



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO DAS
ÁREAS DE RECARGA DO AQUÍFERO GUARANI, NA REGIÃO
DAS NASCENTES DO RIO ARAGUAIA, MT/GO**

Lais Sayuri Ribeiro de Moraes
Tese de Doutorado

Orientação: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Co-Orientação: Dr^a Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Campinas - Julho - 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M792d	Morais, Lais Sayuri Ribeiro de. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de agrotóxicos em água e solo das áreas de recarga do Aquífero Guarani, na região das nascentes do Rio Araguaia, MT/GO / Lais Sayuri Ribeiro de Moraes. -- Campinas, SP: [s.n], 2009. Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Co-orientadora: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Validação de método. 2. Agrotóxicos. 3. Água. 4. Solo. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.
-------	---

Título em inglês: Development and validation of methods for determination of pesticides in water and soil from the Guarani Aquifer recharging, area, near the source Araguaia River, MT/GO

Palavras-chaves em inglês: Method validation, Pesticides, Water, Soil

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Miriam Sannomiya (USP-Leste-SP), Profa. Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz (DQ-UFV)

Data de defesa: 29/07/2009

À Miioco Sakai, minha querida mãe e minha melhor amiga...

... pela liberdade de escolha que sempre me deu e por me apoiar e amparar

SEMPRE, em todos os caminhos pelos quais decidi percorrer...

*... sua força, paciência, esforço e incentivo foram determinantes em todos os
momentos para que eu conseguisse chegar ao final desta fase...*

*Uma enorme admiração e orgulho... são apenas alguns de todos os meus sentimentos
por você...*

À voce, minha mãe, que é o meu maior exemplo...

O modelo de ser humano que procuro seguir em minha vida...

DEDICO ESTA TESE.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Miioco e Francisco, ao meu irmão Eduardo e à Cristiane, por me apoiarem e incentivarem sempre, por acreditarem até o final.

À minha orientadora, Prof^a. Isabel Jardim, por ter aceitado me orientar, por me inserir neste projeto e também em seu laboratório, que foi minha “casa”, meu “lar”, por tantos anos. Pelos ensinamentos, amizade, paciência, carinho, cumplicidade, e principalmente, pela confiança que sempre depositou em mim. Pela oportunidade que me deu de crescer e amadurecer, tanto profissionalmente, quanto em minha vida pessoal. Pela compreensão nos meus momentos mais difíceis e também pela firmeza nos momentos em que eu pensava em desistir.

À Liane (Lianóvisk), minha amiga, "co-orientadora" e minha "personal consultora para todos os assuntos", pela contribuição única, não somente científica, mas também em minha vida. Pelos conselhos sábios, idéias geniais e broncas, sempre na hora certa. Por me ajudar sempre a manter o tal "foco".

Ao Ani (Anízio), pela amizade e também pela contribuição científica no mestrado e no doutorado.

À Andréa, pelo apoio, paciência, companheirismo e amizade em todos os momentos.

À tia Tuca, tio Alexandre, Luciane, André, Natália e Marcos pela torcida.

À minha co-orientadora, Dr^a. Sonia Queiroz, pela contribuição científica.

Aos “parceiros do lab”, Louise, Camila, Milena, Lucília, Rafael, Fernandete, Ana, Priscila, Mariza e Patrícia, pelos vários momentos de descontração, tão necessários.

À Prof^a. Carol Collins, pelos conselhos e sugestões.

Ao grupo do Laboratório de Resíduos da Embrapa, Márcia, Débora, Geane, Marlei e Maria, por sempre me receberem de braços abertos.

Ao Dr. Marco Gomes, da Embrapa, pela coleta das amostras.

Ao Prof. Barone pelas análises realizadas.

À CNPq, pela bolsa, e ao Prodetab pelos recursos concedidos.

SÚMULA CURRICULAR

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Projeto: “*Preparação de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir de Sílica Titanizada e Polibutadieno*”, sob orientação da Profª Drª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Julho/2001 a Julho/2003

BACHARELADO EM QUÍMICA

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Mar/1996 a Dez/2001

TRABALHOS PUBLICADOS:

1. JARDIM, I.C.S.F., MORAIS, L.S.R., QUEIROZ, S.C.N., FERRACINI, V.L. e GOMES, M.A.F., Procedimentos Analíticos e Avaliação da Presença de Herbicidas em Áreas de Recarga do Aquífero Guarani na Região das Nascentes do rio Araguaia MT/GO, em: GOMES, M.A.F., "Uso Agrícola das Áreas de Afloramento do Aquífero Guarani no Brasil: Implicações para a Água Subterrânea e Propostas de Gestão com Enfoque Agroambiental", Embrapa Informação Tecnológica, 2008, 175-192.
2. VIGNA, C.R.M.; MORAIS, L.S.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H., "Poly(methyloctyl siloxane) Immobilized on Silica as a Sorbent for Solid-phase Extraction of Some Pesticides", *Journal of Chromatography A*, 1114 (2006) 211.
3. MORAIS, L.S.R.; JARDIM, I.C.S.F., Characterization of a New Stationary Phase based on Microwave Immobilized Polybutadiene on Titanium Oxide-modified Silica. *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 410.

CURSOS ESPECIALIZADOS:

Nov/2007 - *Normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e de Campo NIT DICLA 028 e 034.* (Embrapa Meio Ambiente /Jaguariúna, 24h)

Set/2007 - *Impactos de Poluentes e Contaminantes Orgânicos no Meio Ambiente e na Saúde e Metodologias Analíticas de Identificação e Quantificação* (INT/RJ, 80h).

Fev/2004 - *Planejamento e Otimização de Experimento* (PUC/RJ, 10h).

Out/2003 - *Princípios Básicos de Eletroforese Capilar.* (FEA-UNICAMP, 9h).

Nov/2002 - *Eletroforese Capilar* (FEA-UNICAMP, 8h).

Mar/2002 - *Análise Química Ambiental* (IQ-UNICAMP, 180 h).

Jul/2001 - *Métodos Cromatográficos de Separação* (IQ-UNICAMP, 180 h).

APRESENTAÇÕES EM EVENTOS:

Out/2007 - 14º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), João Pessoa - PA, “*Otimização do Sorvente Dimetil-Metil-Fenil Siloxano na Extração de Alguns Agrotóxicos em Água*”.

Jun/2007 - 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Águas de Lindóia - SP, “*Otimização de Técnicas de Extração de Agrotóxicos em Solo para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*”.

Maio/2007 - 1st Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW), Pesticides in Food and Environmental Samples, Santa Maria - RS, “*Extração de Agrotóxicos do Solo. Técnica de Agitação Mecânica versus Extração Assistida por Microondas*”.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA:

- Trabalhos apresentados em eventos nacionais: **13**
- Trabalhos apresentados em eventos internacionais: **17**

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO DAS ÁREAS DE RECARGA DO AQUÍFERO GUARANI, NA REGIÃO DAS NASCENTES DO RIO ARAGUAIA, MT/GO. A região das nascentes do Rio Araguaia, na divisa dos estados de Goiás e Mato Grosso abriga uma porção das áreas de recarga do Aquífero Guarani, o qual é um dos maiores sistemas aquíferos do mundo e representa a principal fonte de água potável na região. Este reservatório pode estar comprometido pelo uso crescente de agrotóxicos nas plantações de soja e de milho da região. Diante deste cenário, neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação dos agrotóxicos imazetapir, nicossulfurom, imazaquim, carbofuram, atrazina, linurom, clorimurom-etil e diflubenzurom, utilizados em culturas de milho ou de soja. Para separação, identificação e quantificação dos agrotóxicos foram utilizadas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos e a Cromatografia Líquida acoplada por Fonte de Ionização por Eletronebulização à Espectrometria de Massas em série. A extração em fase sólida (SPE), com cartuchos C18, foi selecionada e otimizada para a extração dos agrotóxicos em amostras de água. Para o preparo das amostras de solo foram estudadas as técnicas de extração por agitação mecânica, por banho ultrassônico e assistida por micro-ondas industrial e caseiro. Os métodos desenvolvidos foram validados obtendo-se limites de quantificação (LQ) em água, na faixa de 0,015-0,1 ng mL⁻¹ empregando SPE-HPLC-DAD e 0,01 ng mL⁻¹ com SPE-LC-ESI-MS/MS. Com a extração assistida por micro-ondas caseiro e LC-ESI-MS/MS foram obtidos LQ de 1 ng mL⁻¹ para todos os agrotóxicos em solo. Em todos os métodos validados, os valores de recuperação dos agrotóxicos em um mesmo dia e em dias diferentes, ficaram dentro da faixa aceitável de 70-120 %. Os ensaios de repetitividade e de precisão intermediária para todos agrotóxicos apresentaram coeficientes de variação inferiores ao limite aceito de 15 %. Os métodos SPE-HPLC-DAD e SPE-LC-ESI-MS/MS foram aplicados em análises de amostras de água da região em estudo, verificando-se que a maioria dos agrotóxicos analisados encontrava-se abaixo do limite máximo de resíduos de 0,1 ng mL⁻¹. Não foram detectados agrotóxicos nas amostras de solo coletadas em outras duas regiões com cultivo de milho e soja, empregando a extração assistida por micro-ondas caseiro e LC-ESI-MS/MS. Os parâmetros físico-químicos determinados para o imazetapir, imazaquim, nicossulfurom e clorimurom-etil mostraram que eles apresentam pouca afinidade pelo solo estudado, tendo grande disponibilidade para lixiviação, em conformidade com o índice de GUS.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR PESTICIDE DETERMINATION IN THE WATER AND SOIL OF THE GUARANI AQUIFER RECHARGE AREA, NEAR THE SOURCE OF THE ARAGUAIA RIVER, MT/GO, BRAZIL. The area near the Araguaia River, between Goiás and Mato Grosso States, is the location of a portion of the recharging of the Guarani Aquifer, which is one of the world's largest aquifer systems and an important source of drinking water. This reservoir could be threatened by the widespread use of pesticides in maize and soybean cultivation in this area. Thus, this work developed analytical methods for the determination of imazethapyr, nicosulfuron, imazaquin, carbofuran, atrazine, linuron, chlorimuron-ethyl and diflufenican, pesticides used in maize and soybean cultivation. Pesticide separation, identification and quantification were performed using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Solid Phase Extraction (SPE) with C18 sorbents was optimized for sample extraction from water. Soil samples were extracted by mechanical shaking, sonication or microwave-assisted extraction with industrial and home microwave ovens. Methods were validated resulting in limits of quantification (LOQ) for the pesticides in water in the range of 0.015-0.1 ng mL⁻¹, using SPE-HPLC-DAD, and 0.01 ng mL⁻¹ using LC-ESI-MS/MS. LOQ of 1 ng mL⁻¹ for all pesticides in soil were achieved using the home microwave oven and LC-ESI-MS/MS. Recoveries for pesticides with all methods were in the range 70-120 %. Relative standard deviations for repeatability and intermediate precision were less than 15 %. SPE-HPLC-DAD and LC-ESI-MS/MS were employed for the analysis of samples of water from the recharge area and most of the pesticides were detected at concentrations below the minimum residue limit (MRL) of 0.1 ng mL⁻¹ established by the European Community. The home microwave oven and LC-ESI-MS/MS were used for the analysis of soil samples from two other regions of Brazil and the pesticides were not detected in these samples. Adsorption and desorption parameters were determined for imazethapyr, imazaquin, nicosulfuron and chlorimuron-ethyl, indicating that these pesticides have little affinity for the soil of the region of the Guarani Aquifer recharge, and show significant leaching potential, according to the ground water ubiquity score (GUS index) for these pesticides.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A utilização de Agrotóxicos no Brasil e no Mundo	1
1.2. Contaminação de Solo e Água por Agrotóxicos.....	3
1.3. Solo.....	5
1.4. Adsorção e Dessorção de Agrotóxicos em Solo	7
1.5. Isotermas de Adsorção e Dessorção	9
1.6. Águas Subterrâneas no Brasil e no Mundo.....	13
1.7. O Cultivo de Soja e Milho na Região Centro-Oeste do Brasil.....	17
1.8. Situação Atual do Sistema Aquífero Guarani na Região das Nascentes do Rio Araguaia	21
1.9. Preparo de Amostra para os Agrotóxicos Estudados	23
1.9.1. Extração de Agrotóxicos em Água.....	23
1.9.2. Extração de Agrotóxicos em Solo.....	25
1.10. Métodos de Determinação dos Agrotóxicos.....	27
1.10.1. Espectrometria de Massas acoplada à Cromatografia Líquida: Definições e Aplicações na Análise de Agrotóxicos	27
1.10.1.1. Fontes de Ionização.....	28
1.10.1.2. Analisadores de Massas	33
1.11. Validação de Métodos.....	36
1.11.1. Guias de Validação.....	36
1.11.2. Parâmetros Analíticos para Validação de Métodos	40
1.11.2.1. Seletividade	41
1.11.2.2. Limite de Detecção	41
1.11.2.3. Limite de Quantificação.....	43
1.11.2.4. Linearidade e Curva Analítica	44
1.11.2.5. Exatidão, Precisão e Recuperação	45
1.11.2.6. Robustez.....	48

1.11.2.7. Confirmação por Espectrometria de Massas.....	48
2. OBJETIVOS	50
2.1. Estratégias para Atingir os Objetivos.....	50
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	52
3.1. Materiais.....	52
3.1.1. Reagentes e Solventes	52
3.1.2. Padrões de Agrotóxicos	52
3.1.3. Colunas Cromatográficas.....	52
3.1.4. Cartuchos de SPE.....	53
3.2. Equipamentos.....	53
3.3. Critérios Para a Seleção dos Agrotóxicos Estudados e suas Propriedades Químicas e Físicas.....	54
3.3.1. Descrição e Propriedades Químicas e Físicas dos Agrotóxicos Seleccionados para Estudo	54
3.3.1.1. Imazetapir (IMZE).....	56
3.3.1.2. Imazaquim (IMZA)	56
3.3.1.3. Nicossulfurom (NICO)	57
3.3.1.4. Clorimurom-etil (CLOR).....	57
3.3.1.5. Diflubenzurom (DIFLU).....	58
3.3.1.6. Linurom (LINU).....	58
3.3.1.7. Atrazina (ATRAZ)	59
3.3.1.8. Carbofuram (CARBO)	59
3.4. Preparação das Soluções Estoque e de Trabalho	60
3.5. Coleta e Tratamento das Amostras.....	61
3.5.1. Amostras de Solo	61
3.5.2. Amostras de Água.....	62
3.6. Otimização dos Procedimentos de Extração dos Agrotóxicos	63
3.6.1. Solo	63
3.6.2. Água.....	64
3.7. Condições de Análise de Solo e Água por HPLC-DAD	64
3.8. Condições de Análise de Solo e Água por LC-ESI-MS/MS.....	65

3.8.1. Condições Cromatográficas	65
3.8.2. Otimização dos Parâmetros para Fragmentação dos Agrotóxicos no Espectrômetro de Massas	65
3.9. Determinação das Propriedades do Solo da Região de Mineiros/GO.	67
3.9.1. Determinação do Teor de Matéria Orgânica do Solo.....	67
3.9.2. Determinação do Teor de Carbono Orgânico	68
3.9.3. Determinação do pH do solo	68
3.9.4. Estudo da Adsorção e Dessorção de Agrotóxicos em Amostras de Solo.	68
3.10. Validação dos Métodos Desenvolvidos.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Otimização dos Procedimentos de Extração dos Agrotóxicos do Solo	74
4.2. Validação dos Métodos por HPLC-DAD para Determinação dos Agrotóxicos no Solo.....	75
4.3. Validação dos Métodos por LC-ESI-MS/MS para Determinação dos Agrotóxicos no Solo.....	83
4.4. Determinação das Propriedades Químicas do Solo da Região de Mineiros/GO.....	88
4.5. Estudo de Adsorção e Dessorção do Imazetapir e do Imazaquim em Amostras de Solo.....	88
4.6. Estudo de Adsorção e Dessorção do Nicossulfurom, Clorimurom-etil e Diflubenzurom em Amostras de Solo de Mineiros-GO	93
4.7. Validação do Método de Determinação de Agrotóxicos em Água Empregando HPLC-DAD.....	97
4.8. Validação do Método de Determinação de Agrotóxicos em Água Empregando LC-ESI-MS/MS	101
4.9. Aplicação dos Métodos Desenvolvidos e Validados	104
4.9.1. Análise de Amostras de Água por HPLC-DAD	104
4.9.2. Análise de Amostras de Água e Solo por LC-ESI-MS/MS.....	106
4.10. Comparação Entre os Métodos de Determinação dos Agrotóxicos em Solo e Água.....	109
4.10.1. Determinação dos Agrotóxicos em Solo.....	109
4.10.2. Determinação dos Agrotóxicos em Água.....	111

5. CONCLUSÕES	114
6. BIBLIOGRAFIA.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
APS	amina primária secundária
ASE	accelerated solvent extraction
ATRAZ	atrazina
BUS	extração por banho ultrassônico
CARBO	carbofuram
CE	Comunidade Européia
CID	collision-induced dissociation
CLOR	clorimurom-etil
CO	carbono orgânico
CV	coeficiente de variação
d.a.	dose de aplicação
DAD	diode array detector
DIFLU	diflubenzurom
EM	efeito de matriz
ESI	eletrospray ionization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FIMES	Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
FM	fase móvel
GC	gas chromatography
GUS	Groundwater Ubiquity Score
HPLC	high-liquid performance chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	International Conference on Harmonization
IMZA	imazaquim
IMZE	imazetapir
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	liquid chromatography

LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
LD	limite de detecção
LDI	limite de detecção do instrumento
LDM	limite de detecção do método
LINU	linurom
LLE	liquid-liquid extraction
LMR	limite máximo de resíduos
LQ	limite de quantificação
LQI	limite de quantificação do instrumento
LQM	limite de quantificação do método
MAE	microwave assisted extraction
MEC	extração por agitação mecânica
MIC	micro-ondas caseiro
MInd	micro-ondas industrial
MO	matéria orgânica
MRM	multiple-reaction monitoring
MS	mass spectrometry
NICO	nicossulfurom
PARA	Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PE	eficiência do processo
PI	pontos de identificação
PLE	pressurized liquid extraction
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RSD	relative standard deviation
SAG	sistema Aquífero Guarani
SANCO	Comission of the European Communities
SFE	supercritical fluid extraction
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction
TIC	total ion chromatogram
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa de vendas de agrotóxicos - 2007 <i>versus</i> 2008 (período: janeiro a outubro)	2
Tabela 2: Escala de mobilidade de agrotóxicos no solo	12
Tabela 3: Área e abrangência dos cinco maiores aquíferos.....	15
Tabela 4: Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários da Região Centro-Oeste - 1970/2006	18
Tabela 5: Modos de análise em MS/MS.....	35
Tabela 6: Relação de órgãos ou comitês de regulamentação e protocolos ou guias de validação.	38
Tabela 7: Valores aceitáveis de porcentagem de recuperação e CV em função da concentração.	47
Tabela 8: Propriedades químicas e físicas obtidas na literatura e concentração da dose de aplicação (d.a.) dos agrotóxicos estudados.	60
Tabela 9: Locais das coletas de solo.	61
Tabela 10: Locais e profundidade das coletas de água.	62
Tabela 11: Programação do gradiente utilizada na separação dos agrotóxicos empregando HPLC-DAD.	64
Tabela 12: Programação do gradiente utilizada na separação dos agrotóxicos empregando LC-ESI-MS/MS.....	65
Tabela 13: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, usando o modo de aquisição MRM, função 1, com janela de retenção de 0-4,5 min.....	66
Tabela 14: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, usando o modo de aquisição MRM, função 2, com janela de retenção de 4,5-5,7 min.....	66
Tabela 15: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo ESI-, para o modo de aquisição MRM, função 3, com janela de retenção de 5,7-10 min.....	67
Tabela 16: Concentrações dos agrotóxicos utilizadas nos experimentos de adsorção e dessorção.....	69
Tabela 17: Concentrações dos agrotóxicos utilizadas para a construção das curvas analíticas nos experimentos de adsorção e dessorção.....	70

Tabela 18: Técnicas de extração e análise cromatográfica utilizadas na validação dos métodos de determinação dos agrotóxicos em água e solo.	71
Tabela 19: Concentração dos agrotóxicos em função de LQI, utilizados para a construção das curvas analíticas.	71
Tabela 20: Recuperações e suas respectivas estimativas de desvio padrão (s) obtidas com as quatro técnicas de extração dos agrotóxicos do solo com concentração de 500 ng g ⁻¹	74
Tabela 21: Limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) obtidos para os agrotóxicos em solo empregando HPLC-DAD e a concentração da dose de aplicação (d.a).	77
Tabela 22: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em solo empregando HPLC-DAD.....	79
Tabela 23: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos extraídos do solo com as técnicas de extração: agitação mecânica (MEC), banho ultrassônico (BUS) e micro-ondas caseiro (MIC), empregando HPLC-DAD. Níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).	82
Tabela 24: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidades das curvas obtidas para os agrotóxicos em solo empregando LC-ESI-MS/MS. ...	85
Tabela 25: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos extraídos do solo através da MIC e analisados por LC-ESI-MS/MS; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).	87
Tabela 26: Propriedades químicas do solo estudado.....	88
Tabela 27: Valores dos coeficientes de Freundlich, K _f e 1/n, do coeficiente de correlação (r) e de K _d para o imazetapir e imazaquim.	90
Tabela 28: Valores de concentração e de porcentagens do imazetapir obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.....	92
Tabela 29: Valores de concentração e de porcentagens do imazaquim obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.....	92
Tabela 30: Valores dos coeficientes de K _d e K _{oc} , tempo de meia-vida e índice de GUS para o imazetapir e o imazaquim.	92
Tabela 31: Valores dos coeficientes de Freundlich, K _f e 1/n, dos coeficientes de correlação (r) e de K _d para o nicossulfurom e o clorimurom-etil.	95
Tabela 32: Valores de concentração e de porcentagens do nicossulfurom obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.....	96

Tabela 33: Valores de concentração e de porcentagens do clorimuirom-etil obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.....	96
Tabela 34: Valores dos coeficientes de K_d e K_{oc} , tempo de meia-vida e índice de GUS obtidos para o nicossulfurom e clorimuirom-etil.....	97
Tabela 35: Limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD.	98
Tabela 36: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD.	100
Tabela 37: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).....	101
Tabela 38: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em água empregando LC-ESI-MS/MS. ...	103
Tabela 39: Recuperações e precisão (repetitividade, n=5, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos em água empregando LC-ESI-MS/MS; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (100x LQM).	104
Tabela 40: Concentrações dos agrotóxicos encontradas nas amostras de água subterrâneas coletadas em 04/2009, nos pontos descritos na Tabela 10 e analisadas por LC-ESI-MS/MS.	107
Tabela 41: K_{oc} , $t_{1/2}$, d.a., índice de GUS e preço dos agrotóxicos.....	108
Tabela 42: Valores das figuras de mérito obtidas nas validações dos métodos para análise dos agrotóxicos em solo.	110
Tabela 43: Valores das figuras de mérito obtidas nas validações dos métodos para a determinação dos agrotóxicos em água.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação do volume de vendas de agrotóxicos (em milhões de reais) no Brasil, entre os anos de 2007 e 2008 (janeiro a outubro). ⁽⁶⁾	2
Figura 2: Vias de entrada dos agrotóxicos no ambiente aquático por aplicação direta ou por mobilização a partir de seu uso na agricultura. ⁽⁹⁾	4
Figura 3: Distribuição das águas na Terra. ^(46,47)	14
Figura 4: Mapa esquemático do SAG com destaque para áreas confinadas e áreas de afloramento ou recarga direta.	16
Figura 5: Quantidade de soja (ton) produzida no Brasil e nas regiões geográficas no período de 1990-2007. ⁽⁵⁵⁾	18
Figura 6: Quantidade de milho (ton) produzido no Brasil e nas regiões geográficas no período de 1990-2007. ⁽⁵⁵⁾	19
Figura 7: Quantidade de milho (ton) produzida nas principais Unidades de Federação em 2008. ⁽⁵⁶⁾	20
Figura 8: Estimativa da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas para 2009. ⁽⁵⁸⁾	21
Figura 9: a) Mapa mostrando a região das nascentes do Rio Araguaia, com área de estudo ressaltada no quadrinho e b) Ampliação da área ressaltada para visualização do Rio Araguaia. ⁽⁴⁸⁾	22
Figura 10: Esquema do instrumento triplo quadrupolo.	34
Figura 11: Estruturas dos agrotóxicos estudados.* Valores dos pKa indicados na Tabela 8....	55
Figura 12: Cromatogramas obtidos para (a) brancos do solo e (b) brancos do solo fortificados com os agrotóxicos na concentração de 1x LQM, extraídos por: MEC - Extração por agitação mecânica; BUS - Extração por banho ultrassônico e MIC - Micro-ondas caseiro e analisados por HPLC-DAD. Identificação dos picos: (1) Imazetapir, (2) Nicossulfurom, (3) Imazaquim, (4) Carbofuram, (5) Atrazina, (6) Linurom, (7) Clorimurom-etil e (8) Diflubenzurom. Condições cromatográficas: coluna analítica Novapak, C18, 150 x 3,9 mm e coluna de guarda, C18, 2,0 x 3,9 mm, 4 µm, Waters. Vazão: 0,8 mL min ⁻¹ , eluição por gradiente com FM acetonitrila:H ₂ O pH=3 (H ₃ PO ₄); volume de injeção: 10 µL; detecção: UV, 220 nm. Programação do gradiente: 20 % de acetonitrila por 2 min, de 2 a 8 min a acetonitrila aumentou linearmente até 50 % e foi mantida durante 7 min. Mudou-se linearmente para 70 % de acetonitrila durante 5 min. Em seguida, voltou à composição inicial (20 % de acetonitrila) durante 5 minutos, mantendo-a constante por 5 minutos.	75
Figura 13: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos.	76

Figura 14: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 0,8, 1, 2, 3, 5 e 12x o LQI, obtidas para o estudo do solo empregando HPLC-DAD.	78
Figura 15: Gráficos de resíduos das curvas do imazaquim e da atrazina.....	81
Figura 16: Cromatogramas obtidos para o branco do solo fortificado na concentração de 5 ng mL ⁻¹ com os agrotóxicos após a extração por MIC, empregando LC-ESI-MS/MS. Condições cromatográficas: coluna analítica Novapak, C18, 150 x 3,9 mm e coluna de guarda C18, 2,0 x 3,9 mm, 4 µm, Waters. Vazão: 0,7 mL min ⁻¹ , eluição por gradiente com FM acetonitrila:H ₂ O, 1 % de ácido acético; volume de injeção: 10 µL. Programação do gradiente: 60 % de acetonitrila por 2 min, de 2 a 6 min a acetonitrila aumentou linearmente até 90 %. Em seguida, voltou à composição inicial (60% de acetonitrila) de 6 a 10 min, mantendo-a constante por 5 minutos..	84
Figura 17: Curvas analíticas dos agrotóxicos, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 5, 12x o LQI obtidas para o estudo do solo, empregando LC-ESI-MS/MS.	86
Figura 18: Isotermas de adsorção e dessorção do imazetapir.	89
Figura 19: Isotermas de adsorção e dessorção do imazaquim.	89
Figura 20: Formas logarítmicas das isotermas de adsorção e dessorção: (a) Imazetapir e (b) Imazaquim.	89
Figura 21: Isotermas de adsorção e dessorção do nicossulfurom.....	94
Figura 22: Isotermas de adsorção e dessorção do clorimurom-etil	94
Figura 23: Formas logarítmicas das isotermas de adsorção e dessorção: (a) Nicossulfurom e (b) Clorimurom-etil.	94
Figura 24: Cromatogramas obtidos para os extratos de: (a) branco da água e (b) amostra de água fortificada com os agrotóxicos antes da extração: (1) Imazetapir, (2) Nicossulfurom, (3) Imazaquim, (4) Carbofuram, (5) Atrazina, (6) Linurom, (7) Clorimurom-etil, (8) Diflubenzurom, empregando HPLC-DAD. Condições cromatográficas descritas na Figura 12.	98
Figura 25: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 1, 2, 3, 5, 10 e 15 x o LQI, obtidas para o estudo em água empregando HPLC-DAD.	99
Figura 26: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 1, 1,6, 2, 3, 4, 5x o LQI, obtidas para o estudo da água empregando LC-ESI-MS/MS.....	102
Figura 27: Cromatogramas de extratos de águas coletadas em março de 2006 e de 2007, respectivamente, na profundidade de 1 m, nos pontos: A1 - Três Irmãos, A2 - Holândia e A3 - Graúna, analisados por HPLC-DAD. Condições cromatográficas descritas na Figura 12.	105

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, os agrotóxicos vêm desempenhando um papel fundamental para o aumento na produção e na qualidade dos alimentos, suprindo desta forma, a demanda da crescente população mundial. Os benefícios trazidos pelos agrotóxicos são indiscutíveis, a sua utilização é inevitável, e tendo em vista o cenário mundial atual, a tendência é o aumento do seu uso.

A utilização excessiva e sem acompanhamento técnico dos agrotóxicos são os fatores que se apresentam como um grande desafio. Seus resíduos passam a desempenhar, neste caso, um novo papel, o de poluentes e contaminantes que podem causar efeitos adversos ao meio ambiente e ao homem. De fato, estima-se que apenas 0,1 % do agrotóxico aplicado nas plantações atinja realmente o alvo definido, o restante entra gratuitamente no ambiente, contaminando o solo, a água e o ar. ⁽¹⁾

A água subterrânea representa aproximadamente 98 % da água potável disponível no planeta ⁽²⁾. Os agrotóxicos que são aplicados nas plantações depositam-se no solo e podem ser transportados para as águas subterrâneas e também para as superficiais, por meio de diversos mecanismos, evidenciando a importância da avaliação dos níveis de agrotóxicos nestes meios e também no solo.

O comportamento dos agrotóxicos no solo é governado por uma variedade de processos dinâmicos físicos, químicos e biológicos, incluindo a adsorção e dessorção, volatilização, degradação química e biológica, absorção pelas plantas, escoamento e lixiviação. Estes processos controlam diretamente o transporte dos agrotóxicos no solo e sua transferência para a água, o ar e os alimentos. A importância relativa destes processos varia com a natureza química dos agrotóxicos e com as propriedades do solo, mas dentre todos, a degradação e a adsorção são os processos determinantes. ^(1,3)

1.1. A utilização de Agrotóxicos no Brasil e no Mundo

Apesar das controvérsias, divergências e radicalizações de opiniões sobre o uso de agrotóxicos, verifica-se um constante aumento na sua utilização na agricultura brasileira e mundial. A Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, USEPA) catalogou, no ano de 2002, mais de 800 agrotóxicos que fazem parte da formulação de aproximadamente 21000 produtos diferentes. Em escala

mundial, a USEPA estimou que 2,5 bilhões de kg de agrotóxicos foram utilizados em 1997 ⁽⁴⁾. O consumo global de atrazina, um dos herbicidas mais utilizado, foi estimado em 70 milhões de kg ano⁻¹, sendo que 90 % desta quantidade foi utilizada em plantações de milho ⁽⁵⁾. No Brasil, o consumo de agrotóxicos cresce a cada ano, sendo que os herbicidas são os mais comercializados.

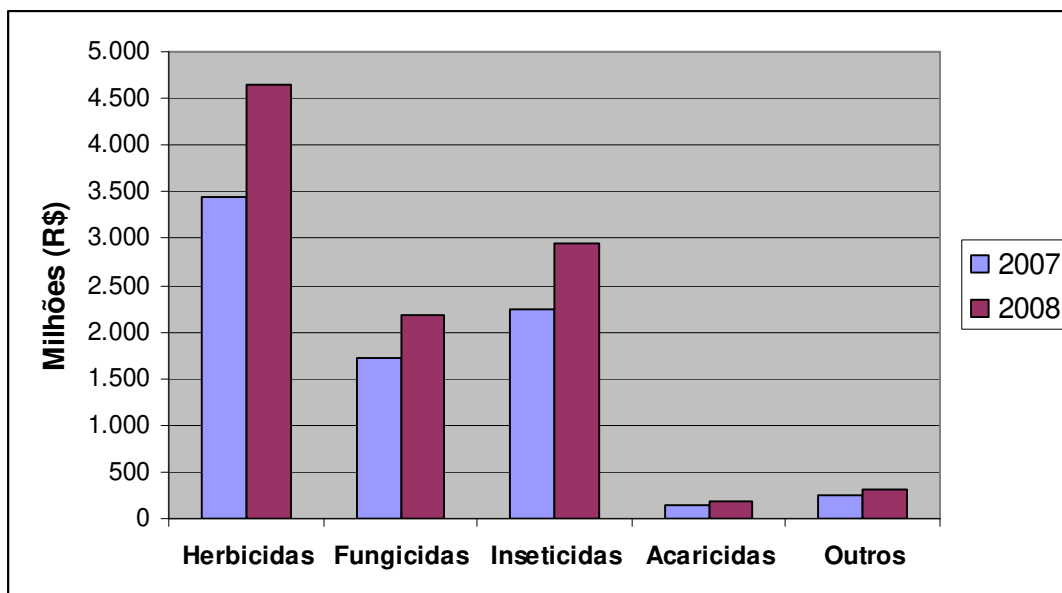


Figura 1: Comparação do volume de vendas de agrotóxicos (em milhões de reais) no Brasil, entre os anos de 2007 e 2008 (janeiro a outubro). ⁽⁶⁾

Na Figura 1 é apresentado o volume de vendas de agrotóxicos (em milhões de reais) no Brasil, nos anos de 2007 e 2008 (janeiro a outubro), indicando a participação expressiva dos herbicidas nesse volume de vendas, seguidos pelos inseticidas e fungicidas. ⁽⁶⁾

Tabela 1: Estimativa de vendas de agrotóxicos - 2007 *versus* 2008 (período: janeiro a outubro)

Segmentos	MERCADO (Milhões R\$)		
	2007	2008	Variação (%)
Herbicidas	3.446	4.643	35
Fungicidas	1.728	2.173	26
Inseticidas	2.244	2.944	31
Acaricidas	146	176	21
Outros	257	309	20
TOTAL	7.821	10.246	31

As vendas de agrotóxicos de janeiro a outubro de 2008, comparadas ao mesmo período de 2007, apresentaram um crescimento acumulado de 31 %, totalizando um mercado de R\$ 10.246 milhões, como é mostrado na Tabela 1. No segmento de herbicidas o aumento foi de 35 %. ⁽⁶⁾

O Brasil atingiu em 2008, a maior área plantada com sementes transgênicas, com quase sua totalidade ocupada por plantas tolerantes a herbicidas e supunha-se que a adoção de sementes transgênicas permitiria uma redução no uso de agrotóxicos. Entretanto, segundo divulgado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2008, o Brasil tornou-se, o maior consumidor mundial de agrotóxicos (733,9 milhões de toneladas), ultrapassando os Estados Unidos (646 milhões de toneladas). Em 2007, as vendas no Brasil significaram 5.372 bilhões de dólares e em 2008, 7.125 bilhões. A cultura que mais consome agrotóxico é a da soja. No total, os herbicidas representam cerca de 45 % das vendas, os inseticidas, 29 %, e os fungicidas, 21 %. ⁽⁷⁾

O Brasil destaca-se no mercado mundial de agrotóxicos também por ser um dos poucos países onde são produzidos e importados agrotóxicos contendo princípios ativos proibidos em diversos países do mundo, como a União Européia, Estados Unidos, Canadá, Japão e China. Em alguns casos, o Brasil importa princípios ativos que foram proibidos até mesmo nos países em que são produzidos. Em 2008, a ANVISA, órgão que regulamenta a utilização de agrotóxicos no Brasil, anunciou a reavaliação de 14 ingredientes ativos proibidos internacionalmente (utilizados em mais de 200 agrotóxicos), entretanto, uma série de ações judiciais movidas pelas indústrias de agrotóxicos impediu esta reavaliação. Dentre os princípios ativos que seriam reavaliados estavam o carbofuram, acefato, endossulfam e glifosato, amplamente utilizados no país. ⁽⁸⁾

1.2. Contaminação de Solo e Água por Agrotóxicos

As águas superficiais e subterrâneas podem ser contaminadas pelos agrotóxicos por meio de diversos mecanismos, como é mostrado na Figura 2 ⁽⁹⁾. A contaminação direta é resultante do controle de ervas aquáticas, despejo de efluentes industriais e esgotos municipais. A contaminação indireta é devida à movimentação dos agrotóxicos após a sua aplicação no solo ou em uma plantação. Neste caso, a contaminação das águas superficiais pode ocorrer através do transporte de vapor e de poeira, da precipitação, escoamento superficial dos

agrotóxicos pela água da chuva, lavagem dos materiais usados durante a aplicação dos agrotóxicos ou ainda pelo descarte inadequado de embalagens usadas.

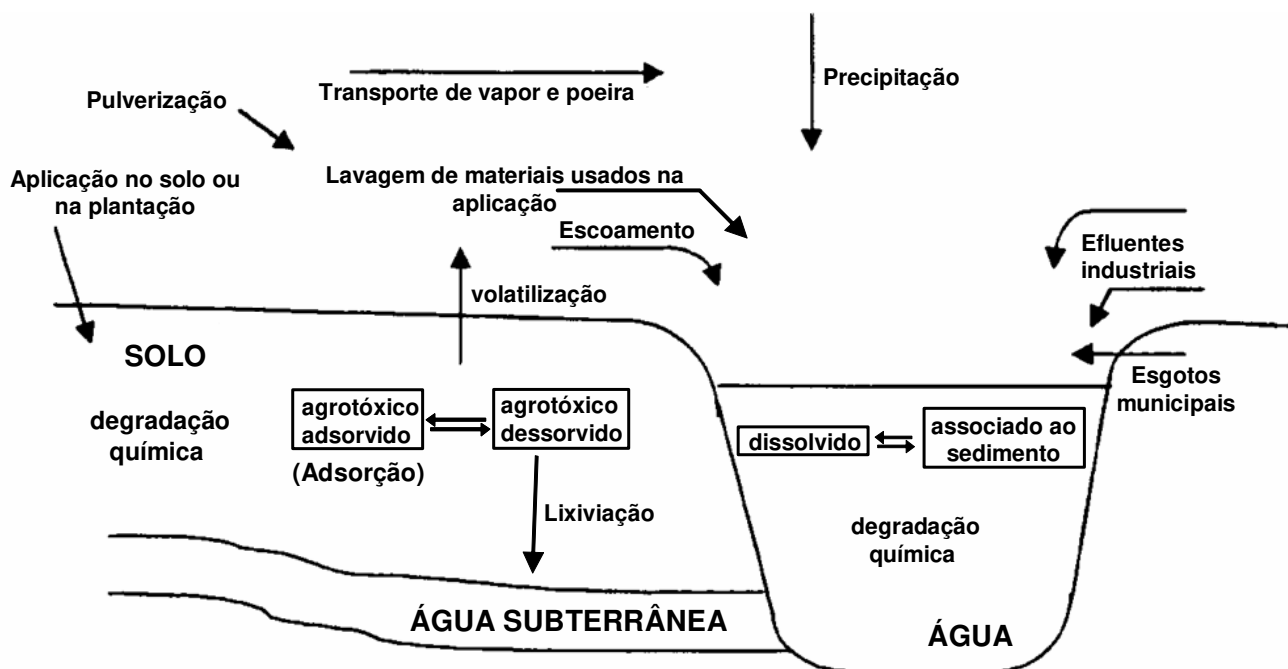


Figura 2: Vias de entrada dos agrotóxicos no ambiente aquático por aplicação direta ou por mobilização a partir de seu uso na agricultura. ⁽⁹⁾

Na água superficial, os agrotóxicos podem simplesmente continuar dissolvidos ou serem adsorvidos pelos sedimentos, o que pode representar uma fonte de contaminação a longo prazo. Os agrotóxicos dissolvidos na água são passíveis de degradarem por fatores químicos, biológicos ou físicos, ou permanecer na sua forma original, disponíveis para os peixes e outros organismos aquáticos, podendo dessa forma, ocorrer bioconcentração ou bioacumulação.

A degradação de um agrotóxico resulta em alterações em sua estrutura química. Um ou mais compostos novos são produzidos e o composto original desaparece. O ideal seria que a degradação resultasse em espécies inorgânicas como água, dióxido de carbono e íons como o cloreto. Entretanto, geralmente, os compostos resultantes são intermediários estáveis, que podem ter um impacto negativo sobre o meio ambiente se forem mais tóxicos que a molécula original. A degradação química pode se dar através de reações de hidrólise e de oxi-redução, sendo estas as mais comuns, dentre outras. A biodegradação é o termo usado para as reações mediadas biologicamente. Neste caso, microorganismos como fungos, algas e bactérias são os

agentes causadores das reações químicas. Na fotólise as reações químicas são induzidas pela luz solar. ⁽¹⁰⁾

A bioconcentração ocorre quando os agrotóxicos persistentes acumulam-se nos organismos vivos (vegetais ou animais). O termo mais restrito, bioacumulação, serve para designar a acumulação de agrotóxicos em organismos vivos, que posteriormente serão consumidos pelo homem (por exemplo, peixes e algas). Moléculas hidrofóbicas, com baixa solubilidade em água e que apresentam afinidade por lipídios e solventes apolares vão interagir com a gordura dos tecidos, particularmente com as dos órgãos que ficam em contato com os fluidos aquosos, como o fígado, por exemplo ⁽¹¹⁾. Mesmo em concentrações muito baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas espécies de organismos que podem concentrá-los várias vezes.

Ao serem aplicados em uma plantação ou diretamente no solo, uma parte dos agrotóxicos que se deposita no solo pode sofrer degradação devido a fatores químicos, biológicos e físicos como os citados e podem também volatilizar. A outra parcela dos agrotóxicos aplicados pode adsorver às partículas do solo e continuar neste estado ou desorver e lixiviar para as camadas mais profundas do solo, podendo alcançar e contaminar as águas subterrâneas.

Os processos de adsorção e desorção tem um papel fundamental na dinâmica de transporte, persistência, transformação e bioacumulação dos agrotóxicos no solo. A extensão da adsorção de um composto ao solo irá influenciar sua biodisponibilidade, degradação e lixiviação e, portanto, possível contaminação de águas subterrâneas.

1.3. Solo

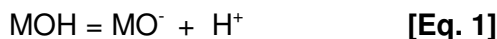
O solo é um sistema de três fases com componentes sólidos, líquidos e gasosos. A fase sólida inclui compostos orgânicos e inorgânicos e representa aproximadamente 50 % do volume total. Destes 50 %, aproximadamente 95 % é de material mineral e os outros 5 % de matéria orgânica (MO). O restante é composto por ar e água. A proporção desta composição varia de acordo com o material de origem, aspectos climáticos e profundidade. ⁽¹²⁾

Os componentes da parte orgânica do solo vão desde moléculas orgânicas simples (como ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos) até polímeros complexos (substâncias húmicas) resultantes da decomposição de plantas, animais e biomassa microbiana. As substâncias húmicas são definidas como sendo um material macromolecular e heterogêneo,

ativo física e quimicamente, e resistentes à biodegradação. Este material representa a maior associação de carbono orgânico da superfície da Terra e é composto de uma mistura de macromoléculas, para a qual ainda não foi possível estabelecer modelos estruturais estequiométricos. A proposta de uma estrutura básica para estas substâncias tem sido objeto de várias investigações, sem que se tenha obtido uma configuração definitiva, bem aceita. Embora estejam em baixas concentrações no solo, as substâncias húmicas tem um papel determinante no solo, pois agem como uma fonte contínua de nutrientes e como um conjunto de colóides orgânicos que regulam o processo de nutrição das plantas, controlando também a mobilidade de íons tóxicos e a umidade do solo. As substâncias húmicas podem ser classificadas em três frações, de acordo com a sua solubilidade: ácidos húmicos e fúlvicos, e humina. Apesar de não terem uma estrutura definida, sabe-se que os ácidos húmicos e fúlvicos apresentam uma alta concentração de grupos polifenólicos e carboxilas (COOH). Estes grupos são de grande importância, pois apresentam cargas negativas, dependendo do pH, as quais influenciam as reações de trocas catiônicas no solo. A matéria orgânica também contém sítios com cargas positivas atribuídos predominantemente aos grupos NH_2 e NH aromáticos. Além disso, o ácido húmico apresenta também caráter hidrofóbico considerável, atribuído às cadeias de hidrocarbonetos alifáticos.⁽¹²⁾

A fase líquida do solo é composta pela mistura de água, sais minerais e moléculas de baixa massa molar como aminoácidos, peptídeos, açúcares e substâncias húmicas nela dissolvidas, e a essa mistura dá-se o nome de solução do solo.

A fração mineral do solo é separada em três partes que são classificadas de acordo com o tamanho das partículas: argila (partículas menores que 0,002 mm), sedimentos (0,002-0,05 mm) e areia (maiores que 0,05 mm). No sedimento e na areia, os minerais mais importantes são o quartzo, o feldspato, a mica, a calcita e a gipsita. A argila apresenta uma área superficial grande e com carga eletrônica, por isso funciona como sítio de muitas reações químicas que ocorrem no solo. Os principais componentes da argila são os minerais filossilicatos e óxidos de ferro, manganês, alumínio e de silício. Os óxidos de ferro e de alumínio, característicos de regiões muito intemperizadas como as tropicais, são importantes na fração argila dos solos brasileiros, apresentando influência significativa nas propriedades destes solos, como a adsorção de íons e moléculas, agregação do solo e comportamento redox. A adsorção à superfície destes óxidos ocorre através dos grupos M-OH , cujas propriedades ácido-base influenciam a natureza da ionização, como é representado pelas Equações 1 e 2:



Os óxidos ficam com carga negativa ou positiva, por dissociação ou associação de H^+ , respectivamente, dependendo do pH da solução em que se encontram. O equilíbrio da Eq. 1 é deslocado para a direita (superfície mais negativa) pela perda de prótons H^+ , isto é, quando há um aumento de pH. O aumento da concentração de H^+ , isto é, diminuição do pH resulta em uma superfície com carga positiva (Eq. 2). Existe um valor de pH no qual as concentrações de MOH_2^+ e MO^- são equivalentes, resultando em uma superfície de carga zero, e este valor é chamado de ponto de carga zero (pH_{PCZ}). Os valores aproximados de pH_{PCZ} para os óxidos de ferro e de alumínio, são de 7 e de 9, respectivamente. Desta forma, abaixo destes valores, há um predomínio de cargas positivas nas superfícies destes dois óxidos. ⁽¹²⁻¹⁴⁾

1.4. Adsorção e Dessorção de Agrotóxicos em Solo

Os mecanismos que promovem a adsorção de um agrotóxico no solo podem ser físicos ou químicos. A adsorção física é resultante das forças de van der Waals entre as moléculas neutras e os colóides do solo. A adsorção química é resultante de interações eletrostáticas entre o solo e as moléculas de agrotóxicos com cargas opostas. ⁽¹⁵⁾

O processo de adsorção pode variar de reversibilidade completa até totalmente irreversível. A sua extensão depende das propriedades do solo e da molécula. Em relação ao solo, estas propriedades incluem a quantidade de MO, carbono orgânico (CO), argila e óxidos metálicos e pH do solo. As propriedades do composto que podem influenciar no processo de adsorção incluem tamanho, forma, configuração, estrutura molecular, grupos funcionais, solubilidade, polaridade, polarizabilidade, distribuição de cargas das espécies que estão interagindo e natureza ácido-base da molécula do agrotóxico. Em geral, somente uma ou duas destas propriedades, tanto do solo quanto das moléculas serão determinantes nos processos de adsorção e dessorção. ⁽¹⁶⁾

O teor de MO é um dos fatores mais importantes na adsorção de compostos neutros ou catiônicos no solo. Para a maioria destes compostos, a quantidade adsorvida está diretamente relacionada ao conteúdo de CO no solo ^(1,15). Esta relação foi demonstrada em diversos trabalhos na literatura, independente do solo estudado ⁽¹⁷⁻²⁶⁾. Alguns estudos mostraram que os ácidos húmicos, principais constituintes da matéria orgânica, são os principais sítios de sorção

para compostos apolares ^(27,28). Barriuso *et al.* propuseram que os ácidos húmicos seriam responsáveis por 70 % da capacidade de sorção para a atrazina. ⁽²⁷⁾

A adsorção de moléculas aniônicas, como por exemplo, ácidos orgânicos fracos, por sua vez é altamente afetada pelo pH do solo ⁽²⁹⁾. Isto em parte é devido ao equilíbrio ácido-base do composto, mas também devido aos efeitos do pH em outras propriedades do solo, como a carga elétrica e a força iônica ⁽¹⁾. Em geral, para a maioria dos solos, a adsorção diminui com o aumento do pH. Quanto aos compostos, esta dependência em relação ao pH do solo deriva das diferentes proporções das formas iônicas e neutras da molécula que está presente em um determinado pH ⁽³⁰⁾. Em valores de pH maiores que o seu pKa, os herbicidas ácidos existem predominantemente na forma aniônica e são repelidos pelos colóides do solo que têm cargas negativas. Conforme o pH do solo vai diminuindo, a concentração da forma molecular aumenta, podendo existir uma interação, devido às forças de van der Waals. ⁽³¹⁾

Em um estudo feito com 58 solos, a adsorção de um herbicida neutro, um catiônico e outro aniônico foi relacionada com alguns tipos de solos e concluiu-se que a adsorção é fortemente dependente do estado eletrônico das moléculas dos herbicidas. Os solos cobriam uma faixa ampla de valores de pH, teores de CO e de composição mineralógica. Os herbicidas utilizados foram atrazina, terbutrina e 2,4-D. Estes herbicidas, já bem estudados na literatura, foram selecionados como modelos de moléculas neutras, catiônicas e aniônicas. Na faixa de pH dos solos estudados (4,6-8,1), a atrazina (pKa=1,7) se encontrava na forma neutra, o 2,4-D (pKa=2,6) na forma aniônica e a terbutrina (pKa=4,4) tanto na forma neutra quanto na catiônica. Neste estudo os autores concluíram que a adsorção da atrazina encontrava-se fortemente correlacionada com o teor de CO do solo, mas era independente do pH. A adsorção da terbutrina relacionou-se pouco com o teor de CO e mostrou alguma correlação com o pH do solo. Quanto ao 2,4-D, sua adsorção aumentou conforme o pH do solo diminuiu, como se esperava, e não houve correlação com o teor de CO do solo. ⁽³²⁾

Boivin *et al.* ⁽²¹⁾ correlacionaram a adsorção da trifluralina e da bentazona com a solubilidade destes compostos em água, que são de 0,221 e 570 mg L⁻¹ (pH 7, 22 °C), respectivamente. A trifluralina apresentou alta adsorção nos 13 tipos de solos estudados, o que foi atribuído pelos autores à sua natureza hidrofóbica, enquanto que a adsorção da bentazona foi baixa devido à sua alta afinidade pela fase líquida, independente do pH e do teor de MO dos solos. Neste mesmo estudo, o 2,4-D apresentou adsorção considerável em todos os solos estudados, apesar de apresentar alta solubilidade em água, indicando que outros fatores como o pH e teores de óxidos são determinantes na adsorção deste composto. ⁽²¹⁾

Outros constituintes do solo, incluindo a quantidade de óxidos de ferro e de alumínio, também devem ser considerados ao se estudar a sorção de compostos aniônicos ^(1,33,34). Os óxidos de Fe e Al mostraram uma forte influência na adsorção do herbicida imazaquim em solos com baixos teores de CO. Comparações entre a adsorção do imazaquim em solos com cargas permanentes e variáveis indicaram que o fator principal na adsorção era a partição hidrofóbica. Entretanto, em solos com carga positiva, contendo os óxidos citados, houve uma adsorção expressiva do imazaquim, devido à troca iônica, particularmente em solos com baixos teores de CO ⁽¹³⁾. Em outro estudo, a adsorção do ácido fraco nicossulfurom também mostrou forte correlação com a quantidade de Fe e Al ⁽³⁵⁾. A adsorção de ácidos orgânicos nos óxidos do solo também se mostra dependente do pH, pois quanto menor for o pH, maior vai ser a carga positiva na superfície dos óxidos, e esta carga é responsável pela adsorção das formas aniônicas dos ácidos.

Os processos de adsorção e dessorção são dinâmicos e as moléculas de agrotóxico são continuamente transferidas entre a solução e a superfície do solo. Uma forma de se estudar este processo é relacionando-se a concentração de equilíbrio do composto no solo e a sua concentração na solução em uma dada temperatura, gerando desta forma, isotermas de adsorção e dessorção.

1.5. Isotermas de Adsorção e Dessorção

Quando uma solução contendo o agrotóxico é colocada em contato com o solo, moléculas do soluto são aderidas na superfície das partículas do solo e um equilíbrio dinâmico é estabelecido entre as duas fases (solução e solo). As isotermas de adsorção e dessorção descrevem as relações no equilíbrio entre estas duas fases e, dessa forma, possibilitam a quantificação da adsorção dos agrotóxicos no solo.

Os métodos para se construir as isotermas de adsorção podem ser diretos ou indiretos. Ambos requerem o equilíbrio de soluções aquosas do agrotóxico em concentrações inicialmente conhecidas com as amostras de solo. O método direto envolve a quantificação da substância em solução e da adsorvida pelos colóides do solo. Após o equilíbrio, a quantidade adsorvida é retirada do solo por uma mistura de solventes adequada e é quantificada diretamente. No método indireto, por sua vez, mede-se apenas o agrotóxico em solução. A quantidade adsorvida é calculada indiretamente pela diferença entre aquela adicionada e a remanescente em solução. ⁽¹²⁾

O método indireto mais comum para a quantificação da sorção é o método de equilíbrio em partição. Esse método consiste em se agitar a mistura solo-solução contendo o agrotóxico por tempo suficiente até que se atinja o equilíbrio aparente do sistema. As variáveis experimentais que devem ser previamente estabelecidas incluem a relação solo-solução, temperatura, material utilizado e a natureza da agitação. Essas variáveis não são padronizadas e podem ter efeito significativo nos resultados. No método de equilíbrio em partição a quantidade de agrotóxico adsorvida no solo, para cada concentração estudada é determinada utilizando-se a Equação 3: ^(18,30)

$$x/m = v/m (C_p - C_e) \quad \text{[Eq. 3]}$$

onde:

x/m = quantidade de agrotóxico adsorvido por grama de solo ($\mu\text{g g}^{-1}$);

v = volume da solução de agrotóxico adicionada (mL);

m = massa de solo (g);

C_p = concentração de agrotóxico na solução padrão adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_e = concentração de agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

As isotermas de adsorção são construídas relacionando a quantidade de agrotóxico adsorvido com as suas respectivas concentrações em equilíbrio com o solo. A relação entre estes dois termos é representada pelo coeficiente de distribuição K_d que reflete a distribuição ou partição de uma espécie entre as fases líquida e sólida. Na literatura vários modelos matemáticos são descritos para representar este equilíbrio. ⁽³⁶⁾

A adsorção de um composto pode ser representada por isotermas lineares de adsorção quando o coeficiente entre x/m e C_e resulta no mesmo valor para todos os pontos da isoterma. Neste caso, uma linha reta no gráfico de adsorção implica que o processo de adsorção não é afetado pela concentração do soluto e a superfície do solo tem capacidade infinita para a adsorção. Isto também pode ocorrer quando se estuda uma faixa estreita de concentrações, na qual não se atinge a capacidade máxima de adsorção do solo. ⁽³⁷⁾

As isotermas lineares de adsorção são apropriadas para espécies em baixa concentração, mas não são apropriadas em concentrações altas, quando os sítios da superfície do sólido são completamente preenchidos. ⁽³⁷⁾

As isotermas lineares não são encontradas com frequência, exceto para alguns cátions, metais pesados e herbicidas em baixas concentrações. Isotermas que exibem comportamento

de retenção não-linear ou curva geralmente são as que se ajustam melhor para a maioria dos compostos. ⁽¹²⁾

Diversos autores têm descrito a adsorção dos agrotóxicos no solo por meio da isoterma de Freundlich, representada pela Equação 4: ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

$$x/m = K_f C_e^{1/n} \quad \text{[Eq. 4]}$$

sendo a forma logarítmica desta equação dada por:

$$\log x/m = \log K_f + (1/n) \log C_e \quad \text{[Eq. 5]}$$

onde:

x/m = quantidade de agrotóxico adsorvido no solo ($\mu\text{g g}^{-1}$);

K_f = coeficiente de adsorção;

$1/n$ = grau de linearidade da adsorção;

C_e = concentração do agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os parâmetros da equação de Freundlich são determinados através da curva $\log x/m$ versus $\log C_e$, a qual resulta em uma reta com inclinação igual a $1/n$ e intercessão igual a $\log K_f$.

O valor de $1/n$ pode ser interpretado como uma medida da grandeza e da diversidade das energias associadas a um processo de adsorção em particular. Um valor de $1/n$ igual a 1 indica uma adsorção linear, ou seja, sítios de adsorção com a mesma energia, e a adsorção ocorre com baixa dependência da concentração do soluto na solução do solo.

Quando $1/n$ é próximo de 1 em uma determinada faixa de concentração estudada, C_e é proporcional a x/m e o coeficiente entre eles (K_d) resulta em valores próximos entre si para todos os pontos da isoterma. Neste caso, é possível fazer uma aproximação, considerando o intervalo como sendo linear e, dessa forma, estimar o valor de K_d . Em uma isoterma linear, o valor de K_d é a própria inclinação da curva x/m versus C_e .

Quando $1/n$ é maior que 1, a energia de adsorção das margens aumenta conforme a concentração de moléculas adsorvidas à superfície do solo aumenta. Isto ocorre quando a adsorção das moléculas modifica a superfície adsorvente, favorecendo futuras adsorções. Um valor de $1/n$ menor que 1 ocorre quando a energia de sorção das margens diminui com o aumento da concentração de moléculas adsorvidas, isto é, o aumento na concentração adsorvida do agrotóxico torna mais difícil a adsorção de moléculas adicionais. Este caso pode

ocorrer quando os sítios de adsorção são preenchidos e os sítios restantes são menos atrativos para as moléculas ainda disponíveis para adsorver. ⁽³³⁾

Os valores de K_f e K_d podem ser considerados como uma primeira aproximação para caracterizar a capacidade de adsorção do agrotóxico nos diferentes tipos de solo.

O K_d dos compostos hidrofóbicos ou não-iônicos é geralmente proporcional à quantidade de carbono orgânico do solo e esta relação é representada pelo coeficiente de distribuição normalizado para o teor de carbono orgânico, como mostra a Equação 6:

$$K_{oc} = \frac{K_d}{F_{oc}} \quad [\text{Eq. 6}]$$

onde:

F_{oc} = fração de carbono orgânico no solo (= %CO/100)

Esta relação é válida quando F_{oc} é maior que 0,001. Valores de F_{oc} menores que este indicam que a adsorção é determinada predominantemente pelos compostos inorgânicos presentes no solo estudado ⁽³⁷⁾. Enquanto K_d pode variar bastante em diferentes solos, K_{oc} sempre difere menos. A expressão de K_d em termos de K_{oc} resulta em valores relativamente constantes para o mesmo composto em diferentes solos ⁽⁴¹⁾. Contudo, quando o conteúdo de carbono orgânico é baixo, a variabilidade em K_{oc} pode ser mais alta. ⁽⁴²⁾

Os valores de K_{oc} são frequentemente utilizados como sendo medidas do potencial de mobilidade dos agrotóxicos no solo. Quanto maior o valor de K_{oc} , mais retido o agrotóxico ficará no solo e menor será seu potencial de lixiviação. Na Tabela 2 é mostrada uma escala de mobilidade baseada no valor de K_{oc} . As classificações mostradas nesta tabela foram baseadas em diversas medidas com vários agrotóxicos em solos diferentes. ⁽¹¹⁾

Tabela 2: Escala de mobilidade de agrotóxicos no solo

K_{oc} (mL g ⁻¹)	Mobilidade
>5000	Imóvel
2000-5000	Baixa
500-2000	Razoável
150-500	Média
50-150	Alta
0-50	Muito alta

Por muitos anos, a mobilidade dos agrotóxicos foi considerada como sendo o fator mais importante nos estudos de contaminação de águas subterrâneas. Entretanto, somente a mobilidade não é um fator suficiente para isso, deve-se considerar também a persistência do agrotóxico que determinará quando este será degradado durante o seu período de residência nas camadas do solo próximas às águas subterrâneas. O termo utilizado para expressar a persistência é o tempo de meia-vida, $t_{1/2}$, o qual é definido como sendo o tempo necessário para que metade da quantidade do agrotóxico presente ou depositada no solo seja dissipada. ^(12,43)

Vários autores têm proposto métodos de seleção para verificar se um agrotóxico é potencialmente lixiviável para águas subterrâneas. O índice Groundwater Ubiquity Score (GUS), ou índice de GUS, desenvolvido por Gustafson, tem sido utilizado como a primeira etapa em abordagem de aproximações sucessivas para especificar quais produtos deveriam merecer estudos mais aprofundados de lixiviabilidade ⁽⁴⁴⁾. O índice de GUS é calculado de acordo com a Equação 7: ^(41,43,45)

$$\text{GUS} = \log(t_{1/2} \text{ solo}) \times (4 - \log(K_{oc})) \quad [\text{Eq. 7}]$$

onde:

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida do composto no solo.

K_{oc} = coeficiente de adsorção à matéria orgânica no solo.

O cálculo do índice de GUS foi baseado na análise de um conjunto de dados consistentes de degradação, tempo de meia-vida e K_{oc} em campo, obtidos para compostos que foram classificados de acordo com a sua lixiviabilidade. A partir deste estudo, concluiu-se que: compostos com índice de GUS > 2,8 apresentam grande tendência em lixiviar, enquanto que compostos com índice de GUS < 1,8 não foram detectados em água subterrânea. Compostos com valores entre 1,8 e 2,8 podem ou não lixiviar. ⁽¹¹⁾

1.6. Águas Subterrâneas no Brasil e no Mundo

Estima-se que o volume total de água na Terra seja de 1.386 milhões de km³. A distribuição volumétrica de água dos principais reservatórios da Terra pode ser visualizada na Figura 3.

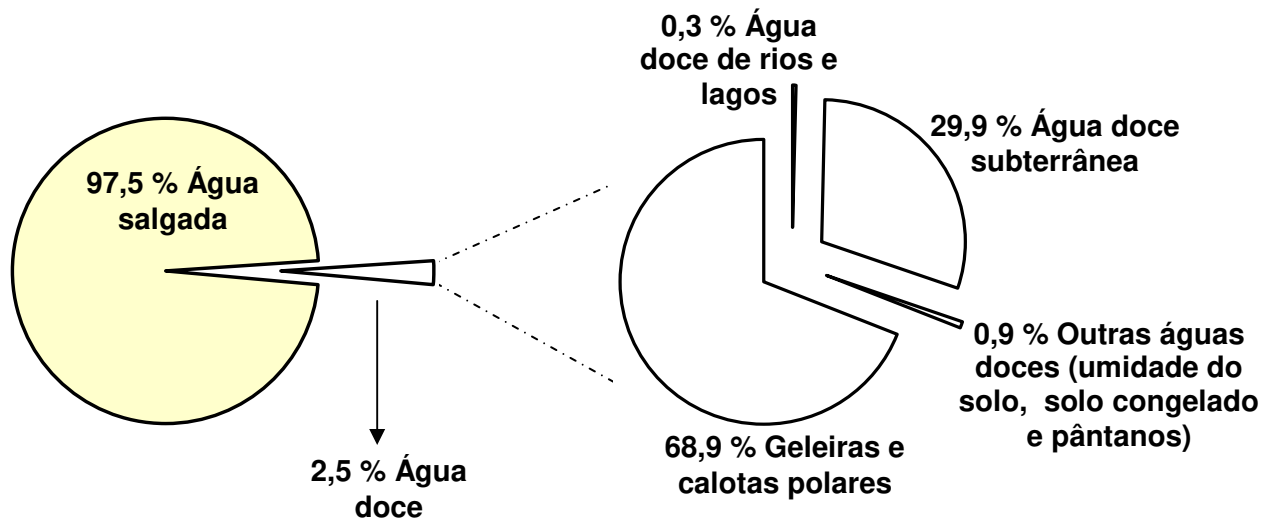


Figura 3: Distribuição das águas na Terra. ^(46,47)

Observa-se na Figura 3, que 97,5% do volume total é de água salgada e somente 2,5 % de água doce. A maior parcela de água doce (68,9 %) está na forma de gelo e neve na Antártica, no Ártico e em regiões montanhosas. As águas subterrâneas representam 29,9 %. Somente 0,3 % do total de água doce da Terra está concentrado em lagos e rios que são os mais acessíveis economicamente. ^(46,47)

Atualmente, a demanda por água doce potável no mundo vem se tornando cada vez maior em consequência do crescimento populacional e, neste cenário, as águas subterrâneas vão se tornando cada vez mais importantes como fonte de abastecimento seguro para o uso doméstico, industrial e agrícola.

No Brasil, 61 % da população é abastecido por águas subterrâneas para fins domésticos. Importantes cidades do País dependem integral ou parcialmente da água subterrânea para abastecimento, como por exemplo: Ribeirão Preto, SP; Mossoró e Natal, RN e Maceió, AL, dentre outras. No Maranhão, mais de 70 % das cidades são abastecidas por águas subterrâneas, ao passo que em São Paulo e no Piauí esse percentual chega a 80 %. ⁽⁴⁸⁾

Um aquífero ou sistema aquífero é definido como sendo uma formação geológica que pode armazenar e transmitir quantidade significativa de água subterrânea entre os seus poros ou fissuras ⁽⁴⁹⁾. Na Tabela 3 estão relacionados os cinco aquíferos mais importantes do mundo e sua abrangência. ⁽⁴⁶⁾

Tabela 3: Área e abrangência dos cinco maiores aquíferos

Aquífero	Abrangência	Área (km²)
Arenito Núbia	Líbia, Egito, Chade e Sudão	2 milhões
Grande Bacia Artesiana	Austrália	1,7 milhões
Guarani	Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai	1,2 milhões
Bacia Murray	Austrália	297 mil
Kalahari/Karoo	Namíbia, Botsuana, África do Sul	135 mil

Como pode ser observado na Tabela 3, a América do Sul possui um dos maiores aquíferos do mundo. O Sistema Aquífero Guarani (SAG) cobre uma superfície de quase 1,2 milhões de km² e está inserido na Bacia Geológica Sedimentar do Paraná. Sua maior parte está localizada em território brasileiro (839.800 km²). No entanto, uma considerável porção localiza-se na Argentina (225.500 km²), havendo ainda partes no Uruguai (58.500 km²) e no Paraguai (71.700 km²). A Figura 4 mostra um mapa esquemático do SAG, destacando as áreas confinadas e as áreas de afloramento ou recarga direta. ⁽⁴⁸⁾

O SAG constitui a principal reserva de água subterrânea da América do Sul, com um volume estimado em 46 mil km³. A população atual em sua área de ocorrência está estimada em aproximadamente 29,9 milhões de habitantes. Nas áreas de recarga direta ou afloramento, a população é de cerca de 3,7 milhões de pessoas (12,5 % do total). ⁽⁴⁸⁾

A água do SAG é de excelente qualidade em diversos locais, principalmente nas áreas de afloramento e próximo a elas, onde é baixa a possibilidade de enriquecimento da água em sais e em outros compostos químicos.

Nas diferentes regiões onde ocorre o SAG, seja no Brasil, no Paraguai ou Uruguai, a diversificação de uso e de manejo têm sido muito grandes em suas áreas de recarga direta, exibindo porções com uso agrícola intenso, pastagens, áreas ainda cobertas por vegetação nativa e áreas degradadas, a exemplo do que ocorre no Rio Grande do Sul. O interesse em se conhecer melhor a ocupação das áreas de afloramento do SAG é decorrente da fragilidade que elas oferecem em relação ao uso agrícola e, conseqüentemente, da possibilidade de lixiviação de produtos químicos até a zona saturada. Acrescenta-se a esse fato, a demanda crescente por

água subterrânea, uma vez que as águas de superfície exigem custos elevados de tratamento para o consumo humano.

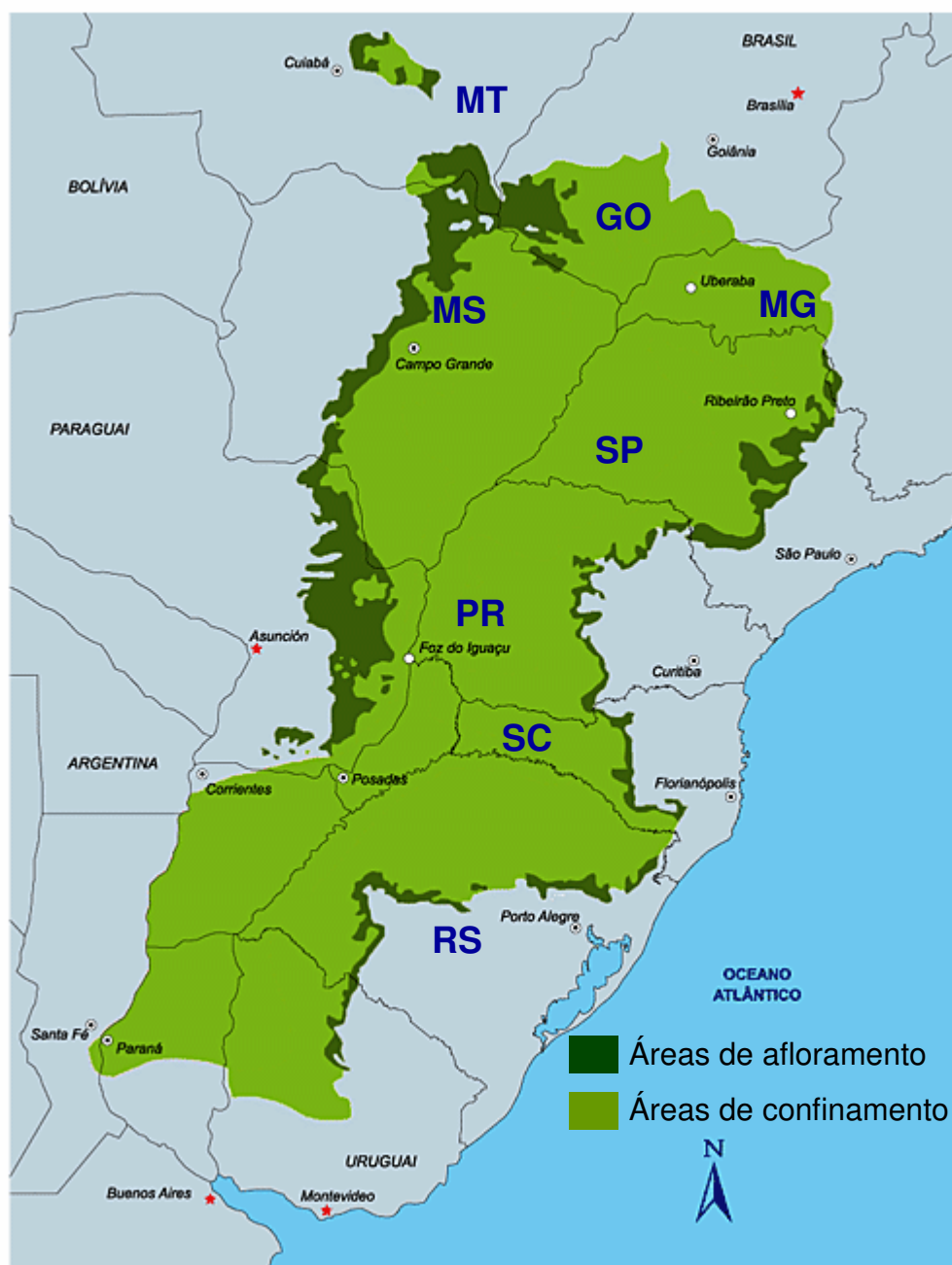


Figura 4: Mapa esquemático do SAG com destaque para áreas confinadas e áreas de afloramento ou recarga direta.

Trabalhos realizados pela Embrapa Meio Ambiente nessas áreas, particularmente na região de Ribeirão Preto, SP, evidenciaram que as atividades agrícolas utilizam uma carga considerável de produtos químicos contaminantes, destacando-se alguns agrotóxicos utilizados intensivamente na cultura de cana-de-açúcar. Tais estudos possibilitaram uma avaliação do nível de comprometimento das práticas agrícolas, não só com a conservação do solo, mas também com o risco de contaminação da água subterrânea por moléculas orgânicas, principalmente herbicidas. ⁽⁵⁰⁻⁵³⁾

Outras regiões de recarga do Aquífero Guarani, como por exemplo, nos estados de Goiás (culturas de milho e de soja), Mato Grosso (cultura de soja), Mato Grosso do Sul (cultura de soja), Paraná (cultura de milho), Santa Catarina (cultura de maçã) e Rio Grande do Sul (cultura de arroz), exibem cenários de risco potencial de contaminação da água subterrânea. ⁽⁴⁸⁾

1.7. O Cultivo de Soja e Milho na Região Centro-Oeste do Brasil

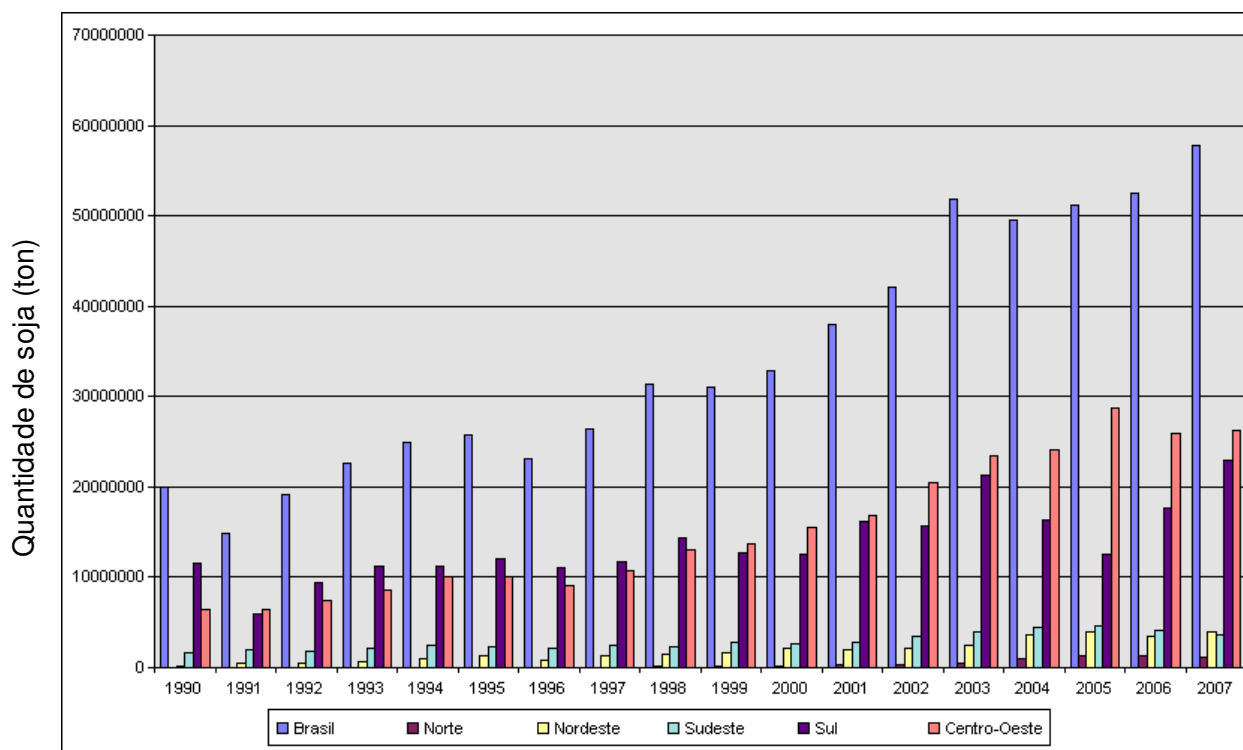
Nos últimos 25 anos, o cultivo de grãos, predominantemente de soja e milho, para exportação e para abastecimento interno aumentou bastante na região que compreende os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando inicialmente as terras com aptidão para este tipo de produção, com solos mais intemperizados, de textura argilosa ou média, profundos e bem drenados (do tipo Latossolos). Mais recentemente, ao longo dos últimos quinze anos, o cultivo de grãos tem ampliado suas fronteiras, ocupando áreas tradicionais de pecuária, com solos arenosos, classificados como inaptos para lavouras. A atividade de cultura intensiva passou a ocupar o lugar das pastagens, e o uso de insumos agrícolas em grande quantidade, principalmente fertilizantes e agrotóxicos, passou a ser um fator de interferência preocupante nesse sistema.

Essa expansão é movida por vários fatores: econômicos, com a valorização da soja no mercado internacional; infra-estrutura, principalmente para o escoamento da produção; degradação das pastagens cultivadas, devido ao manejo inadequado dessas terras, sem a adoção de práticas de conservação de solo e água e o desenvolvimento tecnológico que permitiu o cultivo de lavouras nessas áreas com retorno econômico razoável ⁽⁴⁸⁾. A utilização das terras da região centro-oeste para cultivo de lavouras praticamente dobrou de 1995 a 2006, e para pastagens diminuiu 9 % no mesmo período, como indicado no censo agropecuário de 2006 (Tabela 4). ⁽⁵⁴⁾

Tabela 4: Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários da Região Centro-Oeste - 1970/2006

Dados estruturais	Censos					
	1970	1975	1980	1985	1995	2006
Estabelecimentos (10^3)	253	269	268	268	242	320
Área total (10^6 ha)	81,7	94	113	99	108	100
Utilização das terras (10^6 ha)						
Lavouras	2,4	4,3	6,5	7	6,6	13
Pastagens	55,5	61,3	67,7	59,2	62,8	56,8

A Figura 5 apresenta a quantidade de soja (em grão) produzida no Brasil e nas diferentes regiões geográficas, desde 1990.

**Figura 5:** Quantidade de soja (ton) produzida no Brasil e nas regiões geográficas no período de 1990-2007. ⁽⁵⁵⁾

Como pode ser observado, as regiões Sul e Centro-Oeste são as maiores produtoras de soja desde 1990. Até 1998, a região Sul era a maior produtora, entretanto, a partir de 1999 a região Centro-Oeste assumiu a liderança. ⁽⁵⁵⁾

A produção de soja no país, em 2008, apresentou um acréscimo de 3,4 % em relação ao ano de 2007. A Região Centro-Oeste que responde por 48,5 % da safra, apresentou um crescimento de 6,7 % na área colhida quando comparada à do ano passado. Nesta região, destaca-se o Mato Grosso com uma produção de 17.811.403 toneladas, principal estado produtor da soja e responsável por 29,7 % do total nacional de soja. ⁽⁵⁶⁾

A Figura 6 apresenta a quantidade de milho produzida no Brasil e nas diferentes regiões geográficas, desde 1990. ⁽⁵⁵⁾

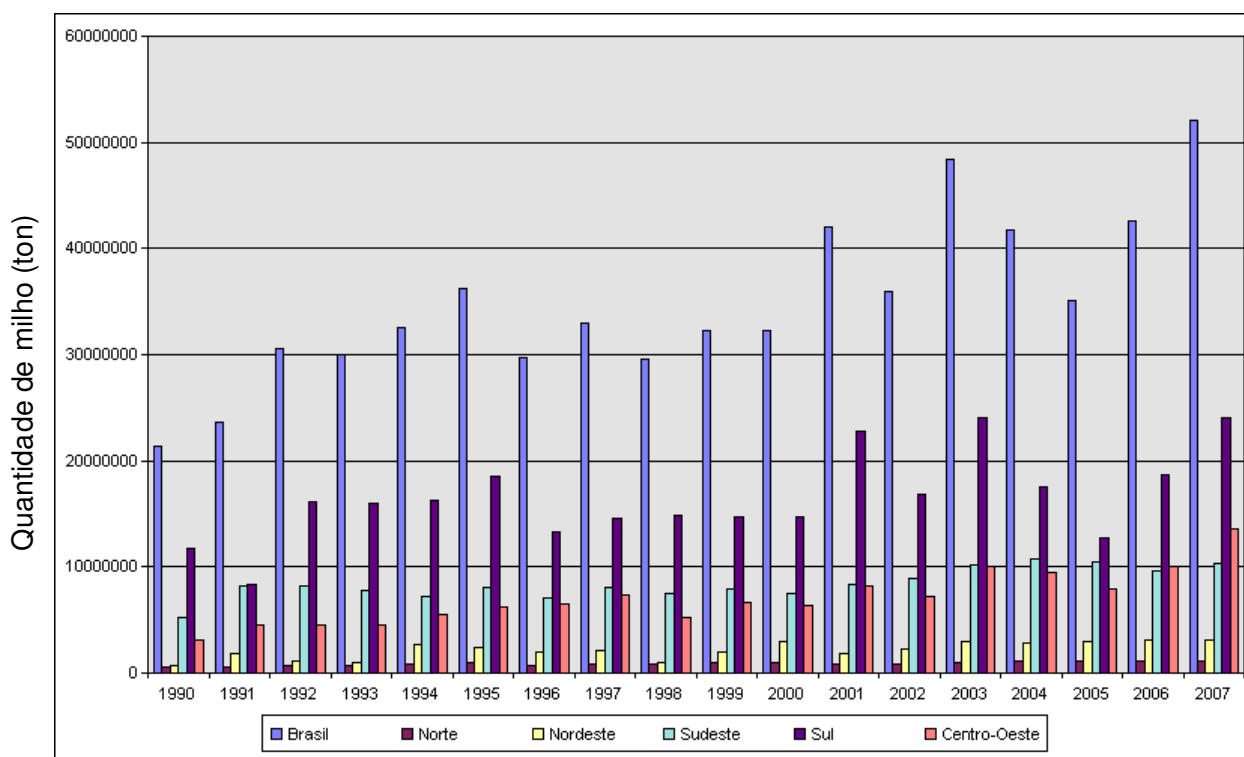


Figura 6: Quantidade de milho (ton) produzido no Brasil e nas regiões geográficas no período de 1990-2007. ⁽⁵⁵⁾

A região Sul é a maior produtora de milho, desde 1990. A produção nas regiões Sudeste e Centro-Oeste estão bem abaixo dos valores obtidos no Sul, mas mesmo assim os valores são expressivos, isto é, ambas as regiões podem ser consideradas como sendo grandes produtoras de milho, ao contrário das regiões Norte e Nordeste, nas quais a produção é baixíssima quando comparada ao total produzido no Brasil. ⁽⁵⁵⁾

Em 2008, a produção nacional do milho em grão foi recorde, totalizando 58,7 milhões de toneladas, variação positiva de 13,3 % em relação ao ano de 2007. Os estados de GO, MT e MS apareceram entre os nove maiores produtores do milho em grão neste mesmo ano (Figura 7).⁽⁵⁶⁾

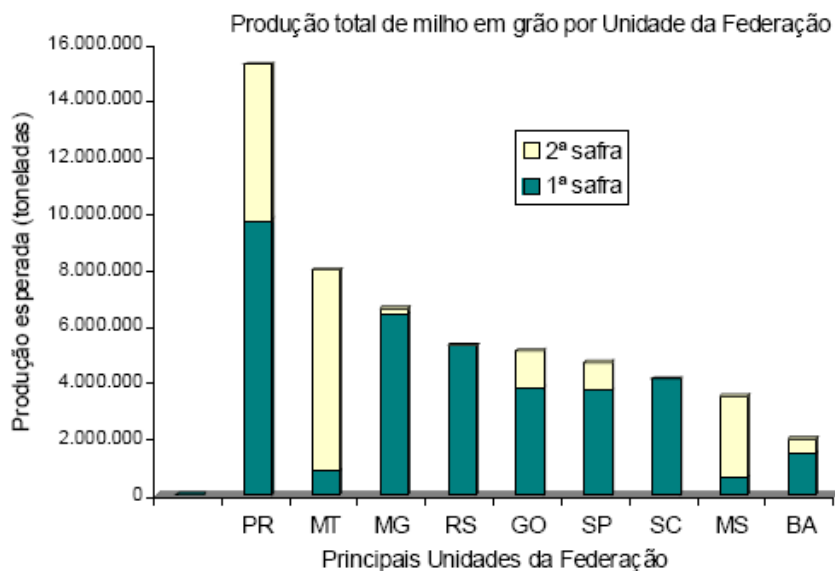


Figura 7: Quantidade de milho (ton) produzida nas principais Unidades de Federação em 2008.⁽⁵⁶⁾

Em 2008, o IBGE publicou mais uma edição dos “Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2008”, na qual, divulga entre outros dados, os índices de utilização de agrotóxicos e a área plantada pelas principais unidades de federação. A região Sul é a que apresenta maior área ocupada por plantações, seguida pelas regiões Centro-Oeste e Sudeste. A região Centro-Oeste é também a segunda maior produtora de grãos do País e a segunda maior consumidora de agrotóxicos (58.186 ton), predominantemente da classe dos herbicidas (31.439 ton). O montante de agrotóxicos utilizados na região Centro-Oeste representa aproximadamente 28 % do consumo nacional.⁽⁵⁷⁾

Uma estimativa do ano de 2009 da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas, divulgada no final do mês de maio do ano corrente, indica uma produção total da ordem de 136 milhões de toneladas, inferior em 6,8 % à obtida em 2008. Para a soja e o milho total a previsão é de retração da produção em 3,9 % e 13,2 %, respectivamente. Observa-se, na Figura 8, que o Mato Grosso supera ligeiramente (0,3 %), o Estado do Paraná mantendo, até este levantamento, a posição de maior produtor nacional de grãos.⁽⁵⁸⁾

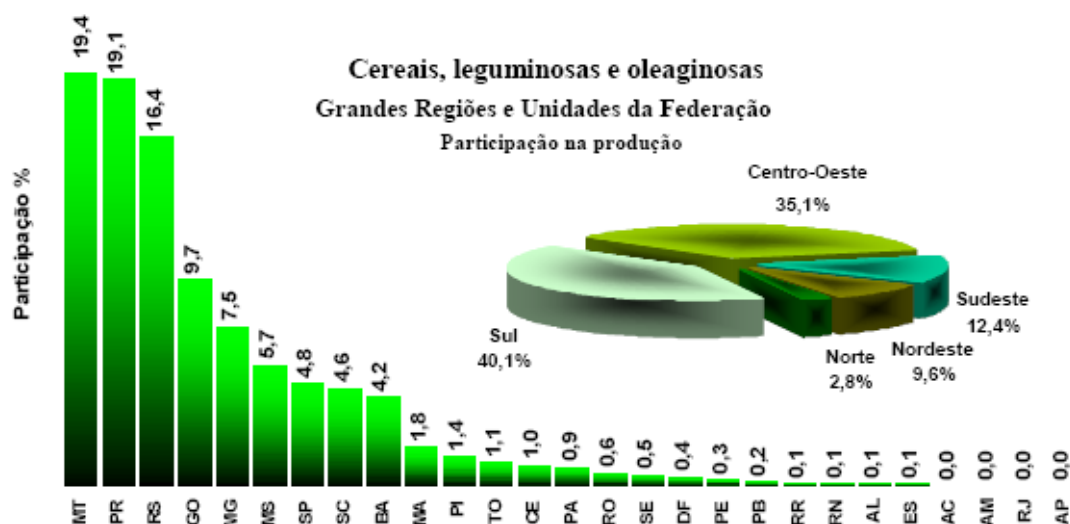


Figura 8: Estimativa da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas para 2009. ⁽⁵⁸⁾

1.8. Situação Atual do Sistema Aquífero Guarani na Região das Nascentes do Rio Araguaia

Através dos dados apresentados pode-se perceber que o cultivo de lavouras de soja e de milho são intensivos na região Centro-Oeste e que isto acarreta em um alto consumo e a utilização excessiva de agrotóxicos. A preocupação com os impactos ambientais decorrentes destes dois fatores é devida principalmente ao fato de que esta região abriga uma área considerável de recarga do Aquífero Guarani, situada nas nascentes do Rio Araguaia.

A região denominada de nascentes do Rio Araguaia mostrada no mapa da Figura 9 envolve parte dos municípios de Mineiros, GO e Alto Taquari, MT, situados na região Centro-Oeste do país. Está compreendida em uma área de aproximadamente 500 km², considerando apenas a porção que é representativa das áreas de recarga direta ou afloramento do SAG que constituem as regiões onde o aquífero se encontra mais exposto e por isso mais vulnerável.

Recentemente, a Embrapa Meio Ambiente realizou um estudo descrevendo o mapeamento e a caracterização física, morfológica e química dos tipos de solo desta região. O solo predominante nesta região é o do tipo Neossolo Quartzarênico que são solos tipicamente arenosos, com baixos teores de matéria orgânica e de minerais de argila, fatores que favorecem a lixiviação de agrotóxicos para as águas subterrâneas. ⁽⁵⁹⁾

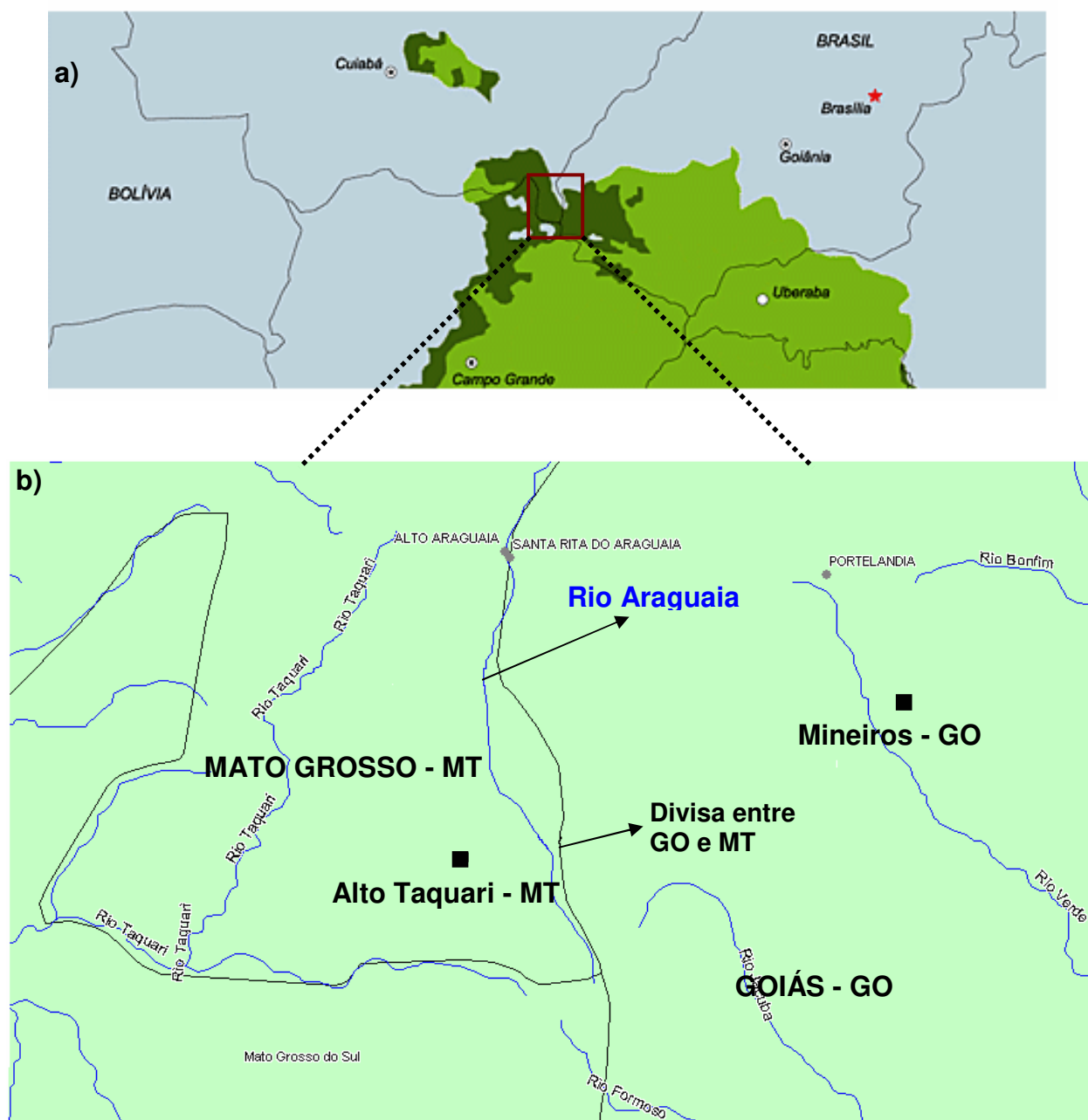


Figura 9: a) Mapa mostrando a região das nascentes do Rio Araguaia, com área de estudo ressaltada no quadrinho e b) Ampliação da área ressaltada para visualização do Rio Araguaia. ⁽⁴⁸⁾

Diante da importância desta região devido à presença das áreas de recarga e também diante do cenário de crescente produção e uso de agrotóxicos, a região das nascentes do Rio Araguaia, ressaltada no mapa da Figura 9, foi selecionada como local de estudo deste trabalho.

1.9. Preparo de Amostra para os Agrotóxicos Estudados

A determinação de agrotóxicos requer várias etapas, a saber a amostragem, o preparo de amostra, análise cromatográfica, interpretação dos resultados e validação dos métodos.

O preparo de amostras constitui uma das etapas mais demoradas da determinação dos agrotóxicos. Nesta etapa, busca-se, através de técnicas de extração, eliminar o maior número de interferentes e encontrar fatores de concentração que permitam atingir os limites máximos de resíduo (LMR) estabelecidos pelas agências reguladoras.

1.9.1. Extração de Agrotóxicos em Água

A concentração máxima permitida de agrotóxicos em água potável, estabelecido pela Comunidade Européia (CE) é de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para cada agrotóxico individual e de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para a soma total de agrotóxicos ^(60,61). A USEPA estabeleceu um LMR em água somente para alguns agrotóxicos e não um valor geral para todos como a CE para água potável. Por exemplo, para a atrazina, o LMR estabelecido pela USEPA é de 3 ng mL^{-1} . ⁽⁶⁰⁾

Diante destes valores, a análise de agrotóxicos em água requer métodos analíticos cada vez mais sensíveis e também níveis maiores de concentração dos analitos durante a etapa de preparo da amostra.

Ao se fazer uma breve revisão na literatura dos últimos cinco anos, pode se concluir que a extração em fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) é a mais utilizada para a determinação de agrotóxicos em água empregando cromatografia líquida ⁽⁶²⁻⁷⁴⁾. A utilização da extração líquido-líquido (Liquid-Liquid Extraction, LLE) neste tipo de análise ainda é reportada em alguns estudos ⁽⁷⁵⁾, entretanto, é evidente que a LLE está sendo substituída pela SPE, devido às suas bem conhecidas desvantagens, como o uso de volumes grandes de solvente. ⁽⁷⁶⁾

A SPE permite a análise simultânea de diversas amostras (tipicamente de 12 a 24), requer o uso de baixos volumes de solvente e o procedimento pode ser automatizado. Além disso, uma das maiores vantagens da SPE é que ela permite a concentração de baixos níveis de agrotóxicos em soluções muito diluídas, como a água para gerar concentrações detectáveis do analito. ^(77,78)

O procedimento básico de SPE consiste na passagem de uma amostra de água (em volumes que variam de 0,1 a 1 L) através de uma fase sólida, também chamada de sorvente (na faixa de 100 a 500 mg) contida em uma coluna, seringa, cartucho ou disco. Os analitos são

posteriormente eluídos com solventes orgânicos (de 5 a 15 mL) que são evaporados e o extrato remanescente é redissolvido em um determinado volume de solvente ou de fase móvel. ⁽⁷⁸⁾

A seleção dos sorventes e dos solventes de eluição são os aspectos mais importantes da SPE e esta seleção depende, entre outros fatores, da faixa de polaridade dos agrotóxicos estudados.

Como solventes de eluição, geralmente são utilizados solventes orgânicos em uma larga faixa de polaridade, como metanol, acetonitrila, etanol, diclorometano, acetato de etila, dentre outros. Quando são analisados agrotóxicos ionizáveis, o pH das amostras de água pode ser modificado para promover uma maior concentração dos analitos em um sorvente apolar, como C18.

Geralmente os sorventes utilizados em SPE são similares às fases estacionárias empregadas em colunas de HPLC. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente contém grupos como C8, C18 e amino ligados à sílica. Embora sejam amplamente utilizados, a presença de silanóis residuais ainda é um inconveniente na análise de compostos básicos. Outros sorventes que não são à base de sílica podem ser utilizados com uma ampla faixa de seletividade, como os poliméricos, poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidina) mais conhecido com Oasis HLB e o estireno-divinilbenzeno. ⁽⁷⁸⁾

Em um estudo utilizando LC-MS/MS, 31 agrotóxicos com diferentes polaridades foram extraídos de amostras de água utilizando cinco tipos de sorventes, dentre eles C18 e Oasis HLB. As melhores recuperações, com menor interferência da matriz, foram obtidas utilizando um volume de eluição de 3 mL (acetonitrila:diclorometano, 1:1 v/v) e o sorvente Oasis HLB. Neste caso, utilizando SPE, obteve-se um fator de concentração da amostra de 500, permitindo a obtenção de baixos valores de LD. ⁽⁷²⁾

Os herbicidas da classe das sulfoniluréias e seus metabólitos foram extraídos de amostras de água utilizando SPE *off-line* e *on-line* e LC-MS/MS. As sulfoniluréias estudadas apresentavam valores de pKa na faixa de 3,3 a 5,2 e por isso sua extração foi mais eficiente em valores menores de pH. Foram utilizados três tipos de cartuchos para SPE, C18, poliestireno-divinilbenzeno e Oasis HLB. As melhores recuperações foram obtidas com os cartuchos de poliestireno-divinilbenzeno. ⁽⁶⁹⁾

Em outro estudo, 37 agrotóxicos de diferentes classes (herbicidas, inseticidas e fungicidas) foram extraídos de águas superficiais, subterrâneas e potáveis com cartuchos Oasis HLB. Com fator de concentração de 100, foi atingido um LQM baixo, de 0,025 ng mL⁻¹. ⁽⁷⁴⁾

A SPE tem sido bastante utilizada em análises de água com LC-MS/MS, na qual há uma necessidade primordial em se minimizar o efeito de matriz. Além dos artigos comentados acima, outros estudos também utilizaram SPE nas análises de água por LC-MS/MS. ^(70,73,75)

1.9.2. Extração de Agrotóxicos em Solo

As técnicas utilizadas para a extração de agrotóxicos do solo envolvem, em sua maioria, a extração por solventes.

A extração por Soxhlet, desenvolvida em 1879, é pouco utilizada atualmente, pois apresenta diversas desvantagens como tempo longo de extração, exige o uso de condições drásticas que podem degradar os agrotóxicos e é bastante laboriosa. ⁽³⁾

Outras técnicas convencionais de extração por solventes são a extração por agitação mecânica ⁽⁷⁹⁾ e por banho ultrassônico ^(64,80-82) utilizando solventes orgânicos ou misturas de solventes orgânicos e água, que pode ou não ter o pH alterado.

A extração por ambas as técnicas pode ser feita à temperatura ambiente, o que permite a análise de compostos termolábeis. Na literatura são descritas muitas variações nos procedimentos destas técnicas, que podem ser extremamente demoradas e trabalhosas ou podem envolver simplesmente uma agitação ou sonicação em solução aquosa por um período curto. As duas técnicas encontram-se bem discutidas na literatura e o seu uso é rotineiro em análises de solo, devido à disponibilidade dos materiais necessários para sua condução. A desvantagem é que podem consumir muito tempo.

Nas últimas duas décadas, outras técnicas têm sido estudadas e reportadas na literatura como alternativas a estas convencionais, como a extração por fluido supercrítico (supercritical fluid extraction, SFE), extração por líquido pressurizado (Pressurized Liquid Extraction, PLE) ou acelerada por solvente (Accelerated Solvent Extraction, ASE), assistida por micro-ondas (Microwave Assisted Extraction, MAE) e, mais recentemente, o método QuEChERS (acrônimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).

Na SFE, um fluido como CO₂ sob condições supercríticas de temperatura e pressão é bombeado através do solo. O CO₂ apresenta uma temperatura crítica moderada e é quimicamente inerte, por isso a SFE é uma boa alternativa para a extração de solo, pois não requer o uso de solventes orgânicos. ^(83,84)

Em alguns artigos a PLE é chamada de extração acelerada por solvente (ASE), pois este é o nome comercial de um dos primeiros equipamentos voltado a esta técnica, fabricado pela empresa Dionex. Na PLE, a amostra sólida é colocada em um dispositivo similar a um

cartucho de extração e os analitos são extraídos da matriz por um solvente ou mistura de solventes que se mantêm em estado líquido sob pressão e temperatura relativamente alta. Geralmente são utilizados acetona, metanol ou mistura de água e metanol como solventes extratores. ^(85,86)

O método QuEChERS foi introduzido originalmente para a análise de agrotóxicos em alimentos não gordurosos. Após sua publicação em 2003, muitos laboratórios adotaram este método de extração na esperança de conseguirem determinar um número cada vez maior de agrotóxicos em uma única análise. ^(87,88,89)

O procedimento do QuEChERS consiste na extração da amostra com acetonitrila. Uma combinação de sais (sulfato de magnésio, cloreto de sódio e tampão citrato) é adicionada para auxiliar na separação das fases. As etapas de limpeza e remoção da água residual são feitas simultaneamente através de um procedimento chamado de SPE dispersivo. Para isso, o extrato é misturado ao sorvente amina primária secundária (APS) e MgSO_4 . O MgSO_4 serve para remover a água residual e a APS, que é um trocador aniônico fraco, remove ácidos, açúcares e outros constituintes que formam ligação de hidrogênio. ⁽⁹⁰⁾

Apesar das vantagens oferecidas pelo QuEChERS, explicitadas inclusive no próprio nome do método (rápido, fácil, barato, robusto e seguro), este apresenta uma desvantagem em relação às outras técnicas, que é a impossibilidade de se obter fatores altos de concentração dos analitos.

O método QuEChERS foi utilizado para a extração de agrotóxicos do solo e resultou em recuperações boas, comparáveis às obtidas com as técnicas PLE e extração por banho ultrassônico. ⁽⁸¹⁾

Dentre as técnicas introduzidas mais recentemente, destaca-se a MAE, cuja aplicação para extração de matrizes sólidas vem sendo exaustivamente reportada na literatura atual ⁽⁹¹⁻⁹⁶⁾, sendo inclusive recomendada pela USEPA para este tipo de análise ⁽⁹⁷⁾. Uma das principais vantagens da MAE é a redução no tempo de extração e isto pode ser atribuído às diferenças no modo em que se dá o aquecimento convencional e o aquecimento por micro-ondas. No primeiro, é necessário um aquecimento contínuo, por um longo período, para aquecer o recipiente que contém a amostra até que o calor seja transferido à solução, enquanto que a radiação micro-ondas aquece diretamente a solução. Isto mantém um gradiente de temperatura mínimo e acelera a velocidade de aquecimento. O aquecimento por micro-ondas envolve dois mecanismos, a condutância iônica e a rotação dipolar, desta forma, os solventes polares são os que mais absorvem a energia das micro-ondas para convertê-la em calor. ⁽⁹⁸⁾

Além da vantagem em relação ao aquecimento, a MAE permite uma redução significativa no consumo de solventes, assim como a possibilidade de se extrair múltiplas amostras. Dessa forma, a MAE preenche todos os requisitos necessários de uma técnica de preparo de amostra moderna e por isso se tornou uma ótima alternativa às técnicas convencionais.

Na literatura, algumas publicações relatam comparações entre as diversas técnicas de extração de agrotóxicos do solo apontando as vantagens e desvantagens de cada uma. ⁽⁹⁹⁻¹⁰³⁾

Neste trabalho, as extrações convencionais por agitação mecânica e banho ultrassônico foram comparadas com a MAE utilizando um microondas caseiro.

1.10. Métodos de Determinação dos Agrotóxicos

Um dos métodos mais empregados para a determinação de agrotóxicos em diversos tipos de matrizes é a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) por se tratarem de compostos muitas vezes não voláteis, termicamente instáveis e de alta polaridade.

As determinações podem ser feitas usando diversos tipos de detectores, sendo os mais empregados o arranjo de diodos (Diode Array Detector, DAD), cujos métodos estão mais estabelecidos, e o espectrômetro de massas (MS), acerca do qual será feita uma breve discussão por se tratar de uma técnica mais recente.

1.10.1. Espectrometria de Massas acoplada à Cromatografia Líquida: Definições e Aplicações na Análise de Agrotóxicos

As duas partes essenciais de um espectrômetro de massas e os componentes associados a elas são: ⁽¹⁰⁴⁾

- 1 - Fonte de Ionização (ou interfaces): promove a ionização das moléculas;
- 2 - Analisador: separa os íons formados de acordo com sua razão massa/carga (m/z).

1.10.1.1. Fontes de Ionização

As diferentes interfaces empregadas em LC-MS têm em comum o fato de promoverem uma ionização suave da molécula, isto é, são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito ^(78,105)

A detectabilidade em um espectrômetro de massas depende completamente da tecnologia da interface empregada. No passado, duas interfaces bastante utilizadas eram o nebulizador térmico e o feixe de partícula, dentre outros. Entretanto, nos últimos anos estes dois foram substituídos por interfaces mais modernas e mais sensíveis, nas quais a fase móvel (FM) e a amostra presente nela são ionizadas à pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Ionization, API). ⁽⁷⁶⁾

A LC-MS baseada na ionização à pressão atmosférica (API) foi desenvolvida em meados de 1974. Entretanto, somente a partir do final da década de oitenta seu uso começou a ser frequente. Atualmente, esta pode ser considerada o tipo de interface mais importante em LC-MS, utilizada em mais de 99 % das análises. ⁽¹⁰⁶⁾

As duas formas mais empregadas deste tipo de ionização são a ionização química à pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) e a ionização por eletro-nebulização (Elektrospray Ionization, ESI). ⁽¹⁰⁶⁾

Em ESI, a FM na qual o analito se encontra dissolvido passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (spray) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2) na região do spray. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fique maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10 % do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização ⁽¹⁰⁷⁾. Existem explicações alternativas para o mecanismo de produção de íons por ESI, entretanto, nenhuma delas é definitiva. ⁽¹⁰⁴⁾

Na APCI o fluxo de líquido vindo do LC também é disperso em pequenas gotas, mas, nesse caso, isto é feito através da combinação de calor e de um gás nebulizante. Desta forma, a APCI apresenta algumas características em comum com a ESI.

Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito. ⁽¹⁰⁸⁾

Como descrito, as diferenças entre as duas fontes de ionização residem nos métodos empregados para a formação das gotas e nos mecanismos da subsequente formação dos íons. Estas diferenças afetam a capacidade analítica, em particular a faixa de polaridade do analito que pode ser ionizado por cada uma das fontes ⁽¹⁰⁷⁾. Neste sentido, pode se afirmar que as duas interfaces são complementares, pois a APCI é utilizada para análise de compostos de polaridades baixas a médias, enquanto que a ESI analisa compostos com polaridades médias a altas ⁽¹⁰⁷⁾. Muitos agrotóxicos podem ser determinados por APCI e por ESI com boa detectabilidade e por isso, muitas vezes, a interface selecionada para um agrotóxico em particular depende da preferência derivada da experiência individual do analista e também das técnicas que se encontram disponíveis, assim como das propriedades da matriz. ⁽⁷⁸⁾

Na APCI não é necessário que se faça uma otimização significativa dos parâmetros da interface. Esta otimização é necessária quando se utiliza a ESI, e além disso esta interface é mais sensível à composição da FM e aos aditivos utilizados. Apesar destas desvantagens, pelo menos 90 % das aplicações com LC-MS são feitas empregando ESI. ⁽¹⁰⁶⁾

Em relação à parte física da fonte de ESI é necessário que se otimize a posição e também o potencial da agulha do *spray*.

A vazão da FM também influencia na resposta do analito, pois afeta a eficiência da ionização. Gotas maiores são geradas em vazões altas. Estas gotas demandam um tempo maior de evaporação. Íons presentes na solução são transferidos para fase gasosa mais rapidamente quando se encontram na forma de gotas pequenas. Dessa forma, a eficiência da ionização é maior em vazões mais baixas ⁽¹⁰⁶⁾. Atualmente, alguns sistemas apresentam uma alta eficiência de dessolvatação, o que possibilita a utilização de vazões maiores sem comprometer a detectabilidade do método. ⁽¹⁰⁹⁾

A operação de um sistema LC-MS implica em um compromisso entre a separação no LC e a ionização no MS. Uma determinada composição de FM pode ser ideal em termos da ionização do analito, mas resultar em retenção irreversível ou em nenhuma retenção e por isso não pode ser utilizada.

A resposta e a separação dos analitos são altamente influenciadas pela composição da FM. Para fármacos e agrotóxicos verificou-se maior detectabilidade tanto em ESI quanto em APCI, com a utilização de metanol ao invés de acetonitrila como solvente orgânico.

Em ambas as interfaces, uma porcentagem alta de água geralmente não é favorável, devido à viscosidade e volatilidade da água, entretanto, na maior parte das análises uma porcentagem de água alta é necessária para promover a separação cromatográfica. ⁽¹⁰⁶⁾

Na análise de compostos que apresentam grupos ionizáveis, a adição de tampões é importante para aumentar a ionização e evitar perdas na resolução, retenção e repetitividade. Entretanto, em LC-MS, é necessário que o tampão utilizado seja volátil, pois do contrário isto pode ocasionar a supressão do sinal, formação de adutos e ruído alto. Além disso, a concentração do tampão deve ser a menor possível, em ESI utilizam-se concentrações de 10 mmol L⁻¹ ou menos. ⁽¹⁰⁶⁾

A seleção da composição de FM no desenvolvimento de um método deve, na medida do possível, objetivar a formação de íons pré-formados na solução, isto é, a protonação de analitos básicos ou desprotonação de analitos ácidos. Desta forma, para analitos básicos, podem ser utilizados, por exemplo, misturas de sais de amônia e ácidos voláteis como ácido fórmico e ácido acético. Estes ácidos podem ser utilizados também para diminuir o pH, auxiliar na geração de íons e, dessa forma, aumentar a detectabilidade ^(106,110,111). A utilização de aditivos na fase móvel também influencia a extensão da supressão da matriz.

Muitos compostos têm afinidade significativa pelo sódio, o qual está presente em uma concentração de 10⁻⁵-10⁻⁴ mol L⁻¹ na maioria dos solventes utilizados em LC. Desta forma, geralmente o íon molecular complexado ao sódio (aduto de sódio) [M+Na]⁺ pode ser observado perto do íon molecular no espectro de massas. Em alguns casos, a complexação com o sódio é tão intensa que o íon molecular desaparece e no espectro só é possível visualizar o aduto de sódio. A abundância relativa destes dois íons pode variar com o tempo e com as condições experimentais, não sendo controlável, por isso é necessário que se reduza ao máximo a formação deste aduto ou pelo menos diminuir sua abundância. Uma forma para isso é a adição de ácido fórmico (1 a 5 %) na FM. ⁽¹⁰⁶⁾

Em casos específicos é feita a adição de acetato de amônia para reduzir a formação de adutos de sódio e de potássio com o objetivo de direcionar a formação de adutos de amônio

que são mais estáveis e por isso podem ser quantificados ou mesmo para aumentar a abundância do íon molecular. ^(106,112)

Os adutos de sódio e de potássio da maioria dos analitos são difíceis de fragmentar e sua abundância e fragmentação não são constantes, por isso não devem ser utilizados em análises quantitativas. Entretanto, na literatura são encontrados trabalhos que relatam a quantificação de alguns agrotóxicos através dos adutos de sódio. ^(113,114)

Uma questão importante no desenvolvimento de métodos para análise quantitativa empregando LC-MS é a possível ocorrência de efeito de matriz. Vários artigos na literatura descrevem a avaliação do efeito de matriz no desenvolvimento de métodos, assim como suas causas, consequências e também meios de evitá-lo ou pelo menos diminuir a sua influência. ^(74,112,115-118)

O efeito de matriz é uma supressão ou aumento da resposta do analito devido a coeluição de constituintes da matriz. A supressão ou aumento da resposta do analito compromete a precisão e exatidão do método analítico. ⁽¹⁰⁶⁾

Existem dois tipos de efeito de matriz. O efeito de matriz absoluto indica a diferença entre as respostas das soluções de padrões do analito e do branco de amostras (matriz da amostra sem o analito de interesse) fortificadas com o analito, enquanto que o efeito de matriz relativo indica a diferença na resposta entre vários lotes de brancos de amostras fortificadas com o analito. O primeiro afeta a exatidão e o segundo, a precisão do método. ⁽¹⁰⁶⁾

O efeito de matriz é um processo que ocorre na fase líquida e não na fase gasosa. Constituintes não voláteis na amostra ou na fase móvel impedem que os íons pré-formados do analito escapem da gota para a fase gasosa. Compostos com afinidade alta por prótons no modo positivo ou com baixa acidez na fase gasosa, no modo negativo também podem suprimir a ionização do analito. Outra forma de supressão é a promovida por compostos que formam par-iônico com os íons pré-formados do analito. O efeito da matriz depende tanto do analito quanto da matriz. Os compostos responsáveis pelo efeito de matriz geralmente não são ionizados por ESI ou APCI, e desta forma não podem ser detectados pelo MS. ⁽¹⁰⁶⁾

As duas formas mais comuns de remover os constituintes da amostra que causam o efeito de matriz são o aperfeiçoamento do procedimento de extração dos analitos ou do método cromatográfico. Um procedimento de extração mais seletivo ou um maior número de etapas de limpeza das amostras é a forma mais efetiva para se reduzir ou eliminar o efeito de matriz.

A interferência do efeito de matriz na exatidão e precisão pode ser amenizada ou eliminada utilizando-se APCI-MS ao invés de ESI-MS. Similarmente, o uso do modo negativo ao invés do modo positivo, ou vice-versa, também pode reduzir o efeito de matriz. ⁽¹⁰⁶⁾

Existem algumas formas de detectar a presença do efeito de matriz e também de mostrar sua intensidade e abrangência. A forma mais direta de avaliar o efeito de matriz é através da comparação entre as respostas do analito em soluções de padrões e em brancos de amostras fortificadas com o analito após a extração. A diferença obtida indica a supressão ou aumento na resposta do analito. Esta aproximação é bastante utilizada para se verificar o efeito de matriz.

Uma descrição completa do efeito de matriz pode ser alcançada adquirindo-se as áreas de três conjuntos distintos de experimentos ou amostras: ⁽¹¹⁶⁾

- 1 - Padrões do analito em solvente,
- 2 - Padrões adicionados no branco da amostra após a extração (extrato da amostra),
- 3 - Padrões adicionados na amostra antes da extração,

Com os valores das áreas dos picos obtidos para estas amostras, pode se calcular os seguintes parâmetros:

- Porcentagem do efeito de matriz (EM)

$$\% \text{ EM} = \frac{\text{Área dos padrões adicionados no branco da amostra após a extração}}{\text{Áreas dos padrões do analito em solvente}} \times 100 \quad [\text{Eq. 8}]$$

- Porcentagem de recuperação obtida com o procedimento de extração utilizado (%R)

$$\% \text{ R} = \frac{\text{Área dos padrões adicionados na amostra antes da extração}}{\text{Área dos padrões adicionados no branco da amostra após a extração}} \times 100 \quad [\text{Eq. 9}]$$

- Porcentagem da eficiência do processo absoluto (EP)

$$\% \text{ EP} = \frac{\text{Área dos padrões adicionados na amostra antes da extração}}{\text{Áreas dos padrões do analito em solvente}} \times 100 \quad [\text{Eq. 10}]$$

$$\text{ou } \% \text{ EP} = \frac{(\% \text{ EM} \times \% \text{ R})}{100} \quad [\text{Eq. 11}]$$

Uma versão modificada da equação que expressa a % EM é: ⁽¹¹⁷⁾

$$\% \text{ EM} = \frac{\text{Área dos padrões adicionados no branco da amostra após a extração}}{\text{Áreas dos padrões do analito em solvente}} - 1 \times 100 \text{ [Eq. 11]}$$

Neste caso, um valor negativo significa um efeito de supressão da matriz no sinal do analito. Um valor positivo indica um efeito de acréscimo no sinal. Quanto mais próximo de 1 for este resultado, menor será o efeito de matriz no sinal dos analitos. ⁽¹¹⁷⁾

Através das equações mostradas é possível verificar a diferença entre as definições dos termos recuperação e eficiência do processo absoluto. A recuperação mede a eficiência do processo de extração do analito na etapa de preparo da amostra. Entretanto, esta só pode ser determinada adequadamente através de um método de separação isento de efeitos de matriz, do contrário o que está se determinando é a eficiência do processo absoluto e não a recuperação da extração. Em muitos estudos nos quais a LC-MS foi utilizada para determinar a recuperação, frequentemente a eficiência do processo absoluto foi reportada com o termo “recuperação”. A recuperação obtida no procedimento de extração deve ser independente da interface e da fonte de ionização utilizada no LC-MS. Quando são obtidas recuperações maiores que 100 %, é certo que a medida que está sendo feita é a da eficiência do processo absoluto e não a da recuperação da extração. Neste caso, o efeito de matriz está provocando um aumento na resposta do analito. ⁽¹¹⁶⁾

As definições dos termos “recuperação” e “eficiência do processo absoluto” discutidas acima são controvertidas, pois a maioria dos guias e trabalhos na literatura realmente expressam a recuperação do procedimento de extração através da equação utilizada para o cálculo da eficiência do processo absoluto.

1.10.1.2. Analisadores de Massas

O analisador de massas separa os íons que vêm da fonte de ionização de acordo com sua razão m/z. Existem vários tipos de analisadores de massas utilizados na espectrometria de massas, entretanto, especificamente em LC-MS, o analisador quadrupolo apresenta alta relevância atualmente. ⁽¹⁰⁶⁾

Os analisadores de massas quadrupolo usam quatro eletrodos em forma de bastão paralelos, organizados em um quadrado para gerar campos elétricos que filtram os íons com base na razão m/z, enquanto se deslocam pelos eletrodos. Em determinadas magnitudes e

frequências, apenas íons com a massa selecionada atingem o detector. Alterando os campos elétricos, as massas de todos os íons podem ser varridas sequencialmente. ⁽¹⁰⁴⁾

O analisador quadrupolo foi o primeiro espectrômetro de massas disponível comercialmente com acoplamento a LC e API. Trata-se de um instrumento de baixa resolução, adequado apenas para varreduras de compostos, pois sua detectabilidade é baixa. ⁽¹¹⁹⁾

Atualmente, o analisador quadrupolo está sendo rapidamente substituído por analisadores triplo quadrupolo e *íon-trap* utilizados em configurações de espectrometria de massas em série ou MS/MS. Esta configuração permite a obtenção de informações estruturais sobre as moléculas com o uso de múltiplos estágios de seleção e separação de massas. ⁽¹¹⁹⁾

A configuração de MS/MS mais versátil e mais utilizada é a do triplo quadrupolo. Neste instrumento, a análise de massas é feita no primeiro e no último quadrupolo, enquanto que o segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão, como é mostrado na Figura 10. Desta forma, no primeiro analisador (Q1) ocorre a seleção do íon precursor, o qual é dissociado (fragmentado) na cela de colisão e os íons produtos correspondentes são analisados no segundo analisador (Q2). ⁽¹⁰⁶⁾

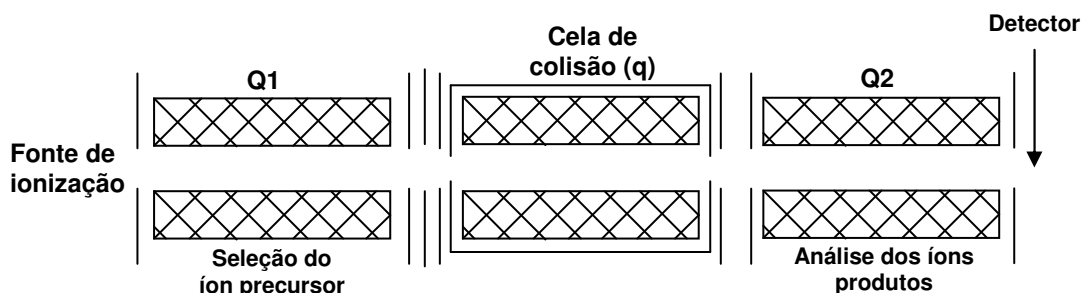


Figura 10: Esquema do instrumento triplo quadrupolo.

Na cela de colisão ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo por dissociação induzida (collision-induced dissociation, CID) através da colisão com um gás inerte. O íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar a sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando a CID é realizada com baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂, etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na

determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando a colisão é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que podem levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada. ⁽¹⁰⁸⁾

Na literatura são descritos vários tipos de monitoramento em MS/MS, mas os mais comuns são a varredura do íon precursor (precursor ion-scan), varredura dos íons produzidos (product-ion scan), varredura da constante perda de fragmentos neutros (constant-neutral-loss scan) e o monitoramento seletivo de reações (selected-reaction monitoring) (Tabela 5). A varredura dos íons produzidos é o modo mais explorativo e é tipicamente utilizado para se obter informações estruturais das moléculas. Nos modos de varredura do íon produto e varredura da constante perda de fragmentos neutros, o objetivo é detectar uma certa classe de moléculas que apresentam um grupo funcional em comum. Estes dois últimos modos são particularmente úteis em análises qualitativas e em varreduras de amostras ambientais ou de alimentos. O monitoramento seletivo de reações é universalmente utilizado em combinação com a separação por LC para quantificar um composto específico em matrizes complexas. O monitoramento seletivo de uma fragmentação induzida por colisão promove boa seletividade e detectabilidade. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado monitoramento de reações múltiplas (multiple-reaction monitoring, MRM). ^(104,106,107)

Tabela 5: Modos de análise em MS/MS

Modo	Experimento	Aplicação
Íon produto	MS1 seleciona um íon precursor MS2 adquire um espectro de massas com todos os fragmentos produzidos	Obter informações estruturais dos íons produzidos na fonte de ionização
Íon precursor	MS1 escaneia todos os íons precursores, MS2 seleciona um fragmento	Monitorar compostos que apresentam fragmentos idênticos
Perda de fragmentos neutros	MS1 e MS2 escaneiam uma diferença fixa de m/z	Monitorar compostos que perdem a mesma espécie neutra
Monitoramento seletivo de reações	MS1 seleciona um íon precursor, MS2 seleciona um fragmento	Monitorar uma reação selecionada

Quando se faz o acoplamento da LC com a MS obtém-se o cromatograma de massas que é denominado desta forma por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este. O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado cromatograma de íons totais (total ion chromatogram, TIC). Já o cromatograma constituído apenas pelos íons de interesse pode ser obtido pelo monitoramento dos íons selecionados (selected ion monitoring, SIM), ajustando-se o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse ou selecionando-os a partir de um banco de dados que contenha os espectros de massas completos. ⁽¹⁰⁸⁾

1.11. Validação de Métodos

1.11.1. Guias de Validação

Milhões de medidas analíticas são feitas todos os dias em milhares de laboratórios no mundo. Há inúmeras razões para fazer estas medidas, como por exemplo: avaliação de produtos que serão exportados ou importados, estudos na área da saúde, verificar a qualidade da água para consumo humano, analisar a composição elementar de uma liga para confirmar sua adequação ao uso na construção de uma aeronave, análise forense de fluidos em investigações criminais, dentre muitas outras. Certamente, todas as camadas da sociedade são influenciadas de alguma forma por medidas analíticas. O custo para a execução destas análises é alto e outros custos adicionais surgem das decisões tomadas com base nos resultados destas análises. ⁽¹²⁰⁾

Citando um exemplo conhecido acerca da importância destes procedimentos, em abril de 2004, a China, principal importador mundial de soja, iniciou um embargo à soja brasileira. Diversos carregamentos brasileiros do produto foram barrados naquele país, sob o argumento de que os grãos sadios de soja estavam contaminados com sementes tratadas com fungicidas. O Brasil é o segundo maior exportador de soja para a China, atrás apenas dos Estados Unidos e neste período, esta proibição afetou em média 85 % dos produtores brasileiros de soja, acarretando em uma perda estimada de mais de 1 bilhão de dólares em exportação de soja para a China ⁽¹²¹⁾. Em junho do mesmo ano, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicou às pressas uma instrução normativa estabelecendo diretrizes para a certificação das condições higiênico-sanitárias da soja em grão destinada à comercialização

interna, à exportação e à importação com o objetivo de convencer a China a recuar no embargo ⁽¹²²⁾. No final do mês de junho de 2004, o fim do embargo chinês à soja brasileira aconteceu exatamente após uma forte queda nos preços, causada, entre outros fatores, pelo próprio veto chinês ao produto brasileiro.

A formação de grupos de países e blocos econômicos, como a Comunidade Econômica Européia e o Mercosul criaram oportunidades de mercado para *commodities* e produtos manufaturados, mas com elas proliferam as regulamentações que disciplinam a entrada nesses mercados. Essas regulamentações são necessárias, pois visam o fornecimento de alimentos seguros para seus consumidores, além de evitar o comprometimento de culturas locais.

Para garantir que estas regulamentações não se tornem barreiras tarifárias, foi criado o Codex alimentarius, a partir do qual houve a definição de normas e padrões a serem seguidos que garantiriam o fornecimento de alimentos seguros. O Codex Alimentarius é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization, FAO) e da Organização Mundial da Saúde. Trata-se de um fórum internacional de normalização sobre alimentos, criado em 1963, e é coordenado por comitês específicos que abordam assuntos tais como: resíduos de agrotóxicos, resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, nutrição e alimentos para dietas especiais, rotulagem de alimentos, métodos de análise e amostragem, princípios gerais, aditivos e contaminantes alimentares, higiene de alimentos, dentre outros. Para as exportações, em que diversos países utilizam barreiras tecnológicas em substituição às barreiras tarifárias, como forma de protecionismo ao comércio internacional, a avaliação da conformidade atua como ferramenta estratégica nas relações econômicas, facilitando ou dificultando o livre comércio entre países e blocos econômicos. Desta forma, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional ^(123,124). No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

A partir de 2004, com o episódio do embargo da China à soja brasileira, o governo do país através da ANVISA e do INMETRO, assim como os laboratórios de análise, produtores e agricultores começaram a se preocupar de forma mais ativa em se enquadrar nas normas e padrões definidos internacionalmente para a exportação de alimentos.

Diversos órgãos reguladores, como a ANVISA e o INMETRO, agências de normalização e grupos ou comitês de estudos de diversos países disponibilizam guias contendo parâmetros e requisitos para a aceitabilidade de um método analítico. O cumprimento destes itens definem o

processo de validação da metodologia em questão. Na Tabela 6 estão relacionados os órgãos ou comitês de regulamentação mais relevantes internacionalmente e no Brasil, e também, o título dos respectivos protocolos ou guias de validação.

Tabela 6: Relação de órgãos ou comitês de regulamentação e protocolos ou guias de validação.

Órgão/Comissão - Nome do guia ou protocolo	Ano de publicação**
<i>Eurachem - The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics</i>	1998
<i>Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) - Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures</i>	1998
<i>AOAC International - Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals</i>	2002
<i>International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis</i>	2002
ANVISA - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos	2003
<i>Codex Alimentarius - Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis</i>	2003
<i>International Conference on Harmonization (ICH) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)</i>	2005
<i>Commission of the European Communities (SANCO) - Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed</i>	2007
ANVISA-PARA - Guia para o Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os Laboratórios Integrantes do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)	2007
INMETRO - Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - Documento de Caráter Orientativo. DOQ-CGCRE-008	2008

*Ano de publicação da última versão/revisão

Os guias apresentados na Tabela 6 apresentam diretrizes voltadas, em sua maioria, à validação de métodos em apenas um laboratório. Os guias da ICH ⁽¹³⁰⁾ e da ANVISA ⁽¹²⁸⁾

estabelecem parâmetros relativos especialmente à validação de métodos para determinação de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos sendo que o guia da ANVISA é, na verdade, uma versão em português do guia da ICH, apresentando critérios para validação (definições, intervalos numéricos aceitáveis, números de ensaios, etc.) iguais aos da ICH.

Os guias da Eurachem ⁽¹²⁰⁾ e da AOAC ^(125,126) apresentam um escopo maior, isto é, podem ser aplicados a validação de métodos para análise de diversos compostos em vários tipos de matrizes. O protocolo da IUPAC ⁽¹²⁷⁾, por sua vez, fornece uma síntese destes guias, em uma tentativa de harmonizar as diferenças que apresentam e o guia do INMETRO ⁽¹³³⁾ apresenta diretrizes semelhantes às da Eurachem, com menor número de ensaios no procedimento de validação.

Apesar da existência dos guias da ANVISA (métodos para fármacos) ⁽¹²⁸⁾ e do INMETRO ⁽¹³³⁾ (geral), não havia no Brasil, ainda recentemente, um guia específico relacionado à validação de métodos analíticos para agrotóxicos em amostras alimentícias e ambientais. Em 1999, um grupo de pesquisadores ligados a órgãos públicos, indústrias e ao meio acadêmico associados ao Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP), publicaram um manual com o objetivo de sugerir bases para a validação de métodos de análise de agrotóxicos em alimentos e também, como uma tentativa de normalizar este tipo de análise no Brasil ^(134,135). Muitos laboratórios, principalmente os de pesquisa em universidades, utilizaram e alguns ainda utilizaram alguns preceitos do manual do GARP para o direcionamento na análise de agrotóxicos ⁽¹³⁶⁻¹³⁹⁾. Algumas diretrizes sugeridas neste manual são as mesmas contidas no guia da ICH, apesar deste último ser voltado à determinação de fármacos.

Em 2001, a ANVISA iniciou o Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), visando avaliar a qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos no País. O Projeto foi transformado em Programa, por meio da Resolução RDC 119, de 19 de maio de 2003 e atualmente foi ampliado, cobrindo 25 estados do país ⁽¹⁴⁰⁾. O PARA tem como objetivos específicos os seguintes itens: identificar e quantificar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos; fortalecer a rede de laboratórios de saúde; rastrear a fonte dos problemas e subsidiar ações de vigilância sanitária; avaliar o uso e mapear a distribuição dos agrotóxicos e disponibilizar informações relativas à contaminação de alimentos por agrotóxicos à sociedade ⁽¹⁴¹⁾. Em 2007, a ANVISA, divulgou um guia (ANVISA-PARA) ⁽¹³²⁾ delineando os requerimentos para a garantia da qualidade das análises realizadas pelos laboratórios integrantes do PARA. Este guia é uma união de trechos de dois guias internacionais: o da SANCO ⁽¹³¹⁾ e o do Codex Alimentarius ⁽¹²⁹⁾. A primeira parte contém uma

versão em português do guia da SANCO e a segunda apresenta tabelas em inglês extraídas do guia do Codex Alimentarius.

Os guias da SANCO ⁽¹³¹⁾ e da ANVISA-PARA ⁽¹³²⁾ apresentam uma diferença notável em relação aos outros guias comentados anteriormente. Por serem versões mais atuais, estes guias prevêm, descrevem e estabelecem parâmetros para a utilização da espectrometria de massas (empregados na cromatografia líquida ou gasosa) como meio de confirmação da presença do analito na amostra estudada, o que representa um avanço em relação aos outros guias.

1.11.2. Parâmetros Analíticos para Validação de Métodos

A validação de um método é feita para assegurar que uma metodologia analítica é exata, específica, reprodutível e robusta em uma faixa específica na qual o analito será analisado. ⁽¹⁴²⁾

Segundo a Eurachem, a validação está frequentemente associada ao desenvolvimento de um método, pois muitos parâmetros de desempenho do método relacionados à validação do método podem ser avaliados durante o seu desenvolvimento. Entretanto, os dois processos devem ser completamente separados. O procedimento de validação é uma última etapa de um processo bem organizado, planejado e sistematicamente executado anteriormente, que inclui a adequação do laboratório, o desenvolvimento do método e estudos de pré-validação. O planejamento e a otimização do método não devem ser confundidos com a etapa de validação, na qual todos os parâmetros já devem estar otimizados e a probabilidade de ocorrência de desvios deve ser mínima.

As condições de adequação de um laboratório devem ser verificadas obrigatoriamente, antes de se iniciar qualquer estudo referente ao desenvolvimento de um método de análise ⁽¹⁴³⁾. Dentre os requisitos básicos, o laboratório deve apresentar instrumentos e vidrarias calibradas, temperatura e umidade controlada, deve ter espaços apropriados para o acondicionamento correto das amostras e dos padrões dos analitos e por fim deve apresentar condições básicas de limpeza, higiene e organização.

Nas fases de otimização e pré-validação do método, a coleta das amostras que servirão de brancos de amostra devem ser feitas com base em alguns critérios pré-determinados ^(143,144) e estes critérios devem ser relatados juntamente aos resultados obtidos na validação.

Os guias mostrados na Tabela 6 apresentam definições e critérios para a obtenção dos parâmetros necessários à validação de um método, chamados de figuras de mérito ou parâmetros de desempenho. Estas definições e critérios podem variar entre os guias, entretanto os parâmetros descritos a seguir integram basicamente todos eles.

1.11.2.1. Seletividade

É a habilidade de um método em quantificar o analito sem equívocos na presença de componentes que podem estar presentes como impurezas, produtos de degradação e excipientes. Um método específico deve medir somente o composto desejado, sem a interferência de outros compostos, sendo que uma separação não é necessariamente requerida. ⁽¹⁴⁵⁾

Na cromatografia líquida, a seletividade pode ser alcançada através da otimização das etapas de extração e de separação dos analitos. Em relação à extração, a seletividade do método é regida pelo tipo de técnica de extração selecionada e por todas as variáveis envolvidas no seu procedimento, como por exemplo, tipo de solventes e tempo de extração. A seletividade na etapa de separação cromatográfica pode variar de acordo com o tipo de recheio da coluna cromatográfica e composição da fase móvel ⁽¹²⁶⁾. A seletividade pode ser avaliada inicialmente através da comparação entre cromatogramas de extratos de brancos da matriz e extratos de brancos da matriz fortificada com padrões dos agrotóxicos para verificar a presença de interferentes no mesmo t_R dos analitos. Em análises por HPLC-DAD, a seletividade deve ser avaliada também através do teste de pureza dos picos, verificada em três pontos, início, ápice e final do pico. Os espectros de UV obtidos nestes três pontos e o espectro do padrão do analito devem ser iguais. ⁽¹⁴⁶⁾

1.11.2.2. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato ⁽¹⁴⁷⁾. Outra definição relevante é dada pela IUPAC, de que o LD é a menor concentração do analito na amostra que pode ser distinguida de zero com confiança. ⁽¹²⁷⁾

No desenvolvimento de um método, quando ocorre concentração dos analitos na etapa de extração da amostra é necessário fazer uma distinção entre dois tipos de LD que apresentam valores diferentes. O LD do instrumento (LDI) é a concentração correspondente à área do pico verificada no cromatograma do analito. O LD do método (LDM) é o valor da concentração do agrotóxico na matriz antes da sua extração e consequente concentração. O LDI e o LDM relacionam-se através da Equação 12:

$$\text{LDM} = \frac{\text{LDI}}{\text{fator de concentração}} \quad [\text{Eq. 12}]$$

onde:

fator de concentração: número de vezes no qual o analito foi concentrado no procedimento de extração.

O LDI pode ser determinado de formas diferentes sendo que as mais comuns são através do método da relação sinal-ruído e através dos parâmetros da curva analítica.

No método da relação sinal-ruído, o LDI é determinado através da injeção de extratos da matriz fortificada com baixas concentrações do analito. Nos cromatogramas obtidos, o LDI é a concentração que resulta em um sinal com altura três vezes maior que o ruído da linha de base.

(130,145)

O LDI pode ser obtido também através da inclinação da curva analítica, como mostrado na Equação 13:

$$\text{LDI} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad [\text{Eq. 13}]$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão da resposta

S = inclinação ou coeficiente angular da curva

O parâmetro s pode ser a estimativa do desvio padrão da equação da curva de regressão ou do coeficiente linear da equação.

O INMETRO ⁽¹³³⁾ e a Eurachem ⁽¹²⁰⁾ expressam o LDI através do desvio padrão dos valores dos brancos das amostras ou brancos das amostras fortificadas, como mostrado na Equação 14:

$$\text{LDI} = \text{média dos valores dos brancos da amostra} + 3 \cdot s \quad [\text{Eq. 14}]$$

onde:

s = desvio padrão dos valores dos brancos da amostra

ou

$$\text{LDI} = 0 + 3 \cdot s \quad [\text{Eq. 15}]$$

onde:

s = desvio padrão dos valores dos brancos das amostras fortificados

Nas duas determinações, o guia da Eurachem recomenda a análise de 10 amostras (n = 10) e o INMETRO, 7 ou mais. A AOAC adota a determinação do LDI mostrada na Equação 14, mas com a análise de 20 amostras ⁽¹²⁵⁾. A determinação do LDI através da Equação 14 pode ser problemática, pois geralmente é difícil medir corretamente o branco da amostra ou esta medida é altamente variável. Além disso, o valor determinado desta maneira é independente do analito. ⁽¹²⁵⁾

1.11.2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com exatidão e precisão adequada. ⁽¹⁴⁵⁾

Para a determinação do LQ do instrumento (LQI), as definições e as equações são as mesmas utilizadas para o cálculo do LDI. Pelo método do sinal-ruído, o LQI é a concentração do analito que resulta em um sinal com altura 10 x maior que o ruído da linha de base. ⁽¹⁴⁷⁾

A determinação do LQI através da curva analítica é expressa pela Equação 16:

$$\text{LQI} = 10 \times \frac{s}{S} \quad [\text{Eq. 16}]$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão da resposta

S = inclinação ou coeficiente angular da curva

A Eurachem ⁽¹²⁰⁾ e o INMETRO ⁽¹³³⁾ apresentam duas formas de calcular o LQI. A primeira é similar à utilizada para o cálculo do LDI, exceto que neste caso, LQI é a concentração do analito correspondente ao valor do branco da amostra mais 5, 6, ou 10 x o desvio padrão da média. A segunda forma é uma opção no caso de haver dificuldade em se encontrar brancos de amostra mensuráveis. Inicialmente deve-se definir qual é a precisão aceitável do método no nível do limite de quantificação. Para esta determinação, brancos da amostra são fortificados com várias concentrações do analito próximas ao valor de LDI. São feitas então 10 replicatas de injeção com cada uma das concentrações. Calcula-se a estimativa do desvio padrão dos valores do analito em cada concentração e constroem-se um gráfico da estimativa do desvio versus a concentração. No gráfico, o LQI é a concentração que corresponde à precisão aceitável do método no nível do limite de quantificação, especificada anteriormente.

1.11.2.4. Linearidade e Curva Analítica

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração, determinada de faixa linear de trabalho ou intervalo de linearidade ^(120,133). No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos LDI e LQI. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do instrumento.

A faixa linear deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa linear. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa linear de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior que o limite de detecção do método. ⁽¹³³⁾

Em geral, são necessários vários pontos de calibração para determinar a faixa de trabalho. O INMETRO ⁽¹³³⁾ e o Codex ⁽¹²⁹⁾ sugerem 7 ou mais pontos, a AOAC ⁽¹²⁶⁾, de seis a 8 pontos. Os guias da ICH ⁽¹³⁰⁾, ANVISA ⁽¹²⁸⁾, e GARP ⁽¹³⁵⁾ sugerem 5 concentrações.

A maior parte dos guias citados recomendam que os pontos das curvas sejam preparados em extratos da matriz, com o objetivo de contabilizar os erros de preparo das amostras, dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 ⁽¹⁴⁸⁾. O valor do coeficiente a (intercepto) também deve ser observado, pois este deve ser menor que uma pequena porcentagem da resposta obtida para o analito no nível avaliado ⁽¹⁴⁹⁾. Caso isto não ocorra, deve-se demonstrar que este fator não afeta a exatidão do método ⁽¹⁴⁶⁾. Entretanto, nenhum dos guias sugere qual é a porcentagem aceitável.

A linearidade do método pode ser avaliada de duas formas. A primeira delas é através da construção do gráfico de resíduos. Os resíduos representam a diferença entre a concentração nominal (teórica) e a concentração média obtida, em porcentagem. Para cada uma das curvas dos analitos, constroem-se um gráfico dos resíduos versus a concentração nominal. Deve-se obter uma distribuição aleatória entre os valores residuais positivos e negativos, sem nenhuma tendência ou padrão, para confirmação da linearidade. ^(127,146,147,150,151)

Outra alternativa para estabelecer a linearidade é dividir a resposta pelas respectivas concentrações obtendo as respostas relativas. Plota-se então um gráfico com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x . A linha obtida deve ser horizontal em toda faixa linear. Este gráfico deve mostrar também os desvios admitidos (geralmente ± 5). Os valores (pontos) que estiverem fora da faixa determinada denotam concentrações analíticas que se encontram fora da faixa linear. ^(146,147,152)

1.11.2.5. Exatidão, Precisão e Recuperação

A exatidão é o grau de concordância entre uma medida (expressa como um valor médio resultante de uma série de medidas) e o valor esperado ⁽¹⁵²⁾. A exatidão do método pode ser

avaliada através de estudos de porcentagem de recuperação do analito em amostras fortificadas com concentrações conhecidas. ^(133,147)

A porcentagem de analito recuperado (R) é calculada pela Equação 17:

$$R (\%) = \frac{C_2}{C_1} \times 100 \quad [\text{Eq. 17}]$$

onde:

C_1 = Concentração inicial do agrotóxico antes da extração

C_2 = Concentração do agrotóxico após a extração

As concentrações utilizadas neste estudo devem cobrir a faixa de interesse e devem incluir uma concentração próxima ao LQI. ⁽¹⁴⁶⁾

Os guias da ICH ⁽¹³⁰⁾ e da ANVISA ⁽¹²⁸⁾ recomendam um mínimo de 9 determinações cobrindo a faixa especificada do procedimento, em três concentrações (baixa, média e alta) e com 3 replicatas de cada uma, para determinação da repetibilidade. O manual da GARP ⁽¹³⁵⁾ recomenda que estas concentrações sejam definidas tomando por base a concentração do LQM, sendo então de 1, 2 e 10 x o LQM. O guia do INMETRO ⁽¹³³⁾ recomenda que as três diferentes concentrações sejam uma próxima ao limite de detecção, outra próxima à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

O guia da SANCO sugere um mínimo de 5 replicatas em dois níveis de concentração (com o objetivo de se avaliar também a precisão do método). O primeiro é a concentração do LQM e o outro deve ser um nível de concentração maior, e a SANCO recomenda que seja o LMR do agrotóxico na matriz estudada. ⁽¹³¹⁾

A precisão descreve o grau de concordância entre medidas independentes obtidas por meio de um procedimento analítico na análise de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas ^(133,152). A precisão está relacionada ao desvio aleatório e mede a dispersão ou espalhamento dos valores ao redor da média e é expressa como estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV), como mostrado na Equação 18.

$$CV (\%) = \frac{\text{estimativa do desvio padrão absoluto}}{\text{recuperação média}} \times 100 \quad [\text{Eq. 18}]$$

onde:

estimativa do desvio padrão absoluto = $[\sum (x_i - X_m)^2 / n-1]^{1/2}$,

n = número total de medidas,

x_i = valor medido,

X_m = média das medidas.

A precisão pode ser avaliada em termos de repetitividade e de precisão intermediária.

A repetitividade representa a precisão de resultados obtidos sob as mesmas condições como: mesmo laboratório, mesmo analista, instrumento e repetições em curto espaço de tempo (133,152)

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra (ou amostras semelhantes), utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições que irão variar (uma ou mais): analista, equipamento, ou tempos diferentes ⁽¹³³⁾. Os guias de validação apresentam diferentes maneiras e números de ensaios para a determinação da repetitividade e da precisão intermediária.

Tanto os resultados obtidos para as porcentagens de recuperação quanto os CV de repetitividade e precisão intermediária dependem do tipo de matriz estudada, do procedimento de extração e principalmente da concentração do analito. Deve-se esperar, por exemplo, uma maior variabilidade dos resultados em valores próximos ao LDI ⁽¹⁴⁷⁾. Dessa forma, na Tabela 7 são mostrados valores aceitáveis de porcentagem de recuperação e CV em função de diferentes concentrações, previstos pelos guias da AOAC ⁽¹²⁶⁾ e SANCO ⁽¹³¹⁾.

Tabela 7: Valores aceitáveis de porcentagem de recuperação e CV em função da concentração.

Guia	Concentração (ng g ⁻¹)	Limites de Recuperação (%)	CV repetitividade (%)
AOAC	1000	75-120	8
	10	70-125	15
SANCO	1-10	70-120	30
	10-100	70-120	20

1.11.2.6. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método pode ser classificado como sendo se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. A robustez é o único parâmetro de uma validação que pode ser avaliado já na etapa de desenvolvimento do método, através da observação da variação dos resultados com pequenas alterações no procedimento de extração e na separação dos analitos.

A robustez pode ser avaliada também isoladamente em um experimento individual, chamado de teste de Youden, no qual os fatores que podem afetar o método são avaliados simultaneamente através de um planejamento fatorial. Neste teste, avalia-se não só a robustez do método, como também verifica-se a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Neste caso, podem ser avaliados fatores como massa de amostra, temperatura de extração, volume de solvente, tipo de solvente, tempo de extração e de agitação, tipo de agitação, dentre outras.^(133,142)

Em relação à separação cromatográfica podem ser avaliados fatores como pH da fase móvel, porcentagem de solvente orgânico, colunas cromatográficas diferentes (variando lotes ou fornecedores), temperatura da coluna, vazão, dentre outras.

1.11.2.7. Confirmação por Espectrometria de Massas

Segundo o guia da SANCO, os detectores seletivos por DAD e por fluorescência, empregados em LC possuem especificidade limitada e o uso destes pode dar somente evidências limitadas de confirmação.⁽¹³¹⁾

O termo “confirmação por espectrometria de massas”, geralmente refere-se a evidência decisiva de que a amostra contém o analito, ou seja, uma prova de identidade.

Os íons dos analitos utilizados para sua identificação e quantificação na amostra devem apresentar picos (com razão sinal/ruído maior ou igual a três) com tempo de retenção, forma e resposta similares àqueles obtidos para o mesmo analito em uma solução padrão, a qual deve ser analisada no mesmo lote das amostras.

Quando se monitora uma faixa determinada de massas ou se utiliza o monitoramento de íons selecionados (SIM), são necessários pelo menos dois íons de $m/z > 200$ ou três íons com $m/z > 100$, de preferência incluindo o íon molecular. Para alguns analitos, são aceitáveis íons com $m/z < 100$, desde que não seja possível a obtenção de íons com $m/z > 100$.⁽¹³¹⁾

Outro guia da Comissão da Comunidade Européia voltado à análise de resíduos e contaminantes em produtos animais também apresenta alguns critérios para a utilização de LC-MS/MS como método de confirmação. Neste guia, é proposto um sistema de pontos de identificação (PI) que serve para definir quantos íons de um mesmo analito devem ser monitorados pelo método de confirmação selecionado. Todas as combinações de diferentes técnicas de MS, LC e GC recebem um determinado número de PI por íon monitorado. São necessários um mínimo de 3 a 4 PI para que o método possa ser utilizado como meio de confirmação. Como definido por este guia, a LC-MS/MS, recebe um PI por cada íon precursor e 1,5 PI por íon produto. Desta forma, é necessário o monitoramento de um íon precursor e dois íons produtos para que a LC-MS/MS seja utilizada para a confirmação dos resultados. Os valores de PI para outras combinações de técnicas também são relatados neste guia. Não há especificação quanto ao valor da m/z dos íons diagnósticos. ⁽¹⁵³⁾

Ao se utilizar uma técnica MS/MS em condições SIM, as intensidades relativas dos íons dos analitos (expressos como porcentagem da intensidade do íon ou transição mais intenso no espectro) devem corresponder às mesmas obtidas com soluções padrões medidas na mesma concentração e nas mesmas condições. Em outras palavras, as abundâncias relativas dos íons do analito na amostra devem ser iguais as abundâncias obtidas com a injeção de padrões do analito em concentrações próximas as encontradas na amostra. ^(131,154)

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de métodos para determinação de agrotóxicos em solo e em água das áreas de recarga do Aquífero Guarani, localizado na região das nascentes do rio Araguaia, na divisa dos estados de Mato Grosso e Goiás. Os agrotóxicos estudados foram imazetapir, nicossulfurom, imazaquim, carbofuram, atrazina, linurom, clorimurom-etil e diflubenzurom, empregados em culturas de milho ou de soja, que são as principais nesta região. Outro objetivo deste trabalho foi estudar, através das isotermas de adsorção e dessorção, o comportamento dos agrotóxicos imazetapir, nicossulfurom, imazaquim, clorimurom-etil e diflubenzurom no solo desta região.

2.1. Estratégias para Atingir os Objetivos

A SPE foi selecionada e otimizada para a extração e preparo das amostras de água. Foi desenvolvido um método de análise multirresíduo dos agrotóxicos estudados em amostras de água de forma que os valores de LQM ficassem abaixo ou pelo menos iguais ao limite máximo de resíduos (LMR) de agrotóxicos em água, sugerido pela CE, de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$.

Foram estudadas quatro técnicas para a extração de agrotóxicos em solo coletado na região de Mineiros, Goiás, sendo elas: extração por agitação mecânica, por banho ultrassônico e assistida por micro-ondas caseiro ou industrial, sendo que as três primeiras foram validadas.

Para separação, identificação e quantificação dos agrotóxicos foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC), com detecção por arranjo de diodos (Diode Array Detection, DAD) e a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série através da Fonte de Ionização por Eletronebulização (Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, LC-ESI-MS/MS). Em ambos os métodos foi empregada uma mesma coluna de fase reversa C18, comercial.

Os métodos desenvolvidos foram validados por meio da obtenção das seguintes figuras de mérito: limites de detecção e de quantificação, curva analítica, linearidade, seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Após a validação, os métodos foram utilizados para a análise de amostras de água coletadas nas proximidades de áreas do aquífero guarani cultivadas com as culturas de milho ou de soja.

O método otimizado e validado para a análise do solo foi aplicado em amostras de solo coletadas em outras duas regiões, Goiânia e Rio Grande do Sul, em áreas com cultivo intensivo de soja.

Os parâmetros físico-químicos, coeficiente de adsorção à matéria orgânica (K_{oc}) e coeficiente de adsorção (K_d) dos agrotóxicos imazetapir, nicossulfurom, imazaquim, clorimurometil foram determinados em solo coletado na região estudada.

Os resultados obtidos neste projeto permitiram avaliar a contaminação e suas implicações ambientais, seja quanto à sorção no solo ou à presença dos agrotóxicos em águas superficiais e/ou subterrâneas. Este trabalho compreendeu uma das etapas do projeto “Manejo Agro-Ecológico das Áreas de Recarga do Aquífero Guarani na Região das Nascentes do Rio Araguaia, GO/MT”, desenvolvido em conjunto com a Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e Solventes

- Acetona p.a., Merck
- Ácido fosfórico p.a., Mallinckrodt
- Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- Diclorometano, Tedia, grau HPLC
- Etanol p.a., Tedia
- Metanol, Tedia, grau HPLC
- Acetato de Etila, Tedia, grau pesticida
- Acetonitrila, Tedia, grau HPLC
- Tetraidrofurano, Tedia, grau HPLC
- Tampão pH 4, Synth
- Tampão pH 7, Synth
- Extran, Merck

3.1.2. Padrões de Agrotóxicos

- Imazetapir, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Nicossulfurom, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Imazaquim, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Carbofuram, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Atrazina, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Linurom, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Clorimurom-etil, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)
- Diflubenzurom, grau de pureza >99%, Chem Service (West Chester, PA, USA)

3.1.3. Colunas Cromatográficas

- Coluna analítica de fase reversa Nova-Pak RP-18, Waters, partículas de 4 µm, dimensões: 3,9 x 150 mm
- Coluna de guarda Nova-Pak RP-18, Waters, partículas de 4 µm, dimensões: 3,9 x 20 mm

3.1.4. Cartuchos de SPE

- Oasis HLB, Waters, 3 mL, 60 mg
- LiChrolut EN, Merck, 3 mL, 200 mg
- LiChrolut NH₂, Merck, 3 mL, 500 mg
- LiChrolut RP-18, Merck, 3 mL, 500 mg
- Supelclean C18, Supelco, 3 mL, 500 mg
- Supelclean ENVI-8, Supelco, 3 mL, 500 mg

3.2. Equipamentos

- Agitador magnético Corning Glass Works, modelo PC-351
- Agitador roto torque Cole-Parmer Instruments Company, modelo 7637-10.
- Agitador vórtex Phoenix, modelo AP 56.
- Balança analítica, Fischer Scientific (sensibilidade de 0,0001 g), modelo A-250.
- Bomba a vácuo Millipore
- *Manifold* para SPE Supelco para a concentração simultânea de até 12 amostras;
- Sistema Milli-Q Plus, Millipore.
- Sistema de ultrassom Thornton, modelos T14 e T50.
- pHmetro Digimed, modelo DM21
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto por:
 - Controlador de sistema SCL-10A;
 - Bomba de alta pressão, tipo recíproca de pistão duplo, modelo LC-10AT;
 - Injetor automático, amostragem programada de 10 µL, modelo SIL-10AF;
 - Forno para coluna, modelo CTO-10AS;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, cela de 8 µL de volume, 10 mm de caminho ótico, modelo SPD-M10A;
 - Sistema de aquisição de dados: software de aquisição de dados cromatográficos Class VP.
- Cromatógrafo a líquido, LC-MS-MS Waters Alliance 2695 composto por:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;

- Espectrômetro de massas em série Micromass Quattro Micro™ API com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*; atuando no modo MRM;
- Sistema de aquisição e tratamento de dados: *software* Mass Lynx v. 4.1;
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda.

3.3. Critérios Para a Seleção dos Agrotóxicos Estudados e suas Propriedades Químicas e Físicas.

A escolha dos agrotóxicos a serem estudados foi feita com base em um levantamento dos agrotóxicos mais utilizados na região em estudo. Este levantamento foi feito por alunos do curso de agronomia da Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior (FIMES-Mineiros/GO) em parceria com a Embrapa Meio Ambiente-Jaguariuna/SP, por meio de aplicação de questionários junto aos produtores das culturas de milho e de soja da região. Para os agrotóxicos mais utilizados foram calculados os potenciais de contaminação de águas subterrâneas pelo método de GUS, com dados obtidos da literatura. Os agrotóxicos que apresentaram potencial de contaminação de médio a alto (índice de GUS $\geq 2,8$) foram selecionados para este trabalho. Deve-se ressaltar que os dados da literatura utilizados no cálculo do índice de GUS referiam-se a solos temperados, com propriedades químicas e físicas diferentes das do solo estudado, desta forma, os valores obtidos serviram apenas como uma estimativa inicial do potencial de contaminação dos agrotóxicos.

3.3.1. Descrição e Propriedades Químicas e Físicas dos Agrotóxicos Selecionados para Estudo

Na Figura 11 são mostradas as estruturas químicas dos agrotóxicos estudados e posteriormente foi feita uma breve descrição de cada um deles ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁸⁾. A grande maioria dos agrotóxicos encontra-se em vários produtos formulados de empresas diferentes, inclusive em formulações diferentes. Os produtos formulados descritos nesta seção fazem parte de uma lista divulgada trimestralmente pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) para acompanhamento de flutuação dos preços dos produtos formulados dos agrotóxicos. Os preços mostrados representam valores médios de janeiro de 2006 até abril de 2009.

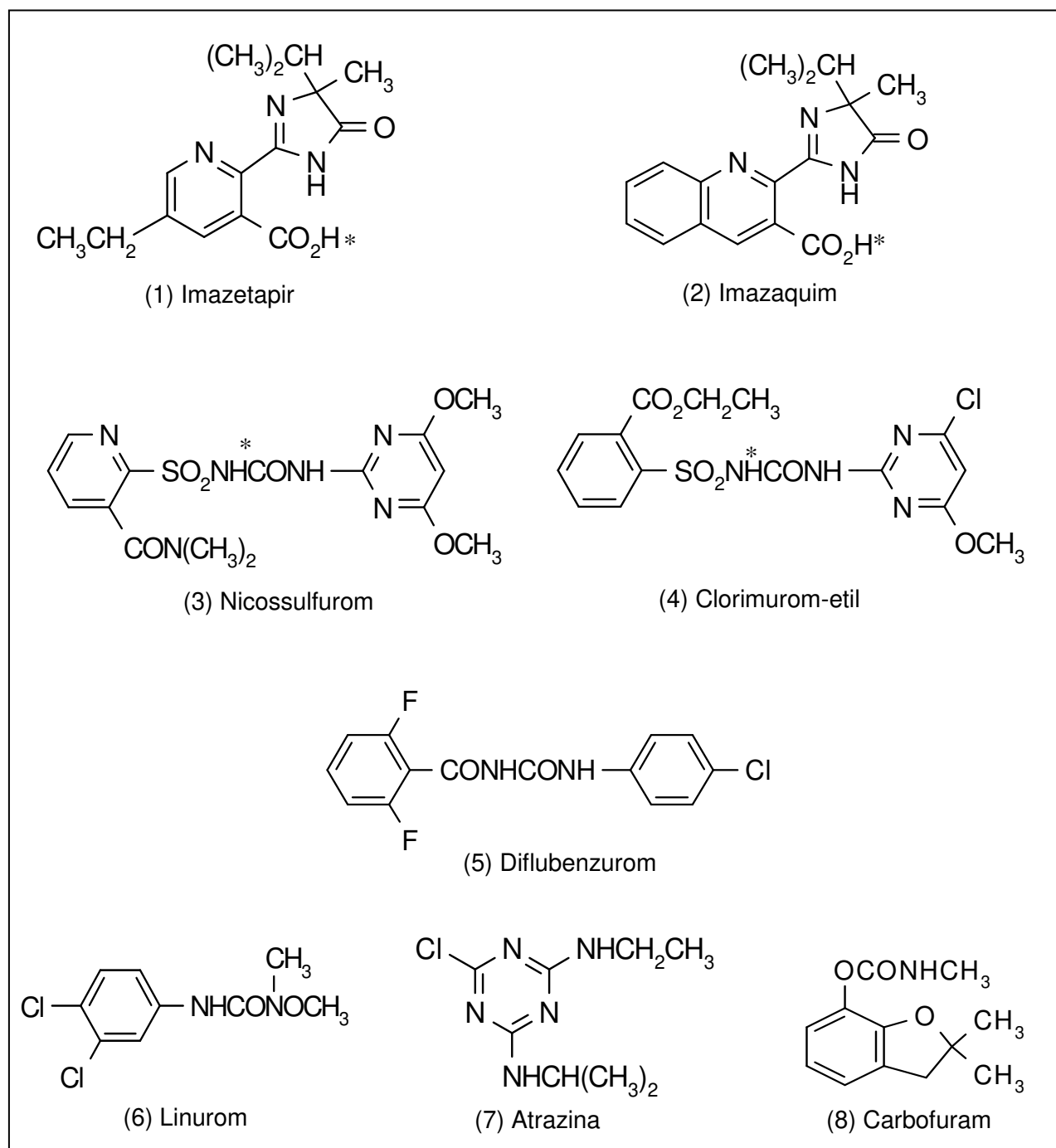


Figura 11: Estruturas dos agrotóxicos estudados.* Valores dos pKa indicados na Tabela 8.

Os produtos formulados contendo agrotóxicos comercializados vêm sempre acompanhados de uma bula, na qual se encontram diversas informações importantes sobre o produto e uma delas é a dose de aplicação (d.a.) recomendada pelo fabricante. Esta dose é

estabelecida de acordo com o tipo de cultura, plantas infestantes ou pestes e também do tamanho da área cultivada (em hectare, ha) ^(155,156). Na Tabela 8 encontram-se algumas propriedades químicas e físicas obtidas na literatura ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶¹⁾, assim como os valores de d.a. dos agrotóxicos estudados em ng g⁻¹. A conversão dos valores em g ha⁻¹ para a concentração em ng g⁻¹, foi calculada considerando-se a densidade (d=1,1 g cm⁻³) ⁽⁴⁸⁾ e a profundidade do solo coletado.

3.3.1.1. Imazetapir (IMZE)

- Nome Químico: ácido-2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-5-etil-3-piridinocarboxílico
- Formula Bruta: C₁₅H₁₉N₃O₃
- Grupo Químico: imidazolinona
- Classe Agronômica: herbicida
- Modalidade de emprego: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, feijão e soja e aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes na cultura de arroz e soja.
- Produto formulado: Pivot
- Formulação: concentrado solúvel
- Preço do produto formulado: R\$ 172,00 / embalagem 5 L
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 530
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha⁻¹): 106
- Valor gasto por hectare: R\$ 34,40
- Titular do registro: Basf S.A.
- Classificação toxicológica: III - Medianamente Tóxico

3.3.1.2. Imazaquim (IMZA)

- Nome Químico: ácido 2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-quinolinacarboxílico
- Fórmula Bruta: C₁₇H₁₇N₃O₃
- Grupo Químico: imidazolinona
- Classe Agronômica: herbicida

- Modalidade de emprego: aplicação em pré-emergência das plantas infestantes na cultura da soja
- Produto formulado: Scepter 70 DG
- Formulação: granulado dispersível
- Preço do produto formulado: R\$ 59,00 / embalagem 200 g
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 140
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 140
- Valor gasto por hectare: R\$ 59,00
- Titular do registro: Basf S.A.
- Classificação toxicológica: III - Medianamente Tóxico

3.3.1.3. Nicossulfurom (NICO)

- Nome Químico: 2-[[[(4,6-dimetóxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-N,N-dimetil-3-piridinacarboxamida
- Fórmula Bruta: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$
- Grupo Químico: sulfoniluréia
- Classe Agronômica: herbicida
- Modalidade de emprego: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes na cultura do milho.
- Produto formulado: Sanson 40 SC
- Formulação: suspensão concentrada
- Preço do produto formulado: R\$ 339,00 / embalagem de 5 L
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 200
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 55
- Valor gasto por hectare: R\$ 93,20
- Titular do registro: Ishihara Brasil Defensivos Agrícolas LTDA
- Classificação toxicológica: I - Extremamente Tóxico

3.3.1.4. Clorimurom-etil (CLOR)

- Nome Químico: etil 2-[[[(4-cloro-6-metóxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoate
- Fórmula Bruta: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$
- Grupo Químico: sulfoniluréia

- Classe Agronômica: herbicida
- Modalidade de emprego: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes na cultura de soja.
- Produto formulado: Classic
- Formulação: Granulado dispersível
- Preço do produto formulado: R\$ 64,88 / embalagem 300 g
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 75
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 50
- Valor gasto por hectare: R\$ 43,20
- Titular do registro: Du Pont do Brasil S.A.
- Classificação toxicológica: III - Medianamente tóxico

3.3.1.5. Diflubenzuom (DIFLU)

- Nome Químico: N-[[[(4-clorofenil)amino]carbonila]-2,6-difluorobenzamida
- Fórmula Bruta: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$
- Grupo Químico: benzoiluréia
- Classe Agronômica: acaricida e inseticida
- Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, citros, milho, soja, tomate e trigo.
- Produto formulado mais comum ou indicado: Dimilin
- Formulação: pó molhável
- Preço do produto formulado: R\$ 49,70 / embalagem 500 g
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g) : 125
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 45
- Valor gasto por hectare: R\$ 17,90
- Titular do registro: Crompton LTDA
- Classificação toxicológica: IV - Pouco tóxico

3.3.1.6. Linurom (LINU)

- Nome Químico: N'-(3,4-diclorofenil)-N-metóxi-N-metiluréia
- Fórmula Bruta: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$
- Grupo Químico: uréia

- Classe Agronômica: herbicida
- Modalidade de emprego: aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de alho, batata, cebola, cenoura, ervilha, milho e soja.
- Produto formulado: Afalon SC
- Formulação: suspensão concentrada
- Preço do produto formulado: R\$ 75,00 / embalagem 1 L
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 450
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 1100
- Valor gasto por hectare: R\$ 183,00
- Titular do registro: Milenia Agrociências S.A
- Classificação toxicológica: III - Medianamente Tóxico

3.3.1.7. Atrazina (ATRAZ)

- Nome Químico: 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- Fórmula Bruta: $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$
- Grupo Químico: triazina
- Classe Agronômica: herbicida
- Modalidade de emprego: aplicação em pré ou pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo.
- Produto formulado: Gesaprim 500
- Formulação: suspensão concentrada
- Preço do produto formulado: R\$ 51,00 / embalagem 5 L
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 2500
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 2250
- Valor gasto por hectare: R\$ 45,90
- Titular do registro: Syngenta Proteção de Cultivos LTDA.
- Classificação toxicológica: IV - Pouco Tóxico

3.3.1.8. Carbofuram (CARBO)

- Nome Químico: 2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato
- Fórmula Bruta: $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$
- Grupo Químico: metilcarbamato de benzofuranila

- Classe Agronômica: inseticida e nematicida
- Modalidade de emprego: aplicação no solo em culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo. Aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e trigo.
- Produto formulado: Furadan 50 GR
- Formulação: granulado
- Preço do produto formulado: R\$ 61,00 / embalagem 10 kg
- Quantidade de agrotóxico no produto formulado (g): 500
- Dose de aplicação do agrotóxico (g ha^{-1}): 1500
- Valor gasto por hectare: R\$ 183,00
- Titular do registro: FMC Química do Brasil LTDA
- Classificação toxicológica: I - Extremamente Tóxico

Tabela 8: Propriedades químicas e físicas obtidas na literatura e concentração da dose de aplicação (d.a.) dos agrotóxicos estudados.

	IMZE	IMZA	NICO	CLOR	DIFLU	LINU	ATRAZ	CARBO
Solubilidade em água (mg L^{-1})	1400	60	7	1200	0,08	64	33	351
pKa*	3,9	3,8	4,6	4,2	nd	nd	nd	nd
t_{1/2} solo (dias)	90	60	24-43	40	10	60	60	30-60
K_{oc} (mL g^{-1})	10	20	-	110	10000	400	100	22
Conc. d.a. (ng g^{-1})	31	41	16,1	15	13,2	322	659	438

* os grupos funcionais aos quais se referem estes pKa estão indicados nas estruturas dos agrotóxicos na Figura 11.
nd: não determinado

3.4. Preparação das Soluções Estoque e de Trabalho

As soluções estoque dos agrotóxicos individuais foram preparadas em acetonitrila na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e todas apresentaram estabilidade por no mínimo seis meses quando estocadas em freezer (-4°C). As soluções de trabalho de todos os agrotóxicos (10 e 50

$\mu\text{g mL}^{-1}$) foram obtidas a partir da diluição das soluções estoque em acetonitrila. Estas soluções estoque foram utilizadas para as fortificações e também para construir as curvas analíticas.

3.5. Coleta e Tratamento das Amostras

A coleta das amostras de água e de solo foi feita pelo pesquisador da EMBRAPA Meio Ambiente Dr. Marco Antonio Ferreira Gomes.

3.5.1. Amostras de Solo

As amostras de solo, livre de agrotóxicos, utilizadas nos experimentos de adsorção e dessorção e desenvolvimento de métodos de análise dos agrotóxicos em solo foram coletadas na Fazenda Chitolina (Mineiros, GO), na qual não há nenhum tipo de cultivo ativo.

Foram coletadas também amostras de solo provenientes de lavouras de soja de outras duas localidades, como descrito na Tabela 9. Todas as amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0 a 0,2 m.

Tabela 9: Locais das coletas de solo.

Pontos	Fazenda	Município/ Estado	Tipo de cultura	Localização (coordenadas)*	
				Latitude	Longitude
-	Chitolina	Mineiros/ GO	-	17.89.083	53.11.917
S1	Levi	Goiânia/GO	Soja e milho	16.67.888	49.25.388
S2	Maldaner's	Selbach/ RS	Soja	28.62.861	52.95.250

*Coordenadas referentes à localização das fazendas

As amostras S1 e S2 foram coletadas em fazendas com cultivo ativo de soja ou de milho e foram analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Todas as amostras foram secas na capela, peneiradas e peneira de 2 mm, estocadas à temperatura ambiente e protegidas da luz até serem utilizadas.

3.5.2. Amostras de Água

As amostras de água subterrâneas, livre de agrotóxicos, utilizadas para o desenvolvimento dos métodos de análise dos agrotóxicos em água foram coletadas na Fazenda Chitolina.

As amostras de água subterrâneas provenientes de áreas com cultivo ativo de soja ou de milho foram coletadas em três fazendas situadas na área de estudo. As coletas em cada fazenda, denominada de pontos, foram feitas em três profundidades diferentes, como pode ser visto na Tabela 10.

As coletas foram feitas em várias datas, de acordo com a possibilidade do grupo de coleta no local de estudo. As amostras coletadas em 12/2005; 03/2006; 03, 06, 09 e 12/2007 foram analisadas utilizando HPLC-DAD e as amostras coletadas em 04/2009 foram analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Tabela 10: Locais e profundidade das coletas de água.

Pontos	Fazenda	Município/ Estado	Tipo de cultura	Profundidade (s) (m)	Localização (coordenadas)	
					Latitude	Longitude
-	Chitolina	Mineiros/ GO	não há	2	17.89.083	53.11.917
A1	Três Irmãos	Mineiros/ GO	Soja e milho	1, 2 e 3	17.83.971	53.09.250
A2	Holândia	Mineiros/ GO	Soja, algodão e milho	1, 2 e 3	18.00.838	53.06.929
A3	Graúna	Alto Taquari/MT	soja e milho	1, 2 e 3	17.94.413	53.13.563

Em cada ponto, a coleta das amostras de água foi realizada por meio de coletores tipo piezômetros (tubos de PVC) com 70 mm de diâmetro em três profundidades distintas (1, 2 e 3 m), instalados à jusante da área cultivada. Após a coleta, as amostras foram colocadas em frascos âmbar de 1 L. Estes frascos foram então vedados e resfriados em gelo e colocadas em um isopor para transporte até o laboratório, onde foram devidamente resfriados a 4 °C, permanecendo nestas condições até o momento da extração.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro de 7 μm e membrana de PVDF de 0,22 μm , com auxílio de uma bomba de vácuo, para remoção de material particulado e colóide.

3.6. Otimização dos Procedimentos de Extração dos Agrotóxicos

3.6.1. Solo

Os brancos de amostras de solo (5 g), isentos de agrotóxicos, foram fortificados 24 horas antes da extração, com 1 mL de uma solução contendo os agrotóxicos estudados na concentração de 50 ng g^{-1} . Após a extração, os extratos foram redissolvidos em 500 μL de acetonitrila, estabelecendo-se assim o fator de concentração da amostra de 10 vezes, tornando a concentração final da amostra 500 ng g^{-1} , no caso de recuperações de 100 %.

Para a extração dos agrotóxicos do solo foram testadas as técnicas de extração por agitação mecânica, por banho ultrassônico e assistida por micro-ondas caseiro ou industrial. As variáveis otimizadas foram os solventes, pH do solvente aquoso, o tempo de extração para todas as técnicas de extração, e a potência do micro-ondas, no caso da extração assistida por micro-ondas. Foram testadas diversas condições, com diferentes combinações das variáveis para cada uma das técnicas e as que resultaram em melhores recuperações foram:

MEC - Extração por agitação mecânica : 10 mL de acetato de etila e 1 mL de água, pH 2,5, ajustado com ácido fosfórico. Tempo de agitação em rotor torque: 2 h.

BUS - Extração por banho ultrassônico: 5 mL de acetona, 5 mL de acetato de etila e 2 mL de água, pH 2,5. Tempo no ultrassom: 1 h.

MIC - Micro-ondas caseiro: 10 mL de acetato de etila, 1 mL água, pH 2,5. Tempo de aquecimento: 2 min, potência do micro-ondas: 200 W.

MInd - Micro-ondas industrial: 10 mL de acetato de etila, 1 mL água, pH 2,5. Tempo de aquecimento: 2 min, potência do micro-ondas: 200 W.

As metodologias envolvendo as três primeiras técnicas de extração foram validadas utilizando HPLC-DAD. A extração por MIC foi utilizada também no desenvolvimento de método empregando LC-ESI-MS/MS.

3.6.2. Água

No início deste trabalho foram testados vários procedimentos de SPE, com diversos tipos de sorvente comerciais e solventes diferentes para a eluição. A condição que resultou em melhores recuperações para todos os agrotóxicos em água foi a descrita a seguir.

Os cartuchos Supelclean LC-18 (500 mg, 3 mL) foram condicionados com 2 mL de acetato de etila, 2 mL de água e 2 mL de água, com pH ajustado em 2,5 com ácido fosfórico. Um litro da amostra (pH ajustado em 2,5 com ácido fosfórico) foi passado pelos cartuchos, sob vácuo, a uma vazão de 10 mL min⁻¹. Os cartuchos foram secos sob vácuo por 30 min. Após a secagem, a eluição foi feita com 5 mL de acetato de etila e 2 mL de acetonitrila. O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e redissolvido em 500 µL de fase móvel.

3.7. Condições de Análise de Solo e Água por HPLC-DAD

Foram feitos vários estudos de composição, tipo de modificador orgânico, pH e vazão de fase móvel (FM) e modo de eluição (isocrática ou gradiente) para a determinação das melhores condições de separação. A FM foi acidificada, quando necessário, com uma solução de ácido fosfórico 10% (v/v). Inicialmente, os agrotóxicos foram injetados separadamente para a identificação dos tempos de retenção e depois em conjunto para a otimização da separação.

A separação dos compostos foi feita empregando uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e detecção no comprimento de onda de 220 nm, no qual todos os agrotóxicos absorviam. Para a separação foi utilizada a eluição por gradiente, conforme programação mostrada na Tabela 11.

Tabela 11: Programação do gradiente utilizada na separação dos agrotóxicos empregando HPLC-DAD.

Tempo (min)	% A	% B
0	80	20
2	80	20
8	50	50
15	50	50
20	30	70
25	80	20
30	80	20

Solvente A: Água em pH 3 ajustado com ácido fosfórico

Solvente B: Acetonitrila/água (90:10, v/v)

3.8. Condições de Análise de Solo e Água por LC-ESI-MS/MS

3.8.1. Condições Cromatográficas

Para a determinação das condições que resultariam em boa separação e na melhor detectabilidade no LC-ESI-MS/MS foram feitos vários estudos de composição da fase móvel e tipos de aditivos a serem adicionados na FM. As condições que geraram os melhores resultados foram a eluição por gradiente, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando como aditivo, ácido fórmico 1% (v/v). Na Tabela 12 encontra-se a programação do gradiente empregada.

Tabela 12: Programação do gradiente utilizada na separação dos agrotóxicos empregando LC-ESI-MS/MS.

Tempo (min)	% A	% B
0	40	60
2	40	60
6	10	90
10	40	60
15	40	60

Solvente A: Água/ácido fórmico 1 % (v/v)

Solvente B: Acetonitrila/água (90:10, v/v)

3.8.2. Otimização dos Parâmetros para Fragmentação dos Agrotóxicos no Espectrômetro de Massas

Para análise dos agrotóxicos empregou-se a fonte de ionização à pressão atmosférica (API) no modo por eletronebulização (ESI). As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: temperatura de 120°C na fonte e vazão de injeção do padrão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura do gás N_2 (gás de dessolvatação) foi de 450°C , mantida a uma vazão de 800 L h^{-1} e para o cone de seleção dos íons a 60 L h^{-1} . A energia do capilar variou de 3-3,5 kV e a do segundo cone (extrator), variou de 3-5 V.

Nas Tabelas 13 a 15 são mostrados os parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para a análise de cada um dos agrotóxicos. Os compostos analisados no modo ESI+, foram divididos em duas funções. Os compostos da Função 1 foram analisados na janela de retenção de 0-4,5 min e os da Função 2 ficaram no intervalo de 4,5-5,7 min (Tabelas 13 e

14, respectivamente). Na Tabela 15, são apresentados os parâmetros do diflubenzurom, que respondeu melhor no modo de ionização negativo (ESI-). O diflubenzurom foi analisado na função 3, com janela de retenção de 5,7-10 min.

Tabela 13: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, usando o modo de aquisição MRM, função 1, com janela de retenção de 0-4,5 min.

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Transição (m/z) Íon Precursor > Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do Cone (V)	t _R (min)	Tempo de residência (s)
NICO	410,4	411,3>182,2	20	23	2,4	0,1
		411,3>213,4	20	23	2,4	0,1
IMZA	311,3	312,4>199,2	26	34	3	0,1
		312,4>267,5	22	34	3	0,1
IMZE	290,3	289,3>177,2	28	35	2,7	0,1
		289,3>230,4	24	35	2,7	0,1
CARBO	221,3	222,3>122,8	24	21	3,2	0,1
		222,3>165,3	10	21	3,2	0,1
ATRAZ	215,7	216,2>174,2	18	33	3,6	0,1
		216,2>103,7	26	33	3,6	0,1

Tabela 14: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo ESI+, usando o modo de aquisição MRM, função 2, com janela de retenção de 4,5-5,7 min.

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Transição (m/z) Íon Precursor > Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do Cone (V)	t _R (min)	Tempo de residência (s)
CLOR	414,8	415,2>186,2	30	26	5	0,3
		415,2>121	40	26	5	0,3
LINU	249,1	249,1>160,2	18	23	5	0,5
		249,1>182,2	18	23	5	0,5

Tabela 15: Parâmetros otimizados para análise dos compostos por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo ESI-, para o modo de aquisição MRM, função 3, com janela de retenção de 5,7-10 min.

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Transição (m/z) Íon Precursor > Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do Cone (V)	t _R (min)	Tempo de residência (s)
DIFLU	310,7	309,3>156,1	10	23	6,2	0,3
		309,3>289,4	10	23	6,2	0,3

3.9. Determinação das Propriedades do Solo da Região de Mineiros/GO.

Os teores de carbono e de matéria orgânica total, e do pH do solo foram determinados por técnicos no laboratório de Solos da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. Os teores dos óxidos de alumínio e de ferro foram determinados por absorção atômica, pelo Prof. José Salvador Barone, no Laboratório Puriquímica, São Paulo.

3.9.1. Determinação do Teor de Matéria Orgânica do Solo

Para a determinação do teor de matéria orgânica total presente no solo foi utilizado o método da perda por ignição, descrito a seguir.

Uma cápsula de porcelana foi aquecida em estufa, a 100 °C por uma hora. Após este período, a cápsula foi resfriada até aproximadamente 25 °C em dessecador, e posteriormente pesada. Dentro dela foram pesados 100 g do solo (P₁), que foram aquecidos em estufa a 65 °C por 12 h. Após este período o material foi resfriado em dessecador, pesado (P₂) e posteriormente triturado.

Pesaram-se 4,0 g do solo triturado em um cadinho de porcelana calcinado a 600 °C, e este foi levado à estufa a 105 °C por duas horas, resfriado em dessecador e pesado (P₃). O cadinho contendo o solo foi colocado em uma mufla aquecida a 600 °C por uma hora. O material foi resfriado em dessecador e pesado (P₄). O teor de matéria orgânica total foi calculado pela Equação 19:

$$\% \text{ Matéria Orgânica (MO)} = \frac{(P_3 - P_4) \times (100 - (P_1 - P_2))}{4,0} \quad [\text{Eq. 19}]$$

O cálculo de $(P_1 - P_2)$, significa perda da umidade e $(P_3 - P_4)$, perda do total de sólidos voláteis.

3.9.2. Determinação do Teor de Carbono Orgânico

Assumindo-se que 100 % de matéria orgânica contêm aproximadamente 58 % de carbono orgânico, o resultado do teor de carbono orgânico foi obtido dividindo-se o teor de matéria orgânica total, obtido no item anterior, pelo fator 1,724 de van Bemmelen, conforme a Equação 20:

$$\% \text{ Carbono Orgânico (CO)} = \frac{\% \text{ MO}}{1,724} \quad [\text{Eq. 20}]$$

3.9.3. Determinação do pH do solo

Para determinação da acidez, 5,0 g do solo seco ao ar e 75 mL de solução extratora de acetato de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0 foram colocados em um erlenmeyer de 250 mL. Após agitação por 15 minutos e repouso por 16 horas, retirou-se uma alíquota de 25 mL do sobrenadante e adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína a 1% e determinou-se a quantidade de H⁺Al por titulação com NaOH $0,025 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi medido em água na proporção 1:2,5 (solo-água).

3.9.4. Estudo da Adsorção e Dessorção de Agrotóxicos em Amostras de Solo

O estudo de adsorção e dessorção foi feito somente para os agrotóxicos imazetapir, imazaquim, nicossulfurom, clorimurom-etil e diflubenzurom, pois estes fazem parte de uma nova geração de agrotóxicos e os dados de suas adsorções em solos ainda são escassos na literatura.

O comportamento de adsorção e dessorção do imazetapir, imazaquim, nicossulfurom, clorimurom-etil e diflubenzurom foi estimado através do método de equilíbrio em partição, cujo procedimento se encontra descrito a seguir. ⁽¹⁶²⁾

O solo foi pesado em tubos de centrífuga de 50 mL e a estes tubos foi adicionada uma solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (para simular uma força iônica similar a qual se encontra o solo

em condições naturais) ^(163,164) contendo os agrotóxicos em várias concentrações, obtidas a partir da solução estoque. As faixas de concentração dos agrotóxicos utilizadas neste estudo foram definidas de forma que fossem amplas e procurou-se atingir a capacidade máxima de adsorção do solo. Para preparar as soluções foi necessário considerar também a solubilidade dos compostos em água. Dentre os agrotóxicos estudados, o diflubenzurom foi o único que apresentou solubilidade muito baixa ($0,08 \text{ mg L}^{-1}$) e por isso a sua concentração máxima foi de $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Na Tabela 16 são mostradas as massas de solo, os volumes de solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e as concentrações dos agrotóxicos utilizadas nos experimentos. Somente para o nicossulfurom foi utilizada uma massa maior devido a sua solubilidade em água.

Tabela 16: Concentrações dos agrotóxicos utilizadas nos experimentos de adsorção e dessorção.

Agrotóxico	Massa de solo (g)	Volume CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (mL)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
			1,5	2,5	5	7,5	10	15	20	30
IMZE	3	15	1,5	2,5	5	7,5	10	15	20	30
IMZA	3	15	1,0	2,5	5	7,5	10	15	20	30
NICO	5	25	1,0	2,5	5	7,5	10	15	20	30
CLOR	3	15	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10	15	20
DIFLU	3	15	0,3	0,5	0,75	1,0	1,5	2,5	3	5

Os tubos foram tampados e as soluções foram agitadas durante 24 horas em agitador orbital (200 rpm) à temperatura de 25°C e depois centrifugadas por 15 min (5000 rpm). Foram retiradas alíquotas do sobrenadante que foram injetadas diretamente no HPLC-DAD para a quantificação dos agrotóxicos. Com os cromatogramas obtidos, foram calculadas as concentrações de agrotóxicos na solução em equilíbrio com o solo (C_e).

As isotermas de adsorção foram construídas relacionando a quantidade de agrotóxico adsorvido com as suas respectivas concentrações em equilíbrio com o solo.

Para a determinação das isotermas de dessorção foram adicionados às frações do solo 15 mL de solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, sem agrotóxico (no experimento do nicossulfurom foram adicionados 25 mL para se manter a proporção de 5 mL de solução por grama de solo). Os tubos foram fechados e as soluções foram agitadas durante 24 horas em agitador orbital (250 rpm), à temperatura de 25°C e depois centrifugadas (5000 rpm) por 15 min. Foram então retiradas alíquotas do sobrenadante que foram injetadas diretamente no HPLC-DAD para a

quantificação dos agrotóxicos. As isothermas de dessorção foram construídas relacionando a quantidade de agrotóxico ainda remanescente no solo, após o processo de dessorção, e as concentrações em equilíbrio com o solo.

O tempo de agitação foi estabelecido em 24 horas para todos os experimentos, pois verificou-se na literatura que este período era suficiente para que ocorresse o equilíbrio solo-solução contendo os agrotóxicos, para todos os agrotóxicos estudados

Para determinação das concentrações em equilíbrio com o solo foram construídas curvas analíticas para cada um dos agrotóxicos estudados, em concentrações indicadas na Tabela 17.

Tabela 17: Concentrações dos agrotóxicos utilizadas para a construção das curvas analíticas nos experimentos de adsorção e dessorção.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
Imazetapir	0,2	1	5	10	20	30
Imazaquim	0,1	0,5	5	10	20	30
Nicossulfurom	0,2	1	5	10	20	30
Clorimurom	0,1	0,3	1	5	10	20
Diflubenzurom	0,1	0,3	0,5	1	3	5

3.10. Validação dos Métodos Desenvolvidos

Foram validados dois métodos para a análise de água, variando-se as diretrizes de validação e o equipamento utilizado (HPLC-DAD ou LC-ESI-MS/MS). Para os dois métodos, a técnica de extração utilizada foi a mesma (SPE). Em relação ao solo foram validados quatro métodos de análise, utilizando três técnicas de extração e os dois equipamentos citados. Na Tabela 18 é mostrada uma síntese dos métodos validados.

Os métodos desenvolvidos para a determinação dos agrotóxicos tanto em água quanto em solo foram validados pela obtenção das seguintes figuras de mérito: limites de detecção e de quantificação, curva analítica, linearidade, seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

Tabela 18: Técnicas de extração e análise cromatográfica utilizadas na validação dos métodos de determinação dos agrotóxicos em água e solo.

Matriz	Nº do método	Técnica de extração	Técnica cromatográfica
Solo	1	MEC	HPLC-DAD
	2	BUS	HPLC-DAD
	3	MIC	HPLC-DAD
	4	MIC	LC-ESI-MS/MS
Água	5	SPE	HPLC-DAD
	6	SPE	LC-ESI-MS/MS

Os parâmetros limite de detecção e limite de quantificação do instrumento (LDI e LQI) foram determinados com base na relação sinal/ruído da linha de base de 3 e 10, respectivamente. Para os métodos com detecção por arranjo de diodos (1 a 3 e 5), os valores de LQI e LDI foram determinados injetando-se os padrões dos agrotóxicos preparados em água destilada em concentrações cada vez menores até a obtenção de picos com altura de 3 e 10 x o ruído. Nestes casos, a determinação foi feita em água destilada, pois verificou-se que não havia interferência da matriz nas análises. Para a determinação do LQI e LDI no LC-ESI-MS/MS as soluções dos padrões dos agrotóxicos foram preparadas em brancos de amostra e estas foram comparadas a brancos de solvente, para verificar a ocorrência do efeito de matriz.

As curvas para todos os métodos foram preparadas em solvente e plotadas em seis diferentes concentrações dos padrões (em triplicata), em função dos valores de LQI, como mostrado na Tabela 19. A linearidade foi obtida pela regressão linear das curvas.

Tabela 19: Concentração dos agrotóxicos em função de LQI, utilizados para a construção das curvas analíticas.

Nº do método	Concentração dos pontos (x LQI) (ng mL ⁻¹)					
1, 2 e 3	0,8	1	2	3	5	12
4	0,5	1	2	3	5	12
5	1	2	3	5	10	15
6	0,5	0,8	1	1,5	2	3

A exatidão, em termos de recuperação, foi determinada através da porcentagem de agrotóxicos recuperada em níveis de fortificação pré-determinados. Para a determinação da exatidão dos métodos de 1 a 5 foram utilizados três níveis de fortificação, de 1 x, 2 x e 10 x o LQM ⁽¹³⁵⁾. A exatidão do método 6 foi determinada como recomendado pelos guias de validação de métodos de análise de agrotóxicos, da ANVISA ⁽¹³²⁾ e da SANCO ⁽¹³¹⁾, utilizando-se apenas dois níveis de fortificação. O primeiro foi o próprio LQM e o segundo, o LMR dos agrotóxicos em água, de 0,1 ng mL⁻¹. A porcentagem de agrotóxicos recuperada (R) foi calculada através Equação 17:

$$R (\%) = \frac{C_2}{C_1} \times 100 \quad [\text{Eq. 17}]$$

onde:

C₁ = Concentração inicial do agrotóxico antes da extração

C₂ = Concentração do agrotóxico após a extração

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária. Para os métodos de 1 a 5, a repetitividade foi determinada em um mesmo dia e consistiu de três séries de três replicatas de cada um dos níveis de concentração (1x, 2x, 10x o LQM). A repetitividade do método 6 também foi determinada em um mesmo dia e consistiu de duas séries de cinco replicatas de cada um dos níveis de concentração (LQM e LMR). A extração de cada um dos níveis de fortificação foi realizada em conjunto com brancos das amostras para certificação da integridade dos dados obtidos. A precisão intermediária dos métodos 1 a 5 foi calculada com três replicatas nas três concentrações (1x, 2x, 10x o LQM), em três dias diferentes. Para o método 6, a precisão intermediária foi calculada com três replicatas nas concentrações de LQM e LMR, em três dias consecutivos. A repetitividade (em um mesmo dia) e a precisão intermediária (em dias diferentes) foram expressas pelo coeficiente de variação (CV) de três medidas de recuperação dos analitos, utilizando a Equação 18:

$$CV (\%) = \frac{\text{estimativa do desvio padrão absoluto}}{\text{recuperação média}} \times 100 \quad [\text{Eq. 18}]$$

onde:

estimativa do desvio padrão absoluto = $[\sum (x_i - X_m)^2 / n-1]^{1/2}$,

n = o número total de medidas,

x_i = o valor medido,

X_m = a média das medidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos Procedimentos de Extração dos Agrotóxicos do Solo

As condições utilizadas em cada uma das extrações: MEC - Extração por agitação mecânica, BUS - Extração por banho ultrassônico, MIC - Micro-ondas caseiro e MInd - Micro-ondas industrial, estão descritas no item 3.6.1. As recuperações obtidas empregando cada uma das técnicas de extração estão mostradas na Tabela 20.

Tabela 20: Recuperações e suas respectivas estimativas de desvio padrão (s) obtidas com as quatro técnicas de extração dos agrotóxicos do solo com concentração de 500 ng g⁻¹

Agrotóxicos	Recuperações ± s(%)			
	MEC	BUS	MIC	MInd
Imazetapir	92 ± 6	84 ± 8	86 ± 4	85 ± 7
Nicossulfurom	97 ± 2	112 ± 6	112 ± 4	98 ± 3
Imazaquim	104 ± 3	111 ± 4	95 ± 4	81 ± 9
Carbofuram	95 ± 5	78 ± 1	85 ± 3	95 ± 7
Atrazina	95 ± 7	108 ± 5	82 ± 9	98 ± 5
Linurom	97 ± 10	87 ± 11	81 ± 2	88 ± 8
Clorimurom	111 ± 3	98 ± 3	110 ± 5	104 ± 8
Diflubenzurom	87 ± 4	101 ± 10	87 ± 4	96 ± 2

Em todos os tipos de extração testados foram obtidos valores de recuperação para os agrotóxicos estudados na faixa aceitável de 70 a 120 % ⁽¹³¹⁾. Aplicando o teste F, ao nível de significância de 5 %, estatisticamente, não há diferença significativa entre os valores obtidos. A quantidade e o tipo de solventes utilizados foram similares nos quatro tipos de extração. Nas extrações MEC e BUS foi necessário pelo menos uma hora de contato entre os solventes e o solo para se obterem recuperações adequadas. Com as extrações MIC e MInd, o tempo foi extremamente reduzido, apenas 2 min de extração, resultando também em recuperações aceitáveis.

4.2. Validação dos Métodos por HPLC-DAD para Determinação dos Agrotóxicos no Solo

Na Figura 12 são mostrados os cromatogramas dos extratos de brancos de solo e de amostras de solo fortificadas com os padrões dos agrotóxicos antes dos procedimentos de extração por MEC, BUS e MIC, respectivamente. O formato dos picos é atribuído ao gradiente.

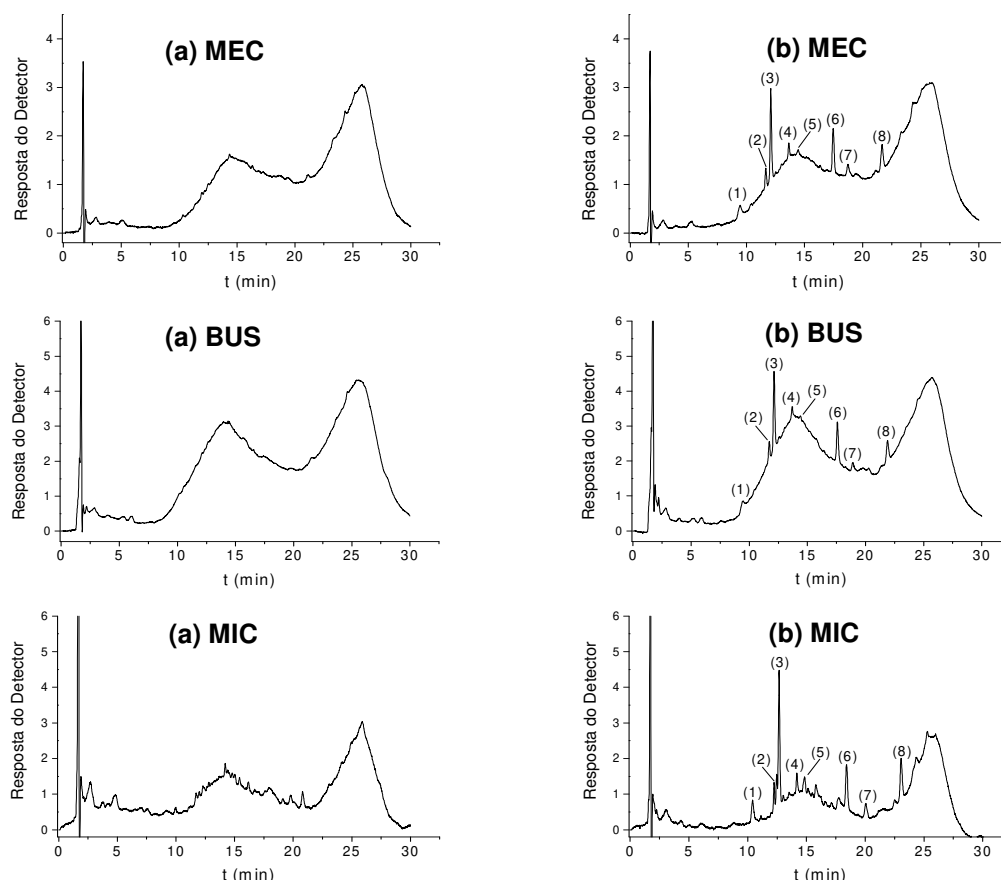


Figura 12: Cromatogramas obtidos para (a) brancos do solo e (b) amostras de solo fortificadas com os padrões dos agrotóxicos na concentração de 1x LQM, extraídos por: MEC - Extração por agitação mecânica; BUS - Extração por banho ultrassônico e MIC - Micro-ondas caseiro e analisados por HPLC-DAD. Identificação dos picos: (1) Imazetapir, (2) Nicossulfurom, (3) Imazaquim, (4) Carbofuram, (5) Atrazina, (6) Linurom, (7) Clorimurom-etil e (8) Diflubenzurom. Condições cromatográficas: coluna analítica Novapak, C18, 150 x 3,9 mm e coluna de guarda, C18, 2,0 x 3,9 mm, 4 μ m, Waters. Vazão: 0,8 mL min⁻¹, eluição por gradiente com FM acetonitrila:H₂O pH=3 (H₃PO₄); volume de injeção: 10 μ L; detecção: UV, 220 nm. Programação do gradiente: 20 % de acetonitrila por 2 min, de 2 a 8 min a acetonitrila aumentou linearmente até 50 % e foi mantida durante 7 min. Mudou-se linearmente para 70 % de acetonitrila durante 5 min. Em seguida, voltou à composição inicial (20 % de acetonitrila) durante 5 minutos, mantendo-a constante por 5 minutos.

A seletividade do método foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas obtidos para cada um dos agrotóxicos no seu comprimento de onda de máxima absorção, λ_{max} (Figura 13), no qual pode-se verificar a ausência de interferentes no t_R dos agrotóxicos.

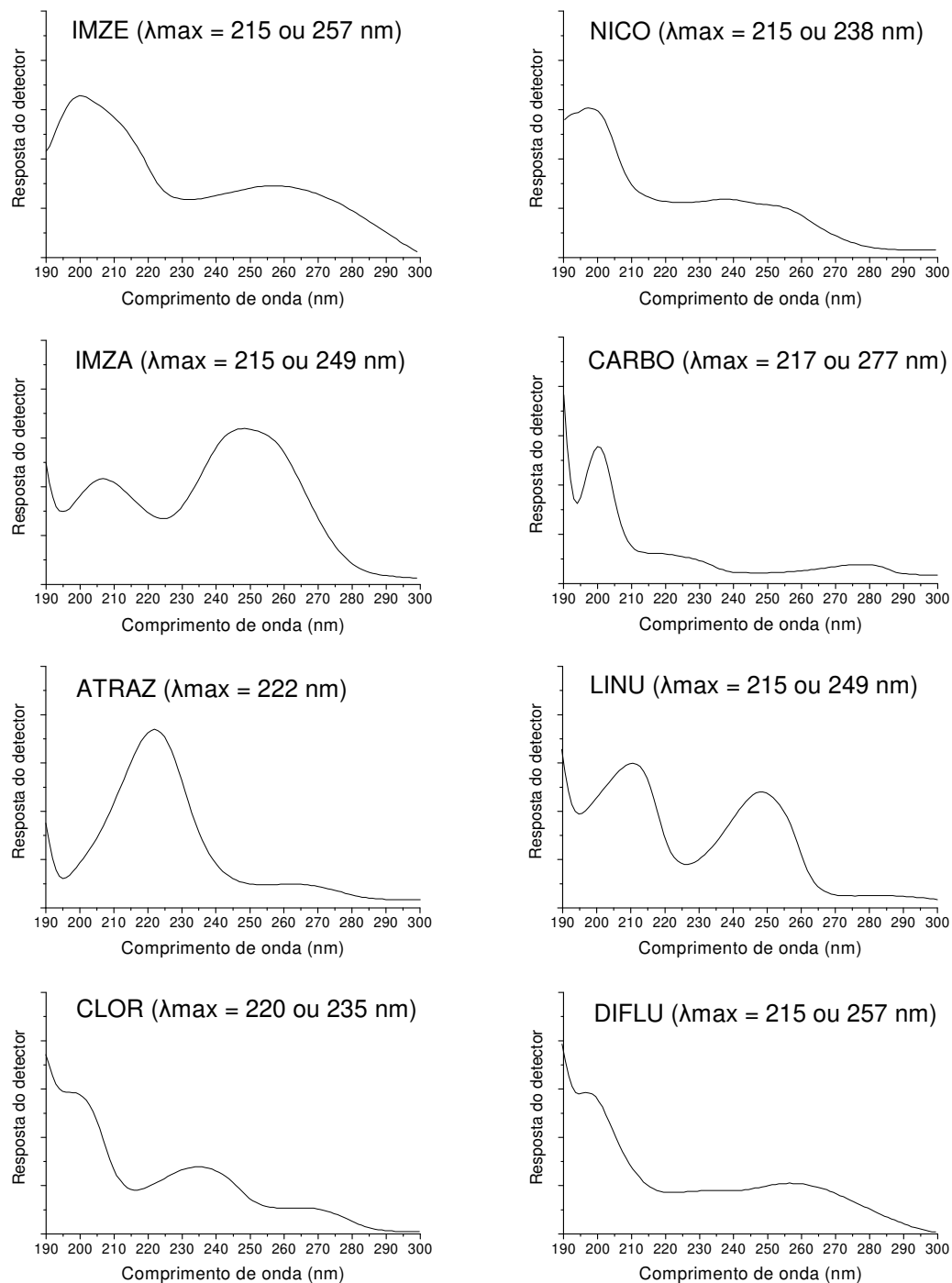


Figura 13: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos.

A seletividade foi verificada também através da análise de pureza dos picos em três pontos: início, ápice e final do pico. Os espectros de UV obtidos nestes três pontos foram iguais aos espectros dos padrões dos agrotóxicos mostrados na Figura 13.

No desenvolvimento de um método de análise de resíduos de agrotóxicos, variáveis como a técnica de extração, o nível de concentração dos analitos e o tipo de detector utilizado, dentre outras, são otimizadas ou determinadas visando a obtenção de valores de LQM cada vez menores. O objetivo principal nesta busca é que estes valores estejam abaixo dos LMR estabelecidos pela legislação vigente. Atualmente, há LMR estabelecidos para alguns agrotóxicos utilizados em matrizes como água, frutas e vegetais. Nesta gama de matrizes, o solo deve ser considerado como um caso a parte, pois suas propriedades e características químicas variam muito com a região, as condições climáticas em que está inserido e o tipo de plantação para o qual é utilizado. Dessa forma, não foram encontrados, em nenhuma legislação nacional ou internacional, os limites máximos para os agrotóxicos em solo, por isso os valores de dose aplicada (d.a.) foram utilizados como base para a determinação dos LQM para análises de agrotóxicos no solo.

As extrações foram feitas partindo-se de 5 g de solo, que foram concentrados a 500 μL , resultando em um fator de concentração de 10. Os valores de LQM para cada agrotóxico foram calculados com base neste fator de concentração. Os resultados de LDI, LQI, LDM e LQM, assim como as concentrações da dose de aplicação, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) obtidos para os agrotóxicos em solo empregando HPLC-DAD e a concentração da dose de aplicação (d.a.).

Agrotóxico	LDI (ng mL ⁻¹)	LQI (ng mL ⁻¹)	LDM (ng g ⁻¹)	LQM (ng g ⁻¹)	Conc. d.a. (ng g ⁻¹)
Imazetapir	57	200	5,7	20	31
Nicossulfurom	35	100	3,5	10	16,1
Imazaquim	12	36	1,2	3,6	41
Carbofuram	35	150	3,5	15	438
Atrazina	6	30	0,6	3	659
Linurom	8	40	0,8	4	322
Clorimurom	38	100	3,8	10	15
Diflubenzurom	41	100	4,1	10	13,2

Na Tabela 21, observa-se que os valores de LQM encontram-se abaixo dos valores de d.a. para todos os agrotóxicos

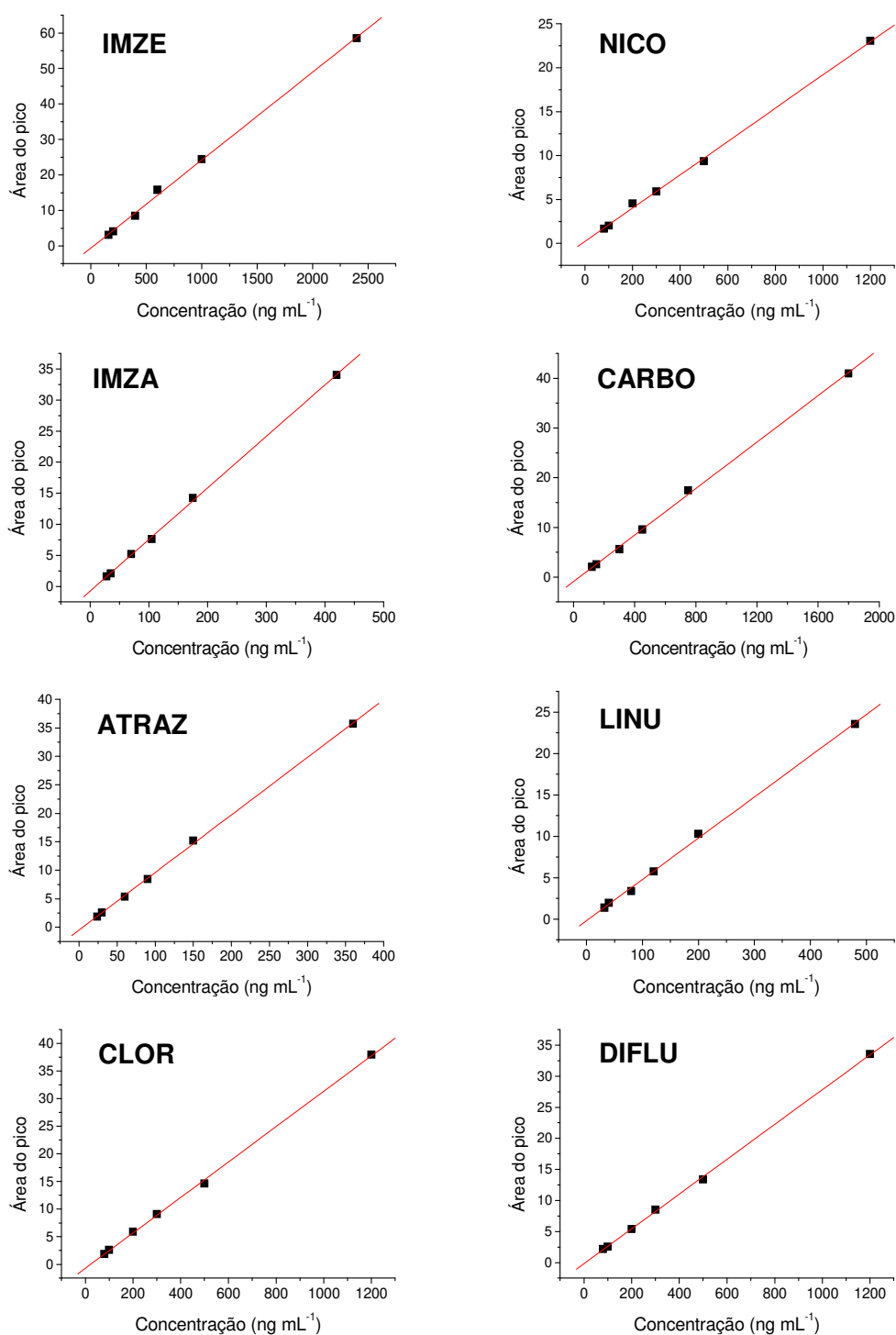


Figura 14: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 0,8, 1, 2, 3, 5 e 12x o LQI, obtidas para o estudo do solo empregando HPLC-DAD.

Na Figura 14 são mostradas as curvas analíticas construídas para cada um dos padrões dos agrotóxicos.

Os parâmetros de regressão linear, os coeficiente de correlação (r) e os intervalos de linearidade das curvas estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em solo empregando HPLC-DAD.

Agrotóxico	Curva Analítica			Intervalo de Linearidade (ng mL ⁻¹)
	a (intercepto)	b (inclinação)	r	
Imazetapir	-569	24,7	0,9998	160 - 2400
Nicossulfurom	243	18,9	0,9997	80 - 1200
Imazaquim	-732	83	0,9997	28 - 420
Carbofuram	-878	23,4	0,9999	120 - 1800
Atrazina	-504	101,1	0,9999	24 - 360
Linurom	-160	49,7	0,9998	32 - 480
Clorimurom	-719	32,1	0,9997	80 - 1200
Diflubenzurom	-172	28	0,9998	80 - 1200

O parâmetro r permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão calculados. Um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão ⁽¹⁴⁸⁾. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 ⁽¹²⁸⁾. Os resultados obtidos estão de acordo com esse requisito.

Na avaliação da linearidade de uma curva, o valor do coeficiente a (intercepto) deve ser observado, pois este deve representar apenas uma pequena porcentagem da resposta obtida para o analito no nível avaliado ⁽¹⁴⁹⁾. Os valores absolutos do coeficiente a , foram relativamente altos para alguns dos agrotóxicos, e por isso a linearidade da curva foi avaliada também através do gráfico de resíduos. Os resíduos representam a diferença entre a concentração nominal, obtida através da curva e a concentração média obtida, em porcentagem.

Para cada uma das curvas obtidas em todos os procedimentos de validação deste trabalho foram construídos os gráficos de resíduos versus a concentração nominal e obteve-se uma distribuição aleatória entre os valores positivos e negativos, sem nenhuma tendência ou padrão, confirmando a linearidade ^(147,150,151). Na Figura 15, são mostrados os gráficos de

resíduos obtidos para as curvas dos agrotóxicos na validação do método de determinação em solo empregando HPLC-DAD, como exemplos de todos os que foram obtidos neste trabalho.

A Tabela 23 mostra os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia e em três dias diferentes, e os valores de CV dos dois experimentos que representam a repetitividade e precisão intermediária do método desenvolvido.

Com as três técnicas de extração foram obtidos valores adequados de recuperação para os agrotóxicos estudados, uma vez que se encontraram na faixa aceitável de 70 a 120 % ⁽¹³¹⁾. As recuperações obtidas em um mesmo dia variaram na faixa de 76 a 112 % e as obtidas em dias diferentes variaram de 77 a 111 %. Com apenas 2 min de extração assistida por micro-ondas caseiro foram obtidas recuperações de 83 a 112 %. Os resultados de repetitividade mostraram boa precisão para os três tipos de extração, sendo que todos os valores de CV (0,2 - 10,2 %) ficaram abaixo do limite recomendado de 15 % ⁽¹²⁶⁾. Foram obtidos resultados aceitáveis também nos testes de precisão intermediária, nos quais os valores de CV variaram de 0,3 a 11,7 %.

A extração por micro-ondas caseiro mostrou-se uma ótima alternativa em relação às outras técnicas testadas, entretanto, ao se trabalhar com um micro-ondas caseiro algumas precauções devem ser tomadas, pois estes equipamentos não apresentam dispositivos de segurança para o controle da pressão e da temperatura como os micro-ondas industriais. Para a extração foi utilizado uma mistura de solventes polares (água) e com polaridade média (acetato de etila). Os solventes polares absorvem as micro-ondas e com isso promovem a extração dos analitos da amostra. Os solventes menos polares absorvem menos ou quase não absorvem as micro-ondas e por isso sua função é abrandar a absorção da micro-ondas pela amostra, de forma que esta seja lenta e gradual, para evitar a degradação da amostra e dos analitos e também para evitar um aumento muito rápido da temperatura e da pressão dentro do forno. O tempo e a potência do forno utilizados na otimização do procedimento de extração foram os menores possíveis, 2 minutos e 200 W, também visando o controle da temperatura e pressão do forno. Matrizes com analitos difíceis de serem extraídos, que demandem um tempo alto de extração não devem ser extraídas por micro-ondas caseiro.

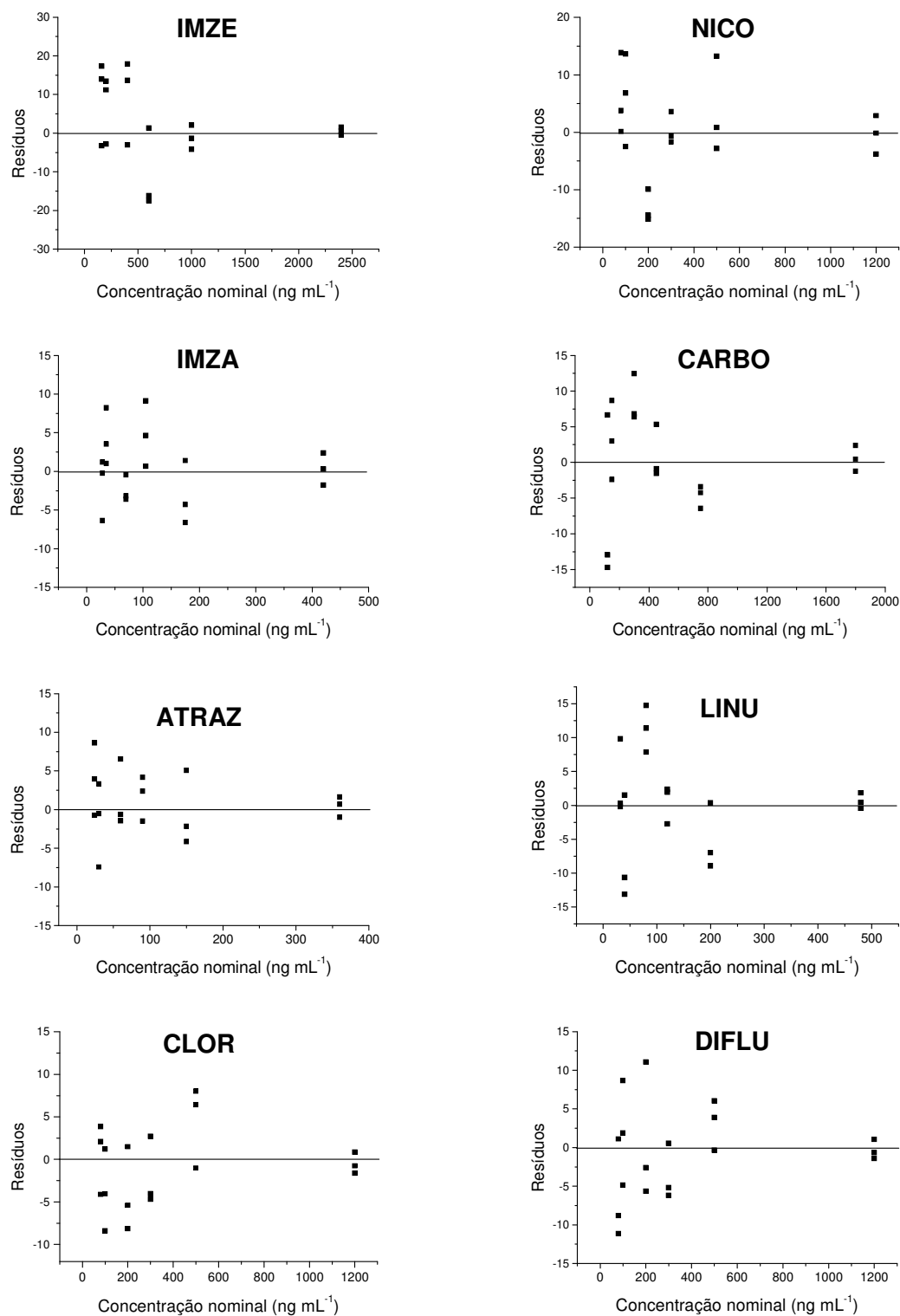


Figura 15: Gráficos de resíduos das curvas do imazaquim e da atrazina.

Tabela 23: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos extraídos do solo com as técnicas de extração: agitação mecânica (MEC), banho ultrassônico (BUS) e micro-ondas caseiro (MIC), empregando HPLC-DAD. Níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).

Agrot.	Tipo de extração	Recuperação ^a (%)			Repetitividade CV (%)			Recuperação ^b (%)			Precisão intermediária CV (%)		
		F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
IMZE	MEC	91	93	97	7,9	4,1	1,4	90	95	105	3,7	7,8	6,7
	BUS	83	98	105	10,2	3,9	6,7	82	106	111	5,0	7,8	2,3
	MIC	105	105	112	1,5	2,4	0,2	105	101	111	2,3	4,0	1,9
NICO	MEC	94	97	99	5,9	5,7	1,5	97	89	98	11,7	8,8	6,1
	BUS	91	85	94	6,4	3,3	2,0	92	93	100	7,4	7,8	5,3
	MIC	101	85	106	4,6	4	3,4	96	87	102	4,4	4,2	5,6
IMZA	MEC	88	84	100	2,8	4	2,6	91	81	104	3,9	5,3	3,5
	BUS	98	82	82	7,1	4,1	2,0	90	88	85	5,4	4,0	3,4
	MIC	103	95	101	3,4	4,4	1,0	103	93	102	1,9	4,0	0,3
CARBO	MEC	78	76	97	3,8	3,3	3,1	89	77	100	5,3	3,5	3
	BUS	91	100	83	6,0	8,7	1,5	95	94	82	8,1	2,8	2
	MIC	97	95	103	5,0	4,4	1,1	93	93	105	3,7	4,9	2,5
ATRAZ	MEC	102	102	102	6,2	3,8	2,8	106	102	106	4,2	4,8	1,2
	BUS	108	103	94	6,2	5,9	3,4	109	100	99	4,7	2,6	6,2
	MIC	107	96	100	4,5	3,7	1,1	110	105	103	4,0	3,7	3
LINU	MEC	86	88	93	6,5	1,5	1,1	87	92	89	6,0	8,1	4,4
	BUS	88	87	111	3,7	2,0	2,7	88	86	108	2,3	0,9	4,2
	MIC	92	101	95	2,7	1,4	1,7	95	96	96	3,4	4,7	1,9
CLOR	MEC	81	83	82	1,3	2	0,3	82	93	84	4,1	11	3,5
	BUS	95	105	104	5,7	2,7	3	94	104	101	0,4	4,9	3,1
	MIC	101	102	85	4,2	2,2	2,5	99	99	86	3,1	2,9	1,3
DIFLU	MEC	93	96	112	9,9	2,4	3,2	89	96	107	5,0	7,2	8,6
	BUS	90	82	105	4,7	2,3	2,4	89	82	101	7,0	3,5	3,3
	MIC	83	104	90	4,1	1,5	2,9	87	98	92	4,6	3,5	2,2

^a Média das recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Média das recuperações obtidas em três dias diferentes

4.3. Validação dos Métodos por LC-ESI-MS/MS para Determinação dos Agrotóxicos no Solo.

Na Figura 16 são mostrados os cromatogramas dos íons de quantificação dos agrotóxicos preparados em brancos de amostras nas concentrações de 5 ng mL⁻¹. O efeito de matriz foi avaliado através da comparação destes cromatogramas com os obtidos para os padrões dos analitos em solvente (acetonitrila), nas mesmas concentrações. Os tempos de retenção e área dos picos foram semelhantes, não sendo verificada dessa forma, a ocorrência de efeito de matriz.

Nos cromatogramas desta figura aparecem vários picos, que são devido ao ruído do equipamento, o qual foi bem visível, devido à baixa concentração dos agrotóxicos. Entretanto, pode-se observar que mesmo nesta concentração baixa todos os agrotóxicos apresentaram sinal pelo menos 10 vezes maior que o ruído. No caso do nicossulfurom este valor pode ser considerado como sendo o menor valor no qual este agrotóxico pode ser quantificado com segurança. No caso da atrazina, uma concentração menor ainda resultaria em um sinal 10 vezes maior que o ruído. Entretanto, optou-se por estabelecer um único valor de LQI para o conjunto de agrotóxicos, com o objetivo de facilitar o procedimento no laboratório durante a etapa de validação do método.

Os valores de LDI e LQI foram estabelecidos em 3 e 10 ng mL⁻¹, respectivamente, e a concentração de 5 ng mL⁻¹ foi utilizada como o primeiro ponto da curva.

As extrações foram feitas partindo-se de 5 g de solo, que foram concentrados a 500 µL, resultando em um fator de concentração de 10 vezes. Os valores de LDM e LQM dos agrotóxicos foram calculados com base neste fator de concentração e resultaram na concentração de 0,3 ng mL⁻¹ e 1 ng mL⁻¹, respectivamente.

Os LQM obtidos com o uso da LC-ESI-MS/MS para todos os agrotóxicos foram menores que os obtidos por HPLC-DAD, mostrados na Tabela 21. Com ambos os métodos foi possível a obtenção de valores de LQM menores que a concentração da dose aplicada para todos os agrotóxicos.

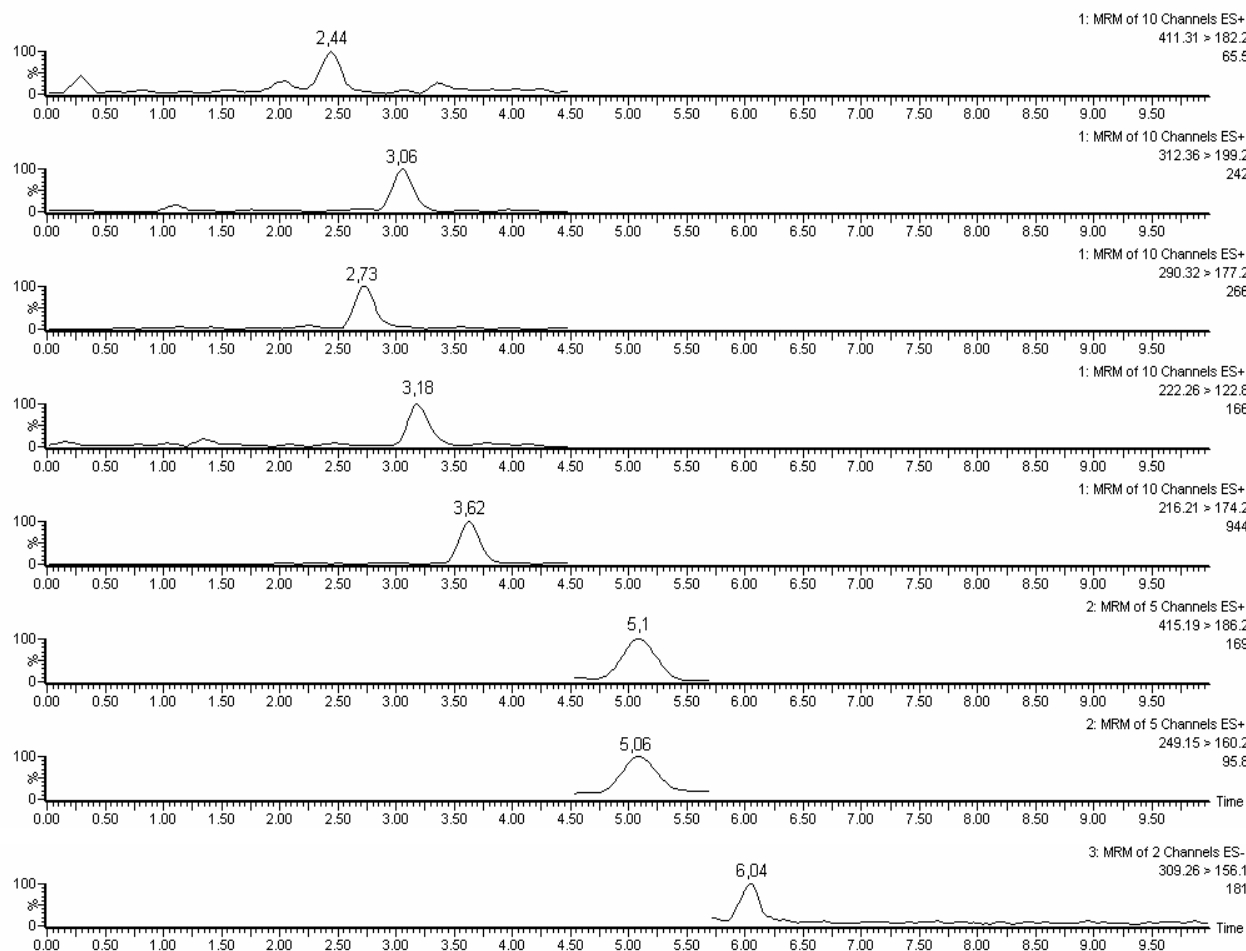


Figura 16: Cromatogramas obtidos para o branco do solo fortificado na concentração de 5 ng mL^{-1} com os agrotóxicos após a extração por MIC, empregando LC-ESI-MS/MS. Condições cromatográficas: coluna analítica Novapak, C18, 150 x 3,9 mm e coluna de guarda C18, 2,0 x 3,9 mm, 4 μm , Waters. Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, eluição por gradiente com FM acetonitrila:H₂O, 1 % de ácido acético; volume de injeção: 10 μL . Programação do gradiente: 60 % de acetonitrila por 2 min, de 2 a 6 min a acetonitrila aumentou linearmente até 90 %. Em seguida, voltou à composição inicial (60% de acetonitrila) de 6 a 10 min, mantendo-a constante por 5 minutos.

Na Figura 17 são mostradas as curvas analíticas construídas para cada um dos padrões dos agrotóxicos

Os parâmetros de regressão linear, os coeficientes de correlação (r) e os intervalos de linearidade das curvas estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidades das curvas obtidas para os agrotóxicos em solo empregando LC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Curva Analítica			Intervalo de Linearidade (ng mL ⁻¹)
	a (intercepto)	b (inclinação)	r	
Nicossulfurom	10,78	11,8	0,9995	5 - 120
Imazaquim	6,76	10,3	0,9998	5 - 120
Imazetapir	-0,28	2,05	0,9996	5 - 120
Carbofuram	-5,44	7,94	0,9998	5 - 120
Atrazina	-13,5	31,95	0,9995	5 - 120
Clorimurom	-3,39	9,6	0,9998	5 - 120
Linurom	-4,78	5,85	0,9998	5 - 120
Diflubenzurom	-1,18	5,98	0,9997	5 - 120

Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,999 e as curvas mostraram um bom intervalo de linearidade. As concentrações utilizadas para a obtenção das curvas por LC-ESI-MS/MS foram bem menores que as utilizadas no desenvolvimento do método por HPLC-DAD (Tabela 22). A utilização de concentrações menores resultou em curvas com valores de intercepto (a) menores também. Os gráficos de resíduos mostraram uma distribuição aleatória entre os valores positivos e negativos, sem nenhuma tendência ou padrão, confirmando a linearidade.

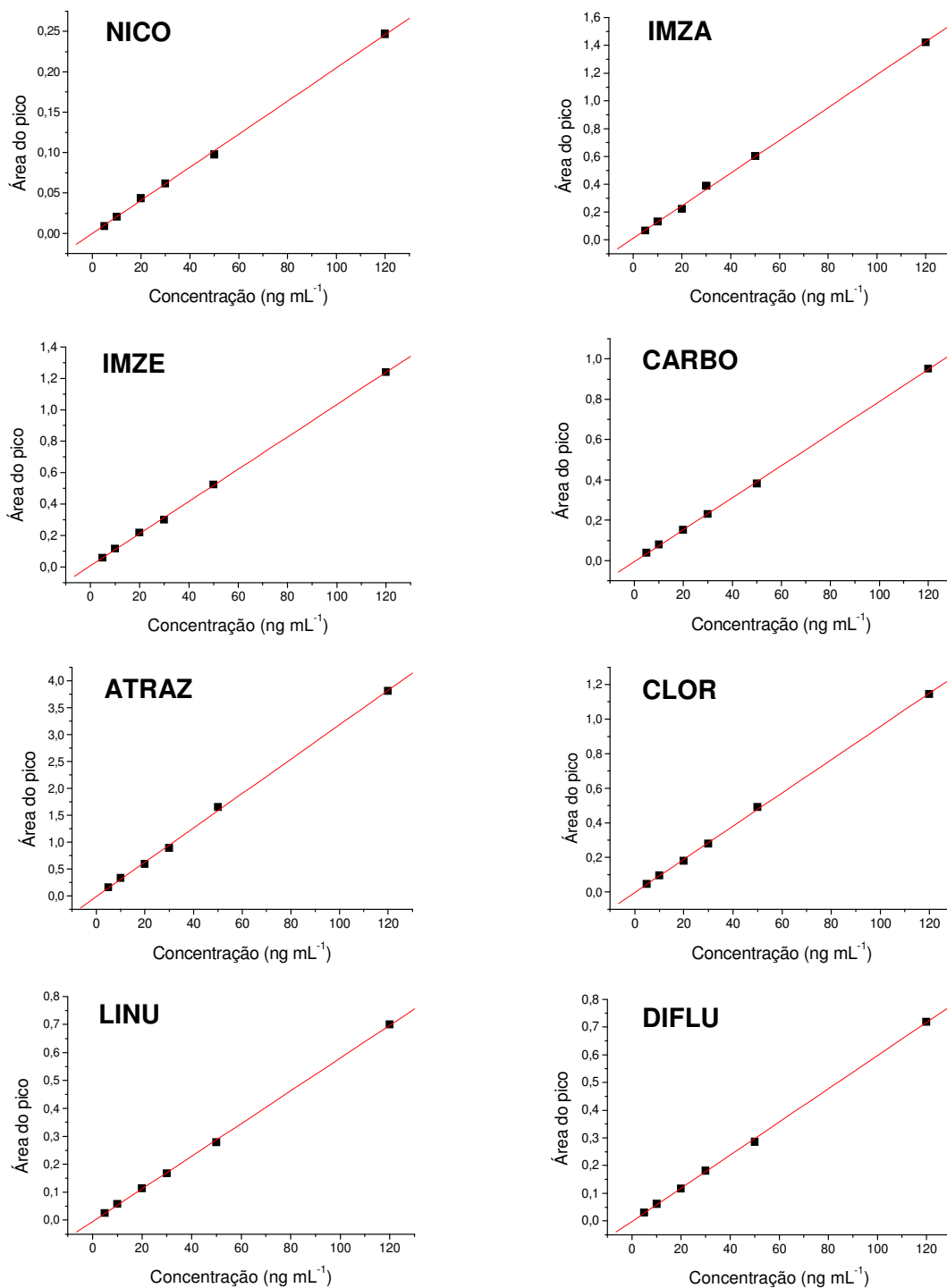


Figura 17: Curvas analíticas dos agrotóxicos, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 5, 12x o LQI obtidas para o estudo do solo, empregando LC-ESI-MS/MS.

A Tabela 25 mostra os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia e em três dias diferentes, e os valores de CV dos dois experimentos que representam a repetitividade e a precisão intermediária do método desenvolvido, respectivamente.

Tabela 25: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos extraídos do solo através da MIC e analisados por LC-ESI-MS/MS; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).

Agrot.	Recuperação ^a (%)			Repetitividade CV (%)			Recuperação ^b (%)			Precisão intermediária CV (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
NICO	97	98	99	5,3	3,7	4,4	101	101	99	4,4	5,7	4,5
IMZA	103	105	110	10,1	4,2	4,4	97	107	101	4,8	6,8	6,5
IMZE	89	98	87	8,6	9,2	2,5	93	106	83	12,1	7,6	5,7
CARBO	103	99	107	10,7	5,8	1,5	95	102	105	9,7	9,9	1,3
ATRAZ	102	104	106	4,5	4,6	2,0	98	102	104	5	4,9	1,4
CLOR	90	81	83	8,6	3,9	1,0	106	85	97	6,4	1,2	3,9
LINU	92	104	101	9,1	7,2	2,7	91	99	102	7,6	5,6	2,0
DIFLU	97	93	109	5,3	5,9	3,5	105	98	108	7,6	5,2	1,5

^a Média das recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Média das recuperações obtidas em três dias diferentes

Foram obtidos valores adequados de recuperação para os agrotóxicos estudados, uma vez que se encontraram na faixa aceitável de 70 a 120 % ⁽¹³¹⁾. Os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia para os três níveis variaram de 81 a 110 % e ficaram dentro da faixa aceitável. As recuperações em dias diferentes variaram de 83 a 108 %. O limite aceitável para o coeficiente de variação é de 15 % ⁽¹²⁶⁾ e os resultados de repetitividade mostraram boa precisão, com valores de CV de 1,0 a 10,7 % (n=3), o mesmo ocorrendo para a precisão intermediária, 1,2 a 9,9 %.

O método validado foi utilizado para a quantificação dos agrotóxicos em amostras de solo provenientes de lavouras de soja de Goiânia, GO e Selbach, RS (Tabela 9).

4.4. Determinação das Propriedades Químicas do Solo da Região de Mineiros/GO.

Na Tabela 26 são mostradas algumas características químicas do solo estudado.

Tabela 26: Propriedades químicas do solo estudado

CO (%)	MO (%)	pH em água (1:2,5)	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃
0,49	0,85	5,4	1,48	1,18

O solo estudado apresentou baixa acidez e baixo teor de MO. Os valores de pH, MO, e Fe₂O₃ determinados foram similares aos descritos na literatura para este mesmo tipo de solo (Neossolo Quartzarênico) em estudos conduzidos em território nacional. ^(165,166)

4.5. Estudo de Adsorção e Dessorção do Imazetapir e do Imazaquim em Amostras de Solo

Os estudos de adsorção e dessorção do imazetapir e imazaquim foram agrupados em um mesmo item por se tratarem de duas moléculas que apresentam muitas semelhanças entre si. Ambas apresentam caráter anfótero devido à presença de grupos funcionais ácidos e básicos e sua adsorção vai depender do pH do solo. ^(29,167)

Nas Figuras 18 e 19 são apresentadas as isotermas de adsorção e dessorção do imazetapir e do imazaquim, respectivamente.

As relações entre as concentrações de agrotóxico em solução e na fase sólida foram descritas pela equação de Freundlich (Eq. 4). Esta equação foi usada na forma logarítmica (Eq. 5), linearizando a curva da isoterma de Freundlich, como pode ser observado na Figura 20 para a obtenção dos valores de K_f e $1/n$, que são os coeficientes da equação da curva linearizada.

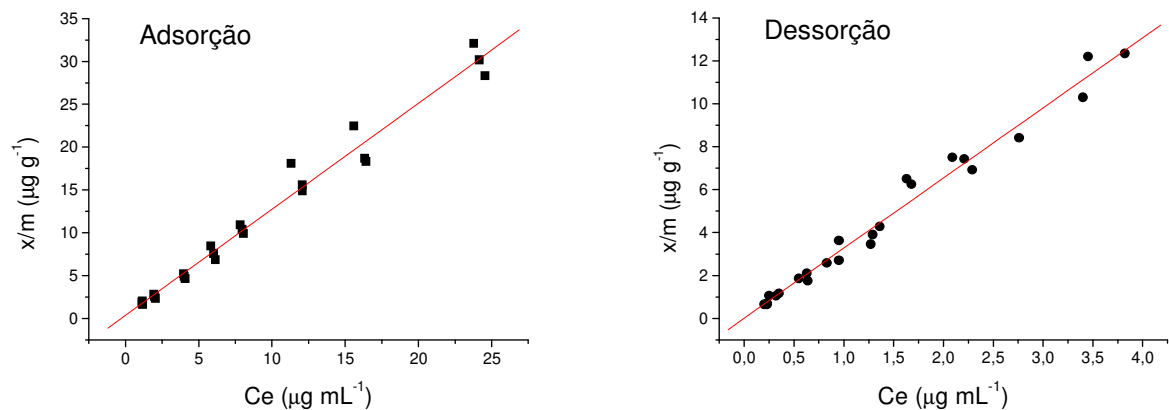


Figura 18: Isotermas de adsorção e dessorção do imazetapir.

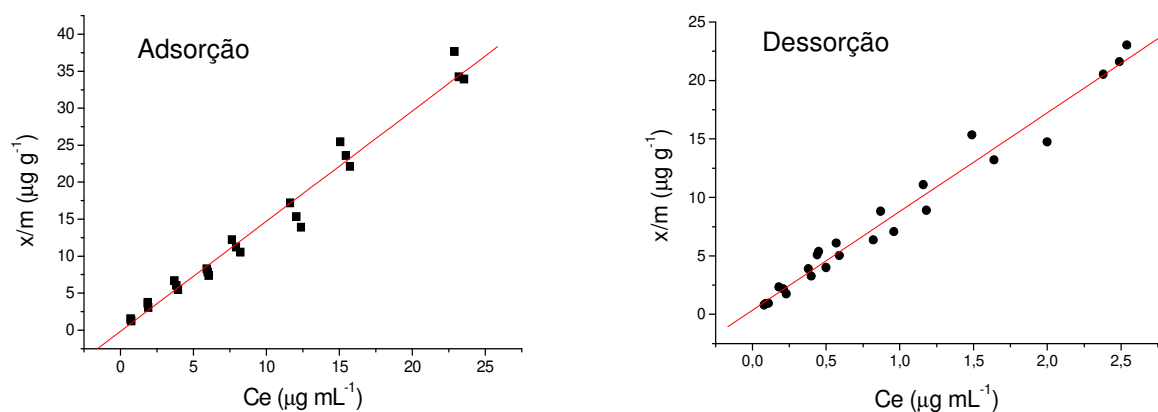


Figura 19: Isotermas de adsorção e dessorção do imazaquim.

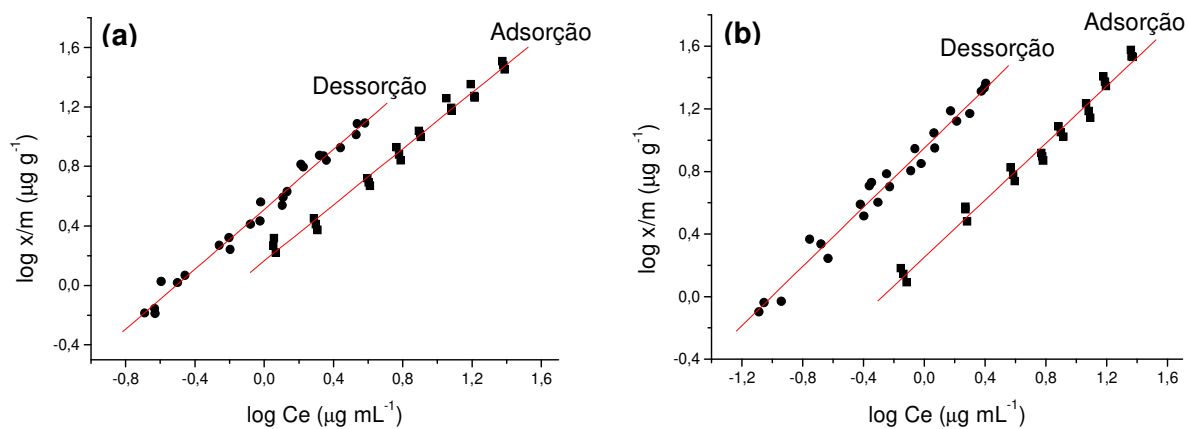


Figura 20: Formas logarítmicas das isotermas de adsorção e dessorção: (a) Imazetapir e (b) Imazaquim.

Os valores dos coeficientes de Freundlich, K_f e $1/n$, determinados pela forma logarítmica da Equação 4, os valores do coeficiente de distribuição K_d e os coeficientes de correlação (r) são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27: Valores dos coeficientes de Freundlich, K_f e $1/n$, do coeficiente de correlação (r) e de K_d para o imazetapir e imazaquim.

Agrotóxico	Processo	r	r (forma logarítmica)	$1/n$	K_f (mL g ⁻¹)	K_d (mL g ⁻¹)
Imazetapir	Adsorção	0,98	0,99	0,94	1,5	1,2
	Dessorção	0,98	0,99	1	3,2	3,3
Imazaquim	Adsorção	0,98	0,99	0,92	1,8	1,5
	Dessorção	0,98	0,99	0,95	8,9	8,4

O modelo de Freundlich apresentou ajuste aos dados, constatado pelos valores de r , de 0,99 em todos os experimentos.

Os valores de K_f obtidos nos experimentos de adsorção indicaram que ocorreu adsorção dos dois agrotóxicos no solo estudado, entretanto esta adsorção foi baixa.

Em solos com pH menores que os pKa 2,1 e 1,8, o nitrogênio das duas moléculas pode estar protonado, resultando em moléculas com carga positiva, suscetíveis a uma ligação catiônica com as cargas negativas da matéria húmica do solo. Entretanto, o pH do solo estudado foi de 5,4, maior que os valores de pKa do grupo carboxila ionizável do imazetapir e do imazaquim, (de 3,9 e 3,8, respectivamente). Portanto, no pH do solo, ambos compostos devem existir predominantemente na forma aniônica ($-\text{COO}^-$) e, conseqüentemente, são repelidos pelas cargas negativas da MO do solo, contribuindo para uma baixa adsorção destes compostos no solo. À medida que o valor do pH se aproxima e se iguala a este pKa, a concentração da forma não ionizada ($-\text{COOH}$) passa a ser igual à da forma aniônica e a molécula pode exibir uma interação fraca com o solo devida às forças de van der Waals, típica de herbicidas não-iônicos. No valor de pH 5,4, pode-se estimar a presença de uma quantidade baixíssima de moléculas dos dois agrotóxicos na forma não-ionizada que contribuiu um pouco para a adsorção.

O solo estudado apresentou baixo teor de MO (0,85 %) e nesta condição, a fração mineral não está completamente recoberta pelas substâncias húmicas e pode contribuir para o

processo de adsorção. Como pode ser visto na Tabela 26, o solo estudado apresentou uma porcentagem considerável de óxidos de ferro e alumínio. No pH do solo estudado (5,4) estes óxidos estão com cargas positivas podendo adsorver as formas aniônicas dos dois compostos, explicando a ocorrência de adsorção.

Apesar da similaridade entre as estruturas dos dois agrotóxicos, o K_d de dessorção do imazaquim foi muito maior que o do imazetapir. Esta diferença pode ser explicada considerando-se a solubilidade dos dois compostos na solução de equilíbrio. O imazetapir apresenta solubilidade igual a $1400 \mu\text{g mL}^{-1}$, e é classificado como muito solúvel em água. Dessa forma, uma boa parte dele dessorveu ao entrar em contato com a solução aquosa no experimento de dessorção. O imazaquim, por sua vez, é considerado pouco solúvel ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) e se manteve adsorvido no solo por meio de fortes interações eletrostáticas com os óxidos metálicos carregados positivamente.

Nas Tabelas 28 e 29 são mostrados os valores de concentração e as porcentagens do imazetapir e imazaquim, respectivamente, adicionados inicialmente ao solo e os valores obtidos durante os experimentos de adsorção e dessorção.

Os valores obtidos no experimento de adsorção mostraram que, em média, somente 21 % do imazetapir aplicado adsorveu no solo (C_s1) (Tabela 28). Mais da metade desta quantidade adsorvida (13 % de C_p), dessorveu no experimento de dessorção e retornou para a solução, confirmando a baixa afinidade do imazetapir pelo solo. De modo geral, ao ser aplicado em uma plantação, uma parte do imazetapir irá atingir o alvo e a outra irá se depositar no solo. Desta quantidade depositada (C_p), apenas 8 % (C_s2) ficará adsorvida permanentemente no solo e os 92 % restantes ($C_e1 + C_e2$) podem ter diversos destinos, sendo que um deles é o lixiviamento para outras camadas do solo e até para o lençol freático.

Na Tabela 29 pode-se observar que a porcentagem de adsorção do imazaquim no solo foi similar a do imazetapir, 23 %. A diferença ocorreu no experimento de dessorção, no qual apenas 8 % do imazaquim voltou para solução. Em relação à quantidade inicial aplicada ao solo (C_p), apenas 15 % do imazaquim irá permanecer no solo, enquanto que o restante (85 %) ficará disponível para se movimentar.

Os valores de $1/n$ obtidos em todos os experimentos foram próximos de 1, desta forma K_d foi estimado como sendo a inclinação das isotermas de adsorção e dessorção. Com os valores de K_d foram calculados os valores de K_{oc} . Apesar da baixa porcentagem de carbono orgânico (0,49 %), o F_{oc} calculado foi maior que 0,001 e a Equação 6 pode ser utilizada para o cálculo de K_{oc} . Os valores obtidos encontram-se na Tabela 30.

Tabela 28: Valores de concentração e de porcentagens do imazetapir obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.

Adsorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Dessorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
C_p	C_{e1}	C_{s1}	C_{s1}	C_{e2}	C_{s2}
1,5	1,15	0,35	0,35	0,22	0,13
2,5	1,99	0,51	0,51	0,31	0,20
5	4,02	0,98	0,98	0,60	0,37
7,5	6,00	1,50	1,50	0,91	0,59
10	7,95	2,05	2,05	1,31	0,74
15	11,83	3,17	3,17	1,84	1,33
20	16,13	3,87	3,87	2,38	1,50
30	24,16	5,84	5,84	3,56	2,28
100 %	79 %	21 %	21 %	13 %	8 %

Tabela 29: Valores de concentração e de porcentagens do imazaquim obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.

Adsorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Dessorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
C_p	C_{e1}	C_{s1}	C_{s1}	C_{e2}	C_{s2}
1	0,73	0,27	0,27	0,10	0,17
2,5	1,89	0,61	0,61	0,21	0,41
5	3,84	1,16	1,16	0,43	0,74
7,5	5,98	1,52	1,52	0,49	1,03
10	7,94	2,06	2,06	0,78	1,28
15	12,02	2,98	2,98	1,07	1,91
20	15,43	4,57	4,57	1,71	2,87
30	23,22	6,78	6,78	2,47	4,31
100 %	77 %	23 %	23 %	8 %	15 %

C_p = Concentração de agrotóxico adicionada ao solo.

C_{e1} = Concentração de agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo.

C_{s1} = Concentração do agrotóxico que se manteve no solo após o experimento de adsorção ($C_p - C_{e1}$).

C_{e2} = Concentração de agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo (dessorvido no experimento de dessorção).

C_{s2} = Concentração do agrotóxico que se manteve no solo após o experimento de dessorção ($C_{s1} - C_{e2}$).

Tabela 30: Valores dos coeficientes de K_d e K_{oc} , tempo de meia-vida e índice de GUS para o imazetapir e o imazaquim.

Agrotóxico	Processo	K_d (mL g^{-1})	K_{oc} (mL g^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)	GUS
Imazetapir	Adsorção	1,2	245	90	3,14
Imazaquim	Adsorção	1,5	306	60	2,70

Os valores de K_{oc} de 245 e 306 mL g⁻¹ obtidos para o imazetapir e imazaquim, respectivamente, indicaram uma mobilidade média para os dois compostos, isto é, ambos apresentam tendência de serem lixiviados entre as camadas do solo.

A mobilidade dos agrotóxicos é um fator importante no estudo de contaminação de águas subterrâneas. Entretanto, deve-se considerar também a persistência destes agrotóxicos no solo que determinará quando estes serão degradados durante o seu período de residência nas camadas do solo próximas às águas subterrâneas, e este parâmetro é expresso pelo tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Através dos valores de K_{oc} e $t_{1/2}$ foram calculados os índices de GUS para os dois agrotóxicos. O parâmetro $t_{1/2}$ não foi determinado neste estudo e também não foram encontrados valores determinados em solos nacionais, por isso, adotaram-se valores comumente utilizados na literatura. ^(160,161)

Como pode ser observado na Tabela 30, o valor de índice de GUS obtido para os agrotóxicos foram maiores ou próximos de 2,8, confirmando seu potencial de lixiviabilidade.

4.6. Estudo de Adsorção e Dessorção do Nicossulfurom, Clorimurom-etil e Diflubenzurom em Amostras de Solo de Mineiros-GO

No estudo de adsorção e dessorção do diflubenzurom utilizou-se uma faixa pequena de concentrações iniciais (C_p), de 0,1 a 5 µg mL⁻¹, menor que a faixa utilizada para os outros agrotóxicos, na sua maioria de 0,2 a 30 µg mL⁻¹. Isto foi devido à baixa solubilidade do diflubenzurom em água, que é de 0,08 mg L⁻¹ ⁽¹⁵⁹⁾. Nas concentrações utilizadas foi possível preparar todas as soluções de forma que todo diflubenzurom dissolvesse e as soluções ficassem límpidas. Entretanto, nos valores de C_p baixos, as soluções de equilíbrio (C_e) analisadas após 24 h não apresentaram o pico do diflubenzurom. Já as soluções de C_p de 3 e 5 µg mL⁻¹, resultaram em cromatogramas com picos em concentrações (C_e) menores que a do LQI, próximas ao LDI. Dois fatores contribuíram para este comportamento. O primeiro deles é a baixa solubilidade deste composto em água e a sua hidrofobicidade. Ao entrar em contato com o solo, o diflubenzurom pode ter permanecido entre suas partículas na forma sólida ou por interações eletrostáticas dos átomos de flúor da molécula com os metais dos óxidos de ferro e de alumínio. Desta forma, a probabilidade de ocorrer contaminação das águas subterrâneas pelo diflubenzurom por meio de lixiviação é baixa.

Nas Figuras 21 e 22 podem ser visualizadas as isotermas de adsorção e dessorção do nicossulfurom e do clorimurom-etil, respectivamente.

As relações entre as concentrações de agrotóxico em solução e na fase sólida foram descritas pela equação de Freundlich (Eq. 4). Esta equação foi usada na forma logarítmica (Eq. 5), linearizando a curva da isoterma de Freundlich, como pode ser observado na Figura 23 para a obtenção dos valores de K_f e $1/n$, que são os coeficientes da equação da curva linearizada.

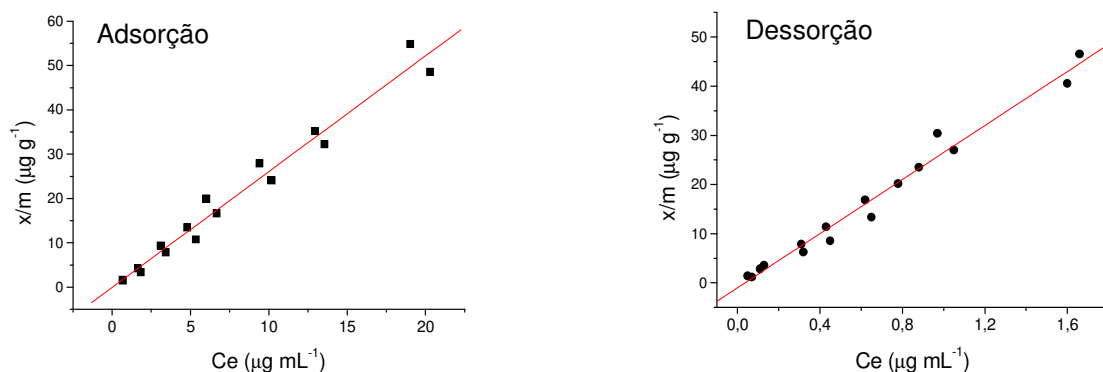


Figura 21: Isotermas de adsorção e dessorção do nicossulfurom

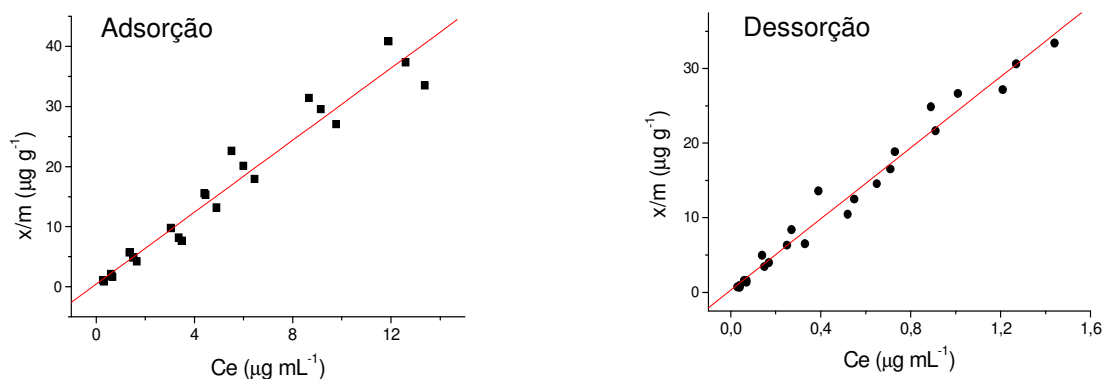


Figura 22: Isotermas de adsorção e dessorção do clorimurom-etil

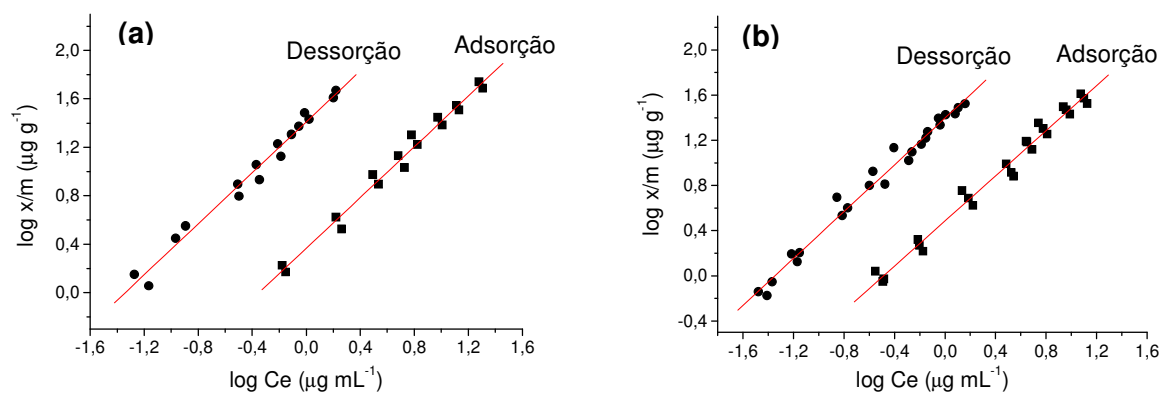


Figura 23: Formas logarítmicas das isotermas de adsorção e dessorção: (a) Nicossulfurom e (b) Clorimurom-etil.

Os valores dos coeficientes de Freundlich, K_f e $1/n$, determinados pela forma logarítmica da equação, os valores do coeficiente de distribuição K_d e os coeficientes de correlação (r), são mostrados na Tabela 31.

Tabela 31: Valores dos coeficientes de Freundlich, K_f e $1/n$, dos coeficientes de correlação (r) e de K_d para o nicossulfurom e o clorimurom-etil.

Agrotóxico	Processo	r	r (forma logarítmica)	$1/n$	K_f (mL g ⁻¹)	K_d (mL g ⁻¹)
Nicossulfurom	Adsorção	0,98	0,99	1,05	2,32	2,61
	Dessorção	0,99	0,99	1,05	25,1	27,5
Clorimurom	Adsorção	0,98	0,99	1	3,06	3
	Dessorção	0,99	0,99	1,03	24,9	23,8

O modelo de Freundlich apresentou ajuste aos dados, constatado pelos valores obtidos para r , de 0,99, para todos os experimentos.

As moléculas do nicossulfurom e clorimurom-etil apresentam caráter levemente ácido com pKa de 4,6 e 4,2, respectivamente. Os valores de K_f de adsorção mostrados na Tabela 31 indicaram que a adsorção destes compostos no solo foi baixa, entretanto, foi maior que a apresentada pelo imazetapir e imazaquim. Uma das razões é que os valores de pKa do nicossulfurom e clorimurom-etil são relativamente maiores e por isso no pH do solo estudado (5,4) existem mais moléculas na forma não ionizada para interagir com a MO do solo. Outra justificativa é que as moléculas do nicossulfurom e clorimurom-etil apresentam dois grupos aminas que, através do nitrogênio, podem complexar com os óxidos de alumínio e de ferro da fração mineral do solo.

Os valores de K_f de dessorção para os dois compostos indicaram que ambos adsorveram fortemente ao solo e isto pode ser atribuído, como já foi citado, à presença dos grupos amina das duas moléculas.

Nas Tabelas 32 e 33 são mostrados os valores de concentração e as porcentagens do nicossulfurom e clorimurom-etil, respectivamente adicionados inicialmente ao solo e as obtidas durante os experimentos de adsorção e dessorção.

Tabela 32: Valores de concentração e de porcentagens do nicossulfurom obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.

Adsorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Dessorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
C_p	C_{e1}	C_{s1}	C_{s1}	C_{e2}	C_{s2}
1	0,68	0,32	0,32	0,06	0,25
2,5	1,75	0,75	0,75	0,12	0,64
5	3,28	1,72	1,72	0,32	1,41
7,5	5,07	2,43	2,43	0,44	1,99
10	6,34	3,66	3,66	0,63	3,02
15	9,80	5,20	5,20	0,83	4,37
20	13,25	6,75	6,75	1,01	5,74
30	19,66	10,34	10,34	1,63	8,71
100%	66 %	34 %	34 %	6 %	28 %

Tabela 33: Valores de concentração e de porcentagens do clorimurom-etil obtidos nos experimentos de adsorção e dessorção.

Adsorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Dessorção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
C_p	C_{e1}	C_{s1}	C_{s1}	C_{e2}	C_{s2}
0,5	0,31	0,19	0,19	0,04	0,15
1	0,64	0,36	0,36	0,07	0,30
2,5	1,52	0,98	0,98	0,15	0,82
5	3,30	1,70	1,70	0,29	1,41
7,5	4,59	2,91	2,91	0,49	2,42
10	5,98	4,02	4,02	0,70	3,32
15	9,19	5,81	5,81	0,94	4,87
20	12,63	7,37	7,37	1,31	6,06
100 %	62 %	38 %	38 %	7 %	31 %

C_p = Concentração de agrotóxico adicionada ao solo.

C_{e1} = Concentração de agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo.

C_{s1} = Concentração do agrotóxico que se manteve no solo após o experimento de adsorção ($C_p - C_{e1}$).

C_{e2} = Concentração de agrotóxico na solução em equilíbrio com o solo (dessorvido no experimento de dessorção).

C_{s2} = Concentração do agrotóxico que se manteve no solo após o experimento de dessorção ($C_{s1} - C_{e2}$).

Os valores de porcentagem média de adsorção e dessorção dos dois agrotóxicos foram similares. Os valores obtidos no experimento de adsorção mostraram que em média, 36 % dos dois agrotóxicos aplicados inicialmente (C_p) adsorveu no solo. Deste valor, somente aproximadamente 7 % dessorveu no experimento de dessorção. Isto significa que uma vez aplicado em uma plantação, 31 % do nicossulfurom e do clorimurom-etil vão ficar retidos no solo, enquanto que os 69 % restantes podem se movimentar no solo.

Comparando-se os resultados de K_f pode-se considerar que os agrotóxicos imazetapir, imazaquim, nicossulfurom e clorimurom-etil apresentaram baixa afinidade pelo solo estudado. No caso do imazetapir e imazaquim, esta afinidade é menor ainda e deduz, dessa forma que, quase toda a quantidade aplicada estará disponível para se movimentar no solo.

Os valores de $1/n$ obtidos em todos os experimentos foram próximos de 1, desta forma K_d foi estimado como sendo a inclinação das isotermas de adsorção e dessorção. Com os valores de K_d foram calculados os valores de K_{oc} .

Na Tabela 34 encontram-se os valores dos coeficientes de K_d e K_{oc} , tempo de meia-vida e índice de GUS obtidos para o nicossulfurom e clorimurom-etil.

Tabela 34: Valores dos coeficientes de K_d e K_{oc} , tempo de meia-vida e índice de GUS obtidos para o nicossulfurom e clorimurom-etil.

Agrotóxico	Processo	K_d (mL g ⁻¹)	K_{oc} (mL g ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	GUS
Nicossulfurom	Adsorção	2,6	532	21	1,6
Clorimurom	Adsorção	3,0	612	40	1,9

Segundo os valores de K_{oc} , ambos agrotóxicos apresentam uma mobilidade razoável, entretanto, os valores de $t_{1/2}$, encontrados na literatura, indicam que os dois agrotóxicos apresentam baixa persistência no solo. Isto significa que ambos tendem a se degradar rapidamente, antes de terem a chance de se movimentar pelo solo. O índice de GUS de 1,6 indicou que o nicossulfurom apresenta baixa probabilidade de contaminar águas subterrâneas por meio do processo de lixiviação. Quanto ao clorimurom, o índice de GUS obtido para ele indicou que seriam necessários estudos mais aprofundados para uma definição mais precisa de seu comportamento no solo, entretanto, como seu tempo de residência no solo é maior, ele certamente deveria ser incluído em uma lista de compostos a serem monitorados na água subterrânea da região estudada.

4.7. Validação do Método de Determinação de Agrotóxicos em Água Empregando HPLC-DAD

A seletividade foi avaliada através da comparação dos extratos do branco da água e da amostra de água fortificada com os padrões dos agrotóxicos antes da extração, como mostrado

nas Figuras 24a e 24b, respectivamente. Também foi verificada a seletividade através da análise de pureza dos picos, em três pontos, início, ápice e fim do pico. Este estudo comprovou que o método desenvolvido é seletivo.

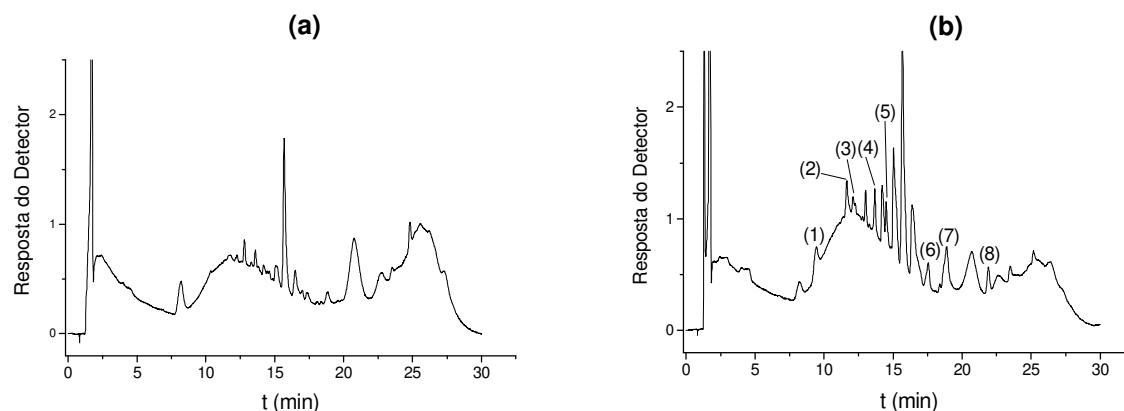


Figura 24: Cromatogramas obtidos para os extratos de: (a) branco da água e (b) amostra de água fortificada com os agrotóxicos antes da extração: (1) Imazetapir, (2) Nicossulfurom, (3) Imazaquim, (4) Carbofuram, (5) Atrazina, (6) Linurom, (7) Clorimurom-etil, (8) Diflubenzurom, empregando HPLC-DAD. Condições cromatográficas descritas na Figura 12.

Os resultados de LDI, LQI, LDM e LQM estão apresentados na Tabela 35. As extrações partiram de 1 L de água, que foram concentrados a 500 μL , resultando em um fator de concentração de 2000. Os valores de LQM para cada agrotóxico foram calculados com base neste fator de concentração.

Tabela 35: Limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD.

Agrotóxico	LDI (ng mL^{-1})	LQI (ng mL^{-1})	LDM (ng mL^{-1})	LQM (ng mL^{-1})
Imazetapir	44	200	0,022	0,1
Nicossulfurom	22	100	0,011	0,05
Imazaquim	10	35	0,005	0,018
Carbofuram	40	150	0,020	0,075
Atrazina	4	30	0,002	0,015
Linurom	6	40	0,003	0,020
Clorimurom	20	100	0,010	0,050
Diflubenzurom	50	100	0,025	0,050

A concentração máxima permitida de agrotóxicos em água potável, estabelecido pela CE é de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para cada agrotóxico individual e de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para a soma total de agrotóxicos ^(60,61). Os valores de LQM para todos os agrotóxicos estão abaixo ou igual a este valor, sendo portanto, aceitáveis.

Na Figura 25 são mostradas as curvas analíticas construídas para cada um dos padrões dos agrotóxicos.

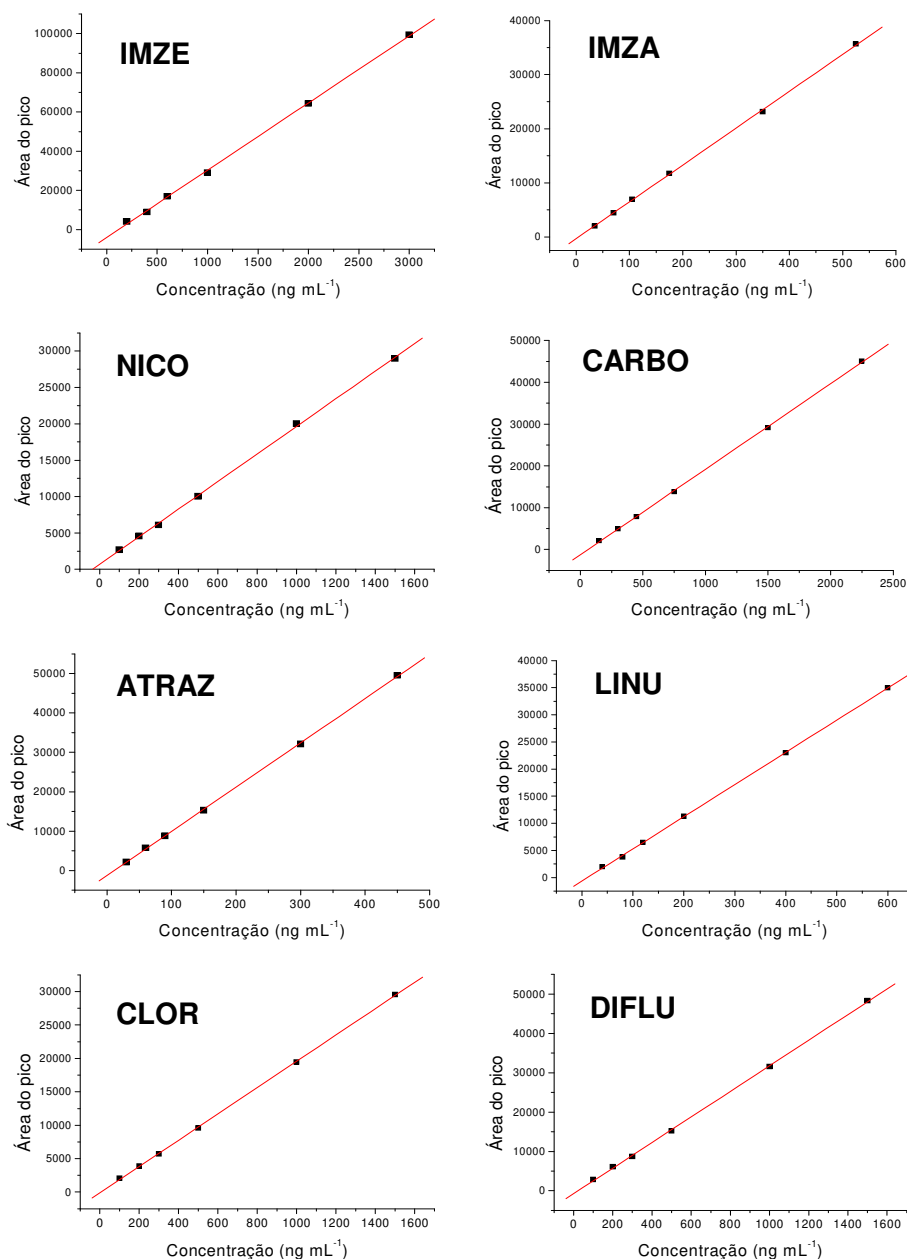


Figura 25: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 1, 2, 3, 5, 10 e 15 x o LQI, obtidas para o estudo em água empregando HPLC-DAD.

Os parâmetros de regressão linear, os coeficientes de correlação (r) e os intervalos de linearidade das curvas estão apresentados na Tabela 36.

As curvas analíticas mostraram um bom intervalo de linearidade, com coeficiente de correlação maior que 0,999 para todos os agrotóxicos. Os gráficos de resíduos foram plotados para cada uma das curvas e não apresentaram nenhuma tendência ou padrão, confirmando a linearidade. ^(147,150,151)

Tabela 36: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD.

Agrotóxico	Curva Analítica			Intervalo de Linearidade (ng mL ⁻¹)
	a (intercepto)	b (inclinação)	r	
Imazetapir	-4025	34	0,9997	200 - 3000
Nicossulfurom	684	19	0,9997	100 - 1500
Imazaquim	-323	68	0,9999	35 - 540
Carbofuram	-1287	20	0,9999	150 - 2250
Atrazina	-1265	112	0,9999	30 - 450
Linurom	-659	59	0,9999	40 - 600
Clorimurom	-109	20	0,9999	100 - 1500
Diflubenzurom	-740	33	0,9998	100 - 1500

A Tabela 37 mostra os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia e em três dias diferentes, e os valores de CV dos dois experimentos que representam a repetitividade e a precisão intermediária do método desenvolvido.

Os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia nos três níveis foram adequados, pois variaram de 76 a 108 % e ficaram dentro da faixa aceitável, de 70 a 120 % ⁽¹³¹⁾. As recuperações entre dias, através da qual foi calculado a precisão intermediária, ficaram na faixa de 78 a 108 %, sendo também aceitáveis. O limite aceitável para o coeficiente de variação é de 15 % ⁽¹²⁶⁾ e os resultados de repetitividade mostraram boa precisão, com valores de CV de 0,5 a 6,5 % ($n=3$), o mesmo ocorrendo para a precisão intermediária, 1,1 a 8,8 %.

Tabela 37: Recuperações (n=3) e precisão (repetitividade, n=3, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos em água empregando HPLC-DAD; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (2x LQM), F3 (10x LQM).

Agrot.	Recuperação ^a (%)			Repetitividade CV (%)			Recuperação ^b (%)			Precisão intermediária CV (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
IMZE	96	79	84	2,7	3,8	0,5	97	82	84	2,1	3,1	2,2
NICO	101	98	108	6,5	4,1	0,8	99	93	107	2,4	7,6	2,2
IMZA	88	92	100	5,1	1,8	0,7	90	95	103	4,2	2,8	3,4
CARBO	95	76	78	1,2	1,2	1,2	97	78	80	2,9	3,1	2,7
ATRAZ	83	100	98	4,7	2,0	0,7	90	103	98	3,5	4,2	1,1
LINU	87	84	103	0,7	0,9	1,3	101	81	99	4,4	3,6	4,5
CLOR	90	95	106	3,3	0,6	0,6	96	102	108	5,7	5,0	3,8
DIFLU	100	104	108	4,1	1,1	0,8	100	107	107	8,8	2,8	2,0

^a Média das recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Média das recuperações obtidas em três dias diferentes

O método validado foi utilizado para a quantificação dos agrotóxicos em amostras de água subterrâneas coletadas em 12/2005; 03/2006; 06, 09 e 12/2007.

4.8. Validação do Método de Determinação de Agrotóxicos em Água Empregando LC-ESI-MS/MS

Todos os compostos apresentaram íons $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$ abundantes que foram selecionados como íons precursores. Não houve formação de adutos de sódio, potássio ou mesmo amônia.

Os agrotóxicos imazetapir, imazaquim, nicossulfurom e clorimurom-etil apresentam valores de pKa na faixa de 3,8 a 4,6. Em valores de pH neutro, estes compostos encontram-se na forma ionizada e apresentam baixa retenção em uma coluna C18. Desta forma, foi necessário diminuir o pH com o objetivo de deixar estes compostos na forma molecular que apresenta maior retenção na coluna C18 e também para aumentar a separação de todos os agrotóxicos. Isto provavelmente resultaria em perdas de íons pré-formados, o que deveria diminuir a detectabilidade destes compostos no ESI-MS/MS. Por outro lado, uma resolução maior entre os picos minimiza a competição entre os analitos durante o processo de ionização

na interface ESI. A interferência da matriz é mais pronunciada, geralmente, no início da corrida cromatográfica, desta forma o ideal é que os analitos apresentem alguma retenção na coluna. A adição de ácido na FM resultou em perda de íons pré-formados, entretanto houve ganho de detectabilidade melhorando-se a resolução e aumentando-se o t_R , dessa forma, foi possível obter baixos valores de LDI e LQI.

Na Figura 26 são mostradas as curvas analíticas construídas para cada um dos padrões dos agrotóxicos.

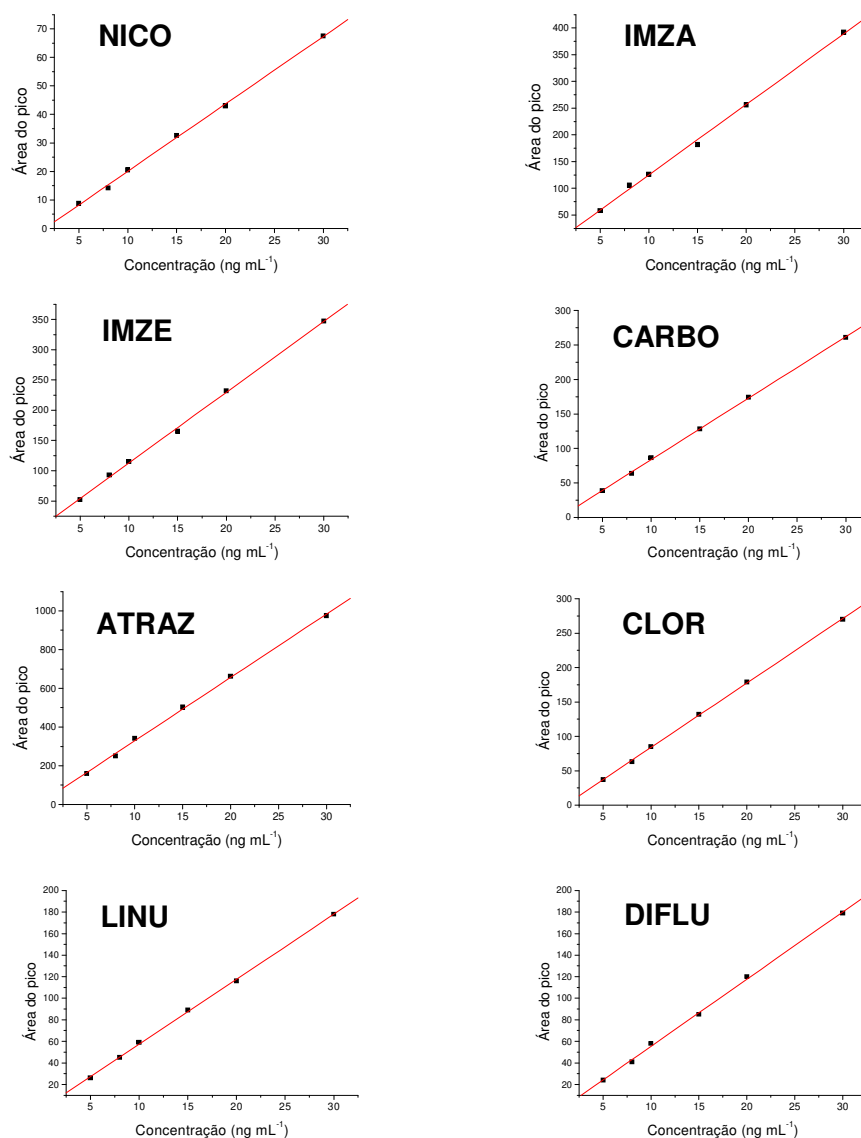


Figura 26: Curvas analíticas dos agrotóxicos nas concentrações de 1, 1,6, 2, 3, 4, 5x o LQI, obtidas para o estudo da água empregando LC-ESI-MS/MS.

Os cromatogramas das soluções dos padrões dos agrotóxicos preparadas em brancos da água foram comparadas com os cromatogramas de padrões preparados em brancos de solvente nas mesmas concentrações e não foi verificada a ocorrência de efeitos de matriz.

Os valores de LDI e LQI foram estabelecidos em 1 e 10 ng mL⁻¹, respectivamente. As extrações partiram de 500 mL de água, que foram concentrados a 500 µL, resultando em um fator de concentração de 1000 vezes. Os valores de LDM e LQM dos agrotóxicos foram calculados com base neste fator de concentração e resultaram nas concentrações de 0,001 ng mL⁻¹ e 0,01 ng mL⁻¹ que é 10 vezes menor que o LMR de agrotóxicos em água potável (0,1 ng mL⁻¹). Estes valores foram apropriados para a validação do método de análise dos agrotóxicos utilizando a LC-ESI-MS/MS.

Os parâmetros de regressão linear, os coeficientes de correlação (r) e os intervalos de linearidade das curvas analíticas construídas para cada um dos padrões dos agrotóxicos estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38: Parâmetros de regressão linear, coeficientes de correlação (r) e intervalos de linearidade das curvas obtidas para os agrotóxicos em água empregando LC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Curva Analítica			Intervalo de Linearidade (ng mL ⁻¹)
	a (intercepto)	b (inclinação)	r	
Nicossulfurom	-3,59	2,36	0,9994	5-30
Imazaquim	-6,6	13,2	0,9992	5-30
Imazetapir	-4,29	11,7	0,9994	5-30
Carbofuram	-5,44	8,9	0,9998	5-30
Atrazina	2,38	32,7	0,9994	5-30
Clorimurom	-9,63	9,36	0,9998	5-30
Linurom	-2,88	6,02	0,9997	5-30
Diflubenzurom	-6,86	6,23	0,9994	5-30

Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,999 e as curvas mostraram um bom intervalo de linearidade, de uma ordem de magnitude. Os gráficos de resíduos mostraram uma distribuição aleatória entre os valores positivos e negativos, sem nenhuma tendência ou padrão, confirmando a linearidade.

Tabela 39: Recuperações e precisão (repetitividade, n=5, e precisão intermediária, n=3) para os agrotóxicos em água empregando LC-ESI-MS/MS; níveis de fortificação: F1 (1x LQM), F2 (100x LQM).

Agrot.	Recuperação ^a (%)		Repetitividade CV (%)		Recuperação ^b (%)		Precisão intermediária CV (%)	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
NICO	98	97	7,0	5,4	98	94	9,6	10,7
IMZA	103	106	5,0	10,1	107	102	8,6	8,1
IMZE	99	90	10,0	7,8	93	96	5,6	5,4
CARBO	95	100	7,0	8,6	90	82	12,0	7,8
ATRAZ	103	105	5,0	7,4	97	93	11,2	12,3
CLOR	88	90	6,0	6,2	99	93	10,7	4,4
LINU	97	95	10,0	4,6	90	96	7,8	6,9
DIFLU	87	95	12,0	12,4	96	100	9,9	10,1

^a Média das recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Média das recuperações obtidas em três dias diferentes

A Tabela 39 mostra os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia e em três dias diferentes em dois níveis de fortificação: o primeiro, na concentração do LQM, de 0,01 ng mL⁻¹ e o segundo, na concentração do LMR, de 0,1 ng mL⁻¹. Os valores de CV dos dois experimentos representam a repetitividade e a precisão intermediária do método desenvolvido.

Os valores de recuperação nos dois níveis em um mesmo dia variaram de 87 a 106 % e em dias diferentes, de 82 a 107 %, estando todos dentro da faixa aceitável, de 70 a 120 % ⁽¹³¹⁾. O limite aceitável para o coeficiente de variação é de 15 % ⁽¹²⁶⁾ e os resultados de repetitividade mostraram boa precisão, com valores de CV de 4,6 a 12,4 % (n=5), o mesmo ocorrendo para a precisão intermediária, 4,4 a 12,3 % (n=3).

O método validado foi utilizado para a análise dos agrotóxicos em águas subterrâneas coletadas em 04/2009.

4.9. Aplicação dos Métodos Desenvolvidos e Validados

4.9.1. Análise de Amostras de Água por HPLC-DAD

Na Figura 27 estão mostrados os cromatogramas de seis amostras coletadas em março dos anos de 2006 e de 2007, respectivamente, na profundidade de 1 m, nos pontos: A1 - Três Irmãos, A2 - Holândia e A3 - Graúna.

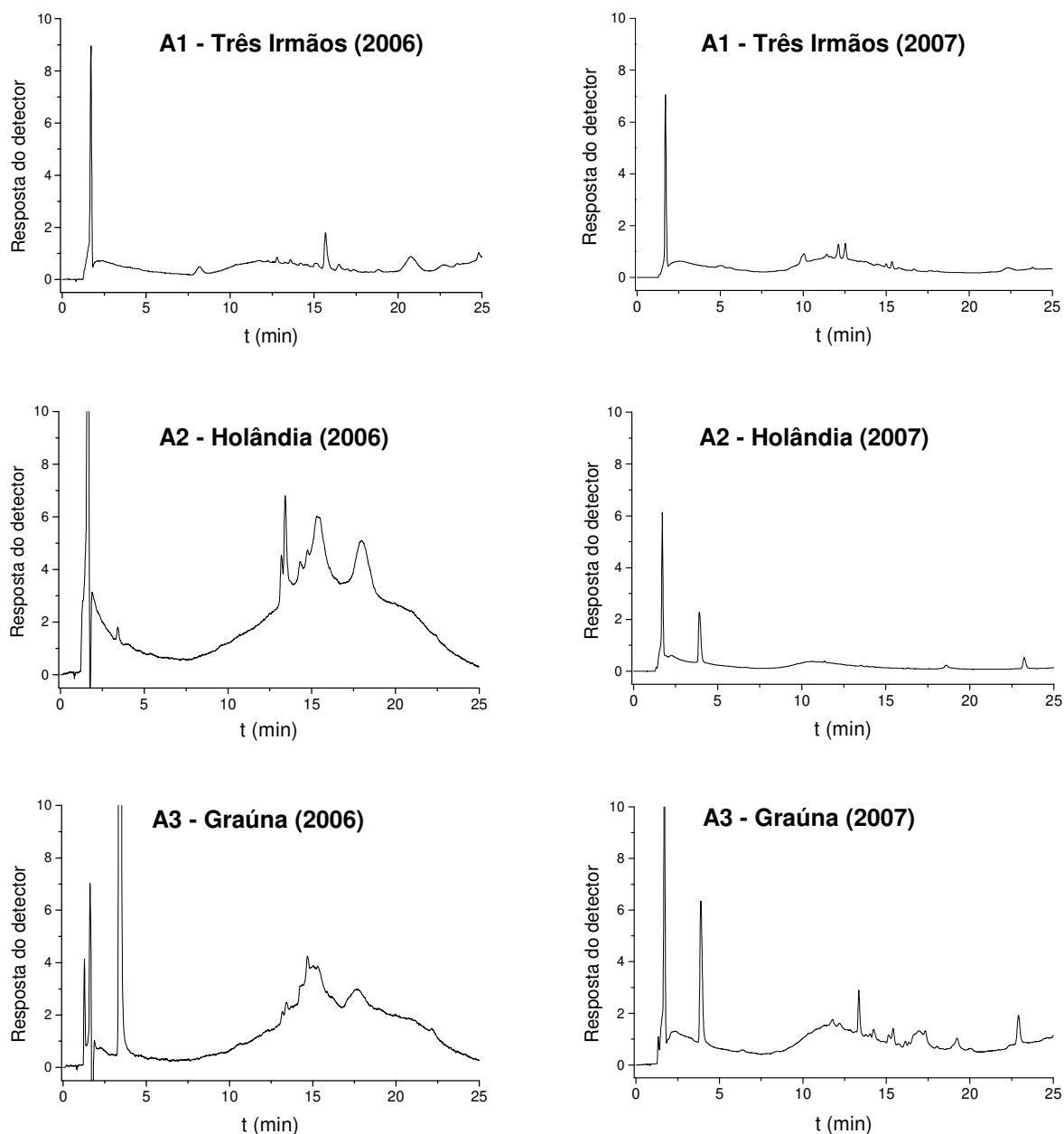


Figura 27: Cromatogramas de extratos de águas coletadas em março de 2006 e de 2007, respectivamente, na profundidade de 1 m, nos pontos: A1 - Três Irmãos, A2 - Holândia e A3 - Graúna, analisados por HPLC-DAD. Condições cromatográficas descritas na Figura 12.

Em uma análise por cromatografia líquida, variações na proporção ou no pH da fase móvel podem resultar em pequenas mudanças no tempo de retenção (t_R) dos compostos no cromatograma. Sendo assim, durante a análise das amostras de água foi injetada também uma solução contendo os padrões dos agrotóxicos a fim de se confirmar o t_R de cada um deles. Quando o t_R de um pico no cromatograma da amostra era o mesmo ou estava próximo ao t_R de algum dos padrões de agrotóxicos, comparava-se então os espectros de absorção no UV destes dois picos. Através da comparação dos espectros de absorção no UV dos picos, não foi detectada a presença de nenhum dos agrotóxicos estudados. Todas as amostras coletadas em 12/2005; 03/2006; 03, 06, 09 e 12/2007, descritas na Tabela 10 foram analisadas e em nenhuma delas foi detectada a presença dos agrotóxicos.

4.9.2. Análise de Amostras de Água e Solo por LC-ESI-MS/MS

A Tabela 40 mostra os resultados das análises de amostras de água subterrânea coletadas em 04/2009 nos pontos A1, A2 e A3 (Tabela 10).

As extrações partiram de 500 mL de água que foram concentradas a 500 μ L, resultando em um fator de concentração de 1000 vezes. Desta forma, a concentração dos agrotóxicos encontradas no equipamento foram divididas por 1000, a fim de se determinar a sua concentração inicial em 500 mL de amostra.

Para todos os analitos foram monitorados dois íons produtos, um para a quantificação e outro para confirmação. A confirmação da presença dos analitos só foi feita quando os picos dos dois íons produtos apresentaram relação sinal/ruído maior ou igual a três.

Ao reportar os resultados das concentrações de uma análise quantitativa, o guia da AOAC ⁽¹²⁶⁾ recomenda que as concentrações menores que o LDM sejam reportadas como “zero” ou “não detectadas”, pois estatisticamente estes valores não são válidos. Entretanto, a detecção ou até mesmo quantificação de analitos nestes níveis pode ser plausível, desde que se considere que a incerteza da medida de detecção ou quantificação seja maior que o próprio valor medido. Isto é, em níveis de concentração menores ou iguais ao LDM ou ao LQM, é possível fazer uma identificação qualitativa dos analitos.

Os analitos que apresentaram picos com sinais menores que o do LDM (0,001 ng L⁻¹) para os dois íons produtos não foram quantificados, mas foram identificados e classificados com concentração “<LD” na Tabela 40. Os analitos que não apresentaram o íon de confirmação foram classificados como não detectados, “ND”.

Tabela 40: Concentrações dos agrotóxicos encontradas nas amostras de água subterrâneas coletadas em 04/2009, nos pontos descritos na Tabela 10 e analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Agrot.	Concentração (ng mL ⁻¹)							
Pontos	A1			A2		A3		
Profund. (m)	1	2	3	1	2	1	2	3
NICO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IMZA	ND	0,006	0,009	0,009	0,006	ND	0,002	ND
IMZE	0,004	0,008	0,003	ND	0,007	ND	ND	ND
CARBO	0,002	0,002	0,002	0,005	0,003	ND	0,004	0,002
ATRAZ	0,005	0,001	0,002	0,005	0,005	0,001	0,003	0,003
CLOR	ND	0,003	0,002	0,002	0,004	<LD	<LD	0,004
LINU	<LD	<LD	0,003	0,005	0,003	<LD	0,007	0,003
DIFLU	0,004	0,004	0,009	0,006	0,008	0,01	0,004	0,016

Todas as concentrações dos agrotóxicos encontradas nas amostras de água estavam abaixo do LMR de 0,1 ng mL⁻¹. Não houve relação entre as concentrações encontradas e as profundidades de coleta das águas.

Na tentativa de explicar os resultados de concentrações dos agrotóxicos nas amostras de água, colocou-se na Tabela 41 alguns dados referentes aos agrotóxicos, como o K_{oc} , o $t_{1/2}$, a d.a., e o índice de GUS, coletados na literatura ou determinados neste trabalho, e também o preço dos agrotóxicos (mostrado também no item 3.3.1).

Tabela 41: K_{oc} , $t_{1/2}$, d.a., índice de GUS e preço dos agrotóxicos.

	K_{oc} (mL g ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	Índice de GUS	d.a. (ng g ⁻¹)	d.a. (g ha ⁻¹)	preço (R\$ / ha)
NICO	532	21	1,6	16,1	55	93,20
IMZA	306	60	2,7	41	140	59,00
IMZE	245	90	3,1	31	106	34,40
CARBO	22	45	4,4	438	1500	183,00
ATRAZ	100	60	3,6	659	2250	45,90
CLOR	612	40	1,9	15	50	43,20
LINU	400	60	2,5	322	1100	183,00
DIFLU	10000	10	-	13,2	45	17,90

O nicossulfurom não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Este agrotóxico apresenta $t_{1/2}$ curto no solo e mobilidade razoável que resultam em uma baixa probabilidade de encontrá-lo em águas superficiais ou subterrâneas. Deve-se considerar entretanto, que outros mecanismos diretos ou indiretos podem contribuir para a contaminação da água da área estudada, como o despejo de esgotos, erosão das áreas agrícolas, precipitação, escoamento pelas águas das chuvas e transporte dos agrotóxicos através do vapor e da poeira. Desta forma, apesar de não sofrer lixiviação e de ter $t_{1/2}$ curto, o nicossulfurom poderia alcançar a água subterrânea por meio dos mecanismos citados. Dois fatores devem contribuir para sua ausência nos três pontos estudados, um é o seu preço e outro é a sua taxa de d.a., que é uma das menores da Tabela 41.

O imazetapir e o imazetapir foram encontrados em concentrações consideráveis nos conjuntos de amostras A1 e A2. Os dois apresentam $t_{1/2}$ longo e potencial para lixiviação, como indicado pelos índices de GUS de 2,7 e 3,1, respectivamente. Os valores de d.a. baixos e também os preços destes agrotóxicos são fatores que podem explicar a sua ausência no conjunto A3.

O carbofuran e a atrazina foram detectados em quase todas as amostras. Ambos apresentam tendência alta em lixiviar, o carbofuran adsorve pouco ao solo e a atrazina apresenta $t_{1/2}$ elevado. O carbofuran é um dos agrotóxicos que apresentam o preço mais alto na Tabela 41 e por isso sua ocorrência deveria ser menor. Entretanto, os fatores determinantes para explicar a presença do carbofuran e da atrazina na maioria das amostras são os seus valores de d.a., muito maiores que os dos outros agrotóxicos.

A d.a. do clorimurrom-etil é baixa e o seu K_{oc} é alto e mesmo assim, ele foi detectado nos três pontos.

A d.a. do linurom serve também para explicar a sua detecção nas três plantações, no entanto, por apresentar valor alto de K_{oc} , o linurom apresenta potencial de lixiviação médio e também preço elevado e por isso sua frequência não foi tão alta quanto a da atrazina.

O K_{oc} do diflubenzurom faz com que ele seja classificado como imóvel no solo, seu $t_{1/2}$ e sua d.a. são extremamente baixos, os menores valores da tabela. E somando-se a estes fatores sua solubilidade em água é baixíssima. Com estas propriedades seria improvável encontrar o diflubenzurom nas amostras, entretanto, o diflubenzurom foi o agrotóxico detectado em maiores concentrações nos três pontos analisados, como pode ser observado na Tabela 40. Estes resultados podem ser explicados por dois fatores, o primeiro deles é que o diflubenzurom é o único dos agrotóxicos estudados que pode ser utilizado tanto para a soja quanto para o milho. O outro é o preço do diflubenzurom que é o mais baixo da Tabela 41.

A detecção do diflubenzurom em todas as amostras serve para mostrar como outros fatores, além das explicações científicas, devem ser considerados ao se estudar o destino dos agrotóxicos no meio ambiente. Nenhum dos parâmetros estudados e determinados apontaria para este resultado e sim para o contrário, isto é, para a ausência do diflubenzurom nas amostras. Na determinação de agrotóxicos deve se considerar também fatores antropogênicos, como a utilização maciça de um agrotóxico devido ao seu preço menor ou a aplicação sem obedecer o período de carência.

4.10. Comparação Entre os Métodos de Determinação dos Agrotóxicos em Solo e Água.

4.10.1. Determinação dos Agrotóxicos em Solo

Neste trabalho foram validados quatro métodos para a análise dos agrotóxicos no solo, três deles com o emprego de HPLC-DAD e um empregando LC-ESI-MS/MS. Nestes métodos empregaram-se no preparo de amostra, as técnicas por agitação mecânica (MEC), por banho ultrassônico (BUS) e assistida por micro-ondas caseiro (MIC).

Todos os métodos resultaram em valores de recuperação (em um mesmo dia e entre dias) adequados, pois estes se encontraram dentro da faixa aceitável de 70 a 120 %. Os valores de CV obtidos nos ensaios de repetitividade (em um mesmo dia) e precisão

intermediária (em dias diferentes) ficaram abaixo do limite recomendado na literatura, de 15 %. Na Tabela 44 são mostradas as faixas de porcentagens de recuperação dos agrotóxicos e dos CV obtidos nas quatro validações, assim como a faixa de valores de LDM e LQM obtidos para todos os agrotóxicos.

Embora as três técnicas de extração empregando HPLC-DAD tenham apresentado valores semelhantes para as figuras de mérito, todos eles dentro dos limites aceitos na literatura, a extração assistida por micro-ondas é extremamente rápida (2 min), igualmente simples e o equipamento empregado, micro-ondas caseiro, é de baixo custo e de fácil acesso, sendo dessa forma uma ótima alternativa em relação às outras técnicas de extração para amostras sólidas, as quais consumiram no mínimo uma hora. Deve-se ressaltar, entretanto o fator periculosidade ao se trabalhar com um micro-ondas caseiro, atribuída à falta dispositivos de segurança para controle de pressão e temperatura.

Os quatro métodos resultaram em valores baixos de LDM e LQM. Comparando-se os valores obtidos através dos métodos 3 e 4 da Tabela 42, que empregaram HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS, respectivamente, pode-se concluir que o último apresentou maior detectabilidade, com a obtenção dos menores valores de LDM e LQM para todos os agrotóxicos.

Tabela 42: Valores das figuras de mérito obtidas nas validações dos métodos para análise dos agrotóxicos em solo.

Figuras de mérito	Métodos de análise			
	1 MEC/HPLC-DAD	2 BUS/HPLC-DAD	3 MIC/HPLC-DAD	4 MIC/LC-ESI-MS/MS
Recuperação ^a (%)	76-112	82-111	83-112	81-110
Recuperação ^b (%)	77-107	82-111	86-111	83-108
Repetitividade CV (%)	0,3 - 9,9	1,5 -10,2	0,2 - 5	1 - 10,7
Precisão intermediária CV (%)	1,2 - 11,7	0,4 - 8,1	0,3 - 4,9	1,2-12,1
LDM (ng g ⁻¹)	0,6-5,7	0,6-5,7	0,6-5,7	0,3
LQM (ng g ⁻¹)	3-20	3-20	3-20	1

^a Faixas de recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Faixas de recuperações obtidas em três dias diferentes

A otimização do método de análise no cromatógrafo, incluindo a separação dos analitos e escolha dos solventes da fase móvel, foi realizada mais rapidamente quando se empregou LC-MS/MS. Uma das razões é que, neste caso, a quantificação dos analitos não requer uma separação total dos analitos na corrida cromatográfica. No LC-MS/MS uma resolução menor entre os agrotóxicos estudados resultou em perda de detectabilidade do método, mas mesmo assim, esta ainda foi maior que a obtida empregando HPLC-DAD.

Os quatro métodos mostraram-se adequados para a separação, identificação e quantificação dos agrotóxicos estudados em solo e a escolha entre os dois tipos de detecção, DAD ou MS/MS, depende das concentrações dos agrotóxicos nas amostras que irão ser analisadas, e também da necessidade de uma confirmação individual do analito estudado e com maior confiabilidade.

O método 4 foi utilizado na análise de amostras de solo de duas plantações com cultivo de soja e milho, oriundas de diferentes regiões e nenhum dos agrotóxicos foi detectado.

4.10.2. Determinação dos Agrotóxicos em Água

Foram validados dois métodos para a análise dos agrotóxicos em água: um empregando HPLC-DAD e outro LC-MS/MS. A técnica de extração utilizada nos dois estudos foi a SPE.

A técnica de SPE desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento do método com uso de HPLC-DAD, pois neste caso o fator de concentração alto durante a etapa de extração de 2000 vezes foi necessário para se atingir o LMR. Este fator, aliado ao uso de HPLC-DAD, um equipamento de menor custo e mais acessível, possibilitou o desenvolvimento de um método analítico suficientemente seletivo e sensível que atingiu o limite máximo de resíduos (LMR) imposto pela CE que é de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para cada agrotóxico, podendo ser empregado para o monitoramento rotineiro dos agrotóxicos estudados em amostras de água. O método empregando SPE-LC-MS/MS demandou menor quantidade de amostra de água. Com a extração de apenas 50 mL de água foi possível atingir o LMR, de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Com o objetivo de se obter um método mais sensível, 500 mL de água foram concentrados a 500 μL resultando em um LQM de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$, como pode ser observado na Tabela 43.

Na validação dos métodos de determinação dos agrotóxicos em água, os valores de recuperação obtidos em um mesmo dia e em dias diferentes ficaram dentro da faixa aceitável de 70-120 %. Os ensaios de repetitividade e de precisão intermediária para todos agrotóxicos apresentaram coeficientes de variação abaixo do limite aceito de 15 %.

Tabela 43: Valores das figuras de mérito obtidas nas validações dos métodos para a determinação dos agrotóxicos em água.

Figuras de mérito	Métodos de análise	
	5 SPE/HPLC-DAD	6 SPE/LC-ESI-MS/MS
Recuperações (%) ^a	76-108	88-106
Recuperações (%) ^b	78-108	82-107
Repetitividade CV (%)	0,6-6,5	4,6-12,4
Precisão intermediária CV (%)	1,1-8,8	4,4-12,3
LDM (ng mL ⁻¹)	0,002-0,022 *	0,001 **
LQM (ng mL ⁻¹)	0,015-0,1 *	0,01 **

^a Faixas de recuperações obtidas em um mesmo dia

^b Faixas de recuperações obtidas em três dias diferentes

* utilizou-se 1 L de amostra de água

** utilizou-se 0,5 L de amostra de água

Os valores de LQM obtidos para todos agrotóxicos pelo método SPE/HPLC-DAD foram adequados, sendo iguais ou menores que o LMR, de 0,1 ng mL⁻¹. Empregando SPE/LC-ESI-MS/MS os valores de LQM foram 10 x menores que o LMR. Deve-se notar, entretanto que a média dos valores de CV obtidos com o método 6 (SPE/LC-ESI-MS/MS) foram maiores que as médias obtidas pelo método 5 e isso pode ser atribuído ao fato de que no método 6 trabalhou-se com concentrações bem menores dos analitos, o que contribui para aumentar a variação nas medidas.

As amostras coletadas entre os anos de 2005 e 2007 foram analisadas por HPLC-DAD e não se detectou a presença de nenhum dos agrotóxicos estudados. Empregando LC-ESI-MS/MS foi possível diminuir os valores de LQM para todos os agrotóxicos e outras amostras de água coletadas em 2009, em três pontos da área de estudo que foram analisadas empregando este método.

O menor valor de LQM obtido com o HPLC-DAD para o conjunto de agrotóxicos estudados foi o da atrazina, de 0,015 ng mL⁻¹. Entretanto, como pode ser observado na Tabela 40, a maioria das concentrações encontradas nas amostras de água foram menores que 0,01

ng mL⁻¹. O método desenvolvido com o emprego de HPLC-DAD foi apropriado para a quantificação dos agrotóxicos em níveis de concentração próximas ao LMR, de 0,1 ng mL⁻¹, entretanto, o LC-ESI-MS/MS pode fornecer informações adicionais quanto a presença ou não dos agrotóxicos nas amostras, mesmo quando estavam em concentrações muito baixas. Além disso, este último equipamento permitiu a análise de um volume menor de amostra, 500 mL, ao invés de 1 L utilizado no HPLC-DAD.

Todos os agrotóxicos foram detectados nos três pontos analisados, com exceção do nicossulfurom que não apareceu em nenhuma das amostras. Os agrotóxicos foram detectados em concentrações menores que o LMR, que variaram de 0,001 a 0,016 ng mL⁻¹ nas três profundidades, de 1, 2 e 3 m. Os valores de concentração total de agrotóxicos encontrados nos pontos A1, A2 e A3 foram bem próximos, 0,069, 0,068 e 0,059 ng mL⁻¹, respectivamente.

Apesar de apresentar uma mobilidade baixa no solo, tempo de meia-vida curto e ser pouco solúvel em água, o diflubenzurom foi o agrotóxico encontrado em maior concentração nas amostras estudadas.

5. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos e validados métodos para separação e identificação dos agrotóxicos imazetapir, nicossulfurom, imazaquim, carbofuram, atrazina, linurom, clorimurom-etil e diflubenzurom em água e solo, que atenderam os requisitos básicos de validação para a sua aplicação na análise de amostras do meio ambiente.

Os estudos de adsorção e dessorção realizados para o imazetapir, imazaquim, nicossulfurom e clorimurom-etil, confirmados pelos valores de K_f , mostraram que uma quantidade pequena dos agrotóxicos, inferior a 36 %, ficou adsorvida ao solo, devido as suas baixas afinidades pelo solo estudado. Desta quantidade, uma pequena parcela dessorveu e se somou à fração não adsorvida ficando disponível para se movimentar através do solo, podendo lixiviar para outras camadas e até para o lençol freático. Estes resultados mostram que é necessário que se monitore estes agrotóxicos, uma vez que podem ser considerados potenciais contaminantes das águas e dos solos.

Concluiu-se que diante da relevância do sistema Aquífero Guarani, este estudo foi de grande importância ao mostrar que devem ser feitos monitoramentos constantes da quantidade de agrotóxicos nesta região, a fim de se preservar o meio ambiente e a qualidade de vida da população. Este estudo também apresentou várias opções de metodologias que podem ser aplicadas na determinação dos agrotóxicos selecionados.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.; García-Río, L., "The Mobility and Degradation of Pesticides in Soils and the Pollution of Ground Water Resources", *Agric. Ecosyst. Environ.*, 26 (2008) 247.
- 2) de Wilde, T.; Mertens, J.; Spanoghe, P.; Ryckeboer, J.; Jaeken, P.; Springael, D., "Sorption Kinetics and its Effects on Retention and Leaching", *Chemosphere*, 72 (2008) 509.
- 3) Andreu, V.; Picó, Y., "Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods", *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 23 (2004) 772.
- 4) Barr, D.B; Needham, L.L., "Analytical Methods for Biological Monitoring of Exposure to Pesticides: a Review", *J. Chromatogr. B*, 778 (2002) 5.
- 5) Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B., "Multiresidue Methods Using Solid-Phase Extraction Techniques for Monitoring Priority Pesticides, Including Triazines and Degradation Products, in Ground and Surface Waters", *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 217.
- 6) <http://www.sindag.com.br/upload/Vendasjaneirooutubro.ppt>, acessado em jun/2009.
- 7) http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm, acessado em jun/2009.
- 8) <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm>, acessado em jun/2009.
- 9) Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M., "Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticidas: Vias de Contaminação e Dinâmica dos Pesticidas no Ambiente Aquático", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 9 (1999) 1.
- 10) Larson, S.J.; Capel, P.D.; Majewski, M.S., "Pesticides in Surface Waters: Distribution, Trends, and Governing Factors", CRC Press, Boca Raton, USA, 1997.
- 11) Hamilton, D.; Crossley, S., "Pesticide Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks", John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2004.
- 12) Chesworth, W., "Encyclopedia of Soil Chemistry", Springer, Dordrecht, 2008.
- 13) Inderjit, "Weed Biology and Management", Springer, Dordrecht, 2004.

- 14) Judd, S.; Stephenson, T., "Process Science and Engineering for Water and Wastewater Treatment", IWA Publishing, London, 2002.
- 15) Grey, T.L.; Walker, R.H.; Wehtje, G.R.; Hancock, H.G., "Sulfentrazone Adsorption and Mobility as Affected by Soil and pH", *Weed Sci.*, 45 (1997) 733.
- 16) Gevaio, B.; Semple, K.T.; Jones, K.C., "Bound Pesticide Residues in Soils: A Review", *Environ. Pollut.*, 108 (2000) 3.
- 17) Huang, W.; Peng, P.; Yu, Z.; Fu, J., "Effects of Organic Matter Heterogeneity on Sorption and Desorption of Organic Contaminants by Soils and Sediments", *Appl. Geochem.*, 18 (2003) 955.
- 18) Ertli, T.; Marton, A.; Földényi, R., "Effect of pH and the Role of Organic Matter in the Adsorption of Isoproturon on Soils", *Chemosphere*, 57 (2004) 771.
- 19) Cooke, C.M.; Shaw, G.; Collins, C.D.; "Determination of Solid-Liquid Partition Coefficients (K_d) for the Herbicides Isoproturon and Trifluralin in Five UK Agricultural Soils", *Environ. Pollut.*, 132 (2004) 541.
- 20) Oliver, D.P.; Kookana, R.S.; Quintana, B., "Sorption of Pesticides in Tropical and Temperate Soils from Australia and the Philippines", *J. Agric. Food. Chem.*, 53 (2005) 6420.
- 21) Boivin, A.; Cherrier, R.; Schiavon, M., "A Comparison of Five Pesticides Adsorption and Desorption Processes in Thirteen Contrasting Field Soils", *Chemosphere*, 61 (2005) 668.
- 22) Kumar, M.; Philip, L., "Adsorption and Desorption Characteristics of Hydrophobic Pesticide Endosulfan in Four Indian Soils", *Chemosphere*, 62 (2006) 1064.
- 23) Rama Krishna, K.; Philip, L., "Adsorption and Desorption Characteristics of Lindane, Carbofuran and Methyl Parathion on Various Indian Soils", *J. Hazard. Mater.*, 160 (2008) 559.

- 24) Hiller, E.; Krascenits, Z.; Čerňanský, S., "Sorption of Acetochlor, Atrazine, 2,4-D, Chlorotoluron, MCPA, and Trifluralin in Six Soils From Slovakia", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 80 (2008) 412.
- 25) Ghosh, R.K.; Singh, N., "Effect of Organic Manure on Sorption and Degradation of Azoxystrobin in Soil", *J. Agric. Food Chem.*, 57 (2009) 632.
- 26) Si, Y.; Takagi, K.; Iwasaki, A.; Zhou, D., "Adsorption, Desorption and Dissipation of Metolachlor in Surface and Subsurface Soils", *Pest Manag. Sci.*, 2009, no prelo.
- 27) Barriuso, E.; Feller, C.; Calvet, R.; Cerri, C., "Sorption of Atrazine, Terbutryn and 2,4-D Herbicides in two Brazilian Oxisols", *Geoderma*, 53 (1992) 155.
- 28) Gunasekara, A.S.; de la Cruz, I.D.P.; Curtis, M.J.; Claassen, V.P.; Tjeerdema, R.S., "The Behavior of Clomazone in the Soil Environment", *Pest Manag. Sci.*, 65 (2009) 711.
- 29) Bresnahan, G.A.; Koskinen, W.C.; Dexter, A.G.; Lueschen, W.E., "Influence of Soil pH-Sorption Interactions on Imazethapyr Carry-Over", *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 1929.
- 30) Kah, M.; Brown, C.D., "Changes in Pesticide Adsorption with Time at High Soil to Solution Ratios", *Chemosphere*, 68 (2007) 1335.
- 31) Renner, K.A.; Meggitt, W.F.; Penner, D., "Effect of Soil pH on Imazaquin and Imazethapyr Adsorption to Soil and Phytotoxicity to Corn (*Zea mays*)", *Weed Sci.*, 36 (1988) 78.
- 32) Yarón, B.; Calvet, R.; Prost, R., "Soil Pollution: Processes and Dynamics", Springer, Dordrecht, 1996.
- 33) Delle Site, A., "Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review", *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 30 (2001) 187.
- 34) Jia, Y.; Aagaard, P.; Breedveld, G.D., "Sorption of Triazoles to Soil and Iron Minerals", *Chemosphere*, 67 (2007) 250.
- 35) Regitano, J.B.; Koskinen, W.C., "Characterization of Nicosulfuron Availability in Aged Soils", *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 5801.

- 36) Do, D.D., "Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics", Imperial College Press, London, 1998.
- 37) Deutsch, W.J., "Groundwater Geochemistry: Fundamentals and Applications to Contamination", CRC Press, Boca Raton, USA, 1997.
- 38) Gawlika, B.M.; Sotirioub, N.; Feichtb, E.A.; Schulte-Hostedeb, S.; Kettrupb, A.; "Alternatives for the Determination of the Soil Adsorption Coefficient, K_{oc} , of Non-Ionic Organic Compounds - a Review", *Chemosphere*, 34 (1997) 2525.
- 39) Wauchope, R.D.; Yeh, S.; Linders J.B., Kloskowski, R.; Tanaka, K.; Rubin, B.; Katayama, A.; Kördel, W.; Gerstl, Z.; Lane, M.; Unsworth, J.B., "Review: Pesticide Soil Sorption Parameters: Theory, Measurement, Uses, Limitations and Reliability", *Pest. Manag. Sci.*, 58 (2002) 419.
- 40) Mamy, L.; Barriuso, E., "Desorption and Time-Dependent Sorption of Herbicides in Soils", *Eur. J. Soil Sci.*, 58 (2007) 174.
- 41) Briggs, G.G., "Predicting the Behaviour of Pesticides in Soil from their Physical and Chemical Properties", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 329 (1990) 375.
- 42) Sonon, L.S.; Schwab, A.P., "Adsorption Characteristics of Atrazine and Alachlor in Kansas Soils", *Weed Sci.*, 43 (1995) 461.
- 43) van der Werf, H.M.G., "Assessing the Impact of Pesticides on the Environment", *Agric. Ecosyst. Environ.*, 60 (1996) 81.
- 44) Spadotto, C.A., "Screening Method for Assessing Pesticide Leaching Potential", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 12 (2002) 69.
- 45) Zanini, G.P; Maneiro, C.; Waiman, C.; Galantini, J.A.; Rosell, R.A., "Adsorption of Metsulfuron-Methyl on Soils Under No-Till System in Semiarid Pampean Region, Argentina, *Geoderma*, 149 (2009) 110.
- 46) Lerner, K.L.; Lerner, B.W., "Encyclopedia of Water Science", Thomson Gale, New York, 2005.

- 47) <http://webworld.unesco.org/water/ihp/db/shiklomanov/summary/html/summary.html#2.%20Water%20storage>, acessado em jun/2009.
- 48) Gomes, M.A.F., "Uso Agrícola das Áreas de Afloramento do Aquífero Guarani no Brasil: Implicações para a Água Subterrânea e Propostas de Gestão com Enfoque Agroambiental", Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2008.
- 49) Stewart, B.A.; Howell, T.A., *Encyclopedia of Water Science*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2003.
- 50) Gomes, M.A.F.; Spadotto, C.A.; Lanchotte, V.L.; "Ocorrência do Herbicida Tebuthiuron na Água Subterrânea da Microbacia do Córrego Espreado, Ribeirão Preto - SP", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 11 (2001) 65.
- 51) Cerdeira, A.L.; Pessoa, M.C.P.Y.; Bonato, P.S.; Queiroz, R.H.C.; Lanchote, V.L., "Metodologia Analítica de Resíduo do Herbicida 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) em Amostras de Água em Área de Cultivo de Cana-de-Açúcar", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 12 (2002) 99.
- 52) Matallo, M.B.; Luchini, L.C.; Gomes, M.A.F.; Spadotto, C.A.; Cerdeira, A.L.; Marin, G.C., "Lixiviação dos Herbicidas Tebutiuron e Diuron em Colunas de Solo", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 13 (2003) 83.
- 53) Gomes, M.A.F.; Spadotto, C.A.; Pereira, A.S.; Matallo, M.B.; Luchini, L.C., "Movimento do Herbicida Tebutiuron em Dois Solos Representativos das Áreas de Recarga do Aquífero Guarani", *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.*, 10 (2006) 479
- 54) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Censo Agropecuário 2006 - Resultados Preliminares, IBGE, Rio de Janeiro, 2007.
- 55) Sistema IBGE de Recuperação automática, <http://www.sidra.ibge.gov.br>, acessado em jun/2009.

- 56) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, "Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), dez/2008", IBGE, Rio de Janeiro, 2008.
- 57) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Estudos e Pesquisas: Informações Geográficas, "Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, Brasil 2008", IBGE, Rio de Janeiro, 2007.
- 58) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, "Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), abril/2009", http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#download, acessado em jul/2009.
- 59) Gomes, M.A.F.; Filizola, H.F.; Boulét, R., "Levantamento Detalhado dos Solos da Área de Abrangência da Voçoroca "Chitolina" Localizada Junto às Nascentes do Rio Araguaia", Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2001.
- 60) Carlile, W.R., "Pesticide Selectivity, Health and the Environment", Cambridge University Press, New York, 2006.
- 61) Hamilton, D.J.; Ambrus, Á.; Diertele, R.M.; Felsot, A.S.; Harris, C.A.; Holland, P.T.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Linders, J.; Unsworth, J.; Wong, S.S., "Regulatory Limits for Pesticide Residues in Water", *Pure Appl. Chem.*, 75 (2003) 1123.
- 62) Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero-Hernández, E.; Hernández-Méndez, J., "Simultaneous Determination of Phenyl- and Sulfonylurea Herbicides in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography With UV Diode Array or Mass Spectrometric Detection", *Anal. Chim. Acta*, 517 (2004) 71.
- 63) Ayano, E.; Okada, Y.; Sakamoto, C.S.; Kanazawa, H.; Okano, T.; Ando, M.; Nishimura, T., "Analysis of Herbicides in Water Using Temperature-Responsive Chromatography and an Aqueous Mobile Phase", *J. Chromatogr. A*, 1069 (2005) 281.

- 64) Vega, A.B.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M.; "Monitoring of Pesticides in Agricultural Water and Soil Samples From Andalusia By Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 538 (2005) 117.
- 65) Biesaga, M.; Jankowsk, A.; Pyrzynska, K., "Comparison of Different Sorbents for Solid-Phase Extraction of Phenoxyalkanoic Acid Herbicides", *Microchim. Acta*, 150 (2005) 317.
- 66) Brondi, S.H.G.; Lanças, F.M., "Development and Validation of a Multi-Residue Analytical Methodology to Determine the Presence of Selected Pesticides in Water Through Liquid Chromatography", *J. Braz. Chem. Soc.*, 16 (2005) 650.
- 67) Zhou, Q.; Wang, W.; Xiao, J., "Preconcentration and Determination of Nicosulfuron, Thifensulfuron-Methyl and Metsulfuron-Methyl in Water Samples Using Carbon Nanotubes Packed Cartridge in Combination with High Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chim. Acta*, 559 (2006) 200.
- 68) Polati, S.; Bottaro, M.; Frascarolo, P.; Gosetti, F.; Gianotti, V.; Gennaro, M.C., "HPLC-UV and HPLC-MSⁿ Multiresidue Determination of Amidosulfuron, Azimsulfuron, Nicosulfuron, Rimsulfuron, Thifensulfuron Methyl, Tribenuron Methyl and Azoxystrobin in Surface Waters", *Anal. Chim. Acta*, 579 (2006) 146.
- 69) Perreau, F.; Bados, P.; Kerhoas, L.; Nélieu, S.; Einhorn, J., "Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides and Their Metabolites in Water Using a Combination of Off-Line or On-Line Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem*, 388 (2007) 1265.
- 70) Martínez, D.B.; Galera, M.M.; Vázquez, P.P.; García, M.D.G., "Simple and Rapid Determination of Benzoylphenylurea Pesticides in River Water and Vegetables by LC-ESI-MS", *Chromatographia*, 66 (2007) 533.
- 71) Carbo, L.; Souza, V.; Dores, E.F.G.C.; Ribeiro, M.L., "Determination of Pesticides Multiresidues In Shallow Groundwater in a Cotton-Growing Region of Mato Grosso, Brazil", *J. Braz. Chem. Soc.*, 19 (2008) 1111.

- 72) Gervais, G.; Brosillon, S.; Laplanche, A.; Helen, H., "Ultra-Pressure Liquid Chromatography-Eletrospray Tandem Mass Spectrometry for Multiresidue Determination of Pesticides in Water", *J. Chromatogr. A*, 1202 **(2008)** 163.
- 73) Carvalho, J.J.; Jerónimo, P.C.A.; Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F., "Evaluation of a Multiresidue Method for Measuring Fourteen Chemical Groups of Pesticides in Water by Use of LC-MS-MS", *Anal. Bioanal. Chem*, 392 **(2008)** 955.
- 74) Marín, J.M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F., "Application of Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Determination of Multi-Class Pesticides in Environmental and Wastewater Samples. Study of Matrix Effects", *J. Chromatogr. A*, 1216 **(2009)** 1410.
- 75) Liu, F.; Bischoff, G.; Pestemer, W.; Xu, W.; Kofoet, A., "Multi-Residue Analysis of Some Polar Pesticides in Water Samples with SPE and LC-MS-MS", *Chromatographia*, 63 **(2006)** 233.
- 76) Kuster, M.; Alda, M.L.; Barceló, D., "Analysis of Pesticides in Water By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Techniques", *Mass Spectrom. Rev.*, 25 **(2006)** 900.
- 77) Lanças, F. M., "Extração em Fase Sólida (SPE)", Editora Rima, São Carlos, 2004.
- 78) Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G., "Environmental and Food Applications of LC-Tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: An Overview", *Mass Spectrom. Rev.*, 23 **(2004)** 45.
- 79) Sondhia, S., "Determination of Imazosulfuron Persistence in Rice Crop and Soil", *Environ. Monit. Assess.*, 137 **(2008)** 205.
- 80) Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F., "Assessment of Pesticide Contamination in Soil Samples From an Intensive Horticulture Area, using Ultrasonic Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *Talanta*, 65 **(2005)** 1179.

- 81) Lesueur, C.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M., "Comparison of Four Extraction Methods for the Analysis of 24 pesticides in Soil Samples with Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Ion Trap-Mass Spectrometry", *Talanta*, 75 (2008) 284.
- 82) Ozcan, S.; Tor, A.; Aydin, M.E., "Application of Miniaturised Ultrasonic Extraction to the Analysis of Organochlorine Pesticides in Soil", *Anal. Chim. Acta*, 640 (2009) 52.
- 83) Castelo-Grande, T.; Augusto, P.A.; Barbosa, D., "Removal of Pesticides From Soil by Supercritical Extraction - A Preliminary Study", *Chem. Eng. J.*, 111 (2005) 167.
- 84) Goncalves, 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 (2006) 6.
- 85) Dagnac, T.; Bristeau, S.; Jeannot, R.; Mouvet, C.; Baran, N., "Determination of Chloroacetanilides, Triazines and Phenylureas and Some of Their Metabolites in Soils by Pressurized Liquid Extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS", *J. Chromatogr. A*, 1067 (2005) 225.
- 86) Chen, J.; Loo, B.; Ray, C., "Determination of Trifloxystrobin and Its Metabolites in Hawaii Soils by ASE-LC-MS/MS", *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 1829.
- 87) Pizzutti, I.R.; de Kok, A.; Zanella, R.; Adaime, M.B.; Hiemstra, M.; Wickert, 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 (2007) 123.
- 88) Hiemstra, M.; de Kok, A., "Comprehensive Multi-Residue Method for the Target Analysis of Pesticides in Crops Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 3.

- 89) Ferrer, I.; Thurman, E.M., "Multi-Residue Method for the Analysis of 101 Pesticides and Their Degradates in Food and Water Samples by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 1175 (2007) 24.
- 90) Díez, C.; Traag, W.A.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J., "Comparison of an Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" Method with Classical Multi-Residue Methods for the Extraction of Herbicide Residues in Barley Samples", *J. Chromatogr. A*, 1131 (2006) 11.
- 91) Esteve-Turrillas, F.A.; Aman, C.S.; Pastor, A.; de la Guardia, M., "Microwave-Assisted Extraction of Pyrethroid Insecticides from Soil", *Anal. Chim. Acta*, 522 (2004) 73.
- 92) Gfrerer, M.; Lankmayr, E., "Screening, Optimization and Validation of Microwave-Assisted Extraction for the Determination of Persistent Organochlorine Pesticides", *Anal. Chim. Acta*, 533 (2005) 203.
- 93) Esteve-Turrillas, F.A.; Pastor, A.; de la Guardia, M., "Comparison of Different Mass Spectrometric Detection Techniques in the Gas Chromatographic Analysis of Pyrethroid Insecticide Residues in Soil After Microwave-Assisted Extraction", *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 801.
- 94) Hernández-Soriano, M.C.; Peña, A.; Mingorance, M.D., "Response Surface Methodology for the Microwave-Assisted Extraction of Insecticides from Soil Samples", *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 619.
- 95) Fuentes, E.; Báez, M.E.; Labra, R., "Parameters Affecting Microwave-Assisted Extraction of Organophosphorus Pesticides From Agricultural Soil", *J. Chromatogr. A*, 1169 (2007) 40.
- 96) Smalling, K.L.; Kuivila, K.M., "Multi-Residue Method for the Analysis of 85 Current-Use and Legacy Pesticides in Bed and Suspended Sediments", *J. Chromatogr. A*, 1201 (2008) 8.
- 97) U.S. EPA, SW-846, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3546.pdf>, acessado em jun/2009.

- 98) Eskilsson, C.S.; Björklund, E., "Analytical-Scale Microwave-Assisted Extraction", *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 227.
- 99) Barriada-Pereira, M.; Concha-Graña, E.; González-Castro, M.J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodriguez, D.; Fernández-Fernández, E., "Microwave-Assisted Extraction Versus Soxhlet Extraction in the Analysis of 21 Organochlorine Pesticides in Plants", *J. Chromatogr. A*, 1008 (2003) 115.
- 100) Sun, L.; Lee, H.K., "Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Supercritical Fluid Extraction of Carbamate Pesticides in Soil by Experimental Design Methodology", *J. Chromatogr. A*, 1014 (2003) 165.
- 101) Sanghi, R.; Kannamkumarath, S., "Comparison of Extraction Methods by Soxhlet, Sonicator and Microwave in the Screening of Pesticide Residues From Solid Matrices", *J. Anal. Chem.*, 350 (2004) 1032.
- 102) Wang, W.; Meng, B.; Lu, X.; Liu, Y.; Tao, S., "Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Pesticides from Soils: A Comparison Between Soxhlet Extraction, Microwave-Assisted Extraction and Accelerated Solvent Extraction Techniques", *Anal. Chim. Acta*, 602 (2007) 211.
- 103) Pateiro-Moure, M.; Martínez-Carballo, E.; Arias-Estévez, M.; Simal-Gándara, J., "Determination of Quaternary Ammonium Herbicides in Soils Comparison of Digestion, Shaking and Microwave-Assisted Extractions", *J. Chromatogr. A*, 1196-1197 (2008) 110.
- 104) Ekman, R.; Silberring, J.; Westman-Brinkmalm, A.; Kraj, A., "Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation and Applications", John Wiley & Sons, New York, 2009.
- 105) Herbert, C.G.; Johnstone, R.A.W., "Mass Spectrometry Basics", CRC Press, Boca Raton, 2003.
- 106) Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", 3rd ed., Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2006.

- 107) Ardrey, R.E., "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction", John Wiley & Sons, Chichester, 2003.
- 108) Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F., "O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos", *Quím. Nova*, 31 (2008) 623.
- 109) Díaz, L.; Llorca-Pórcel, J.; Valor, I., "Ultra Trace Determination of 31 Pesticides in Water Samples by Direct Injection-Rapid Resolution Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 624 (2008) 90.
- 110) Laganà, A.; Fago, G.; Marino, A., "Simultaneous Determination of Imidazolinone Herbicides from Soil and Natural Waters Using Soil Column Extraction and Off-Line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography with UV Detection or Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 70 (1998) 121.
- 111) D'Ascenzo, G.; Gentili, A.; Marchese, S.; Perret, D., "Development of a Method Based on Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry for Analyzing Imidazolinone Herbicides in Environmental Water at Part-Per-Trillion Levels", *J. Chromatogr. A*, 800 (1998) 109.
- 112) Granby, K.; Andersen, J.H.; Christensen, H.B., "Analysis of Pesticides in Fruit, Vegetables and Cereals Using Methanolic Extraction and Detection By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 165.
- 113) Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C., "Multiresidue Analysis of 74 Pesticides in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 33.
- 114) Botitsi, H.; Economou, A.; Tsipi, D., "Development and Validation of a Multi-Residue Method for the Determination of Pesticides in Processed Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1685.

- 115) Taylor, P.J., "Matrix Effects: the Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry", *Clin. Biochem.*, 38 (2005) 328.
- 116) Niessen, W.M.A.; Manini, P.; Andreoli, R., "Matrix Effects in Quantitative Pesticide Analysis Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (2006) 881.
- 117) Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D.M.; Lu, Z.; Mazzeo, J.R., "Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses", *J. Chromatogr. B*, 852 (2007) 22.
- 118) Greulich, K.; Alder, L., "Fast Multiresidue Screening of 300 Pesticides in Water for Human Consumption by LC-MS/MS", *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 183.
- 119) Picó, Y.; Font, G.; Ruiz, M.J.; Fernández, M., "Control of Pesticide Residues by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Ensure Food Safety", *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (2006) 917.
- 120) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, LGC, Teddington, Middlesex, UK, 1998, <http://www.Eurachem.bam.de>, acessado em jun/2009.
- 121) Agência Folha, "Entenda a Polêmica Envolvendo o Embargo Chinês à Soja Brasileira", Porto Alegre, 2004, <http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u85789.shtml>, acessado em jun/2009.
- 122) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa Nº 15, de 09 de junho de 2004, Anexo: Requisitos e Procedimentos para Verificação das Condições Higiênico-Sanitárias da Soja em Grão, Brasília, 2004, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7776>, acessado em jun/2009.
- 123) Comitê Codex Alimentarius do Brasil (CCAB), <http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comite>

- s/ccab.asp, acessado em jun/2009.
- 124) The Codex Alimentarius Commission, http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp, acessado em jun/2009.
- 125) AOAC International, Peer-Verified Methods Program; Manual on Policies and Procedures, AOAC International, Washington, D.C., 1998.
- 126) AOAC International, AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002, http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf, acessado em jun/2009.
- 127) Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R., "Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, 74 (2002) 835.
- 128) ANVISA, Anexo: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003, http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, acessado em jun/2009.
- 129) Codex Alimentarius, CAC/GL, Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, 40-1993, Rev.1-2003, 2003, http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en, acessado em jun/2009.
- 130) ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>, acessado em jun/2009.
- 131) Commission of the European Communities (SANCO), 2003, Document nº SANCO/2007/3131. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Bruxelas, Bélgica, 2007, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf, acessado em jun/2009.
- 132) ANVISA, Guia para o Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os Laboratórios Integrantes do PARA, 2007,

- http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/CONTROLE_QUALIDADE.pdf, acessado em jun/2009.
- 133) INMETRO, Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - Documento de Caráter Orientativo. DOQ-CGCRE-008, Revisão 2, 2007, http://www.inmetro.gov.br/Sid_oq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf, acessado em jun/2009.
- 134) Lara, W.H.; Batista, G.C., "Pesticidas", *Quím. Nova*, 15 (1992) 161.
- 135) Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), GARP, São Paulo, 1999.
- 136) Gobo, A.B.; Kurz, M.H.S.; Pizzuti, I.R.; Adaime, M.B.; Zanella, R., "Development and Validation of Methodology for the Determination of Residues of Organophosphorus Pesticides in Tomatoes", *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004) 945.
- 137) Vigna, C.R.M.; Moraes, L.S.R.; Collins C.H.; Jardim I.C.S.F., "Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica as a Sorbent for Solid-Phase Extraction of Some Pesticides", *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 211.
- 138) Silva, D.M.L.; Camargo, P.B.; Martinelli, L.A.; Lanças, F.M.; Pinto, J.S.S.; Avelar, W.E.P., "Organochlorine Pesticides in Piracicaba River Basin (São Paulo/Brazil): A Survey of Sediment, Bivalve and Fish", *Quím. Nova*, 31 (2008) 214.
- 139) Imoto, M.N.; Freitas, R.J.S., "Determinação dos Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) em Análise de Resíduos de Pesticidas Organohalogenados por Cromatografia em Fase Gasosa", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 18 (2008) 35.
- 140) ANVISA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Gerência Geral de Toxicologia (GGTOX), Relatório de Atividades de 2001- 2007, 2008, http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2007.pdf, acessado em jun/2009.
- 141) ANVISA, Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública (GGLAS), Gerência Geral de Toxicologia (GGTOX), Planejamento Estratégico e Delineamento das Ações da

- Coordenação Técnica do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), 2006, http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/planejamento_programa_analise_residuos_agro_alimentos.pdf, acessado em jun/2009
- 142) Shabir, G.A., "Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 57.
- 143) CITAC and Eurachem, CITAC and Eurachem Guide - Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation, CITAC and Eurachem, 2002, <http://www.eurachem.org/guides/CITAC%20EURACHEM%20GUIDE.pdf>, acessado em jul/2009.
- 144) Popek, P.E., "Sampling and Analysis of Environmental Chemical Pollutants", Academic Press, San Diego, 2003.
- 145) Bliesner, D.M., "Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide", John Wiley & Sons, New York, 2006.
- 146) Huber, L., "Validation of Analytical Methods: Review and Strategy", *LC/GC International*, 11 (1998) 96
- 147) Taverniers, I; de Loose, M.; Van Bockstaele, E., "Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance", *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 535.
- 148) Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C., "Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos", *Quím. Nova*, 27 (2004) 771.
- 149) Chandran, S.; Singh, R.S.P, "Comparison of Various International Guidelines for Analytical Method Validation", *Pharmazie*, 62 (2007) 4.

- 150) Valente, A.L.P.; Augusto, F.; Riedo, C.R.F, "Métodos de Separação - Análise Quantitativa por Cromatografia", 2003, http://www.chemkeys.com/bra/md/mds/aqpc_5.htm, acessado em jul/2008.
- 151) Ribeiro, F.A.L.; Ferreira, M.M.C.; Morano, S.C.; Silva, L.R.; Schneider, R.P., "Planilha de Validação: Uma Nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados", *Quim. Nova*, 31 (2008) 164.
- 152) Konieczka, P., "The Role and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 37 (2007) 173.
- 153) EU. Commission Directive 2002/657/EC Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, *Off. J. Eur. Communities*, L221 (2002) 8.
- 154) Careri, M.; Mangia, A., "Validation and Qualification: The Fitness for Purpose or Mass Spectrometry-Based Analytical Methods and Analytical Systems, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 38.
- 155) http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em jun/2009.
- 156) http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp, acessado em jun/2009.
- 157) <http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea/defensivos.aspx>, acessado em jul/2009.
- 158) Larini, L, "Toxicologia dos Praguicidas", Editora Manole Ltda, São Paulo, 1999.
- 159) Tomlin, C.D.S., "The e-Pesticide Manual", 20th ed., British Crop Protection Council, Londres, 2001.
- 160) Hornsby, A.G.; Wauchope, R.D.; Herner, A.E., "Pesticide Properties in the Environment", Springer, Netherlands, 1996.
- 161) Wauchope, R.D.; Buttler, T.M.; Hornsby, A.G.; Augustijn-Beckers, P.W.; Burt, J.P., "The SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision-Making", *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 123 (1992) 1.

- 162) OECD, "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Adsorption/Desorption using a Batch Equilibrium Method OECD Test Guideline", OECD Publications, Paris, Vol. 106, 2000, <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9710601E.PDF>, acessado em agosto/2009.
- 163) Banerjee, K.; Oulkar, D.P.; Patil, S.H.; Dasgupta, S.; Nikam, A.T.; Adsule, P.G., "Sorption Behaviour of Forchlorfenuron in Soil", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 80 (2008) 201.
- 164) Dores, E.F.G.C.; Spadotto, C.A.; Weber, O.L.S.; Carbo, L.; Vecchiato, A.B.; Pinto, A.A., "Environmental Behaviour of Metolachlor and Diuron in a Tropical Soil in the Central Region of Brazil", *Water Air Soil Pollut.*, 197 (2009) 175.
- 165) Oliveira Jr., R.S.; Koskinen, W.C.; Ferreira, F.A., "Sorption and Leaching Potencial of Herbicides on Brazilian Soils", *Weed Res.*, 41 (2001) 97.
- 166) Barizon, R.R.M.; Lavorenti, A.; Regitano, J.B.; Tornisielo, V.L., "Sorção e Dessorção do Imazaquin em Solos com Diferentes Características Granulométricas, Químicas e Mineralógicas", *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 29 (2005) 695.
- 167) Weber, J.B.; McKinnon, E.J.; Swain, L.R., "Sorption and Mobility of ^{14}C -Labeled Imazaquin and Metolachlor in Four Soils As Influenced by Soil Properties", *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 5752.