento (flutuações eletrônicas, do

alto vácuo, por fadiga de componentes, entre outros) e devido a ciclos de inicialização e desligamento total da parte eletrônica e do vácuo. No equipamento utilizado no presente trabalho, usa-se um padrão de polipropilenoglicol (comercialmente denominado PPG) que apresenta íons com massas conhecidas na região entre 50 e 2000 u.m.a, aproximadamente. Esse intervalo de massas compreende grande parte das substâncias de interesse ambiental. A partir da informação das massas, constrói-se uma curva de calibração com o ajuste da frequência da corrente (RF) e da diferença de potencial aplicada entre os pólos (hastes). Além da calibração das massas, esse procedimento define a resolução. O ajuste é realizado para que a resolução fique na faixa de $0,7 \pm 0,1$ para a chamada unitária (*UNIT*), 1,5 para a baixa (*LOW*) e $0,5 \pm 0,1$ para a alta (*HIGH*). Na FIG. 20 é mostrado um espectro da resolução isotópica a FWHM de uma região das massas do composto PPG.

FIGURA 20: Resolução isotópica a FWHM de uma das massas do composto PPG.

5.7 Validação de metodologia analítica

Em análises químicas, gerar resultados totalmente livre de erros e incertezas é uma tarefa praticamente impossível. Em cada operação que constitui a análise química há uma incerteza associada. Cada operação ou conjunto de operações deve ser realizado de modo adequado e correto para que os resultados gerados tenham validade. É necessário que a qualidade das medições químicas seja demonstrada por meios rastreáveis e comparáveis. Isso permite que, ao final de uma análise química, os resultados possam atender, por exemplo, às exigências das regulamentações nacionais e internacionais em que pese a necessidade de valores de análises confiáveis. Dessa forma, para garantir informações seguras e confiáveis é realizada uma avaliação denominada validação de ensaio químico (ICH, 1994).

O conceito de validação é bem definido. A definição, porém, varia de autor a autor. O desenvolvimento de um novo método ou a adaptação de métodos já validados, quando bem definido e documentado, deve sempre fornecer evidências organizadas, claras e objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado.

A validação de todo e qualquer método de análise consiste em realizar uma série de testes analíticos e estudos estatísticos, comparando os resultados com critérios pré-estabelecidos. No presente estudo, o procedimento de validação foi conduzido conforme o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2003 e incluiu os seguintes parâmetros de desempenho: especificidade/seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

5.7.1 Especificidade/Seletividade

Especificidade e seletividade são parâmetros relacionados à capacidade de detecção de um composto químico específico, porém, são termos que ainda causam confusão quando usados para caracterizar um método. Especificidade ou método específico diz respeito à resposta para apenas um

composto químico e seletividade ou método seletivo diz respeito ao método que produz respostas para vários compostos químicos, mas que pode distinguir ou discriminar a resposta de um composto químico dentre um conjunto de sinais (INMETRO, 2003).

A seletividade avalia o grau de interferência que ocorre na análise de uma amostra. Assim, são consideradas as impurezas, produtos de degradação, outros ingredientes ativos, bem como compostos de propriedades similares às espécies de interesse. O conhecimento e a definição das interferências direcionam as etapas seguintes do método analítico. Normalmente, é o primeiro passo a ser dado no desenvolvimento da metodologia, cuja avaliação pode ser realizada a partir de amostras em branco com e sem adição de analitos sendo medidas para o teste de interferentes (Ribani et al., 2004; Lindholm, 2004). O resultado dessas medições deve ser tratado e avaliado em bases matemáticas.

5.7.2 Faixa linear e faixa linear de trabalho

Neste trabalho foi utilizado um método relativo para a obtenção das concentrações. Para qualquer método quantitativo, existe um intervalo de concentrações do analito ou valores de propriedade no qual o método pode ser aplicado, denominada faixa de trabalho. Na verdade, com as devidas considerações, podem existir mais de um intervalo de trabalho sem prejuízo da análise. Dentro desse intervalo, pode estar associada uma faixa de resposta linear, cuja resposta do sinal terá relação linear com o analito ou valor de propriedade (INMETRO, 2003). Nesse caso, estamos considerando um comportamento linear. Desde que conhecida a relação de proporcionalidade, o comportamento da resposta não precisa ser necessariamente linear. Porém, para facilitar os cálculos e, em determinados casos, manter as condições de análise sob condições de mais fácil controle, o trabalho em condições de resposta linear é mais recomendado.

A faixa linear de trabalho de um método é o intervalo entre duas concentrações do analito no qual, sob as condições estabelecidas para o ensaio, inclusive linearidade, é realizada a medição com precisão e exatidão. Esse

intervalo deve compreender a faixa de aplicação para o qual o ensaio vai ser realizado (efeitos toxicológicos, atendimento à legislação, condições de segurança do trabalho, impacto ambiental, entre outros). Em um estudo como este onde as concentrações de interesse e determinadas são muito baixas, deve-se estar atento e demonstrar que os valores medidos próximos ao limite inferior sejam diferentes dos valores dos brancos analisados (INMETRO, 2003).

5.7.3 Linearidade

Linearidade representa a capacidade de um método analítico de gerar sinais que sejam diretamente proporcionais à quantidade do analito em um determinado intervalo de concentração. A correlação linear entre o sinal medido e a concentração da espécie é expressa graficamente por meio da chamada curva analítica em que a abscissa representa a concentração do analito e a ordenada representa o sinal do detector. Para a construção de uma curva analítica sugere-se a utilização de no mínimo, sete valores de concentração (Barwick, 2003). Mesmo que a resposta seja linear em um amplo intervalo de concentrações, deve-se considerar a limitação entre valores mais restritos para que a curva represente um comportamento mais fiel. Em intervalos mais amplos, mesmo que os testes estatísticos indiquem uma boa correlação, muitas vezes, e por experiência profissional, sabe-se que os resultados estarão sujeitos a uma maior variação da precisão, principalmente os de menor valor.

A relação matemática utilizada para o cálculo da concentração dos analitos pode ser obtida usando o modelo conhecido como regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, e é descrita pela equação da reta $y = ax + b$, onde:

y = resposta medida ou sinal analítico (altura ou área do pico), variável dependente

x = concentração do analito, variável independente

a = inclinação da curva analítica (coeficiente angular)

b = interseção da curva com a ordenada, quando $x = 0$ (coeficiente linear)

O princípio do ajustamento linear pelo método dos mínimos quadrados é obter matematicamente uma curva em que a soma dos quadrados dos resíduos seja mínima. Esses resíduos são obtidos pela diferença entre os dados originais e a curva proposta (Pimentel & Barros Neto, 1995).

Uma vez que as medições estão sujeitas a variações, é possível realizar estimativas em relação aos pontos duvidosos, por meio do cálculo de t , utilizando a equação:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad (\text{equação 1})$$

onde:

resíduo = $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$

S_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos da curva

Para cada ponto da curva ou somente para os duvidosos, o valor de $t_{\text{calculado}}$ sendo menor ou igual ao valor de $t_{\text{unilateral}}$ com $(n - 1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto faz parte da curva, no intervalo de confiança desejado, e a faixa até ele é linear (INMETRO, 2003).

Uma boa estimativa da qualidade da curva é a avaliação do coeficiente de correlação (r^2), que quanto mais próximo do valor 1, indica menor dispersão dos valores da curva analítica em relação aos valores esperados do comportamento linear. A recomendação do INMETRO para o coeficiente de correlação é de valores acima de 0,90, já a ANVISA recomenda valores, no mínimo, superiores a 0,99 (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2003). Vale lembrar que o coeficiente de correlação indica a porcentagem de variação explicada. Para $r^2 = 0,9$ a porcentagem de variação explicada é de 90%; para $r^2 = 0,99$ será 99% e $r^2 = 0,999$ será 99,9% e assim em diante.

A escolha da regressão pelo modelo linear e a verificação do ajuste em função dos valores experimentais da curva podem ser avaliados pela análise da

variância (*Analysis Of Variance*, ANOVA). Calcula-se a porcentagem máxima de variação explicável para os dados experimentais e a porcentagem de variação explicada (r^2). A partir do teste F, verifica-se se a regressão é significativa e se há evidência de falta de ajuste ao modelo linear obtido (Barros Neto et al., 1996).

5.7.4 Limite de detecção e quantificação

Uma tradução livre da definição de limite de detecção (LD), pela *International Union Of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), é: o resultado único e simples que, associado a uma probabilidade, pode ser distinguido do valor de um branco adequado. Para fins práticos, o limite de detecção com 95% ou 99% de confiança atende à maior parte das aplicações (INMETRO, 2003). Essa informação dá uma idéia da confiabilidade em relação aos resultados falso positivo, α , ou falso negativo, β .

Em cromatografia, o ruído da linha de base pode ser utilizado para obter o limite de detecção relacionando-se com o sinal de um pico próximo. Assim, para uma abordagem mais simples, considera-se a razão sinal/ruído de 3:1, ou seja, $LD = \frac{3 \times s}{S}$, em que s é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação (*Slope*) da curva analítica.

Limite de quantificação (LQ) é considerado como a quantidade mínima de um analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Em técnicas que utilizam linha de base o LQ segue o mesmo princípio do LD, porém com a relação sinal/ruído de 10:1, ou seja, $LQ = \frac{10 \times s}{S}$. Na maioria das vezes, o LQ é determinado como sendo o ponto de menor concentração da curva analítica, excluindo-se o branco. Várias resoluções determinam também que o LQ corresponde ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão (DP).

5.7.5 Exatidão

Exatidão do método é definido como o grau de aproximação entre o resultado de um experimento e o valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

A avaliação da exatidão em métodos analíticos pode ser realizada por processos distintos como a utilização de material certificado de referência que, quando disponíveis, são os materiais de controle preferidos em razão da sua relação direta com os padrões internacionais; comparação entre métodos analíticos, que avalia o grau de proximidade dos resultados obtidos entre dois métodos; adição padrão, aplicado quando é difícil ou impossível preparar o branco matriz sem a substância de interesse e o processo mais utilizado que é o ensaio de recuperação (Brito et al., 2003; Ribani et al., 2004).

O estudo de recuperação consiste na fortificação (“*spike*”) da amostra com concentração conhecida do analito de interesse em pelo menos três níveis diferentes, sendo, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração intermediária ao intervalo estimado (INMETRO, 2003). A recuperação é calculada conforme a equação:

$$Rec \% = \left(C_1 - \frac{C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

onde:

C_1 é a concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 é a concentração determinada na amostra não adicionada;

C_3 é a concentração adicionada;

5.7.6 Precisão

Precisão é definida como a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou

padrões sob condições determinadas (INMETRO, 2003). Normalmente, a precisão é avaliada em termos de desvio-padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), conhecido como coeficiente de variação (CV), e expressa pela equação:

$$CV\% = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

onde:

$\bar{x}$ = média aritmética das medições;

s = desvio padrão das medições;

Nos processos de validação de métodos analíticos de resíduos e impurezas a taxa aceitável de DPR é de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani et al., 2004).

A interpretação dos valores de precisão pode ser medida levando-se em consideração procedimentos como a repetitividade, precisão intermediária e a reprodutibilidade.

- **Repetitividade:** representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo local, mesmo instrumento sob as mesmas condições e repetições sob curto espaço de tempo.
- **Precisão intermediária:** representa a precisão sobre a mesma amostra quando um método é aplicado várias vezes pelo mesmo laboratório, porém variando condições como analista, equipamento e tempos diferentes.
- **Reprodutibilidade:** representa a concordância entre os resultados interlaboratoriais de uma mesma amostra sob condições variadas, além do local, analista, equipamento, etc.

5.7.7 Robustez

Robustez é a capacidade de um método se manter inalterado frente às pequenas variações na execução de experimentos analíticos. Em processos cromatográficos o ensaio de robustez mede a sensibilidade do método variando-se parâmetros como pH, temperatura, concentração do solvente orgânico, natureza do gás de arraste em CG, tempo de extração, agitação, etc (Vander Heyden, 1997).

Para determinação de robustez o INMETRO sugere a aplicação do teste de *Youden* que permite avaliar a robustez do método e também ordenar a influência de cada variação no resultado final (INMETRO, 2003).

5.7.8 Incerteza de medição

Na química analítica são inúmeros os fatores que podem comprometer o resultado de uma medição. Minimizar os erros inerentes às medições por meio da declaração da estimativa de incerteza tornou-se requisito fundamental à qualidade laboratorial.

A definição de incerteza de medição, segundo o Guia Eurachem é: *“Um parâmetro associado ao resultado de uma medição, caracteriza a dispersão que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando”* (Eurachem, 2002).

O parâmetro pode ser um desvio padrão ou um múltiplo dele oriundo de várias fontes possíveis como: amostragem, efeito matriz, interferentes, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações atribuídas ao método ou à medição e variação aleatória (Eurachem, 2002).

Na estimativa da incerteza total quando o componente de incerteza é expresso como desvio padrão, ele é designado de Incerteza Padronizada - $u(x_i)$. Para o resultado de y de uma medição, que é obtido por meio de outros valores de outras grandezas, a incerteza total é denominada Incerteza Padronizada Combinada - $u_c(y)$, que é um desvio padrão estimado igual a raiz quadrada

positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza. A Incerteza Expandida – U é o componente que fornece um intervalo mais provável, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. U é obtido multiplicando-se $u_c(y)$ por um Fator de Abrangência – k , que é baseado no nível de confiança desejado, por exemplo, 2 se o nível de confiança for de 95% (Eurachem, 2002).

6. REVISÃO DA LITERATURA

Um grande número de pesquisas realizadas na área química, tem como alvo, a análise de resíduos de agrotóxicos em razão da difundida aplicação desses compostos no meio ambiente. Essa razão levou Azevedo et al. (2000) a desenvolverem um método piloto de monitoramento de 42 agrotóxicos e 33 outros poluentes orgânicos nas águas de 43 rios de Portugal utilizando as técnicas de GC–MS e LC–APCI–MS em que constataram a presença dos compostos atrazina e simazina na maioria das amostras analisadas.

Recentemente Gervais et al. (2008) desenvolveram um método multirresíduo para determinação de resíduos de agrotóxicos em água utilizando cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* e extração em fase sólida (SPE–UPLC–ESI–MS/MS). Os estudos concluíram que o método é sensível e seletivo e pode ser usado na rotina laboratorial, pois apresentou linearidade dentro do recomendado com $r > 0,9919$ e repetibilidade em 20 ng.L^{-1} com desvio padrão relativo (DPR) $< 12,6\%$ para todos os compostos. A média de recuperação dos compostos em diferentes amostras alcançou o limite de 82 a 109%.

He e Lee, (2006) analisaram resíduos de simazina, fensulfotiom, etridiazole, mepronil e bensulide em amostras de água natural utilizando microextração de fluxo contínuo (MEFC) combinada à cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC–UVVis). A técnica demonstrou compatibilidade entre o procedimento de MEFC e a separação por HPLC. Todos os compostos exibiram boa linearidade e coeficientes de determinação (R^2) entre 0,9879 e 0,9999 e limites de detecção abaixo de 4 ng.ml^{-1} .

Pozo et al. (2006), desenvolveram um método (SPE–LC–ESI–MS/MS) de 16 antibióticos em água em que obtiveram uma rápida triagem e quantificação de todos os analitos, além de recuperações adequadas entre 74 e 123% com um desvio padrão relativo (DPR) de 14%.

Em amostras de solo, Gonçalves et al. (2006) sugeriram a determinação de agrotóxicos organoclorados, organofosforados, triazínicos entre outros, baseadas na extração em fluído supercrítico (SFE) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem (GC–MS/MS). A alta sensibilidade e seletividade da técnica permitiram a detecção de compostos orgânicos persistentes e produtos de degradação, bem como, de herbicidas e inseticidas na matriz de estudo, em concentrações entre 0,1 a 3,7 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ e precisão de 4,2 e 15,7%.

Queirós et al. (2004) concluíram que a técnica LC–ESI–MS utilizada para determinação de agrotóxicos em águas de torneira e superficial é robusta e pode ser usada na rotina laboratorial.

Sánchez-Brunete et al. (2003) determinaram carbamatos como propoxur, carbofurano, oxamil, metomil, carbaril e metiocarbe em solo utilizando cromatografia líquida com detecção por fluorescência e derivatização pós-coluna e obtiveram baixos limites de detecção, boa linearidade e alta precisão da técnica.

Asperger et al. (2002) também desenvolveram uma metodologia rápida para a determinação de 11 resíduos de agrotóxicos em água potável e superficial na cidade de Leipzig, Alemanha, combinando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC–MS/MS). O método foi aplicado com sucesso garantindo recuperações adequadas de todos os compostos, além de um tempo de análise de, no máximo, 14 minutos.

A determinação de carbamatos também foi sugerida por Honing et al. (1996) em amostras de água e sedimento, em que os autores realizaram um comparativo de desempenho entre as técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por *Thermospray* (TSP) e *Ionspray* (ISP).

Em amostras de alimentos, Walorczyk (2007) desenvolveu um método multirresíduo de análise de 122 agrotóxicos em cereal e comida animal, aplicando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em

tandem (GC–MS/MS) com extração em fase sólida dispersa. Conseguiu recuperações entre 73 a 129% e coeficiente de variação entre 1 e 29% para a maioria dos compostos.

Hiemstra & Kok (2007) propuseram um método multirresíduo para detecção de 171 agrotóxicos e seus metabólitos em frutas, vegetais e cereais utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC–ESI–MS/MS) em que obtiveram recuperações entre 70–110% e DPR < 15% para todos os compostos estudados. A seletividade e robustez do método por LC–MS/MS foram demonstradas, durante o período de um ano, pela comparação de resultados com métodos convencionais GC e LC já validados, aplicados em mais de 3500 amostras.

Hernández et al. (2006) sugeriram um método multirresíduo para determinação de 43 compostos agrotóxicos e 9 metabólitos em frutas e vegetais usando LC–ESI–MS/MS, obtendo exatidão e precisão satisfatórias para a maioria dos analitos analisados.

Soler et al. (2004) sugeriram o desenvolvimento de um método multirresíduo em amostras de frutas para determinação dos agrotóxicos acrinatrina, carbosulfano, ciproconazol, alfa-cialotrina, propanil, piriproxifem, pirifenoxi, cresoxim metílico e tebufenpirade utilizando LC–ESI–MS/MS *ion trap*. A utilidade do método foi demonstrada pela análise de extratos naturais obtidos pela dispersão da matriz em fase sólida usando C₁₈ como dispersante e diclorometano-metanol como eluente e pela extração sólido-líquido com acetato de etila e sulfato de sódio anidro.

Normalmente, após todo processo de desenvolvimento de uma metodologia analítica, é realizada etapa da validação que é considerada uma das mais importantes para que se possa demonstrar a qualidade dos dados gerados. Como se pode observar, a cromatografia é a técnica mais utilizada nas análises de resíduos de agrotóxicos. Recentemente, com o surgimento de sistemas de detecção mais sensíveis, como a espectrometria de massas, por exemplo, aumentaram drasticamente os estudos envolvendo os compostos orgânicos

agrotóxicos, tanto na área ambiental, como em outros ramos da química. É possível desenvolver e validar métodos em diversas matrizes e em pouquíssimo tempo, obtendo resultados satisfatórios, conforme exigidos pela legislação e órgãos oficiais de regulamentação.

Beceiro-González et al. (2007) desenvolveram um método rápido, simples e sensível para análise simultânea de 46 agrotóxicos em água utilizando a técnica de microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction* – SPME) e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC–MS). O método foi validado para 29 compostos e seguiu a recomendação da norma ISO/MEC 17025 incluindo cálculo de incerteza. Os resultados mostraram que o método é apropriado para a rotina de controle de qualidade de agrotóxicos em água potável e superficial, exceto para os compostos EPTA, diazinom e fonofós.

Utilizando amostras alimentícias, Banerjee et al. (2007) validaram e estimaram a incerteza de um método multirresíduo para 82 agrotóxicos em uvas aplicando a técnica de (LC–MS/MS). Além da precisão e exatidão satisfatórias em níveis tão baixo quanto $2,5 \text{ ng.g}^{-1}$, as recuperações atingiram os limites de 70 a 120% abaixo do nível de 10 ng.g^{-1} .

Botitsi et al. (2007), também em estudo realizado recentemente utilizando LC–ESI–MS/MS, propuseram e validaram um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em matrizes alimentares que cumpriu todos os critérios estabelecidos de seletividade, sensibilidade e identificação dos compostos impostos pela legislação.

Pirard et al. (2007) validaram um método de determinação de agrotóxicos em mel utilizando extração líquido–líquido *on-column* usando como suporte sólido inerte terras diatomáceas e analisando em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas operada em modo MS/MS. A validação seguiu a decisão da Comissão Européia 2002/657/EC dedicada a resíduos em animais e produtos derivados. Parâmetros como especificidade, reprodutibilidade,

curvas de calibração, exatidão, sensibilidade e robustez foram realizadas e demonstraram a confiabilidade do método para os compostos selecionados.

Pang et al. (2006) desenvolveram um estudo de validação de 660 resíduos de agrotóxicos em tecidos de animais como carne de vaca, carneiro, porco, galinha e coelho, utilizando cromatografia por permeação em gel (CPG), GC/MS e LC–MS/MS.

Ronning et al. (2006) sugeriram o desenvolvimento e validação de um método simples e rápido baseados na diretiva europeia 2002/657/EC para determinação e confirmação de resíduos de cloranfenicol em amostras de alimentos como ovo, carne, mel, frutos do mar e leite, bem como amostras de urina e plasma. O estudo utilizou a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC–MS/MS). Na validação, foram avaliados os parâmetros $CC\alpha$ (Limite de decisão) e a $CC\beta$ (Capabilidade de detecção).

Em amostras biológicas, Tan & Mohd, (2003) analisaram e validaram um total de sete agrotóxicos e oito alquilfenóis em sangue de cordão umbilical utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC–MS) e conseguiram, para a maioria dos compostos, recuperações entre 65 e 120% e coeficientes de variação (CV) abaixo de 15%.

A determinação de fármacos em amostras ambientais como também em estudos de bioequivalência, tem sido cada vez mais explorada, em razão das facilidades de se utilizar as técnicas analíticas de ultima geração. Van de Steene & Lambert, (2008) validaram um método para determinação de nove produtos farmacêuticos em afluentes, efluentes e águas superficiais utilizando a técnica de SPE–LC–ESI–MS/MS. O método apresentou resultados adequados de precisão e exatidão e recuperações entre 60 e 100%.

Paralelo aos processos de validação, também são realizados inúmeros estudos específicos e mais detalhados de parâmetros como, exatidão, precisão,

robustez, ensaios de recuperação, que visam proporcionar aos leitores um entendimento melhor dos conceitos que os determinam.

Dejaegher & Vander Heyden (2007) discutiram definições sobre a robustez da metodologia analítica desenvolvida em análise de fármacos aplicados em métodos de ensaio de técnicas como cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC), cromatografia gasosa (CG), cromatografia de fluido super crítico (CFS) e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC).

Ribani et al. (2007) avaliaram os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) na quantificação do omeprazole e suas impurezas seguindo as recomendações sugeridas dos guias oficiais de quantificação e concluíram que os cálculos de LD e LQ em análises cromatográficas e correlatas são mais confiáveis metrologicamente quando baseadas nos parâmetros da curva analítica.

Brito et al. (2002) evidenciaram que os ensaios de recuperação são adequados para avaliação dos critérios de exatidão e precisão de um método desenvolvido para análise de resíduos de agrotóxicos, utilizando, para esse estudo, amostras de solo e água de coco.

Na literatura, a disponibilidade de estudos analíticos envolvendo compostos orgânicos em matrizes como o lodo gerado em sistemas de tratamento de água (ETA) ainda é bastante reduzido, entretanto, a caracterização do material há muito já é conhecida e vários artigos citam a utilização do lodo como matéria prima em ramos industriais específicos.

Teixeira et al. (2006) realizaram a caracterização física, química e mineralógica em lodo de ETA com a finalidade de avaliar a possibilidade de incorporação desse resíduo em massa cerâmica para produção de tijolos. Os resultados indicaram que, apesar da incorporação do lodo piorar as propriedades físicas e tecnológicas do material cerâmico, ele pode ser adicionado à massa cerâmica para produção de tijolos e telhas dependendo da temperatura de queima e da concentração da mistura.

Hoppen et al. (2005) propuseram a co-disposição do lodo, ainda úmido, em matrizes de concreto e concluíram que os traços de concreto com até 5% de lodo podem ser aplicados na fabricação de artefatos, blocos e peças de concreto até a construção de pavimentos em concreto de cimento Portland. Para teores acima deste a aplicação restringe-se a contrapisos, blocos e placas de vedação, peças decorativas, calçadas e pavimentos residenciais, entre outras.

Teixeira et al. (2005), em nota científica, avaliaram o efeito da aplicação do lodo de ETA nos teores de macronutrientes, carbono orgânico total e condutividade eletrolítica em amostras de solo degradado pela mineração da cassiterita e concluíram que o material pode ser disposto em áreas degradadas, já que este eleva os teores de cálcio, magnésio, potássio e o valor do pH do solo.

Oliveira et al. (2004) sugeriram o aproveitamento do lodo de ETA gerado em estações de tratamento da região de Campos dos Goytacazes no RJ como matéria prima na indústria de cerâmica vermelha. O resíduo constituído principalmente de SiO_2 , Al_2O_3 e Fe_2O_3 , possui grande potencial para ser usado na indústria de cerâmica, no entanto, devido o alto valor no limite de plasticidade recomenda-se que seja usado somente como constituinte de formulações argilosas adicionado em quantidades adequadas.

Portella et al. (2003) fizeram a caracterização físico-químico do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna em Curitiba utilizando nas análises difração de raios X (DRX), análise química por fluorescência de raios X e espectrofotometria de absorção atômica e concluíram que os elementos predominantes são o alumínio (20,8%), ferro (7,6%) e silício (12,75%).

Atualmente, é possível observar que as técnicas analíticas mais avançadas podem ser usadas também em trabalhos utilizando lodo gerado em tratamento de esgoto. Eichhorn et al. (2005) desenvolveram um procedimento para determinação de alquilbenzenos sulfonados e seus metabólitos utilizando a técnica LC-ESI-MS/MS em lodo de esgoto conjugado com solo agrícola. A técnica mostrou-se ser uma poderosa ferramenta na determinação de níveis traço dos respectivos compostos.

Schröder (2003) elaborou uma metodologia de extração e determinação de surfactantes fluorados aniônicos e não aniônicos e seus metabólitos em lodo de esgoto. Os compostos foram analisados por LC–MS utilizando ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química por pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI) após extração por Soxhlet, extração por vapor quente e extração líquida pressurizada usando amostras fortificadas. As recuperações alcançadas ficaram entre 105 e 120%.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Materiais e métodos

- Espectrômetro de massas com triploquadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (LC–ESI–MS/MS), API 5000, *Applied Biosystems* /MDS Sciex, Canadá;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent 1100 *Series* com bomba quaternária e desgaseificador automático, USA;
- Coluna cromatográfica Varian Metasil ODS – C18 15 cm x 4,6 mm x 3 µm MetaChem;
- Material e equipamento básico de laboratório químico;

7.2 Soluções e reagentes

Os padrões de atrazina, simazina, azoxistrobina, propoxur e carbofurano utilizados no presente trabalho foram de procedência da *Riedel-de Haen*, (*Seelze, Germany*) e os solventes acetonitrila (ACN), e metanol (MeOH), (grau HPLC) da J.T.Baker (USA). As soluções dos agrotóxicos foram preparadas com ACN:H₂O na proporção 1:1 e acondicionadas em tubos de polipropileno de 15 mL sendo posteriormente revestidos com papel alumínio e mantidos em temperatura de 4°C. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada em um sistema *EasyPure RF System* (Barnstead, Dubuque, IA, EUA) e acetato de amônio P.A. (J.T. Baker, USA) utilizado como aditivo na fase móvel.

7.3 Amostragem

O processo de coleta das amostras foi realizado em um dos decantadores da estação de tratamento da água, denominado Decantador 1. Dividiu-se a área do tanque em oito quadrantes semelhantes e coletou-se uma fração representativa do lodo de cada divisão em potes de vidro de 2 L, os quais foram protegidos da luz e mantidas em banho de gelo até armazenamento no laboratório. No momento da coleta, o lodo tem aspecto físico gelatinoso uniforme e homogêneo, de coloração marrom acastanhado e facilmente coletável. Após a coleta, se mantido imóvel, o lodo tende a decantar e formar duas fases.

7.4 Preparo das amostras

As amostras de água e lodo “*in natura*” foram preparadas e fortificadas em tubos de centrífuga de polipropileno (PP), de 50 mL, sendo posteriormente separado o sobrenadante do material sólido por centrifugação.

O estudo de recuperação foi realizado utilizando dois níveis de concentração denominados baixo e alto, cujos valores não são iguais para todos os compostos. Foram realizadas extrações sólido-líquido (*Solid Liquid Extraction*, SLE) utilizando uma mistura extratora contendo MeOH:H₂O, 80/20 v/v. Os analitos foram extraídos utilizando 20 mL e 40 mL dessa mistura extratora para os níveis baixo e alto, respectivamente. Após a extração, as amostras foram filtradas com membranas de 0,45 µm (Millex[®], Millipore, Bedford, MA, EUA) e injetadas no sistema LC–MS/MS. A seguir, os passos do processo são descritos e indicados na FIG. 21.

Para os demais parâmetros do processo de validação, o procedimento de avaliação realizou-se adicionando padrão na matriz e no solvente puro, em cada nível de concentração de interesse.

Procedimento

- Inicialmente, as amostras de lodo foram deixadas descansar no próprio frasco de 2L por, no mínimo 24 horas, sendo o sobrenadante descartado. Esta etapa se faz necessário, pois o lodo recém coletado apresenta muita água.
- Retirou-se 45 mL de lodo transferindo para um tubo de centrifuga de 50 mL (triplicata). Uma amostra em branco consistindo somente dos reagentes utilizados, sem a matriz, foi preparada em paralelo para acompanhamento.
- Fortificaram-se as amostras com 135 μL e 270 μL para os níveis de recuperação baixo e alto, respectivamente, a partir de solução padrão nas concentrações de 25 ng.mL^{-1} para os compostos azoxistrobina, carbofurano e propoxur e 500 ng.mL^{-1} para atrazina e simazina;
- As amostras foram homogeneizadas durante 5 minutos e centrifugadas durante 10 minutos em 3000 rpm;
- O sobrenadante foi separado e analisado;
- Do lodo decantado pela centrifugação, coletou-se cerca de 5g transferindo para um tubo de centrifuga de 50 mL;
- A extração foi realizada em duas etapas com agitação de 10 minutos cada. Para os níveis baixo e alto adicionou-se às amostras 20 e 40 mL da mistura extratora ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:20 v/v), respectivamente, a cada etapa;
- Centrifugaram-se as amostras por 10 minutos em 3000 rpm;
- Do sobrenadante, coletaram-se alíquotas para análise em LC–ESI–MS/MS. As soluções foram filtradas antes da injeção.

FIGURA 21: Fluxograma das etapas de preparação das amostras de lodo para análise de agrotóxicos por LC-ESI-MS/MS.

7.5 Separação cromatográfica

A eluição dos compostos foi realizada em modo isocrático com fluxo de $1000 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, utilizando-se como fase móvel uma solução aquosa como fase A e uma solução de acetonitrila como fase B, ambas contendo $5 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$ de uma solução de acetato de amônio como aditivo. Na TAB. 10 encontram-se as condições de eluição dos compostos.

TABELA 10: Programação isocrática de eluição por cromatografia líquida.

Tempo (minuto)	Fase A (%)	Fase B (%)
3,00	40	60
1,00	40	60
5,00	40	60

7.6 Parâmetros e otimização do espectrômetro de massas

A caracterização dos compostos foi realizada em modo positivo, MS (Q1 Scan), e MS/MS (*Product Ion Scan* e *Precursor Ion Scan*), respectivamente. Utilizou-se o sistema *Multiple Reaction Monitoring*, MRM, para as análises quantitativas após a otimização dos parâmetros dos analitos como: Potencial do Orifício (*Declustering Potential*, DP), Energia de Colisão (*Collision Energy*, CE) e Potencial da Cella de Colisão (*Collision Exit Potential*, CXP).

TABELA 11: Parâmetros otimizados em modo MRM para análise de agrotóxicos.

Analito	ESI	Transição ^a m/z	Propósito	Dwell Time (ms)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Atrazina	+	216/132	C ^b	100	36	35	21
	+	216/174	Q ^c	100	36	25	30
Azoxistrobina	+	404/344	C	100	106	35	46
	+	404/372	Q	100	106	21	26
Carbofurano	+	222/123	C	100	66	31	22
	+	222/165	Q	100	66	17	28
Propoxur	+	210/168	C	100	56	23	10
	+	210/111	Q	100	56	23	28
Simazina	+	202/104	C	100	36	33	8
	+	202/132	Q	100	36	27	22

a- Precursor/produto; b- C=confirmação; c- Q=quantificação

Foram otimizados também os parâmetros da fonte de ionização, como: gás nebulizante (GS1) e gás secante (GS2), a voltagem na ponta do capilar (IS) e os gases nitrogênio de colisão (*Collisionally Activated Dissociation*, CAD Gas[®]) e

dessolvatação (*Curtain Gas*[®], CUR). Nas TAB. 11 e 12 são apresentados os resultados da otimização dos parâmetros usados nas análises dos agrotóxicos.

TABELA 12: Parâmetros otimizados da fonte de ionização por ESI e do gás de colisão.

Parâmetro	ESI (+)
Voltagem do capilar (<i>IonSpray Voltage</i> , IS), V	5000
Cortina de Gás (<i>Curtain Gas</i> [®] , CUR), psi	15
Gás Nebulizante (GS1), psi	50
Gás Secante (GS2), psi	40
Temperatura (TEM), °C	700
Gás de Colisão (CAD <i>Gas</i> [®]), u.a.	7

7.7 Validação da análise química

O procedimento de validação da análise foi baseado nas orientações do INMETRO, (INMETRO, 2003), e da Comunidade Européia (Directiva da CE, 2002). Como esses documentos são orientativos, diversos testes estatísticos foram baseados em publicações com finalidade semelhante. Segundo esses dois documentos, para a validação de uma análise química não há necessidade que o desempenho seja avaliado em todos os parâmetros mencionados. Baseando-se, então, nessas recomendações, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Em cada um desses parâmetros foram realizadas uma série de experimentos em número estatisticamente significativo ($n = 7$). A fundamentação teórica de cada teste não é discutida neste texto, podendo ser consultada nas referências apresentadas. Sempre que necessário, a apresentação dos resultados poderá ser acompanhada de um rápido esclarecimento teórico para tornar mais direta a discussão.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Validação da análise química

8.1.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em diversas etapas. A primeira etapa consistiu no registro do espectro de massas dos compostos e a identificação dos íons precursores e produtos. Como exemplo, na FIG. 22 pode ser observado o espectro de massas do carbofurano. Observa-se que, além dos íons do composto, outros íons (compostos) estão presentes como impurezas.

FIGURA 22: Espectro de massas do carbofurano. O íon precursor aparece na m/z 222. O íon produto de quantificação aparece na m/z 165,0 e o íon de confirmação aparece na m/z 123,0.

Em uma segunda etapa, a corrida cromatográfica é otimizada para a separação dos compostos presentes na solução. Nesta etapa, além dos compostos de interesse, é necessária também a separação desses compostos dos demais presentes como impurezas. Na prática, nem sempre se consegue uma separação adequada dos compostos, podendo ocorrer desde sobreposição total ou parcial, supressão de sinal e até mesmo uma boa separação, porém com tempos de retenção impraticáveis. Assim, com o acoplamento com o espectrômetro de massas é possível resolver esse inconveniente com a seleção de massas características adequadas para a análise (FIG. 23). Após essas etapas, o comportamento de soluções em concentrações e meios diferentes é avaliado por meio da curva analítica.

FIGURA 23: Cromatograma da solução multirresíduos (500 ng.L⁻¹ de cada composto). Propoxur TR = 2,3; Carbofurano TR = 2,3; Simazina TR = 2,4; Atrazina TR = 2,9; Azoxistrobina TR = 3,4. TR é o tempo de retenção da corrida cromatográfica em minutos.

O resultado do teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias nas medidas de adição padrão em dois grupos de soluções, sendo um somente com os solventes e o outro com a matriz é apresentado na TAB.13. Para $n = 7$ e 95 % de confiança, os resultados foram comparados com o valor crítico $F_{6,6, 95\%} = 4,28$ mostrando que para os compostos estudados existem alguns pontos que não passam no teste. Porém, essa situação pode ser explicada, já que a variância no primeiro grupo é muito grande devido às flutuações das medidas. Mesmo assim, pode-se afirmar que a matriz não interfere consistentemente na precisão das medidas considerando o intervalo de concentrações deste estudo.

Utilizando o teste de Grubbs avaliaram-se os valores das áreas das 7 replicatas quanto a resultados discrepantes, o qual permitiu a detecção e rejeição de um dos valores do composto atrazina devido ao $G_{\text{calculado}} = 2,22$ exceder o $G_{\text{crítico}} = 2,02$. Outros compostos apresentaram alguns valores pouco acima do valor $G_{7, 95\%}$ crítico, porém não foram significantes a ponto de comprometerem o estudo dos parâmetros.

No caso do teste t, a significância das diferenças das médias dos dois grupos de soluções é comparada com o valor crítico $t_{12, 95\%} = 2,179$. Para valores abaixo desse valor crítico, considera-se que as médias não apresentam diferenças significativas. Em relação aos compostos estudados, os testes indicaram existir diferenças entre as condições (adição no solvente e adição na matriz) para a maior parte das concentrações avaliadas. Esse resultado indica que resultados obtidos contra uma curva analítica preparada somente com os solventes serão diferentes se obtidos contra uma curva preparada com uma matriz igual ou semelhante à amostra. Na prática, na inexistência de padrões ou materiais certificados com essa matriz, as determinações poderão ser realizadas a partir de procedimentos de adição–padrão ou mesmo com curva analítica em matriz sintética caso sejam aceitáveis para a aplicação às diferenças obtidas.

TABELA 13: Dados para o teste de seletividade (teste F, $n = 7$) da azoxistrobina, simazina, propoxur, atrazina e carbofurano. Adição de padrão na matriz e no solvente somente. Tabela completa somente para a azoxistrobina. Para os demais compostos, somente os valores calculados.

Azoxistrobina								
Adição na matriz								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
repetição 1	10800	23600	43200	88600	171000	219000	266000	515000
repetição 2	11500	22500	43100	99100	178000	225000	267000	528000
repetição 3	11300	23800	44000	105000	179000	226000	276000	529000
repetição 4	11800	23300	44400	107000	170000	227000	273000	533000
repetição 5	10900	23200	44500	117000	174000	228000	270000	516000
repetição 6	10500	24300	41500	113000	176000	222000	270000	520000
repetição 7	11300	23200	42100	112000	172000	225000	274000	521000
s ²	199524	318095	1309524	93059524	12238095	9619048	13476190	47809524
Adição no solvente								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
repetição 1	10600	25100	48500	105000	154000	164000	251000	481000
repetição 2	10500	24600	49600	106000	157000	171000	249000	486000
repetição 3	11100	25500	51500	108000	155000	166000	246000	480000
repetição 4	11000	26100	48900	107000	153000	166000	254000	479000
repetição 5	11000	26300	50100	108000	158000	166000	245000	493000
repetição 6	11300	25500	49300	104000	155000	173000	249000	471000
repetição 7	11000	25000	50000	104000	157000	170000	242000	495000
s ²	79048	366190	956667	3000000	3285714	11000000	16000000	70619048
F_{calculado}	2,52	1,15	1,37	31,02	3,72	1,14	1,19	1,48
t_{calculado}	1,15	6,49	11,32	0,01	12,57	32,96	11,14	9,62

Cont. TABELA 13

Simazina								
Adição na matriz								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	26590	51890	125600	310000	908095	2199048	1286667	9036190
Adição no solvente								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	89014	70300	39524	822381	712857	1542857	634762	1972857
F_{calculado}	3,35	1,35	3,18	2,65	1,27	1,43	2,03	4,58
t_{calculado}	1,78	5,47	12,16	8,13	11,28	3,67	11,67	6,06

Propoxur								
Adição na matriz								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	76957	41714	86700	159048	636190	1516667	658095	1636190
Adição no solvente								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	15329	95057	71257	526667	162857	1192381	921429	2119048
F_{calculado}	5,02	2,28	1,22	3,31	3,91	1,27	1,40	1,30
t_{calculado}	0,46	0,39	0,11	3,42	4,10	7,44	2,32	0,29

Cont.TABELA 13

Atrazina								
Adição na matriz								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	238181	231962	326667	2024762	3973333	1129048	2702857	5904762
Adição no solvente								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	262695	252324	163333	466190	1205714	1142857	962381	4238095
F_{calculado}	1,10	1,09	2,00	4,34	3,30	1,01	2,81	1,39
t_{calculado}	4,32	4,48	4,35	4,45	7,76	1,43	14,81	8,78

Carbofurano								
Adição na matriz								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	57024	40533	72381	532381	1916190	2579048	2681429	14904762
Adição no solvente								
Concentração, ng.L ⁻¹								
	10	25	50	100	150	200	250	500
s²	131581	240662	405714	215714	798095	876190	2029048	3142857
F_{calculado}	2,31	5,94	5,61	2,47	2,40	2,94	1,32	4,74
t_{calculado}	2,23	0,82	2,30	4,41	8,12	12,83	0,38	2,40

A análise da FIG. 24 nos mostra que as inclinações das curvas da azoxistrobina resultantes da condição com matriz e somente com solvente são diferentes. A TAB. 14 apresenta as concentrações hipotéticas decorrentes dessas duas curvas. Em situações extremas ou controladas poderia ser aceito a

utilização de qualquer uma das curvas para a quantificação (análises prospectivas, de avaliação de tendência, em concentrações muito abaixo de concentrações críticas, entre outras). Porém, é necessário que se mantenha registro dessas observações para não incorrer em desvio da interpretação da situação real (falso positivo e falso negativo).

FIGURA 24: Retas de regressão linear para o composto azoxistrobina. Com adição na matriz ($y = 1059x + 1867,4$) e adição somente no solvente ($y = 958,18x + 1994,2$).

TABELA 14: Comparação entre as concentrações da azoxistrobina obtidas pelas curvas analíticas com matriz e somente com solvente.

	Com matriz	Sem matriz	
Área, y	$y = 1059,7x + 1867,4$	$y = 958,2x + 1994,2$	Diferença
Concentração, ng.L ⁻¹			
10.000	7,7	8,3	0,7
20.000	17,1	18,8	1,7
40.000	36,0	39,7	3,7
100.000	92,6	102,3	9,7
200.000	187,0	206,6	19,7

8.1.2 Linearidade

A linearidade da curva analítica ou de adição padrão é demonstrada por meio do coeficiente de correlação (r^2), do gráfico dos resíduos, da análise dos resíduos (teste t) e da análise de variância (ANOVA).

Para todos os compostos em estudo, a linearidade na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.L⁻¹ é apresentada na FIG. 25 e na TAB. 15. Como pode ser observado nas figuras mencionadas, os pontos das 8 diferentes soluções se comportam quase que como uma reta. Os coeficientes de correlação calculados pelo Excel (*Microsoft*) para azoxistrobina, simazina, propoxur, atrazina e carbofurano são 0,997; 0,999; 0,999; 0,999 e 0,999, respectivamente, o que representa uma excelente linearidade considerando-se que o intervalo de concentração comporta duas ordens de grandeza.

FIGURA 25: Linearidade para os compostos azoxistrobina (404/372), simazina (202/132,1), propoxur (210/111,2), atrazina (216/174,1) e carbofurano (222,1/165,2) com matriz. Intervalo de concentração: 10 a 500 ng.L⁻¹.

A análise dos resíduos a partir do teste t de *Student* é apresentada na TAB. 15. Os valores para cada composto mostram que vários pontos estão acima do valor crítico que é de 2,365 com 95% de confiança, ou seja, não poderiam ser considerados como pertencentes à reta de regressão. Mesmo que esses indicadores sejam obtidos a partir de testes estatísticos, pela experiência na técnica não podemos considerar que estes pontos não possam ser utilizados para a quantificação dos compostos em questão. O INMETRO (INMETRO, 2003), por exemplo, recomenda que r^2 deva ser superior a 0,90, pois considera uma condição em que a quantificação já seja possível.

TABELA 15: Teste de verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva sendo o valor crítico para $n = 7$ de 2,365 com 95% de confiança.

Padrão, ng.L ⁻¹	t _{calculado}				
	Azoxistrobina	Simazina	Propoxur	Atrazina	Carbofurano
10	1,790	0,550	2,185	3,270	3,021
25	0,831	0,593	1,808	2,117	2,254
50	2,248	2,055	1,184	1,316	1,345
100	1,131	3,597	0,164	1,415	1,254
150	1,544	0,552	1,301	2,988	2,944
200	4,604	4,542	2,926	3,238	2,896
250	3,256	3,183	4,780	2,466	3,022
500	3,405	2,668	3,665	3,405	3,496

Os gráficos apresentados nas FIG. 26, 27, 28, 29 e 30 mostram a distribuição espacial dos resíduos absolutos em função da concentração e em função da probabilidade normalizada de cada resíduo (todas as 56 soluções = 8 padrões x 7 replicatas).

FIGURA 26: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto azoxistrobina na transição 404/372, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 1058x + 2121$ na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L^{-1} .

Em quase todos os gráficos, observa-se que há um certo padrão na distribuição dos resíduos. Para as concentrações menores que 100 ng.L^{-1} , os resíduos tendem a apresentar valores negativos. De 100 a 250 ng.L^{-1} , os resíduos tendem a apresentar valores positivos. Isso poderia representar dois comportamentos distintos para essa faixa de concentração, levando a pensar em separar em duas faixas com comportamento linear distinto. A distribuição negativa para o último ponto corroboraria essa conclusão. Porém, o gráfico dos resíduos versus a probabilidade normal, apresenta uma distribuição que se aproxima muito

de uma reta, sem grandes tendências que prejudiquem o comportamento linear. Além disso, a maior parte dos pontos está distribuída no intervalo de probabilidade de -2 a +2 o que significa dentro de $\pm 2s$ (dois desvios padrão, ou seja, com 95% de confiança). A FIG. 26 faz um comparativo entre o gráfico de resíduos, a curva analítica com valor médio e a curva analítica com valores individuais de cada medida das replicatas (azoxistrobina, somente).

FIGURA 27: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto simazina na transição 202/132,1, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 166,03x + 242,8$ na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.L^{-1} .

FIGURA 28: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto propoxur na transição 210/111,2, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 121,95x + 451,43$ na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.L^{-1} .

FIGURA 29: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto atrazina na transição 216/174,1, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 253,14x + 1735,1$ na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L^{-1} .

FIGURA 30: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para o composto carbofurano na transição 222/165,2, adicionado na matriz, ajustado para o modelo linear $y = 225,27x + 88,112$ na faixa de concentração entre 10 e 250 ng.L^{-1} .

Os resultados de ANOVA apresentados nas TAB. 16, 17, 18, 19 e 20 para os compostos indicam que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados, representados pelas equações da reta ($y = ax+b$) nas respectivas tabelas. O teste F mostra que a regressão aplicada é significativa ($F_{\text{calculado}} = 4578, 13722, 14978, 9852 \text{ e } 14058 > F_{1,14,95\% \text{ tabelado}} = 4,60$). A porcentagem de variação explicada calculada pela tabela ANOVA é uma outra forma de se avaliar como o modelo linear obtido se ajusta aos dados.

O teste F para o ajuste indica uma falta de ajuste para o composto azoxistrobina ($F_{\text{calculado}} = 11,78 > F_{6,8,95\% \text{ tabelado}} = 3,58$). Esses dados indicam uma certa dispersão dos pontos, porém, pela porcentagem explicada (99,70%

explicada em 99,97% explicável), essa dispersão não compromete o ajuste aplicado e o uso da curva. A tabela de ANOVA permite observar que essa falta de ajuste não é significativa, pois as porcentagens máximas explicadas estão próximas das porcentagens máximas explicáveis para todos os compostos. O fator erro puro (EP) que está associado aos erros aleatórios, representa uma fração muito pequena em relação à soma quadrática total (SQT). Isso significa que as características dos dados avaliados permitem que se possa explicar uma porcentagem muito grande (quase 100%) do comportamento inerente aos dados.

TABELA 16: Análise de variância (ANOVA) para a azoxistrobina na transição 404/372, na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 250 ng.L⁻¹. Modelo linear adotado $y = 1058x + 2121$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	407.424.724.430	1	407.424.724.430	
Resíduos	1.245.908.292	14	88.993.449	4578
Falta de Ajuste	1.119.208.828	6	186.534.805	
Erro Puro	126.699.464	8	15.837.433	11,78
Total	408.670.632.722	15		
% de variação explicada	99,70		F _{1,14,95%}	4,6
% máxima de variação explicável	99,97		F _{6,8,95%}	3,58

TABELA 17: Análise de variância (ANOVA) para a simazina na transição 202/132,1, na matriz. Modelo linear adotado $y = 166,03x + 242,8$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	10079657487	1	10079657487	
Resíduos	10283921	14	734566	13722
Falta de Ajuste	4678273	6	779712	
Erro Puro	5605648	8	700706	1,11
Total	10089941408	15		
% de variação explicada	99,90		F _{1,14,95%}	4,6
% máxima de variação explicável	99,94		F _{6,8,95%}	3,58

TABELA 18: Análise de variância (ANOVA) para o propoxur na transição 210/111,2, na matriz. Modelo linear adotado $y = 121,95x + 451,43$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	5428259821	1	5428259821	
Resíduos	5073664	14	362405	14978
Falta de Ajuste	3435080	6	572513	
Erro Puro	1638584	8	204823	2,80
Total	5433333485	15		
% de variação explicada	99,91		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,97		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 19: Análise de variância (ANOVA) para a atrazina na transição 216/174,1, na matriz. Modelo linear adotado $y = 253,14x + 1735,1$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	23305023422	1	23305023422	
Resíduos	33116285	14	2365449	9852
Falta de Ajuste	22123718	6	3687286	
Erro Puro	10992567	8	1374071	2,68
Total	23338139707	15		
% de variação explicada	99,86		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,95		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 20: Análise de variância (ANOVA) para o carbofurano na transição 222,1/165,2, na matriz. Modelo linear adotado $y = 225,27x + 88,112$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	18540260749	1	18540260749	
Resíduos	18464180	14	1318870	14058
Falta de Ajuste	10919760	6	1819960	
Erro Puro	7544420	8	943052	1,93
Total	18558724928	15		
% de variação explicada	99,90		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,96		$F_{6,8,95\%}$	3,58

8.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Com exceção do carbofurano, não foi possível calcular o LD (TAB. 21) para os compostos uma vez que os sinais dos brancos eram muito baixos e com frequência não apresentavam sinal de medição. Apesar dos diferentes conceitos relacionados a este parâmetro (INMETRO, 2003), a falta dessa informação para este trabalho não é considerada significativa. Dessa forma, o LD de 1 ng.L^{-1} para o carbofurano é meramente ilustrativa.

No presente trabalho, a partir da experiência obtida com o método e do desempenho do instrumento, o LQ para cada composto na matriz estudada corresponde ao ponto de menor concentração da curva analítica que é de 10 ng.L^{-1} . Os cromatogramas e suas respectivas razões sinal/ruído das FIG. 31, 32, 33, 34 e 35 indicam que, para alguns compostos, o LQ poderia ser menor do que o valor adotado. Os valores calculados pela multiplicação do desvio padrão do Branco por 10 (INMETRO, 2003), conforme TAB. 21, e os valores do ponto de menor concentração estão na mesma ordem de grandeza, sendo o menor ponto da curva, superior ao calculado. Na prática, obtém-se uma maior segurança na quantificação sem deixar de aproveitar do desempenho do instrumento. Além disso, não há o comprometimento da análise em relação às concentrações de referência, uma vez que na legislação brasileira ou nas internacionais, quando necessárias, os valores são muito superiores ao LQ de 10 ng.L^{-1} .

TABELA 21: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação calculado (LQ_{calc}) e Limite de Quantificação adotado (LQ_{adot}) para os compostos estudados. Número de replicatas do Branco, $n = 7$.

Composto	Limite de Detecção, LD, ($t_{6,95\%}$) ng.L^{-1}	Limite de Quantificação Calculado, LQ_{calc} . ng.L^{-1}	Limite de Quantificação Adotado, ng.L^{-1}
Azoxistrobina	a	a	10
Simazina	a	6	10
Propoxur	a	9	10
Atrazina	a	4	10
Carbofurano	1	4	10

a – Não foi possível calcular, pois os sinais dos Brancos eram muito baixos.

FIGURA 31: Cromatograma da atrazina na concentração de 25 ng.L⁻¹.

FIGURA 32: Cromatograma da azoxistrobina na concentração de 10 ng.L⁻¹.

FIGURA 33: Cromatograma do carbofurano na concentração de 10 ng.L^{-1} . FIGURA 34: Cromatograma do propoxur na concentração de 25 ng.L^{-1} .

FIGURA 35: Cromatograma da simazina na concentração de 25 ng.L⁻¹.

8.1.4 Estudo de recuperação das amostras de lodo

A exatidão e a precisão do método foram medidas por meio do estudo de recuperação dos analitos nos níveis de 75 e 150 ng.L⁻¹ para os compostos azoxistrobina, carbofurano e propoxur e 1500 e 3000 ng.L⁻¹ para atrazina e simazina.

Na extração dos compostos foi utilizado como solvente uma mistura de metanol/água na proporção de 80/20 v/v, cujo bom desempenho ocorreu em duas etapas de agitação manual durante dez minutos cada. Na TAB. 22 são apresentados os valores médios de recuperação dos analitos na amostra de lodo, juntamente com seus desvios padrões e coeficientes de variações e na FIG. 36 os resultados de recuperação exibidos graficamente.

TABELA 22: Valores do estudo de recuperação dos compostos agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água.

Compostos	Concentrações (ng.L ⁻¹)							
	75				150			
	N	R (%)	DP	CV(%)	n	R (%)	DP	CV(%)
Azoxistrobina	8	72	4	6	9	79	6	8
Carbofurano	9	83	22	27	9	68	13	20
Propoxur	9	117	37	32	9	113	35	40
	1500				3000			
	N	R (%)	DP	CV(%)	n	R (%)	DP	CV(%)
Atrazina	9	61	4	7	9	66	4	6
Simazina	9	79	12	12	9	80	8,5	11

n = Número de amostras; R = Recuperação; DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação;

FIGURA 36: Gráfico das recuperações dos compostos agrotóxicos nos níveis baixo e alto.

As amostras foram analisadas em nove replicatas para cada concentração. Utilizou-se, posteriormente o teste Q para verificação da qualidade dos dados, cuja equação:

$$Q_{\text{calculado}} = \text{variação/intervalo} \quad (\text{equação 4})$$

avaliou a presença de resultados discrepantes para cada composto. Um dos valores do composto azoxistrobina foi rejeitado devido ao $Q_{\text{calcul.}}$ ter sido maior que o $Q_{\text{tabel.}} = 0,44$ com uma confiança de 90%.

Em razão da matriz de estudo (lodo) ser um material complexo de composição heterogênea e tratando-se de análise de resíduos, os valores de recuperação dos compostos, que vão de 61 a 117%, estão dentro dos limites aceitáveis, considerando ser o intervalo ideal entre 50 a 120% com precisão de $\pm 20\%$.

Na avaliação da precisão, os coeficientes de variação do composto propoxur, principalmente, excederam o limite recomendado. Isso se explica devido a grande dispersão dos resultados que ficaram entre 51 a 163% para o nível baixo e 57 a 183% para o nível alto. Mesmo com a aplicação do teste Q, não foi possível rejeitar nenhum valor discrepante, pois o conjunto de dados, apesar da dispersão, apresentou valores próximos entre si, fazendo com que houvesse pequena variação em relação ao intervalo e consequentemente, com o $Q_{\text{calcul.}}$ sendo menor que o $Q_{\text{tabel.}}$.

Os valores superestimados de recuperação do propoxur, bem como da média de suas recuperações, podem ser atribuídos à ocorrência de um possível efeito de matriz próximo ao tempo de retenção do composto. Quando estabelecidos os parâmetros de porcentagem da linha de base, em 50% de s/r para todos os compostos como melhor condição para integração automática dos picos, utilizando os recursos do programa, vários picos das análises de extração do propoxur, por serem pouco sensíveis e estarem em baixa concentração, precisaram ser reintegrados, de forma manual, o que causou acréscimo na área desses picos, tanto para o nível baixo como para o nível alto. Na FIG. 37 e 38 são

apresentados exemplos de cromatogramas do composto propoxur integrados manualmente em que se observa um possível efeito de matriz, tanto nos picos de nível baixo como nos picos de nível alto.

FIGURA 37: Picos cromatográficos da análise dos extratos do propoxur no nível baixo.

FIGURA 38: Picos cromatográficos da análise dos extratos do propoxur no nível alto.

8.1.5 Robustez

Os efeitos do teste de robustez são apresentados na TAB. 23. A verificação gráfica e calculada se esses efeitos são ou não significativos é apresentada nas FIG. 39, 40 e 41. O INMETRO (INMETRO, 2003) não estabelece parâmetros de comparação para inferir se um método é ou não robusto. Assim, esses efeitos obtidos a partir do planejamento fracionário saturado de 7 variáveis e 8 experimentos (combinações) ou por planejamento de *Plackett-Burman* (Zeaiter et al., 2004; INMETRO, 2003; Vander Heyden et al., 2001), também com

8 experimentos, foram avaliados pela estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de Dong (pequenos experimentos), (Zeaiter et al., 2004; Vander Heyden et al., 2001).

TABELA 23: Testes dos efeitos de Robustez. Solução multirresíduo em concentração de 50 ng.L⁻¹ para cada composto.

Fator	Nominal	Variação	Contraste ou Efeito				
			Azoxistrobina	Simazina	Propoxur	Atrazina	Carbofurano
Massa, g	5	5,2	1425	980	-50	200	-55
Tempo agitação, s	60	70	1925	320	150	50	285
MeOH/H ₂ O, v/v	80/20	75/25	25	45	450	0	-405
Volume da mistura extratora, mL	10	11	-475	230	950	1200	-70
Tempo Centrifugação, min	10	9	1125	-145	-50	-50	350
Velocidade Centrifugação, rpm	3000	2900	625	595	1250	-200	430
Temperatura Forno, °C	20	25	925	55	50	2150	415

FIGURA 39: Gráfico de meia-normal para o carbofurano (esquerda) e para a azoxistrobina (direita), a partir dos efeitos da TABELA 23.

FIGURA 40: Gráfico de meia-normal para a simazina (esquerda) e para a atrazina (direita), a partir dos efeitos da TABELA 23.

FIGURA 41: Gráfico de meia-normal para o propoxur, a partir dos efeitos da TABELA 23.

Para o carbofurano e a azoxistrobina, foi confirmada a robustez do método pelos valores calculados. Para a simazina, a atrazina e o propoxur, o método não se mostrou robusto para algumas condições avaliadas. Normalmente, considera-se que até o valor de ME (*Margin of Error*) não há efeito significativo. Porém, há o risco de se ter um falso positivo. Até o valor de SME (*Simultaneous Margin of Error*) corre-se o risco de se ter um falso negativo. Então, mesmo nessas condições e seguindo-se a tendência da literatura (Zeaiter et al., 2004; Vander Heyden et al., 2001), considera-se o valor de ME como referência. O comportamento gráfico dos efeitos para o carbofurano e a azoxistrobina corrobora os valores calculados apresentando um comportamento linear. O gráfico da simazina, apesar de ter um comportamento quase linear, apresenta um ponto (efeito da massa do lodo) com efeito significativo. Nesse caso, a possível variação da massa de lodo medida para a extração deve ser menor do que a avaliada (< 5,2 g de lodo). Atrazina e propoxur apresentam um comportamento não linear. Para a atrazina os fatores são o volume da mistura extratora e a temperatura do forno. Percebe-se que com o aumento do volume da mistura extratora o sinal da atrazina tende a melhorar. O mesmo comportamento vale para a temperatura do forno (sistema de introdução de amostra). Para o propoxur os fatores significativos são o volume da mistura extratora e a velocidade de centrifugação. Os efeitos são análogos ao da atrazina. Em relação aos efeitos negativos, os fatores da razão da mistura extratora MeOH/H₂O e o volume da mistura extratora

apresentaram os maiores efeitos. Porém, de acordo com a avaliação, esses efeitos não são significativos. De uma forma geral, na etapa da extração, o aumento da massa e do tempo de agitação produz efeitos positivos. A variação da razão da mistura extratora de 80/20 para 75/25 (MeOH/H₂O, v/v) e o volume dessa mistura apresentaram um comportamento particular. Os efeitos tanto melhoram como diminuem o sinal. Esse comportamento pode ser atribuído à natureza química dos compostos que interagem diferentemente com o metanol. De qualquer forma, na análise de amostras reais, caso seja necessário, é interessante que se realize uma análise prospectiva para que seja conhecida a ordem de grandeza das concentrações dos compostos de interesse antes de se realizar a análise definitiva. Em uma análise multirresíduo, esses comportamentos devem ser considerados para otimizar a determinação em uma única corrida.

8.1.6 Aplicação da metodologia validada em amostras de lodo

A metodologia foi aplicada em amostras de lodo para determinação dos agrotóxicos atrazina, simazina, azoxistrobina, propoxur e carbofurano.

Uma das dificuldades ultrapassadas neste trabalho foi estabelecer as etapas iniciais do tratamento das amostras, pois o lodo decantado é uma matriz que se altera em função das características da água que entra na ETA e no tratamento aplicado. Nas amostras centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos), o teor de água obtido por secagem a 110°C foi da ordem de 84-89% m/m. Considerando os resultados de perda ao fogo obtido por Reis (2006), podemos afirmar que o lodo de ETA decantado apresenta mais de 90% m/m em água. Daí a dificuldade em se estabelecer um ponto de referência (medição da massa, do volume ou de ambos) para o início do tratamento de uma amostra que apresenta uma fração sólida que retém muita água.

Para este trabalho e em função da instrumentação analítica disponível, norteou-se o desenvolvimento da metodologia para explorar a elevada sensibilidade instrumental. Como pode ser observado nos resultados, pode-se trabalhar com um baixo limite de determinação o que em termos práticos significou eliminar a etapa de concentração, simplificando o método. Com isso,

conseguiu-se minimizar a geração de resíduos tanto líquidos como gasosos. Além disso, reduzindo etapas de manipulação da amostra, reduz-se também a introdução de reagentes que resulta em uma solução final para análise de baixa complexidade. Para se trabalhar em baixas concentrações, a simplicidade das soluções significa um espectro mais limpo e menos sujeito a interferências tanto na etapa da cromatografia quanto na etapa da discriminação das massas. Como consequência, para essas amostras e em baixas concentrações, o efeito matriz não constitui dificuldade para a determinação desses compostos.

Todos os resultados obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação desses compostos. Então, para as condições de análise, os resultados indicaram não existir contaminação no lodo pelos agrotóxicos estudados nos períodos correspondentes às coletas. Apesar dos cromatogramas das amostras do lodo apresentarem picos correspondentes ao composto azoxistrobina (FIG. 42), os mesmos não puderam ser quantificados, pois apresentaram concentração muito abaixo do limite de quantificação do composto ($< 10 \text{ ng.L}^{-1}$). Segundo a OMS (OMS 2006), a atrazina pode ser encontrada em águas subterrâneas e em águas potáveis em concentrações abaixo de 10 ng.L^{-1} . Para o carbofurano, a OMS reporta concentrações de poucos $\mu\text{g.L}^{-1}$ em águas superficiais, subterrâneas e potáveis, sendo que para as águas subterrâneas as concentrações podem chegar a $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. A simazina é encontrada em águas subterrâneas e superficiais em concentrações de até poucos $\mu\text{g.L}^{-1}$. No caso do propoxur, a OMS afirma que é pouco provável que se encontre em água potável.

Uma possível tentativa de se determinar os compostos (caso realmente os compostos estivessem presentes) seria utilizar uma metodologia por adição padrão. Outra possibilidade seria, semelhantemente, adicionar uma quantidade conhecida de cada composto de modo que a concentração final (amostra+adição) resultasse em um valor acima do limite de determinação. Essas duas vias, porém, não foram viabilizadas, pois além de se tentar determinar concentrações distantes dos limites postos pela legislação, demandaria a realização de um novo conjunto de experimentos de validação. Não se descarta, porém, o interesse em se conseguir determinar esses compostos mesmo em concentrações muito abaixo da legislação.

FIGURA 42: Cromatogramas das amostras indicando pico do composto azoxistrobina (vermelho).

A aplicação de uma etapa de concentração por redução do solvente também foi descartada, pois, além de aumentar uma etapa na metodologia, poderia, mais seriamente, impactar negativamente na recuperação do composto devido às perdas naturais do processo e por degradação devido às condições de manipulação da solução. A contaminação cruzada por instrumentos (pipetas, vidrarias, entre outros) ou por reagentes não foi verificada nos brancos analisados.

A possibilidade da ocorrência de um falso negativo não é considerada, já que os limites de determinação estão muito abaixo dos limites estabelecidos pela legislação ou pelos valores de referência. Os valores baixos para os limites de determinação também permitem que se tenha segurança na avaliação da ocorrência de falso negativo mesmo considerando-se as eventuais baixas porcentagens de recuperação de um ou outro composto.

Outra hipótese da não detecção dos compostos está vinculada ao tratamento da água realizado nas ETAs que, em razão da pré-cloração, utilizando hipoclorito de sódio, pode ter degradado ou transformado os compostos de interesse antes mesmo da formação dos flocos no processo de coagulação. No entanto, para a atrazina e a simazina a degradação em função da pré-cloração pode não ter sido eficiente, pois conforme os estudos de Ormad et al. (2008), que avaliaram a efetividade do tratamento de água na remoção de agrotóxicos, indicaram que a atrazina e simazina, obtiveram remoção abaixo da média com 20 e 50%, respectivamente. O estudo demonstrou também que o tratamento utilizando somente cloro foi realmente eficiente para cerca de 40% dos agrotóxicos avaliados com variações nas porcentagens de remoção ficando entre 70 e 100%.

8.2 Destinação dos resíduos e materiais de laboratório utilizados nos experimentos

As atividades laboratoriais normalmente geram consideráveis quantidades de resíduos sólidos e líquidos provenientes dos ensaios analíticos que devem ser tratados e descartados de forma adequada conforme as normas dos órgãos regulamentadores.

No presente estudo, os resíduos líquidos oriundos das curvas de calibração, extrações com solventes orgânicos, descartes instrumentais dentre outros, contendo ou não os agrotóxicos, foram armazenados em recipientes apropriados (vidro) para serem posteriormente tratados e descartados, conforme descrito no Guia de Procedimentos para Armazenamento, Tratamento e Descarte de Resíduos de Laboratório Químicos do CQMA (Pires et al., 2006).

Os tubos de polipropileno, assim como outros materiais descartáveis utilizados nos experimentos, contendo as amostras de lodo contaminadas, após o descarte do resíduo líquido, também foram armazenados adequadamente e encaminhados para incineração, pois, mesmo sendo o lodo de ETA considerado “resíduo sólido” não perigoso de classe 2 (não-inerte), alguns compostos, como o carbofurano e o propoxur, são tóxicos e conferem periculosidade aos resíduos conforme descreve os anexos C, D e E da norma ABNT NBR 10004:2004 (ABNT, 2004).

9. CONCLUSÃO

O presente trabalho procurou determinar agrotóxicos em lodo de ETA explorando-se as potencialidades da cromatografia líquida e da espectrometria de massas associadas em uma instrumentação analítica de concepção moderna. Os resultados permitem concluir que:

1. A etapa inicial de preparação da amostra é crítica, já que a princípio o lodo de ETA não é homogêneo e pode apresentar características diferentes em função das condições da água bruta e do sistema de tratamento adotado.
2. Mesmo com essas características, pode-se tratar as amostras estabelecendo uma condição inicial que seja igual para as amostras coletadas em datas diferentes, revertendo os cálculos para essa situação.
3. A técnica analítica utilizando cromatografia líquida por fase reversa e detecção por espectrometria de massas com fonte de ionização por *electrospray*, mostrou-se seletiva na determinação dos agrotóxicos de interesse presentes em matriz de lodo de ETA.
4. A técnica analítica é adequada para a quantificação dos compostos de interesse visando o atendimento da legislação brasileira e, quando da falta dessa, dos valores de referência internacionais.
5. A metodologia desenvolvida para este trabalho mostrou-se adequada para a quantificação dos compostos de interesse visando o atendimento da legislação brasileira e, quando da falta dessa, dos valores de referência internacionais.
6. O processo de validação demonstrou que a metodologia desenvolvida é seletiva para a análise proposta.

7. O processo de validação demonstrou que a metodologia desenvolvida é robusta em intervalos característicos para cada composto, sendo possível conhecer quais são os parâmetros que demonstraram maior significância no desempenho da análise.
8. O processo de validação demonstrou que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada à análise proposta nas condições dos parâmetros avaliados.
9. O processo de validação agrega valor à análise, uma vez que demonstra estatisticamente como é o desempenho da metodologia utilizada.
10. A metodologia adotada neste trabalho é simples e permite a minimização da contaminação e da perda de compostos por excesso de manipulação.
11. Em função das características da técnica instrumental, a metodologia permite a redução dos resíduos químicos pelo uso de quantidades pequenas de reagentes em cada etapa e pela diminuição das etapas de tratamento.
12. As análises das amostras neste trabalho não indicaram a presença dos agrotóxicos atrazina, simazina, carbofurano e propoxur.
13. Para a azoxistrobina, o pequeno sinal apresentado não foi quantificado, uma vez que representava uma área muito menor do que a correspondente ao limite de determinação.
14. Mesmo sem verificar a presença desses compostos nas amostras de lodo, não há como afirmar que não estão presentes nas amostras de água bruta, já que podem sofrer degradação ao longo e devido ao tratamento da ETA e no próprio corpo d'água antes de ser captada para tratamento.

10. TRABALHOS FUTUROS

Na Ciência, como na Vida, o término de uma etapa representa o começo de uma nova jornada. A realização de um trabalho faz com que novas idéias e novos projetos surjam mais fortes e com potencial maior de compreensão e entendimento, na medida em que aumenta sua complexidade.

As perspectivas de trabalhos futuros são de que o presente estudo atue como ponto de partida no desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo lodo de ETA, já que ainda há muito que se estudar sobre o material. A utilização de novas técnicas analíticas, novas metodologias seriam importantes, bem como a determinação de novos agrotóxicos ou outros tipos de compostos orgânicos para melhor avaliar e monitorar o lodo antes do seu descarte ou uso como material reciclável. Para isso, é importante também que se amplie o número de regiões e estações de tratamento de água a serem estudadas, com a finalidade de se comparar resultados devido às diferentes características existentes.

Outro aspecto importante em posteriores trabalhos envolvendo o lodo ou outro tipo de matriz é continuar agregando qualidade aos resultados obtidos pelos processos de validação, por meio de tratamentos estatísticos, assegurando, dessa forma, a confiabilidade do desenvolvimento metodológico, conforme exigência dos órgãos reguladores e procedimentos metrológicos. A estimativa das incertezas associadas ao processo como um todo é uma informação importante que deve ser adicionada aos próximos trabalhos.

APÊNDICE A – Propriedades dos compostos utilizados no presente estudo (Brasil_b, 2008; Larini, 1999).

ATRAZINA

Ingrediente ativo ou nome comum: Atrazina

Grupo químico: Triazinas

Nome químico: 6-cloroN²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

Número CAS: 1912-24-9

Fórmula molecular: C₈H₁₄ClN₅

Massa molecular: 215,7 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 175°C

Densidade: 1,2 g.cm³ a 20°C

Pressão de vapor: 3,0 x 10⁻⁷ mmHg a 20°C

Índice de GUS*: 3,24

Aparência: Pó incolor

Solubilidade em água: 33 mg.L⁻¹ a 20°C

Fórmula estrutural:

Classificação toxicológica: III

Classe: Herbicidas

Toxicidade aguda em ratos (DL50): Via oral = 2000 mg.kg⁻¹; Via dérmica = 3000 mg.kg⁻¹.

Uso agrícola: Herbicida sistêmico, seletivo e utilizado no controle pré e pós emergente de ervas daninhas e folhas largas nas culturas de abacaxi, cana de açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal, soja e sorgo.

AZOXISTROBINA

Ingrediente ativo ou nome comum: Azoxistrobina

Grupo químico: Estrubilurina

Nome químico: (E)-2-{2[6-(cianofenoxi)piridimina-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo

Número CAS: 131860-33-8

Fórmula molecular: C₂₂H₁₇N₃O₅

Massa molecular: 403,0 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 116°C

Densidade: 1,34 g.cm³ a 20°C

Pressão de vapor: 8,25 x 10⁻¹³ mmHg a 20°C

Índice de GUS*: 4,54

Aparência: Sólido branco

Solubilidade em água: 6 mg.L⁻¹ a 20°C

Fórmula estrutural:

Classificação toxicológica: III

Classe: Fungicidas

Toxicidade aguda em ratos (DL50): Via oral > 5000 mg.kg⁻¹; Via dérmica > 2000 mg.kg⁻¹.

Uso agrícola: Aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, café, cebola, cenoura, cevada, citrus, couve-flor, crisântemo, feijão, figo, goiaba, mamão, manga, melancia, melão, morango, pepino, pêssgo, pimentão, soja, tomate, trigo e uva.

CARBOFURANO

Ingrediente ativo ou nome comum: Carbofurano

Grupo químico: Carbamatos

Nome químico: 2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato

Número CAS: 1563-66-2

Fórmula molecular: $C_{12}H_{15}NO_3$

Massa molecular: 221,2 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 153°C

Densidade: 1,2 g.cm³ a 20°C

Pressão de vapor: 2,0 x 10⁻⁵ mmHg a 33°C

Índice de GUS*: 4,52

Aparência: Sólido cristalino branco

Solubilidade em água: 320 mg.L⁻¹ a 20°C

Fórmula estrutural:

Classificação toxicológica: I

Classe: Inseticida, nematicida, cupinícida, acaricida

Toxicidade aguda em ratos (DL50): Via oral = 6,4 a 14,1 mg.kg⁻¹.

Uso agrícola: É aplicado no solo como inseticida de longa ação residual e nematicida nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana de açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo.

PROPOXUR

Ingrediente ativo ou nome comum: Propoxur

Grupo químico: Carbamatos

Nome químico: 2-isopropoxifenil-N-metilcarbamato

Número CAS: 114-26-1

Fórmula molecular: $C_{11}H_{15}NO_3$

Massa molecular: 209,2 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 91,5°C

Densidade: 1,17 g.cm³ a 20°C

Pressão de vapor: 6,5 x 10⁻⁶ mmHg a 20°C

Índice de GUS*: 4,79

Aparência: Pó cristalino branco

Solubilidade em água: 2000 mg.L⁻¹ a 20°C

Fórmula estrutural:

Classificação toxicológica: II

Classe: Inseticida

Toxicidade aguda em ratos (DL50): Via oral = 100 mg.kg⁻¹; via dérmica > 5000 mg.kg⁻¹.

Uso agrícola: É aplicado como inseticida não-sistêmico, especialmente no combate a insetos domésticos e controle do vetor da malária. Na agricultura é aplicado nas partes aéreas das culturas de algodão, alho, ameixa, amendoim, berinjela, cacau, cebola, citros, maçã, pêssego, pimenta e pimentão.

SIMAZINA

Ingrediente ativo ou nome comum: Simazina

Grupo químico: Triazinas

Nome químico: 6-cloro-N²,N⁴-dietil-1,3,5,-triazina-2,4-diamina

Número CAS: 122-34-9

Fórmula molecular: C₇H₁₂ClN₅

Massa molecular: 201,7 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 226°C

Densidade: 1,17 g.cm³ a 20°C

Pressão de vapor: 6,1 x 10⁻⁹ mmHg a 20°C

Índice de GUS*: 3,43

Aparência: Pó incolor

Solubilidade em água: 3,5 mg.L⁻¹ a 20°C

Fórmula estrutural:

Classificação toxicológica: III

Classe: Herbicida

Toxicidade aguda em ratos (DL50): Via oral = 5000 mg.kg⁻¹; via dérmica = 5000 mg.kg⁻¹.

Uso agrícola: Herbicida sistêmico utilizado no controle pré e pós emergente de ervas daninhas e folhas largas nas culturas de abacaxi, banana, cacau, café, cana de açúcar, citros, maçã, milho, pinus, seringueira, sisal, soja, sorgo e uva.

* **GUS:** *Groundwater Ubiquity Score* – Índice de vulnerabilidade da água subterrânea

APÊNDICE B – Definição dos termos estatísticos utilizados no texto.

1. **Efeitos** (teste de robustez): variação da resposta analítica de cada composto de interesse em duas condições experimentais próximas. Ver também Fracionário Saturado e *Plackett-Burman*.
2. **Erro Puro**: “dispersão das respostas repetidas ao redor de suas médias em cada nível” (Barros Neto e col., 1996). Permite que se avalie avaliar a influência do erro aleatório nas respostas ou medidas.
3. **Explicada, porcentagem da variação**: indicador do desempenho do modelo aplicado para o ajuste dos pontos.
4. **Explicável, porcentagem máxima da variação**: desempenho máximo do ajuste dos pontos. Em função da característica dos pontos, nem sempre pode-se explicar 100% do comportamento dos pontos a partir do melhor ajuste obtido.
5. **Falta de Ajuste**: é um parâmetro que depende do modelo ajustado. À medida que as estimativas se afastarem do valor médio das repostas, a falta de ajuste será maior.
6. **Fracionário Saturado, planejamento**: Desenho aplicado ao planejamento para a otimização de um experimento ou verificação da robustez de um processo. No caso do presente trabalho, a fração é 2^{7-4} , sendo 7 fatores e 8 combinações de experimentos. Ver também *Efeitos e Plackett-Burman*.
7. **Grubbs, teste**: teste para valores discrepantes.
8. **Margin of Error, ME**: critério de avaliação da significância de um efeito no teste de robustez. Como está sujeito a erros de falso negativo, o SME deve também ser considerado. Mesmo nessa condição, o ME é o critério

recomendado para testes de robustez. Ver também *Simultaneous Margin of Error, SME*.

9. **Meia-Normal, Meio-Normal, gráfico:** apresenta os módulos dos efeitos em função da probabilidade acumulada do número de eventos. Efeitos desprezíveis aparecem muito próximos da abscissa. Efeitos significativos se afastam da abscissa ou aparecem fora do comportamento linear dos pontos.
10. **Plackett-Burman, planejamento:** representa uma categoria dos planejamentos saturados com o maior grau de fracionamento. Geralmente, as quantidades de experimentos são 4, 8, 12, 16,...múltiplos de 4. Ver também *Efeitos e Fracionário Saturado*.
11. **Simultaneous Margin of Error, SME:** critério de avaliação para múltiplos efeitos. É mais conservador do que o ME, porém, corre o risco de apresentar eventos de falso positivo. Ver também *Margin of Error, ME*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, V.; PICÓ, Y.; Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. ***Trends Anal. Chem.***, v. 23, n. 10-11, 2004.

ANDREY, R.E.; ***Liquid chromatography–mass spectrometry: an introduction***. Huddersfield. Wiley Ed, 2003.

ASPERGER, A.; EFER, J.; KOAL, T.; ENGEWALD, W.; Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on line solid–phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry using turbulent–flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatography separation. ***J. Chromatogr. A***, 960, 109-119, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ***Resíduos sólidos (Classificação)***. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. (NBR 10004).

AZEVEDO, A.D.; LACORTE, S.; VINHAS, T.; VIANA, P.; BARCELÓ, D.; Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. ***J. Chromatogr. A***, 879, 13-26, 2000.

BANERJEE, K.; OULKAR, D.P.; DASGUPTA, S.; PATIL, S.B.; PATIL, S.H.; SAVANT, R.; ADSULE, P.G.; Validation and uncertainty analysis of a multi–residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. ***J. Chromatogr. A***, 1173, 98-109, 2007.

BARCELÓ, D.; Environmental Protection Agency and other method for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. ***J. Chromatogr.***, v. 643, p. 117-143, 1993.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; ***Planejamento e otimização de experimentos***. Editora da Unicamp, Campinas 1996.

BARWICK, V.; ***Preparation of calibration curves***. A guide to best practice. LGC/VAM/032 September, 2003.

BEAUSSE, J.; Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. ***Trends Anal. Chem.***, v. 23, n. 10-11, 2004.

BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; CONCHA-GRAÑA, E.; GUIMARAES, A.; GONÇALVES, C.; MONUIATEGUI-LORENZO, S.; ALPENDURABA, M.F.; Optimization and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. ***J. Chromatogr. A***, 1141, 165-173, 2007.

BOTITSI, H.; ECONOMOU, A.; TSIPI, D.; Development and validation of a multi-residue method for the determination pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. ***Anal. Bioanal. Chem.***, 389, 1685-1695, 2007.

BRAGA, R.; Raízes da Questão Regional no Estado de São Paulo: Considerações sobre o Vale do Ribeira. ***AGETEO***. v. 24, n. 3, p. 43-68, 1999.

BRASIL DAS ÁGUAS. ***Rio Ribeira (PR/SP)***. Disponível em: <http://www.brasildasaguas.com.br/brasil_das_aguas/rio_ribeira_do_iguape.html>. Acesso em: 19 de junho de 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). Centro de Documentação. Catálogo de Publicação de 2007. ***Balanço entre demanda e disponibilidade de águas superficiais***. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/AcoesAdministrativas/CDOC/CatalogoPublicacoes_2007.asp>. Acesso em: 13 de junho de 2008.

BRASIL_a. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA). ***Agrotóxicos e Toxicologia. Critérios para a classificação toxicológica***. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/manual/anexo_03.htm>. Acesso em: 29 de maio de 2008.

BRASIL_b. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA). ***Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias***. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 17 de abril de 2008.

BRASIL_c. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA). ***Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos***. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em: 24 de abril de 2008.

BRASIL. ***Constituição da República Federativa do Brasil de 1988***: promulgada em 5 de outubro de 1988, Brasília. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm#indice>. Acesso em: 12 de junho de 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). ***Resolução n. 357***, D.O.U., de 17/03/05, Brasília.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde. Ministério da Saúde do Brasil, 2006, Brasília.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria n. 518, 2004**. Ministério da Saúde do Brasil, D.O.U., de 25 de março de 2004, Brasília.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; SANTOS, T.C.R.; RIBEIRO, M.L.; Avaliação da exatidão e precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba v. 12, p. 155-168, 2002.

BRUINS, A.P.; Mechanistic aspects of electrospray ionization. **J. Chromatogr. A**, 794, 345-357, 1998.

BUSTILLOS, O.V.; SASSINE, A.; MARCH, R.; **A Espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo, Brasil, Editora Scortecci, 2003.

C.A.T.I. – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Projeto LUPA– Levantamento das Unidades de Produção Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br>>. Acesso em: 14 de jan. 2008.

CASTILLO, L.E.; DE LA CRUZ, E.; RUEPERT, C.; Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of central America. **Environ. Toxic. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 41-51, 1997.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Banana: Mercado atual e perspectivas do setor. Palestra ministrada em Janaúba (MG)**. Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 10 de jan. de 2008.

CETEC – Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação. **Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da Bacia do Ribeira de Iguape e Litoral Sul, UGRHI – 11** – Relatório Zero. 2003. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br>>. Acesso em: 09 jan. de 2008.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento de São Paulo. **Relatório de qualidade de águas interiores do estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/monitoramento.asp>>. Acesso em: 04 jan. 2008.

CORRÊA E SILVA, M.; **Exposição ocupacional a agrotóxico no cultivo da banana na região do Vale do Ribeira – SP**. São Paulo. Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo, Dez. 2007.

DEJAEGER, B.; VANDER HEYDEN, Y.; Ruggedness and robustness testing. **J. Chromatogr. A**, 1158, 138-157, 2007.

Directiva 96/23/CE do Conselho de 12 de Agosto de 2002, relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (JO L 221 de 17.08.2002, p. 8)

Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano (JO L 330/32 de 05.12.1998, p. 32).

DORES, E.F.G.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M.; Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

EICHHOR, P.; LÓPEZ, O.; BARCELÓ, D.; Application of liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry for the identification and characterisation of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenyl carboxylates in sludge-amended soils. **J. Chromatogr. A**, 2005.

EUROPEAN COMMUNITIES (DRINKING WATER) (NO.2). **REGULATIONS 2007. STATUTORY INSTRUMENTS**. S.I. No. 278 of 2007. Disponível em: <http://faolex.fao.org/cgi-bin/faolex.exe?rec_id=077152&database=FAOLEX&search_type=link&table=result&lang=eng&format_name=@ERALL>. Acesso em: 14 de agosto de 2008.

FRANÇA, M.A.; **Vale do Ribeira (SP): Proposições econômicas, sociais, políticas e ambientais para o crescimento e desenvolvimento sustentável dos municípios da região administrativa de Registro**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

GELMINI, G.A.; PELEGRINETTI, J.R.; CASTANHEIRA, L.C.; HOPPE, J.E.M.; **Agrotóxicos e afins – Coletânea da legislação. Básica e correlata**. Campinas. Coordenadoria de Defesa Agropecuária. 2004. Tomo V.

GERVAIS, G.; BROSILLON, S.; LAPLANCHE, A.; HELEN, C.; Ultra–pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. **J. Chromatogr. A**, 1202, 163-172, 2008.

GONÇALVES, C.; CARVALHO, J.J.; AZENHA, M.A.; ALPENDURADA, M.F.; Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1110, 6-14, 2006.

GUERRA, R.C.; **Caracterização e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

GUIA EURACHEM. Determinando a incerteza na medição analítica. Versão Brasileira, 2002

HAYES, W.J.; LAWS, E.R.; **Handbook of Pesticides Toxicology**. 1. ed., San Diego: Academic, 1997.

HE, Y.; LEE, K.H.; Continuous flow microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of pesticides in natural waters. **J. Chromatogr. A**, 1122, 7-12, 2006.

HERNÁNDEZ, F.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; BIJLSMA, L.; BARREDA, M.; PITARCH, E.; Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. **J. Chromatogr. A**, 1109, 242-252, 2006.

HIEMSTRA, M.; KOK, A.; Comprehensive mult-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1154, 3-25, 2007.

HOGAN, D.J.; CARMO, R.L.; ALVES, H.P.F.; RODRIGUES, I.A.; **Desenvolvimento sustentável no Vale do Ribeira (SP): conservação ambiental e melhoria das condições de vida da população**. 1998. Disponível em: <http://www.nepo.unicamp.br/textos_publish/pesquisadores/Roberto%20do%20Carmo/projetos/roberto/valeribeira.htm>. Acesso em: 27 de dezembro de 2007.

HONING, M.; RIU, J.; BARCELÓ, D.; VAN BAAR, B.L.M.; BRINKMAN, U.A.Th.; Determination of tem carbamate pesticides in aquatic and sediment samples by liquid chromatography-ionspray and thermospray mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 733, 283-294, 1996.

HOPPEN, C.; PORTELLA, K.F.; JOUKOSKI, A.; BARON, O.; FRANK, R.; SALES, A.; ANDREOLI, C.V.; PAULON, V.A.; Co-disposição de lodo centrifugado de estação de tratamento de água (ETA) em matriz de concreto: método alternativo de preservação ambiental. **Cerâm.**, v. 51, 85-95, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Contagem da população 2007**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2006/estimativa.shtm>>. Acesso em: 14 de novembro de 2007.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)**. Oct. 1994.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC **Compendium of Chemical Terminology, Versão Eletrônica**. Disponível em <<http://goldbook.iupac.org/D01629.html>>. Acesso em: 26 de junho 2008.

KONSTANTINOU, I.K.; HELA, D.G.; ALBANIS, T.A.; The status of pesticide pollution in surface Waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environ. Pollut.**, 141, 555-570, 2006.

KOTAKA, E.T.; ZAMBRONE, F.A.D.; Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos. São Paulo, SP. ILSI Brasil, 2001.

LARINI, L.; **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo, SP. Editora Manole, 1999.

LEBRE, D.T.; **Desenvolvimento de metodologia para a determinação de herbicidas e inseticidas em águas superficiais utilizando extração líquido-sólido e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

LEE, P.W.; **Handbook of residue analytical methods for agrochemicals**. Newark, Delaware. Wiley Ed., 2003.

LINDHOLM, J.; **Development and validation of HPLC methods for analytical and preparative purposes**. 2004. Tese (Doutorado) – Uppsala University.

MACIEL, E.; **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multirresíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera indica*)**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARQUES, M.N.; **Avaliação do impacto de agrotóxicos em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Uma contribuição à análise crítica da legislação sobre o padrão de potabilidade**. 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MARQUES, M.N.; BADIRU, A.I.; BELTRAME, O.; PIRES, M.A.F.; Pesticide leaching and run-off hazard in the Ribeira de Iguape river basin in São Paulo state, Brazil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 2, 179-185, 2007.

MARTINS JÚNIOR, H.A.; **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem com ionização por electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L.; Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

NIJHUIS, A.; VAN DER KNAAP, H.C.M.; DE JONG, S.; VANDEGINSTE, B.G.M.; Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. **Anal. Chim. Acta**, 391, 1999.

OLIVEIRA, E.M.S.; MACHADO, S.Q.; HOLANDA, J.N.F.; Caracterização de resíduo (lodo) proveniente de estação de tratamento de águas visando sua utilização em cerâmica vermelha. **Cerâm.**, v.50, p.324-330, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guias para la calidad del agua potable**, 2° ed, v. 1 – recomendações1. Ginebra, 1995.

ORMAD, M.P.; MIGUEL, N.; CLAVER, A.; MATESANZ, J.M.; OVELLEIRO, J.L.; Pesticides removal in the process of drinking water production. **Chemosph.**, 71, 97-106, 2008.

PANG, G-F.; CAO, Y-Z.; ZHANG, J-J.; FAN, C-L.; LIU, Y-M.; LI, X-M.; JIA, G-Q.; LI, Z-Y.; SHI, Y-Q.; WU, Y-P.; GUO, T-T.; Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1125, 1-30, 2006.

PERES, F.; **É veneno ou é remédio: Os desafios sobre a comunicação rural sobre agrotóxicos**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J.; High – performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using a post–column photochemical reaction and fluorimetric detection. **Anal. Chim. Acta**, 540, 383-391, 2005.

PIMENTEL, M.F.; BARROS NETO, B.; Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Quím. Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PIRARD, C.; WIDART, J.; NGUYEN, B.K.; DELEUZE, C.; HEUDT, L.; HAUBRUGE, E.; DE PAUW, E.; FOCANT, J.F.; Development and validation of a multi–residue method for pesticide determination in honey using on–column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 2007.

PIRES, M.A.F.; MARTINS, E.A.J.; DANTAS, E.S.K.; FURUSAWA, H.A.; COTRIM, M.E.B.; **Guia de Procedimentos para Armazenamento, Tratamento e Descarte de Resíduos de Laboratório Químico**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), Jun. 2006.

PIZZUTTI, I.R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; HIEMSTRA, M.; WICHERT, C.; PRESTES, O.D.; Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **J. Chromatogr. A**, 1142, 123-136, 2007.

PORTELLA, K.F.; ANDREOLI, C.V.; HOPPEN, C.; SALES, A.; BARON, O.; Caracterização físico-química do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna – Curitiba/PR. **XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária Ambiental**. Joinville, SC. 2003.

POZO, O.J.; GUERRERO, C.; SANCHO, J.V.; IBANEZ, M.; PITARCH, E.; HOGENDOORN, E.; HERNÁNDEZ, F.; Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on–line solid–phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1103, 83-93, 2006.

QUEIRÓS, S.C.N.; **Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para extração em fase sólida**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

QUEIRÓS, S.C.N.; LAZOU, K.; SANDRA, P.; JARDIM, I.C.S.F.; Determination of pesticides in water by liquid chromatography–(electrospray ionization)–mass spectrometry (LC–ESI–MS). **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 14, p. 53-60, 2004.

REIS, E.L.T. **Abordagem sistêmica do sistema de tratamento de água de Registro, São Paulo, com ênfase na avaliação do impacto do descarte dos resíduos na bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape**. 2006. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

REIS, E.L.T.; COTRIM, M.E.B.; RODRIGUES, C.; PIRES, M.A.F.; BELTRAME FILHO, O.; ROCHA, S.M.; CUTOLO, S.A.; Identificação da influência do descarte de lodo de estações de tratamento de água. **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, p. 865-872, 2007.

RIBANI, M.; Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G.; Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **J. Chromatogr. A**, 1156, 201-205, 2007.

RISSATO, S.R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G.P.; GERENUTTI, M.; Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

RONNING, H.T.; EINARSEN, K.; ASP, T.N.; Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of method based on 2002/657/EC. **J. Chromatogr. A**, 1118, 226-233, 2006.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C; RODRIGUEZ, A.; TADEO, J.L.; Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonification–assisted extraction in small columns and liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1007, 85-91, 2003.

SANTOS FILHO, D.F.; **Tecnologia em tratamento de água**. Rio de Janeiro, RJ. Editora Almeida Neves Editores, 1976.

SÃO PAULO (Estado). Decreto n. 8468, de 8 de setembro de 1976. Aprova o Regulamento da Lei n. 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a Prevenção e Controle da Poluição do Meio Ambiente.

SCHRÖDER, H.F.; Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurized liquid extraction and separation on fluorine–modified reversed-phase sorbents. **J. Chromatogr. A**, 1020, 131-151, 2003.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES PARA O GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, SIGRH. Disponível em: http://www.sigrh.sp.gov.br/cgi-bin/sigrh_home_colegiado.exe?COLEGIADO=CRH-RB&TEMA=RELATORIO. Acesso em: 15 de agosto de 2008.

SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y.; Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion–trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. **J. Chromatogr. A**, 1048, 41-49, 2004.

TAN, B.L.L.; MOHD, M.A.; Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatography–mass spectrometry. **Talan.**, 61, 385-391, 2003.

TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, S.A.; SOUZA, N.R.; ALÉSSIO, P.; SANTOS, G.T.A.; Efeito da adição de lodo de estação de tratamento de água (ETA) nas propriedades de material cerâmico estrutural. **Cerâm.**, v.52, p.251-220, 2006.

TEIXEIRA, S.T.; MELO, W.J.; SILVA, E.T.; Aplicação de lodo da estação de tratamento da água em solo degradado. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40, n.1, p.91-94, 2005

TOMITA, R.Y.; Legislação de agrotóxicos e sua contribuição para a proteção da qualidade do meio ambiente. **Biolog.**, v. 67, n. 1/2, p. 1-10, 2005.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National Primary Drinking Water Standards. Office of water. Washington, D.C. 20460, June 2003.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. The incorporation of water treatment effects on pesticides removal and transformations in food quality protections act (FQPA) drinking water assessments. OPP – Office of Pesticides Programs. Washington, D.C. 20460, 25 october 2001.

VAN DE STEENE, J.C.; LAMBERT, W.E.; Validation of a solid – phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *J. Chromatogr. A*, 1182, 153-160, 2008.

VAN DER WERF, H.M.G.; Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosys. & Environ.*, v. 60, p. 81-96, 1996.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L.; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 2001.

VANDER HEYDEN, Y.; QUESTIER, F.; MASSART, D.L.; A ruggedness strategy for procedure related factors: experimental set–up and interpretation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 153-168, 1998.

VEGA, A.B.; FRENICH, G.; MARTINEZ VIDAL, J.L.; Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2005.

WALORCZYK, S.; Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1165, 200-212, 2007.

WEBER, J.B.; WILKERSON, G.G.; REINHARDT, C.F.; Calculating pesticide sorption coefficients (K_d) using selected soil properties. *Chemosph.*, 55, 157-166, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The International Programme on Chemical Safety (IPCS). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by hazard*. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/>. Acesso em: 12 de agosto de 2008.

ZEAITER, M.; ROGER, J.M.; BELLON-MAUREL, V.; RUTLEDGE, D.N.; Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. *Trends Anal. Chem.*, v. 23, n. 2, 2004.