



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS – EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TECNOLÓGICA E AMBIENTAL – PPGQTA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
EMPREGANDO DLLME E DLLME-SFO PARA A
EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS
MULTICLASSE EM ÁGUA MINERAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cátia Marian Bolzan

**Rio Grande - RS, Brasil
2014**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
EMPREGANDO DLLME E DLLME-SFO PARA A
EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS
MULTICLASSE EM ÁGUA MINERAL**

por

Cátia Marian Bolzan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa
Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da
Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

**Rio Grande, RS, Brasil
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQTA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
EMPREGANDO DLLME E DLLME-SFO PARA A
EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS
MULTICLASSE EM ÁGUA MINERAL**

elaborada por
Cátia Marian Bolzan

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
(Orientador - Presidente)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Daiane Dias (FURG)

Rio Grande, 07 de março de 2014

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço **a Deus**, pela vida, pelas oportunidades em meu caminho, pela coragem para vencer os obstáculos e por me dar forças para conseguir realizar os meus objetivos.

Ao meu marido **Ismael**, por ser tão importante na minha vida e por estar sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Devido ao seu companheirismo em todas as horas, a sua compreensão em todos os momentos e dificuldades, a sua paciência, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Ismael, te amo.

Aos meus pais, **Dário e Velci**, por me proporcionarem amor, apoio, educação, por acreditarem em mim e suportarem a saudade e a distância, por sacrificarem os seus sonhos em favor dos meus. Pai e mãe, obrigada por tudo, amo vocês.

Ao meu irmão **Ronaldo**, pelo seu apoio incondicional, sempre me incentivando a seguir em frente sem desistir dos meus sonhos. Obrigada mano.

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela oportunidade, incentivo e conhecimento compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Osmar Damian Prestes** pela disposição, participação na defesa da dissertação e pelas valiosas sugestões para o final deste estudo.

À **Profª. Drª. Daiane Dias** pela participação no exame de qualificação e na defesa da dissertação e pelas contribuições para o final deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Rodolfo Carapelli** pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões para a conclusão deste estudo.

Aos colegas do **LACOM**, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao **Bruno Guimarães** pelos ensinamentos com relação ao planejamento fatorial utilizado neste estudo.

À **FURG** pela oportunidade e principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

À **FAPERGS** por me oportunizar a bolsa de estudo!

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica, proporcionando-me esta realização e formação com qualidade.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO DLLME E
DLLME-SFO PARA A EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS
MULTICLASSE EM ÁGUA MINERAL
AUTORA: CÁTIA MARIAN BOLZAN
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL
Rio Grande, 07 de março de 2014

O Rio Grande Sul destaca-se no cenário nacional como grande produtor de diversas culturas, as quais demandam grande quantidade de agrotóxicos das mais diversas classes químicas e toxicidades. No entanto a intensa utilização destes compostos torna-se uma preocupação devido a possíveis contaminações das águas superficiais e subterrâneas. Em virtude da degradação dos mananciais a água mineral passou a ser uma das fontes mais utilizadas para o consumo humano, pois tem-se a percepção de que a mesma possui melhor qualidade que a água tratada, além disso acredita-se que a mesma esta isenta de substâncias orgânicas prejudiciais à saúde humana. Neste trabalho, foi realizada a determinação dos agrotóxicos atrazina, simazina, imazapir, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol e epoxiconazol em água mineral empregando a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFO) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série com fonte de ionização por Eletrobulização (LC-ESI-MS/MS). Para o método empregando DLLME e LC-ESI-MS/MS foram otimizados alguns fatores como o tipo e volume de solvente extrator e dispersor e pH. Após a otimização dos parâmetros de extração, fragmentação dos compostos e separação cromatográfica, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,999. Os Limites de Quantificação (LOQs) para o método estiveram na faixa de 5 a 500 ng L⁻¹. Foram obtidas recuperações entre 102 - 120% para a repetibilidade e entre 92 e 110% para a precisão intermediária, com RSD de 2 a 10% para todos os compostos. Para o método empregando DLLME-SFO e LC-ESI-MS/MS foram avaliados alguns parâmetros que afetam a eficiência da extração como, tipo e volume de solvente extrator e dispersor, força iônica e pH. Nas condições ótimas de extração todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,997. Os LOQs para o método variaram entre 12,5 - 125 ng L⁻¹. As recuperações foram entre 70 e 118% para a repetitividade e entre 76 e 95% para a precisão intermediária, com RSD de 2 a 18% para todos os compostos. Com relação ao Efeito Matriz (EM) avaliado para todos os compostos pelos dois métodos, foi observado baixo EM. Isso indicou que não é necessário utilizar a curva analítica preparada no extrato branco da matriz para a quantificação destes analitos. Ambos os métodos foram aplicados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água mineral provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul e não foram encontrados resíduos de agrotóxicos nas amostras analisadas. Os métodos validados apresentaram como principais vantagens baixo consumo de solventes orgânicos e amostra, rapidez, altos fatores de concentração e recuperações dentro da faixa aceitável. Os limites de quantificação dos métodos ficaram abaixo dos limites máximos de resíduos permitidos pela legislação brasileira para agrotóxicos em água mineral.

Palavras-chave: agrotóxicos, água mineral, microextração líquido - líquido, LC-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHODS EMPLOYING DLLME AND
DLLME-SFO FOR SIMULTANEOUS EXTRACTION OF PESTICIDES

MULTICLASS IN MINERAL WATER

AUTHOR: CÁTIA MARIAN BOLZAN

ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.

March 07th, 2014, Rio Grande, RS, Brazil

The Rio Grande do Sul stands out on the national scene as a major producer of several crops, which demand large quantities of pesticides from different chemical classes and toxicities. However the intense use of these compounds becomes a concern due to potential contamination of surface water and groundwater. Due of the degradation of the springs the mineral water has become one of the most used sources for human consumption, because there is the perception that it has better quality than that treated water, moreover it is believed that it is exempt of organic substances harmful to human health. This study was performed to determine the pesticides atrazine, simazine, imazapic, imazethapyr, imidacloprid, cyproconazole, tebuconazole and epoxiconazole in mineral water employing the Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME), Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Solidification of a Floating Organic Drop (DLLME-SFO) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in sequential with Electrospray Ionization source (LC-ESI-MS/MS). For DLLME and LC-ESI-MS/MS such factors as the type and volume of extraction solvent and disperser and pH were optimized. After optimization of the parameters extraction, fragmentation of the compounds and chromatographic separation, the method was validated by evaluating analytical curve, linearity, limits of detection and quantification, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy (recovery). All calibration curves showed r values greater than 0.999. The LOQs for the method was in the range 5-500 ng L⁻¹. The recoveries ranged between 102 - 120% for repeatability and between 92 and 110% for intermediate precision with RSD from 2 to 10% for all compounds. For the method using DLLME-SFO and LC-ESI-MS/MS some parameters that affect the extraction efficiency as the type and volume of extraction solvent and disperser, ionic strength and pH were evaluated. All calibration curves showed r values greater than 0.997. The LOQs for the method was in the range 12.5 - 125 ng L⁻¹. The recoveries ranged between 70 and 118% for repeatability and between 76 and 95% for intermediate precision with RSD from 2 to 18% for all compounds. Regarding the Matrix Effect (EME) for all compounds evaluated by two methods, low ME was observed. This indicated that it is not necessary to use matrix-matched calibration standards for the quantification of these analytes. Both methods were applied for the determination of pesticide residues in mineral water samples from different regions of the Rio Grande do Sul state and pesticide residues were not detected in the analyzed samples. Validated methods presented as main advantages low consumption of organic solvents and sample, speed, high pre-concentration factors and recoveries within the acceptable range. The limits of quantification of the methods were below the maximum residue levels allowed by Brazilian legislation for pesticides in mineral water.

Keywords: pesticides, mineral water, liquid-liquid microextraction, LC-ESI-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento DLLME para a concentração dos agrotóxicos	50
Figura 2. Procedimento DLLME-SFO para a concentração dos agrotóxicos.....	54
Figura 3. Cromatograma total da separação dos analitos por LC-ESI-MS/MS.....	63
Figura 4. Cromatograma no modo MRM da transição monitorada para a quantificação.....	65
Figura 5. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetoneitrila com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%).....	66
Figura 6. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetona com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%).....	66
Figura 7: efeito da mistura de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetoneitrila com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%)..	67
Figura 8. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando o metanol com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%).....	70
Figura 9. Efeito de diferentes proporções de solventes extratores e dispersores na recuperação dos analitos. Barras de erros indicam valores de RSD (%).....	70
Figura 10. Superfície de contorno que representam a extração do imazapique (a) e imazetapir (b)	74
Figura 11. Seleção do solvente extrator e dispersor. Barras de erros indicam, valores de RSD(%).....	80
Figura 12. Superfícies de contorno que representam a extração de atrazina (a) e simazina (b).....	86
Figura 13. Efeito de matriz para o método da DLLME.....	94
Figura 14. Efeito matriz para o método da DLLME-SFO.....	94
Figura 15. Recuperação dos analitos pela DLLME na água gaseificada e não gaseificada. Barras de erros indicam valores de RSD(%).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das águas minerais.....	21
Tabela 2: Agrotóxicos estudados que possuem registro na legislação brasileira.....	22
Tabela 3. Grupo químico, classe, classificação toxicológica e culturas em que são empregados os agrotóxicos em estudo.....	45
Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados.....	46
Tabela 5. Propriedades físicas dos solventes extratores.....	51
Tabela 6. variáveis e níveis avaliados no DCCR para otimização da extração de agrotóxicos por DLLME.....	52
Tabela 7. Propriedades dos solventes.....	55
Tabela 8. Variáveis e seus respectivos níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	55
Tabela 9. Variáveis e seus respectivos níveis avaliados no DCCR.....	56
Tabela 10. Modo gradiente otimizado para a separação por LC-ESI-MS/MS.....	62
Tabela 11. Condições de fragmentação para determinação dos analitos no espectrômetro de massas e tempo de retenção (t_R).....	64
Tabela 12. Teste de Tukey para a seleção do solvente extrator.....	68
Tabela 13. Teste de Tukey para a seleção de diferentes proporções de solvente extrator e dispersor.....	71
Tabela 14. matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com os resultados em área do pico para os analitos em estudo.....	72
Tabela 15. efeitos estimados das variáveis independentes na extração dos analitos.....	75
Tabela 16. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.....	77
Tabela 17. Valores em área do pico preditos pelos modelos e os desvios relativos para cada analito.....	78
Tabela 18. Teste de Tukey para a seleção do solvente extrator e dispersor.....	81
Tabela 19. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com os resultados em área do pico para os analitos em estudo.....	82
Tabela 20. Efeitos estimados das variáveis independentes na extração dos agrotóxicos.....	82
Tabela 21. Matriz do DCCR, com as áreas do pico obtidas para cada analito em estudo.....	84
Tabela 22. Efeitos estimados das variáveis independentes na extração dos analitos.....	85
Tabela 23. Parâmetros de ANOVA no modo MS residual.....	86
Tabela 24. Valores em área do pico preditos pelos modelos e os desvios relativos para cada analito.....	86
Tabela 25. Limites detecção e quantificação instrumental ($\mu\text{g L}^{-1}$) e dos métodos (ng L^{-1}).....	88
Tabela 26. Resultados obtidos para as curvas analíticas.....	89
Tabela 27. Resultados obtidos para a curvas no extrato e curva trabalho para a DLLME.....	89
Tabela 28. Resultados obtidos para as curvas no extrato e curva trabalho para a DLLME-SFO.....	90

Tabela 29. Nível de fortificação, recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para cada analito.....	91
Tabela 30. Nível de fortificação, recuperação (R%) e precisão intermediária ($RSD_{pi}\%$) para os analitos.....	93
Tabela 31. Principais diferenças entre os métodos.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DLLME-SFO - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of a floating organic drop*

EM - Efeito matriz

ESI - Ionização por Eletronebulização, do inglês *Eletronebulização Ionization*

ESI+ – Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês *Eletronebulização Ionization Positive Mode*

eV - elétron-Volt

FM - fase móvel

FPD - Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron-Capture Detection*

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_{OC} - Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

K_{OW} - Coeficiente de partição octanol-água

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-ESI-MS/MS – Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Eletronebulização acoplada à Espectrometria de Massas *em série*, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Eletronebulização Ionization with tandem Mass Spectrometry*

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LPMs – Limites máximos permitidos

m/z - Razão massa-por-carga

MM – Massa Molar

MRM - Monitoramento de Múltiplas Reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

p.a. - grau pró-análise

pH - potencial hidrogeniônico

pKa - potencial de dissociação ácida

r - Coeficiente de correlação linear

R – Recuperação

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada (legislação)

RE - Resolução (legislação)

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

t_R - tempo de retenção

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
2.	Objetivos.....	17
3.	Revisão Bibliográfica	18
3.1	Água mineral	18
3.1.1	Classificação das Águas Minerais	20
3.1.2	Legislação para agrotóxicos em água mineral	21
3.2	Agrotóxicos.....	21
3.2.1	Destino dos agrotóxicos no ambiente.....	23
3.3	Técnicas de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em águas	24
3.3.1	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva	25
3.3.1.2	Aplicações da DLLME.....	27
3.3.2	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante	29
3.3.2.1	Aplicações da DLLME-SFO	31
3.4	Técnica cromatográfica para a determinação de resíduos de agrotóxicos.....	32
3.4.1	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	33
3.4.1.1	Efeito de Matriz em LC-MS.....	35
3.5	Validação de métodos cromatográficos.....	36
3.5.1	Curva analítica e linearidade.....	36
3.5.2	Limite de Detecção e de Quantificação.....	37
3.5.3	Precisão.....	37
3.5.4	Exatidão.....	38
3.6	Planejamentos Experimentais	39
4.	Materiais e Métodos	41
4.1.1	Instrumentação.....	41
4.2	Reagentes, solventes e materiais.....	42
4.3	Seleção dos agrotóxicos para estudo.....	42
4.4	Preparo das soluções analíticas.....	45
4.5	Amostras de água mineral.....	45
4.6	Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS	46
4.6.1	Preparo da fase móvel	46
4.6.2	Escolha da composição da fase móvel e do modo de eluição.....	46
4.6.3	Escolha da vazão da fase móvel.....	47
4.6.4	Otimização dos parâmetros para a fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas	47
4.7	Preparo da amostra.....	47
4.7.1	Otimização do preparo de amostra por DLLME	48
4.7.1.1	Seleção do solvente extrator	49
4.7.1.2	Seleção do solvente dispersor.....	50
4.7.1.3	Delineamento Composto Central Rotacional 2 ³	50
4.7.2.1	Otimização do preparo de amostra por DLLME-SFO	52

4.7.2.2	Seleção do solvente extrator	53
4.7.2.3	Seleção do solvente dispersor	54
4.7.2.4	Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	54
4.7.2.5	Delineamento composto central rotacional 2^2	55
4.8	Validação dos métodos	55
4.8.1	Limite de detecção e quantificação	56
4.8.2	Curva analítica, curva trabalho e linearidade	56
4.8.3	Exatidão	58
4.8.4	Precisão	58
4.8.5	Efeito de matriz	59
4.9	Aplicabilidade	60
5	Resultados e Discussões	61
5.1	Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS	61
5.1.1	Otimização das condições cromatográficas	61
5.1.2	Otimização dos parâmetros para a fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas	62
5.2	Otimização do preparo de amostra por DLLME	64
5.2.1	Seleção do solvente extrator	64
5.2.2	Seleção do solvente dispersor	68
5.2.3	Delineamento Composto Central Rotacional 2^3	70
5.2.4	Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME	78
5.3	Otimização do preparo de amostra por DLLME-SFO	79
5.3.1	Seleção do solvente extrator e do solvente dispersor	79
5.3.2	Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	80
5.3.3	Delineamento Composto Central Rotacional 2^2	82
5.3.4	Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME-SFO	86
5.4	Validação dos métodos	86
5.4.1	Limite de Detecção e de Quantificação	86
5.4.2	Curva analítica, curva trabalho e linearidade	88
5.4.3	Exatidão (Recuperação)	89
5.4.4	Precisão	91
5.4.5	Efeito de Matriz	92
5.4.6	Aplicabilidade dos métodos	94
5.4.7	Resultados da comparação entre a extração na água mineral não gaseificada e gaseificada por DLLME	94
5.4.8	Comparação entre os métodos da DLLME e DLLME-SFO	95
6	Conclusões	98
7	Referências Bibliográficas	100

1. Introdução

A água é um dos recursos naturais mais utilizados, sendo de fundamental importância para a existência e manutenção da vida, por isso, deve estar presente no ambiente em qualidade e quantidade apropriada. A qualidade da água tem sido afetada por diversos tipos de poluentes, e a poluição decorrente do desenvolvimento da agricultura tem afetado de forma significativa os recursos naturais, principalmente através da aplicação dos agrotóxicos. Porém os agrotóxicos desempenham papel fundamental para a obtenção de altas produtividades agrícolas, pois tem por finalidade o controle das pragas que atacam a agricultura e prejudicam as culturas (SANCHES *et al.*, 2003).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil destaca-se no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, sendo responsável por 86% do consumo na América Latina (IBGE, 2010), e de acordo com os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), no ano de 2011 o consumo médio de ingrediente ativo/hectare foi em torno de 10 kg. As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste caracterizam-se como as maiores consumidoras do país. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) o Rio Grande Sul destaca-se no cenário nacional como grande produtor de diversas culturas, as quais demandam grande quantidade de agrotóxicos das mais diversas classes químicas e toxicidades tornando o estado responsável por 15% do consumo total do país (SINDAG, 2011).

Estes agrotóxicos são aplicados diretamente no solo ou pulverizados sobre as plantações, sendo, portanto, liberados diretamente no meio ambiente. De acordo com as suas propriedades físico-químicas os compostos de alta solubilidade em água, baixo valor do coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo (K_{oc}) e elevado tempo de meia vida apresentam tendência de serem lixiviados podendo atingir as águas subterrâneas como é o caso da água mineral e conseqüentemente alterar a sua qualidade (ANDREU *et al.*, 2004). Em virtude da degradação dos mananciais de água superficial, a água mineral passou a ser uma das fontes de água mais utilizadas para o consumo humano, uma vez que se tem a percepção de qualidade em sua composição.

Com base nisso a legislação brasileira regulamenta o controle da qualidade da água mineral através da RDC nº, 274, de 22 de Setembro de 2005 da ANVISA, a qual estabelece os limites máximos permitidos (LMPs) de resíduos de agrotóxicos na água mineral. Devido aos padrões de pureza estabelecidos pela ANVISA, o meio científico, em especial a Química Analítica, vem se empenhando muito para desenvolver métodos e instrumentação analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas, a fim de atender as normas de controle vigente, que são de extrema importância para monitorar a possível contaminação ao meio ambiente e conseqüentemente na saúde humana (Demoliner, 2008).

Nesse sentido as principais técnicas empregadas para analisar resíduos de agrotóxicos em água são a Cromatografia Líquida (LC) e a Cromatografia Gasosa (GC). Estas técnicas cromatográficas podem ser acopladas a diversos detectores. Atualmente, devido as suas vantagens, o Espectrômetro de Massas (MS) tem sido o mais utilizado. Na etapa de preparo de amostra visando análise de resíduos de agrotóxicos em água destaca-se a técnica de extração em fase sólida. Por outro lado, as técnicas de microextração vem ganhando espaço, e entre elas podemos citar a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFO).

A inexistência de dados em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos em águas minerais no estado do Rio Grande do Sul justifica a importância científica deste trabalho. Além disso, o mesmo contribuirá para a geração de um panorama atual da situação em termos de contaminação das fontes de águas minerais por resíduos de agrotóxico no estado como forma de proteção à saúde da população usuária. Portanto este estudo visa o desenvolvimento de métodos que permitam a extração, detecção e quantificação de agrotóxicos em amostras de águas minerais dando subsídios para que os órgãos de fiscalização possam tomar as decisões cabíveis caso ocorram excessos dos resíduos com relação aos limites máximos permitidos. Além disso, fazer com que sejam estabelecidos limites para aqueles contaminantes presentes que ainda não tenham seus limites estabelecidos pela ANVISA, resultando num avanço enorme no sentido de preservação da saúde da comunidade.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar métodos para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos em água mineral empregando a DLLME, DLLME-SFO e LC-ESI-MS/MS dando maior ênfase ao preparo da amostra, através da otimização das técnicas de preparo de amostra DLLME e DLLME-SFO.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Selecionar os principais agrotóxicos empregados nas culturas agrícolas praticadas nos municípios onde estão situadas as fontes de água minerais;
- ❖ Otimizar os parâmetros instrumentais do LC-ESI-MS/MS como por exemplo, energia do cone, energia de colisão, temperatura da fonte, fluxo do gás de dessolvatação, vazão da fase móvel, coluna cromatográfica e separação cromatográfica para determinação dos compostos em estudo;
- ❖ Otimizar os principais parâmetros que afetam a eficiência da extração por DLLME e DLLME-SFO;
- ❖ Validar os métodos avaliando a curva analítica, linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz;
- ❖ Fazer um comparativo entre o método da DLLME e a DLLME-SFO;
- ❖ Fazer um comparativo entre a extração na água mineral gaseificada e não gaseificada;
- ❖ Demonstrar a aplicabilidade do método para diferentes amostras de água mineral empregando DLLME, DLLME-SFO e LC-ESI-MS/MS.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Água mineral

A água é um recurso natural intensamente explorado pelo homem e nas últimas décadas a sua disponibilidade para o consumo humano encontra-se limitada por diversos fatores. Entre estes estão a escassez natural e a contaminação biológica e físico-química provenientes de atividades antrópicas como o destino final do esgoto doméstico e industrial, disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos e industriais e a modernização da agricultura. Tais fontes de contaminação podem levar à presença na água, de bactérias patogênicas, vírus, parasitas, substâncias orgânicas e inorgânicas prejudiciais à saúde humana. Com a dúvida sobre a qualidade da água de abastecimento público, a população passou a utilizar a água mineral com maior intensidade, pois tem-se a percepção de que a mesma possui melhor qualidade e é mais segura sob o ponto de vista físico-químico e microbiológico que a água tratada (FARD, 2007).

Para a água ser considerada mineral, ela deve percorrer o subsolo e preencher os poros ou vazios intergranulares das rochas sedimentares, ou as fraturas, falhas e fissuras das rochas compactas e ser enriquecida com minerais através do contato com as rochas (PETRACCIA *et al.*, 2005). No entanto, a composição química da água varia de acordo com as rochas e terrenos pelos quais a mesma passou enquanto infiltrava-se no solo (MORGANO *et al.*, 2002).

De acordo com o Código de Águas Minerais (Decreto-Lei nº 7.841, de 08/08/1945) as águas minerais são definidas como: “aquelas provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas que possuam composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns, com características que lhes confirmam uma ação medicamentosa”. A água mineral é caracterizada por apresentar propriedades medicinais porque os sais que são incorporados durante o processo de infiltração no subsolo podem trazer benefícios para o tratamento de determinados problemas de saúde, dentre os quais pode-se citar como exemplo: o magnésio, o qual previne a hipertensão, o bicarbonato, que controla a acidez do estômago e o cálcio o qual previne a osteoporose. Além disso, a água mineral apresenta algumas

propriedades que tornam o seu uso mais vantajoso em relação às águas superficiais, pois é filtrada e purificada naturalmente através da percolação, resultando em um produto de excelente qualidade, dispensando tratamentos prévios (FARD, 2007, BORGHETTI *et al.*, 2004).

Para a água ser classificada como água mineral natural e comercializada (envasada) em embalagens próprias, deve preencher os seguintes critérios: ser potável, isso significa que a água não pode ter qualquer vestígio de poluição orgânica (presença de coliformes); apresentar aspecto límpido e sem odor e os elementos da sua composição não podem exceder aos valores máximos determinados pela legislação brasileira (BARRETO, 2011).

A RDC nº173 de 13 de setembro de 2006, dispõe sobre as boas práticas para industrialização e comercialização de água mineral natural e estabelece que as indústrias envasadoras devem adotar medidas a fim de garantir a qualidade sanitária da água mineral, de forma que a mesma não apresente perigo à saúde da população consumidora. Assim sendo, práticas rigorosas de higiene devem ser seguidas para que não ocorra contaminação microbiológica na fonte de água mineral ou durante o processo de industrialização. Desta forma a água mineral deve ser coletada sob condições que garantam a manutenção das características originais da água emergente da fonte. Essas características devem permanecer estáveis dentro dos limites naturais de flutuação, não devendo apresentar influência direta de águas superficiais. Além disso, o Código de Águas Minerais, Decreto-Lei nº 7.841, proíbe a utilização de processos que alterem as características originais da fonte de água mineral, e por isso não é permitido a utilização de tratamento para diminuir a carga microbiana ou alterar a composição físico-química da água mineral.

Nos últimos anos, a preocupação com a qualidade da água tratada decorrente da poluição progressiva, das incertezas relacionadas à qualidade desta e o sabor e odores desagradáveis causados pela adição de cloro nas águas de abastecimento público tem provocado um aumento significativo na demanda por água mineral em todos os países (DIAS, 2008).

3.1.1 Classificação das Águas Minerais

No Brasil a legislação que regulamenta a qualidade da água mineral é o Código de Águas Minerais, Decreto-Lei nº 7.841 que dispõe sobre a composição química e as propriedades físico-químicas que a água mineral deve apresentar e a RDC nº 54, de 15 de junho de 2000, da ANVISA que estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral. De acordo com estas legislações a classificação da água mineral é feita de acordo com as características químicas e físico-químicas relativas às fontes, com relação ao elemento químico predominante conforme está especificado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das águas minerais

Classificação	Caracterização
Alcalino-Bicarbonatadas	Contêm compostos alcalinos, equivalentes no mínimo a 0,2 g L ⁻¹ de bicarbonato de sódio.
Alcalino-Terrosas Cálcicas	Contêm no mínimo 0,048 g L ⁻¹ de Ca ²⁺ , sob forma de bicarbonato de cálcio.
Alcalino-Terrosas Magnésianas	Contêm no mínimo 0,030 g L ⁻¹ do cátion Mg ²⁺ , sob a forma de bicarbonato de magnésio.
Carbogasosas	Contêm 200 mL L ⁻¹ de gás carbônico livre dissolvido a 20 °C e 760 mm de Hg de pressão.
Cloretadas	Contêm no mínimo 0,5 g L ⁻¹ de NaCl.
Ferruginosas	Contêm no mínimo 0,005 g L ⁻¹ de Fe ²⁺ .
Nitratadas	Contêm no mínimo 0,1 g L ⁻¹ do ânion NO ₃ ²⁻ de origem mineral
Radíferas	Contêm substâncias radioativas dissolvidas que lhes atribuem radioatividade permanente
Fracamente Radioativa	Contêm no mínimo um teor em radônio compreendido entre 5 e 10 unidades Mache por litro, a 20 °C e 760 mm de Hg de pressão
Radioativas	Contêm um teor em radônio compreendido entre 10 e 50 unidades Mache por litro, a 20 °C e 760 mm de Hg de pressão
Fortemente Radioativas	Contêm um teor em radônio superior a 50 unidades Mache por litro, a 20 °C e 760 mm de Hg de pressão
Sulfatadas	Contêm no mínimo 0,1 g L ⁻¹ do anion SO ₄ ²⁻ , combinado aos cátions Na ²⁺ , K ²⁺ e Mg ²⁺
Toriativas	Contêm um teor de torônio em dissolução equivalente em unidades eletrostáticas a 2 unidades Mache por litro

Com relação à temperatura, as fontes são classificadas como frias quando a temperatura for inferior a 25 °C, hipotermiais quando sua temperatura estiver compreendida entre 25 °C e 33 °C, mesotermiais quando sua temperatura estiver compreendida entre 33 °C e 36 °C e hipertermiais quando

sua temperatura for superior a 38 °C (RDC nº 54 de 15 de junho de 2000, da ANVISA).

3.1.2 Legislação para agrotóxicos em água mineral

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta principalmente quando a água é utilizada para consumo humano. Por isso no Brasil a RDC nº 274, de 22 de Setembro de 2005 da ANVISA estabelece limites máximos permitidos de resíduos de agrotóxicos na água mineral. Dentre os oito compostos estudados, somente dois possuem registro na legislação brasileira (Tabela 2).

Tabela 2. Agrotóxicos estudados que possuem registro na legislação brasileira.

Composto	Nível máximo permitido pela RDC nº 274 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Atrazina	2
Simazina	2

Fonte: BRASIL, 2005.

Já a legislação da Comunidade Européia (DIRECTIVE 98/83/EC) estabelece que a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico em águas destinadas para o consumo humano é $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e o somatório das concentrações de todos os agrotóxicos incluindo os produtos de degradação não deve ultrapassar de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (SLOBODNÍK *et al.*, 1997).

3.2 Agrotóxicos

O aumento da população mundial e a necessidade de elevar a produção de alimentos revolucionaram as técnicas utilizadas na agricultura. Uma das mais importantes mudanças que ocorreram na forma e nos meios de produção agrícola foi a utilização de agrotóxicos, produtos estes utilizados para o controle de insetos, doenças e plantas invasoras que prejudicam o

desenvolvimento das culturas (COUTINHO *et al.*, 2005). De acordo com a legislação brasileira, através do decreto nº 4.074, que regulamenta a lei 7802/1989, os agrotóxicos são definidos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos usados comercialmente são compostos orgânicos sintéticos com baixa massa molecular, geralmente com baixa solubilidade em água e alta atividade biológica (SILVA e FAY, 2004). Do ponto de vista ambiental, o melhor sistema de classificação para os agrotóxicos é aquele baseado no mecanismo de ação. O conhecimento dos mecanismos de ação permitirá uma melhor previsão do que pode acontecer para organismos não alvos, assim também como verificar o comportamento do agrotóxico no ecossistema (DEMOLINER, 2008).

Desde 2008, o Brasil destaca-se como o maior consumidor mundial, cujos compostos mais utilizados são os herbicidas 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29%. Além disso, no ano de 2011 foram utilizadas 826,7 mil toneladas de agrotóxicos para uma área plantada de 71 milhões de hectares (SINDAG, 2011).

No meio ambiente, o uso de agrotóxicos destinados ao controle de pragas na agricultura deve ser moderado e aplicado com alguns cuidados, caso contrário, pode causar a contaminação e até a desertificação do solo. O uso intenso de agrotóxicos pode causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos (JARDIM *et al.*, 2009).

3.2.1 Destino dos agrotóxicos no ambiente

Quando introduzidos no ambiente, cerca de 55% do total de agrotóxicos aplicados não atingem o alvo, dispersando-se para outros compartimentos ambientais como água, solo e atmosfera. Após atingirem o solo, vários processos físicos, químicos e biológicos determinam seu comportamento. A dinâmica dos agrotóxicos é governada pelo processo de adsorção, o qual é responsável pela ligação desses às partículas do solo, influenciando na disponibilidade para os demais processos como a transformação, degradação e transporte, seja por volatilização, lixiviação e/ou por escoamento superficial (MARTINI *et al.*, 2012).

Considerando os processos de transporte entre compartimentos ambientais, a lixiviação e o escoamento superficial merecem destaque. O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais, através do transporte do agrotóxico adsorvido às partículas do solo erodido ou dissolvido em água. A lixiviação dos agrotóxicos através do perfil do solo tende a resultar em contaminação das águas subterrâneas, e, nesse caso, as substâncias químicas são carregadas em solução juntamente com a água que alimenta os aquíferos (MARTINI *et al.*, 2012).

As propriedades físico-químicas que definem a tendência dos agrotóxicos de sofrer lixiviação no meio ambiente são a solubilidade em água, coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo (K_{oc}), e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no solo e na água.

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do agrotóxico em ser lixiviado superficialmente no solo atingindo águas superficiais (SILVA, 2004).

Com o coeficiente de adsorção é possível prever a tendência do agrotóxico a ficar adsorvido na matéria orgânica no solo. Moléculas altamente solúveis tendem a apresentar valores de K_{oc} relativamente baixos (menores que $150 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), podendo ser mais rapidamente biodegradáveis no solo e na água (BARCELÓ, 2006).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos (SILVA, 2004).

De modo geral os agrotóxicos que apresentam alta solubilidade em água, baixo valor de K_{oc} , elevado tempo de meia vida apresentam tendência de serem lixiviados como mencionado anteriormente. No entanto o potencial de lixiviação dos agrotóxicos no meio ambiente pode ser calculado através do índice de GUS, conforme esta descrito na equação 1 (MARTINI *et al.*, 2012).

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

Onde:

$t_{1/2}$: corresponde à meia vida em campo

K_{oc} : o coeficiente de partição com o carbono orgânico do solo.

O resultado desse cálculo possibilita classificar os agrotóxicos em três categorias, aqueles que não sofrem lixiviação (IL) $GUS < 1,8$; compostos que se encontram na faixa de transição (TL) $1,8 < GUS < 2,8$ e compostos provavelmente lixiviados (PL) $GUS > 2,8$ (MARTINI *et al.*, 2012).

Os efeitos causados no meio ambiente pelos agrotóxicos dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) outrossim, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do agrotóxico no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004).

3.3 Técnicas de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em águas

Uma das operações preliminares de uma análise química consiste em submeter uma alíquota representativa da amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subsequentes de análise. Esses procedimentos dependem da natureza da amostra, dos analitos a serem

determinados e suas concentrações, do método de análise e da precisão e exatidão desejada (RODRIGUES *et al.*, 2010). Dentre todas as operações analíticas, a etapa de preparo de amostra é a mais crítica. Em geral, é nessa etapa que se cometem mais erros e que se consome mais tempo. Idealmente, um procedimento de preparo de amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de solventes orgânicos e de amostra, apresentar maior seletividade na extração e produzir resultados precisos e exatos, além disso, esta etapa deve permitir a eliminação de possíveis interferentes e garantir a inexistência de perdas dos compostos e contaminações durante as extrações (FARAJZADEH *et al.*, 2012).

A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de águas apresenta as dificuldades inerentes a todas as determinações analíticas devido às baixas concentrações dos analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) e as amostras serem bastante complexas. Uma possível estratégia para realizar as determinações em baixas concentrações é a utilização de métodos de extração que permitam um alto fator de concentração. Neste sentido as técnicas de microextração como a e micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a micro-extração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) tem atraído muita atenção porque além de proporcionar altos fatores de concentração apresentam vantagens em relação a métodos convencionais de extração. Entre estas podem-se citar a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação e compatibilidade com as técnicas analíticas como LC-MS (CALDAS *et al.*, 2010) e GC-MS (NAGARAJU *et al.*, 2007, RAVELO-PÉREZ *et al.*, 2009).

3.3.1 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

O princípio da DLLME baseia-se na adição rápida de uma mistura apropriada do solvente extrator e do solvente dispersor na amostra aquosa, a qual contém os analitos de interesse, por meio de uma seringa adequada, ocasionando uma vigorosa turbulência na mistura e proporcionando a formação de uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator. Devido a esta grande área superficial o equilíbrio é atingido rapidamente e a

extração é independente do tempo, sendo esta a principal vantagem do método. Após leve agitação, uma solução turva com microgotas é formada e os analitos são pré-concentrados no solvente extrator, que foi disperso na amostra com o auxílio do solvente dispersor. Após centrifugação, o solvente extrator é recuperado e a determinação dos analitos pode ser realizada empregando técnicas analíticas convencionais (REZAEI *et al.*, 2006, CALDAS *et al.*, 2011, MARTINS, 2010).

De acordo com MARTINS (2010), a solubilização do analito em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, sendo que o analito é geralmente apolar apresentando maior afinidade pela fase orgânica, que é um solvente orgânico apolar em comparação com a fase aquosa, que por sua vez, é altamente polar.

Na DLLME os fatores que afetam a eficiência do processo de extração são: (a) o tipo de solvente extrator, (b) tipo de solvente dispersor, (c) volume de solvente extrator, (d) volume de solvente dispersor, (e) pH da amostra e (f) força iônica.

A seleção do solvente extrator é um parâmetro fundamental na DLLME, pois o mesmo influencia diretamente na eficiência da extração. Devido a isso o solvente selecionado deve apresentar maior densidade que a água, elevada eficácia de extração dos analitos de interesse, bom comportamento cromatográfico, baixa solubilidade em água e capacidade de formação da solução turva na presença de solvente dispersor (CALDAS *et al.*, 2011; MARTINS, 2010). Entre os principais solventes extratores utilizados na DLLME pode-se destacar o uso do tetracloreto de carbono (CUNHA *et al.*, 2009), monoclorobenzeno (BIDARI *et al.*, 2011), clorofórmio (BIPARVA *et al.*, 2010), tetracloroetileno (CORTADA *et al.*, 2009), diclorobenzeno (GUO *et al.*, 2009), diclorometano (XIA JIA *et al.*, 2008).

O volume do solvente extrator é outro parâmetro muito importante a ser otimizado, pois este deve ser suficiente para extrair todos os analitos, no entanto deve-se utilizar o menor volume possível com a finalidade de aumentar o fator de concentração. Portanto, o volume ótimo de solvente extrator deve garantir tanto um alto fator de concentração quanto permitir a obtenção de um volume de fase sedimentada suficiente para as análises subsequentes (MARTINS, 2010).

Para a escolha do solvente dispersor, a principal característica a ser considerada é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa. O solvente dispersor tem por finalidade auxiliar o solvente extrator na formação das gotículas. Devido a esse contato entre as gotículas e o analito, a DLLME acelera o processo de transferência de massa da fase aquosa para a fase orgânica, aumentando a eficiência e diminuindo o tempo da extração. Por possuírem baixa toxicidade e baixo custo, acetona, metanol e acetonitrila geralmente são utilizados como solventes dispersores (CALISTO, 2008).

O volume de solvente dispersor é outro importante parâmetro que influencia na eficiência da extração. A variação da quantidade de solvente dispersor causa uma variação no volume da fase sedimentada, tornando necessário, modificar simultaneamente o volume do solvente extrator e do solvente dispersor para manter constante o volume da fase sedimentada. Além disso, cabe ressaltar que a utilização de elevado volume de solvente dispersor aumenta a solubilidade dos analitos na água e diminui a eficiência da extração (MARTINS, 2010, MACIEL, 2013).

A influência da força iônica também deve ser otimizada, uma vez que a adição de sais também influencia a eficiência da extração. A presença do sal pode diminuir a solvatação das moléculas do analito, devido às moléculas de água terem preferência por solvatar às moléculas de sal, além disso, a adição de sal aumenta o volume de fase sedimentada porque diminui a solubilidade do solvente extrator (MACIEL, 2013).

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, que é otimizado em função da acidez ou basicidade dos compostos. Compostos ácidos normalmente requerem uma acidificação da amostra para permanecerem na forma molecular e facilitar a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator (CALDAS *et al.*, 2011).

3.3.1.2 Aplicações da DLLME

Os últimos desenvolvimentos da DLLME incluem aplicações para variados grupos de substâncias orgânicas e inorgânicas em vários tipos de

matrizes. A seguir, estão apresentadas algumas publicações que utilizaram a DLLME para análise de compostos orgânicos em diversas diferentes matrizes.

CORTADA *et al.* (2009) utilizaram o método de DLLME para a determinação de 18 agrotóxicos organoclorados em amostras de água. Para a determinação foi empregado Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). A extração foi realizada utilizando 10 μL de tetracloetileno como solvente extrator e 1 mL de acetona como solvente dispersor. Os limites de detecção (LOD) variaram entre 1 e 25 ng L^{-1} . As recuperações foram de 70 a 120% com desvio padrão relativo (RSD) variando entre 5 e 15%.

Um método simples, rápido e sensível utilizando DLLME foi desenvolvido por BERIJANI *et al.* em 2006 para a determinação de 13 agrotóxicos organofosforados em amostras de água com determinação por Cromatografia Gasosa com Detecção por Fotometria de Chama (GC-FPD). Para a extração foram utilizados 12 μL de monoclorobenzeno como solvente extrator e 1 mL de acetona como solvente dispersor. Os LODs do método foram de 3 a 20 pg mL^{-1} . As recuperações do método foram entre 79 e 107%, com precisão entre 5 - 7%.

Em estudo publicado em 2009 por LIU *et al.* foi desenvolvido um método empregando DLLME para determinação de metolcarb, carbofurano, carbaril, isoprocard e diethofencard em amostras de água empregando cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Nas melhores condições de extração o método apresentou recuperações variando de 86 e 97% com RSDs inferior a 9%. Os LODs ficaram entre 5 e 100 ng mL^{-1} .

CALDAS *et al.* (2010) desenvolveram e validaram um método analítico para extração e concentração de três agrotóxicos de diferentes classes: carbofurano, clomazona e tebuconazol em amostras aquosas utilizando DLLME. O limite de quantificação (LOQ) obtido para o método, considerando um fator de concentração de 50 vezes foi de 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$, as recuperações variaram de 62 a 120%, com RSDs de 2 a 9% e faixa de calibração linear de 1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em 2009 CUNHA *et al.* desenvolveram um método rápido para a extração de 24 agrotóxicos em amostras de suco de maçã. A extração foi realizada utilizando 100 μL de tetracloreto de carbono e 400 μL de acetona. O método foi considerado adequado para a análise dos agrotóxicos em estudo.

TOMASINI *et al.* em 2011b, desenvolveram um método para a extração de fipronil em mel. Para a extração, 1 g de amostra foi diluída em 5 mL de água com a finalidade de obter uma amostra homogênea. A extração foi realizada utilizando 2 mL de acetonitrila como solvente dispersor e 100 μL de tetracloreto de carbono como solvente extrator. Os LOQs do método foram entre 0,03 e 0,6 mg kg^{-1} . As recuperações variaram entre 70 e 101% com precisão inferior a 11%.

Em 2007 FARINA *et al.*, desenvolveram um método para a extração de fenóis voláteis em amostras de vinho tinto. A determinação dos analitos foi realizada por GC-MS. A faixa linear do método variou entre 50 - 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A extração dos fenóis foi realizada utilizando tetracloreto de carbono como solvente extrator e acetona como solvente dispersor. O método otimizado apresentou recuperações dentro da faixa recomendada pelas agencias reguladoras de 70 a 120% com RSD inferior a 20%.

XIA *et al.* (2008) desenvolveram um método para determinação de metilcarbamato, otimizando as variáveis relevantes, como o volume do solvente extrator e dispersor, efeito da adição de sal, volume de amostra e tempo de extração utilizando um planejamento fatorial para a otimização da DLLME com determinação cromatográfica. Na validação do método a recuperações obtidas variaram de 96 e 101%, com RSDs menores que 6%, o LOD obtido foi de 1 ng mL^{-1} e faixa linear de 0,01 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando que o método proposto é adequado para análise de metacrato em amostras de água.

3.3.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante

Recentemente, um novo método de microextração em fase líquida chamado de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFO), foi desenvolvido por LEONG *et al.* em 2009. A técnica é simples e rápida, baseada no uso de solvente orgânicos com menor densidade que a água. O procedimento de extração é o mesmo da DLLME, envolvendo a injeção rápida da mistura dos solventes extratores e dispersores na amostra aquosa. Ao injetar os solventes orgânicos na amostra, uma solução turva é formada. Esta solução turva proporciona uma grande área

de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator proporcionando assim, a rápida transição do analito da fase aquosa para a fase orgânica. O estado de equilíbrio na DLLME-SFO é alcançado rapidamente, resultando em um tempo de extração muito curto, sendo uma vantagem notável da DLLME-SFO comparado com outras técnicas de microextração. Após centrifugação, a gota formada, flutua na solução e o tubo é colocado em banho de gelo para resfriar. O solvente extrator solidifica e após é retirado com auxílio de uma espátula e colocado em um frasco para a análise (WANG *et. al.*, 2011, CHANG *et. al.*, 2010, LIU *et.al.*, 2010, LEONG *et. al.*, 2008).

No procedimento da DLLME-SFO, os fatores que influenciam a eficiência da extração são: (a) o tipo de solvente extrator, (b) tipo de solvente dispersor, (c) volume de solvente extrator, (d) volume de solvente dispersor, (e) pH da amostra e (f) força iônica.

A seleção de um solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante na DLLME-SFO. O solvente extrator deve ser selecionado dentre os que apresentarem menor densidade que a água, elevada eficácia de extração dos analitos, ponto de fusão próximo ao da temperatura ambiente (entre 20 e 30 °C), baixa solubilidade em água, alto grau pureza, bom comportamento cromatográfico e baixa volatilidade para minimizar as perdas durante a extração. Entre os principais solventes extratores utilizados na DLLME-SFO pode-se destacar o uso do 1-dodecanol, 1-undecanol, hexadecano e tetradecano (DAI *et. al.*, 2010, LEONG *et al.*, 2008, WANG *et. al.*, 2011, CHANG *et. al.*, 2010).

Para a escolha do solvente dispersor, a principal característica a ser considerada é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa. A necessidade destas características limita, geralmente, ao uso de metanol, acetonitrila, acetona como solventes dispersores (LIU *et.al.*, 2010, LEONG *et. al.*, 2008).

Com relação aos parâmetros volume de solvente extrator, volume de solvente dispersor, força iônica e pH, os efeitos causados por estas variáveis na eficiência da extração dos analitos são os mesmos apresentados pelo método da DLLME e por isso não serão descritos novamente (item 3.3.1).

3.3.2.1 Aplicações da DLLME-SFO

Os últimos desenvolvimentos da DLLME-SFO incluem aplicações para variados grupos de substâncias orgânicas em diferentes tipos de matrizes. A seguir, estão apresentadas algumas publicações que utilizaram a DLLME-SFO para análise de compostos orgânicos em diversas matrizes.

LEONG *et al.*, 2008 desenvolveram um método simples, de baixo custo e de alta precisão empregando a DLLME-SFO para a determinação de 1,2-diclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno, tetracloroetileno, hexaclorobutadieno e 4 bromodifenil eter em amostras de água. A quantificação foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) e a confirmação por GC-MS. A extração foi realizada utilizando 0,5 mL de acetona como solvente dispersor e 10 μL de 2-dodecanol como solvente extrator. Os LODs variaram entre 0,005 - 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o GC-ECD e entre 0,005 - 0,047 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o GC-MS. Boas recuperações e precisão inferior a 20% foram obtidos para ambos os métodos.

Em um estudo publicado em 2010 por DAI *et al.*, foi desenvolvido um método empregando a DLLME para a extração de bifenilas policloradas em amostras de água. A quantificação foi realizada por GC-ECD. Para a extração foi utilizado 8 μL de 1-undecanol e 1 mL de acetonitrila. A faixa linear variou de 5 a 2500 ng L^{-1} com coeficiente de correlação linear superior a 0,9987 e as recuperações variaram entre 79 e 111%.

Um método simples e rápido foi desenvolvido por WANG *et al.*, em 2011 para a extração dos triazóis miclobutanil, tebuconazol, tridimenol e hexaconazol em amostras de água com determinação por HPLC-DAD. A faixa linear foi avaliada entre 0,5 e 200 ng mL^{-1} com coeficientes de correlação linear superior a 0,9992. Os LODs foram de 0,06 - 0,1 ng mL^{-1} . As recuperações obtidas para os analitos em estudo foram entre 84 e 110% com RSDs variando entre 4 e 6%.

A determinação de piretróides em amostras de água de torneira e de lago foi realizada por LIU *et al.*, em 2010. A quantificação dos compostos foi realizada por GC-ECD. Para a extração foi utilizado 8 μL de 1-dodecanol e 0,5 mL de metanol como solventes extratores e dispersores respectivamente. Os LOQs para a fenpropatrina, cialotrina, permetrina e tau-fluvalinato foram de 1,5;

1,4; 2,9 e 1,4 ng L⁻¹, respectivamente. Este método foi aplicado para extração, concentração e determinação de piretróides em amostra de água obtendo resultados satisfatórios.

Em 2009 LEONG *et al.*, desenvolveram um método empregando a DLLME-SFO para a extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água. Para a determinação foi utilizada GC-ECD. Na extração dos agrotóxicos foi utilizado 200 µL de acetonitrila e 10 µL de hexadecano como solventes extratores e dispersores respectivamente. A faixa linear variou de 0,025 - 20 µg L⁻¹ e os LODs foram de 0,011 - 0,11µg L⁻¹. As recuperações do método variaram entre 82 - 102% com RSDs inferior a 9%.

A determinação de dinitrobenzenos por GC-ECD empregando a DLLME-SFO foi realizada por WU *et al.*, em 2010. Os LODs para o 1,2-dinitrobenzeno, 1,3-dinitrobenzeno e 1,4-dinitrobenzeno foram de 0,034, 0,079, 0,019 µg L⁻¹, respectivamente. Para a extração foi utilizado 8 µL de 1-dodecanol e 200 µL de metanol. As recuperações apresentadas pelo método foram de 93 - 105% com RSDs variando de 2 a 5%.

3.4 Técnica cromatográfica para a determinação de resíduos de agrotóxicos

Dentre uma enorme variedade de poluentes presentes nas águas, estão os agrotóxicos, cujas concentrações no meio ambiente são extremamente baixas, assim como os limites máximos permitidos pelas agências reguladoras. Para tanto são necessárias técnicas analíticas de detectabilidade e seletividade elevadas para determinações quantitativas destes compostos. A cromatografia é uma técnica amplamente empregada e permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhuma outra técnica de separação é tão poderosa e de aplicação tão generalizada como a cromatografia (SKOOG, 2008). A cromatografia líquida é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia, pois independentemente da limitação da volatilidade ou estabilidade térmica, requer somente amostra solúvel na fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006). A determinação de resíduos de agrotóxicos em níveis traços em amostras aquosas por cromatografia líquida é rotineiramente executada em muitos

laboratórios analíticos. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) (DEMOLINER, 2008).

3.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma das técnicas mais poderosas para a determinação de resíduos de agrotóxicos polares, de baixa volatilidade ou instabilidade térmica porque é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto a espectrometria de massas permite a sua identificação e/ou confirmação em níveis traços (JARDIM *et al.*, 2009). Na detecção por espectrometria de massas é possível obter informação estrutural acerca do analito assegurando sua identificação com maior seletividade do que quando é feita apenas com base nas características de retenção das substâncias analisadas, como ocorre nas outras técnicas de detecção (VÉKEY, 2011). Além disso, quando as substâncias a serem analisadas não podem ser totalmente separadas pela técnica cromatográfica empregada, usando MS/MS é possível detectá-las individualmente se possuírem diferentes massas moleculares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O sistema básico de um espectrômetro de massas é composto por: fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. As fontes de ionização mais empregadas, que produzem ionização a pressão atmosférica, são: Ionização por Eletronebulização (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009).

Em LC-MS/MS, a amostra é inicialmente separada e direcionada ao MS onde ocorre a produção de íons pela fonte de ionização (COLLINS *et al.*, 2006).

Na ESI o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na fase móvel (FM), no caso do eluente da LC) 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 N₂) 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 fica 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 interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003, CHIARADIA *et al.*, 2008).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008). O emprego de LC-MS utilizando ESI como fonte de ionização é ideal para análise de moléculas mais polares e de maior massa molecular. Ainda, LC-ESI-MS/MS é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos, peptídeos, oligonucleotídeos e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009).

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 (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008; HARRIS, 2008).

Da fonte de íons, os íons são transferidos para o analisador de massas, onde são separados de acordo com seus valores de massa-*por-carga* (*m/z*). O analisador de massas opera sob vácuo, para assegurar que os íons se desloquem com eficiência máxima. O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo é formado pela junção de três quadrupolos em sequência. No primeiro quadrupolo um íon selecionado é separado da corrente de íons vinda

da fonte de íons. No segundo quadrupolo este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N₂ ou Ar. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos fragmentos iônicos formados para enviar ao detector (DEMOLINER, 2008).

O detector mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z. A maioria dos sistemas de MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector, combinado a um amplificador de sinal. O registro de todas as cargas detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas (SCHREIBER, 2007).

3.4.1.1 Efeito de Matriz em LC-MS

O efeito de matriz em LC-MS/MS ocorre quando substâncias da matriz co-eluem com as substâncias de interesse, alterando a eficiência da ionização dos analitos, suprimindo ou enriquecendo o sinal dos mesmos (TAYLOR, 2005; ISMAIEL *et al.*, 2008; TOMASINI, 2011a). Este efeito pode ser notado pela diferença significativa na resposta obtida entre os padrões preparados no solvente com os padrões preparados no extrato da matriz (PRESTES, 2007). O exato mecanismo pelo qual ocorre o efeito matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a co-eluição de um componente da matriz não monitorado. A ocorrência e a intensidade do efeito matriz podem variar dependendo da composição da matriz (GONZÁLEZ *et al.*, 2008, COSTA, 2012).

Para minimizar a influência dos componentes da matriz na quantificação de compostos é utilizada a limpeza dos extratos, mas também existem os procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a adição de padrão interno e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (SANCO, 2004; PINHO; SILVÉRIO, 2010). Portanto, a avaliação cuidadosa do efeito de matriz deve constituir uma parte integrante e importante da validação de um método LC-MS/MS, onde efeito de matriz deve ser avaliado usando nas análises extratos adicionados com analitos após a extração (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003, SILVEIRA, 2012).

3.5 Validação de métodos cromatográficos

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método é uma exigência na prática das análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003).

Os parâmetros geralmente investigados no processo de validação são: curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e efeito de matriz (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

3.5.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

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 (Equação 2) (INMETRO, 2010).

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y .

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica específica. Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de determinação (r^2) do gráfico analítico. Também é possível calcular o coeficiente de correlação (r), que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de r (RIBANI *et al.*, 2004).

Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela ANVISA (ANVISA, 2003) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2010).

3.5.2 Limite de Detecção e de Quantificação

O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental enquanto o LOQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida/quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

A estimativa do valor do LOD e do LOQ pode ser calculada por várias maneiras, como por exemplo, através do método visual, método da relação sinal/ruído e aqueles baseados em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.3 Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As formas de expressá-la

são por meio da repetitibilidade, precisão intermediária e a reprodutibilidade. A precisão normalmente é expressa como desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores de até 20% para análise de resíduos de agrotóxicos.

A repetibilidade expressa a precisão de um método a partir de várias medições sucessivas da mesma amostra em condições de operação idênticas (metodologia, analista, equipamento, reagentes, laboratório) num curto intervalo de tempo. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. O termo repetibilidade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO e, é sinônimo para repetibilidade utilizado pela ANVISA (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

A precisão intermediária do método está relacionada às variações dentro de um mesmo laboratório como diferentes dias e/ou analistas, e/ou equipamentos (LANÇAS, 2004). Através da precisão intermediária é possível verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Os ensaios necessários para a avaliação da precisão intermediária seguem a mesma recomendação da repetibilidade.

A reprodutibilidade avalia se a precisão de um método é constante ao longo do tempo, usando um procedimento analítico que pode apresentar diferentes condições de operação (diferentes laboratórios, operadores, equipamentos, condições de análise), e que é geralmente avaliado através da participação de ensaios interlaboratoriais (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como valor verdadeiro (INMETRO, 2007). É normalmente expressa em termos de percentagem (EURACHEM, 1998).

A exatidão está sempre associada à precisão, sendo ambas avaliadas de forma concomitante. Ou seja, são verificadas com nove determinações no mínimo, de forma a contemplar o intervalo linear do método, ou melhor, três concentrações, baixa (limite de quantificação), média e alta, com o mínimo três réplicas em cada concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

O processo normalmente utilizado para avaliar a exatidão de um método é a realização de ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A recuperação é a medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. É o método mais utilizado para a validação de métodos cromatográficos pode ser expressa pela Equação (3) (LANÇAS 2004; INMETRO 2010).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANCO, 2007). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

3.6 Planejamentos Experimentais

A metodologia do planejamento fatorial combinada à análise de superfície de resposta é uma importante ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre os experimentos, minimizando assim o empirismo associado a técnicas de otimização por tentativa e erro (SOARES, 2012).

O planejamento apresenta como vantagens a redução do número de ensaios ou repetições, melhorando a qualidade dos resultados obtidos após o experimento. Com isso, observa-se uma considerável diminuição do tempo e do custo vinculado às etapas de otimização (RODRIGUES e IEMMA, 2005)

O planejamento fatorial é aplicado para investigar as influências de todas as variáveis experimentais e os efeitos individuais e as interações entre elas sobre a resposta analítica. Os efeitos são definidos como a mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo (-) para o nível alto (+) e podem ser classificadas em duas categorias: efeitos principais (é o efeito causado no sistema químico por uma das variáveis quando seus níveis passam de um valor para outro) e efeitos de interação (é o efeito causado no sistema em estudo pela interação de variáveis) (GUIMARÃES, 2012).

O planejamento fatorial pode ser fracionado ou completo. O planejamento fatorial fracionado tem por finalidade avaliar os efeitos das variáveis estudadas (triagem de variáveis) o qual pode ser muito útil na seleção dos níveis ou fatores em estudo. Após a triagem feita usando o planejamento fatorial, uma etapa de otimização propriamente dita deve ser realizada utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM). Neste caso pode ser utilizado um planejamento fatorial completo, no qual as variáveis são estudadas em um número maior de níveis e, desta forma, viabiliza o estabelecimento de um modelo empírico e a geração de uma superfície de resposta, permitindo estabelecer as melhores condições de trabalho (MALTEZ, 2007).

Desta forma, as principais vantagens da otimização empregando a metodologia do planejamento fatorial associada à superfície de resposta são redução do número de ensaios ou repetições e melhora na qualidade da informação obtida através dos resultados. Os fatores podem ser analisados simultaneamente, com a possibilidade de otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo, bem como de avaliação e cálculo do erro experimental (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

4. Materiais e Métodos

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de métodos para determinar resíduos de agrotóxicos multiclasse em amostras de água mineral. Para a extração e a concentração foram utilizadas as técnicas de preparo de amostra DLLME e DLLME-SFO. Também foram otimizados os parâmetros de fragmentação dos compostos orgânicos para serem determinadas por Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Eletronebulização acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-ESI-MS/MS). O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1.1 Instrumentação

- ❖ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- ❖ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ❖ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- ❖ pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- ❖ Sistema de filtração em membrana Phenomenex;
- ❖ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ❖ Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- ❖ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- ❖ Cromatógrafo a Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletronebulização, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e volume de injeção de 10 µL;

- ❖ Coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);
- ❖ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

4.2 Reagentes, solventes e materiais

- ❖ Ácido fosfórico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ❖ Ácido fórmico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ❖ Água destilada;
- ❖ Água Ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- ❖ Metanol, acetona e acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ❖ Diclorometano, dicloroetano e clorofórmio (grau espectroscópio) Merck (Darmstadt, Alemanha);
- ❖ Tetracloreto de carbono, tetracloroetileno, monoclorobenzeno, 1,2 diclorobenzeno Vetec (Rio de Janeiro, Brasil);
- ❖ Padrões analíticos: atrazina, simazina, imazapique, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol e epoxiconazol (pureza > 99%), (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- ❖ 1- Dodecanol, 1-Undecanol (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- ❖ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ❖ Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- ❖ Membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- ❖ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ❖ Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc).

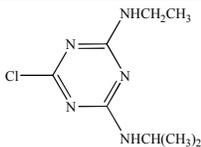
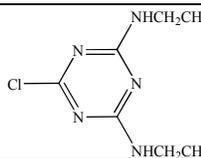
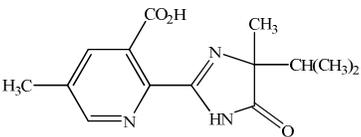
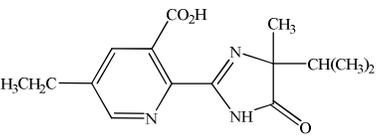
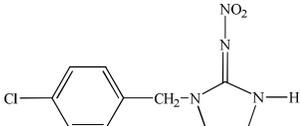
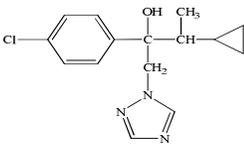
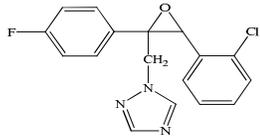
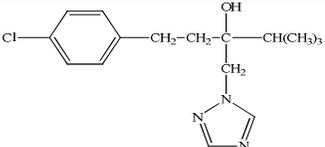
4.3 Seleção dos agrotóxicos para estudo

Para a seleção dos agrotóxicos estudados, inicialmente foi realizada uma pesquisa no site do IBGE, com o objetivo de verificar quais as culturas

agrícolas são cultivadas nos municípios onde estão localizadas as fontes de águas minerais selecionadas para este estudo. Posteriormente foi consultado o site do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT), com a finalidade de averiguar quais são os agrotóxicos indicados para estas culturas. Devido às diferentes culturas plantadas, são utilizados diversos tipos de agrotóxicos pertencentes a diferentes classes químicas. Para este estudo foram selecionados os agrotóxicos atrazina, simazina, imazapique, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol e epoxiconazol os quais são considerados de maior relevância.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas as principais propriedades físico-químicas e características dos agrotóxicos selecionados.

Tabela 3. Grupo químico, classe, classificação toxicológica e culturas em que são empregados os agrotóxicos em estudo

Atrazina	
	<p>Grupo Químico: Triazina</p> <p>Classe: Herbicida</p> <p>Classificação Toxicológica: I Extremamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Milho, Arroz</p>
Simazina	
	<p>Grupo Químico: Triazina</p> <p>Classe: Herbicida</p> <p>Classificação Toxicológica: III Mediamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Milho, Arroz</p>
Imazapique	
	<p>Grupo Químico: Imidazolinona</p> <p>Classe: Herbicida</p> <p>Classificação Toxicológica: III Mediamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Arroz, Milho, Cana-de-açúcar</p>
Imazetapir	
	<p>Grupo Químico: Imidazolinona</p> <p>Classe: Herbicida</p> <p>Classificação Toxicológica: I Extremamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Arroz, Milho, Cana-de-açúcar</p>
Imidacloprido	
	<p>Grupo Químico: Neonicotinóide</p> <p>Classe: Inseticida</p> <p>Classificação Toxicológica: III Mediamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Arroz, Aveia, Soja, Trigo, Milho</p>
Ciproconazol	
	<p>Grupo Químico: Triazol</p> <p>Classe: Fungicida</p> <p>Classificação Toxicológica: III Mediamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Maça, Uva, Soja, Trigo</p>
Epoconazol	
	<p>Grupo Químico: Triazol</p> <p>Classe: Fungicida</p> <p>Classificação Toxicológica: I Extremamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Soja, Trigo, Milho</p>
Tebuconazol	
	<p>Grupo Químico: Triazol</p> <p>Classe: Fungicida</p> <p>Classificação Toxicológica: I Extremamente Tóxico</p> <p>Culturas Indicadas: Arroz, Uva, Maça, Soja e Trigo</p>

Fonte: ANVISA 2010

Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados

Agrotóxicos	Massa Molar	pKa	K _{OW}	Solubilidade em água (g L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa) 25 °C	Índice de GUS
Atrazina	216	1,7	2,7	3,3.10 ⁻²	3.10 ⁻⁷	3,3
Simazina	202	1,6	2,1	6,2.10 ⁻³	2,9.10 ⁻³	2,0
Imazapique	275	2,2	2,4	2,1	1.10 ⁻²	1,9
Imazetapir	289	2,1	1,4	1,4	1,3.10 ⁻²	4,4
Imidacloprido	256	n.d	0,5	0,6	4.10 ⁻³	3,7
Ciproconazol	292	b.f	3,1	9,3.10 ⁻²	2,6. 10 ⁻²	3,1
Tebuconazol	308	b.f	3,7	3,6.10 ⁻²	1,7. 10 ⁻³	2,0
Epoconazol	330	b.f	3,4	6,6.10 ⁻³	1.10 ⁻²	2,4

Fonte: TOMLIN, 2003; Pesticide Properties Database PPDB, 2010. pKa: constante de dissociação ácida; K_{OW}: coeficiente de partição octanol-água; nd: não dissocia; b.f: base muito fraca.

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico (atrazina, simazina, imazapique, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol, epoxiconazol) foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em metanol, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 °C.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas soluções trabalho de concentrações de 100 e 10 mg L⁻¹ de cada substância em metanol.

Uma solução trabalho contendo a mistura dos oitos analitos foi preparada em diferentes concentrações para cada analito: 2,5 mg L⁻¹ para o imidacloprido; 0,25 mg L⁻¹ para a atrazina, simazina, imazapique e imazetapir; 0,05 mg L⁻¹ para o ciproconazol e 0,025 mg L⁻¹ para epoxiconazol e tebuconazol. Diluições da solução trabalho, preparadas diariamente, foram utilizadas para a otimização e validação dos métodos por LC-ESI-MS/MS.

4.5 Amostras de água mineral

As amostras de água mineral, provenientes do município de Ijuí/RS, foram adquiridas em um supermercado local e foram utilizadas na otimização e

validação do método. A representatividade da amostragem foi de 10% do total disponível na prateleira do supermercado.

As amostras de água mineral utilizadas para a aplicabilidade do método, provenientes de diferentes municípios (Ijuí, Sarandi, Lajeado, Porto Alegre e Caxias do Sul) foram adquiridas em supermercados locais, com representatividade de 10% do total disponível em cada ponto de venda. Todas as amostras adquiridas foram adicionadas no mesmo recipiente com a finalidade de obter uma mistura homogênea e garantir uma análise representativa de todas as amostras selecionadas aleatoriamente. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e em local escuro antes das análises.

4.6 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS

Para a otimização das condições cromatográficas primeiramente foi realizada a infusão individual dos agrotóxicos no espectrômetro de massas com a finalidade de verificar o modo de ionização negativo ou positivo e as transições características de cada analito. Posteriormente foi otimizada a separação cromatográfica dos compostos por LC-ESI-MS/MS.

4.6.1 Preparo da fase móvel

Os solventes utilizados, metanol e acetonitrila, foram preparados individualmente, filtrados a vácuo através de membranas de nylon de 0,45 µm. A água ultrapura e os solventes foram desgaseificados em ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes e rotulada.

4.6.2 Escolha da composição da fase móvel e do modo de eluição

Na cromatografia líquida de alta eficiência, a fase móvel desempenha um papel muito importante, pois sua composição quase sempre é fundamental no processo de separação cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2006). E devido à diferença de polaridade dos analitos, a determinação da composição da fase móvel envolveu a comparação entre diferentes proporções de metanol,

acetonitrila, água ultrapura e o uso de ácido acético e fórmico como modificadores orgânicos. A escolha da fase móvel adequada foi realizada comparando a resposta do instrumento e a resolução cromatográfica dos picos entre os eluentes.

Modos de eluição isocrático e gradiente foram avaliados durante o desenvolvimento da separação cromatográfica.

4.6.3 Escolha da vazão da fase móvel

A função da bomba é enviar um fluxo constante e reprodutível de fase móvel para a coluna, produzindo uma vazão que permita que as análises sejam realizadas em um tempo curto e a uma vazão constante para não interferir no sistema de detecção (DEMOLINER, 2008). A escolha da vazão da fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções padrões, testando vazões entre 0,2 e 0,4 mL min⁻¹.

4.6.4 Otimização dos parâmetros para a fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas

A otimização dos parâmetros para a fragmentação dos analitos é uma etapa de fundamental importância para selecionar os íons a serem monitorados na identificação e quantificação, assim como, obter a melhor resposta para os analitos em estudo (CABRERA, 2012).

Para a otimização dos parâmetros de fragmentação, foram realizadas infusões diretas das soluções padrões individuais, com concentração de 1,0 mg L⁻¹, no espectrômetro de massas. Nesta etapa foi ajustado o modo de ionização (eletronebulização positiva ou negativa); a voltagem do cone para selecionar o íon precursor, a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; a temperatura da fonte de ionização; a temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente e a voltagem do capilar.

4.7 Preparo da amostra

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais a etapa de preparo de amostra é fundamental para garantir a eficiência da

extração, uma vez que as concentrações dos analitos são muito baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) e as amostras são bastante complexas (WANG *et al.*, 2011). Por isso, é necessária uma etapa prévia de preparo da amostra a qual deve permitir a eliminação de possíveis interferentes e garantir a inexistência de perdas dos compostos e contaminações durante as extrações, e, além disso, permitir a concentração dos analitos.

4.7.1 Otimização do preparo de amostra por DLLME

O procedimento otimizado para o método da DLLME baseia-se na injeção de uma mistura apropriada do solvente extrator e do solvente dispersor, na solução aquosa que se encontra em um tubo cônico com auxílio de uma seringa. Após leve agitação, uma solução turva (solução aquosa/ solvente extrator/ solvente dispersor) com microgotas é formada. Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, a qual é retirada com o auxílio de uma seringa. Posteriormente a fase sedimentada é evaporada em fluxo de nitrogênio e redissolvida em metanol e quantificada por LC-ESI-MS-MS. O procedimento empregado na DLLME pode ser observado na Figura 1.

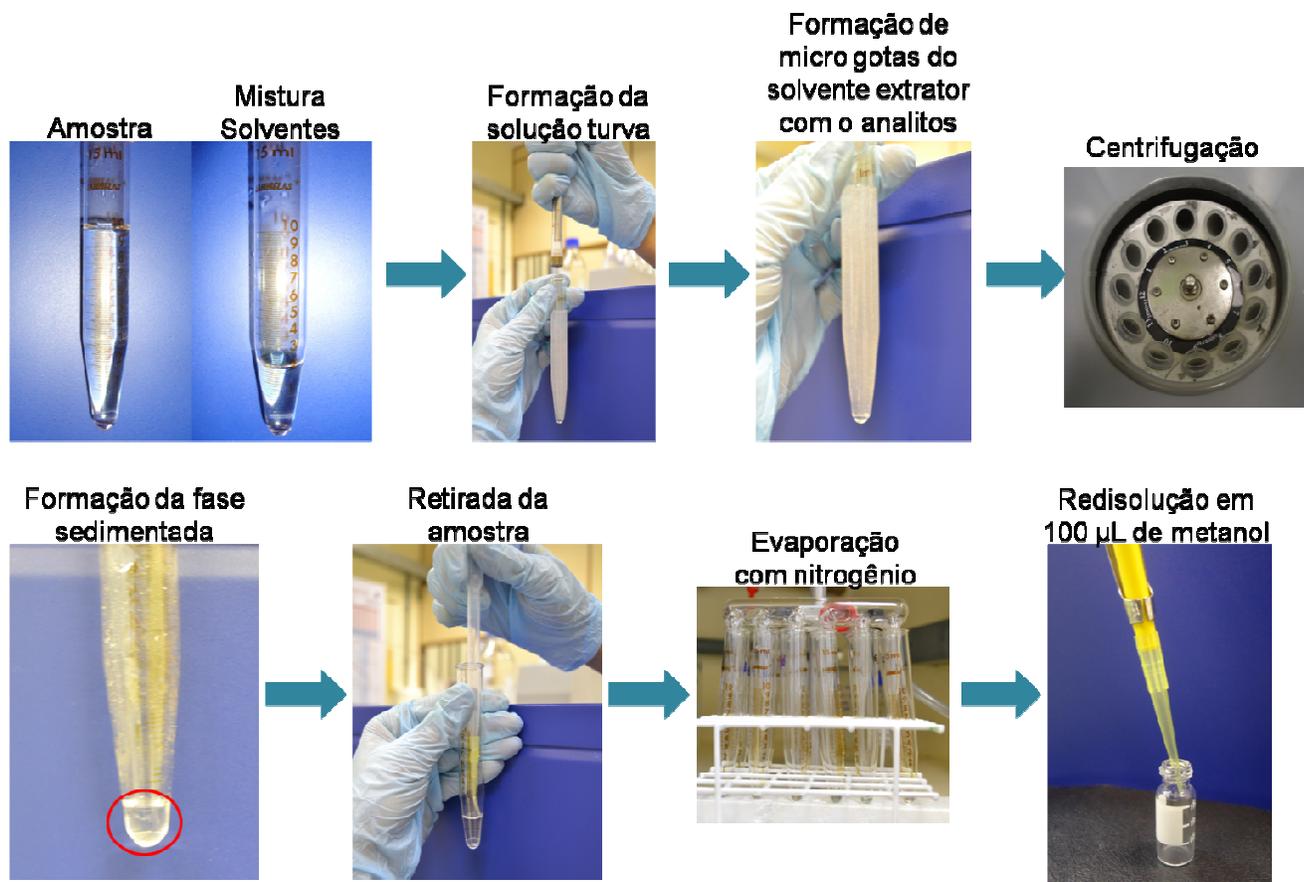


Figura 1. Procedimento DLLME para a concentração dos agrotóxicos

4.7.1.1 Seleção do solvente extrator

Para a escolha do solvente extrator foram selecionados seis solventes os quais se caracterizam por apresentarem diferentes densidades e solubilidades em água: dicloroetano (DCE), clorofórmio (CLF), tetracloreto de carbono (TCC), tetracloreto de etileno (TCE), diclorobenzeno (DCB), monoclorobenzeno (MCB). Os experimentos foram realizados utilizando 10 mL de amostra de água mineral acidificada a pH 3 com H_3PO_4 1:1 (v/v), 150 μL do solvente extrator combinado individualmente com 2 mL de cada um dos seguintes solventes dispersores: acetonitrila, acetona e metanol. Na Tabela 5 são apresentadas a fórmula molecular, densidade e solubilidade em água dos solventes avaliados.

Em uma etapa posterior também foi avaliada a mistura dos seguintes solventes extratores, com os quais se obteve melhores resultados para a maioria dos analitos: DCE:CLF, DCE:DCB, DCE:MCB, CLF:DCB, CLF:MCB,

DCB:MCB na proporção (1:1 v/v). Os experimentos foram realizados empregando as mesmas condições descritas anteriormente, porém o solvente dispersor utilizado foi a acetonitrila.

Tabela 5. Propriedades físicas dos solventes extratores.

Solventes	Formula Molecular	Densidade (g cm ⁻³)	Solubilidade em água (g L ⁻¹)
Clorofórmio	CHCl ₃	1,48	8,0
Diclorobenzeno	C ₆ H ₄ Cl ₂	1,31	0,15
Dicloroetano	C ₂ H ₄ Cl ₂	1,32	8,7
Monoclorobenzeno	C ₆ H ₅ Cl	1,11	0,5
Tetracloroeto de Carbono	CCl ₄	1,59	0,8
Tetracloroetileno	C ₂ Cl ₄	1,62	0,16

4.7.1.2 Seleção do solvente dispersor

Para a escolha do solvente dispersor foram selecionados os seguintes solventes dispersores que se caracterizam por serem miscíveis tanto na fase aquosa quanto na orgânica: acetonitrila (ACN), acetona (ACT) e metanol (MET). Os experimentos foram realizados utilizando 10 mL de amostra de água mineral acidificada a pH 3 com H₃PO₄ 1:1 (v/v), 150 µL de solvente extrator e 2 mL do solvente dispersor.

Posteriormente também foram avaliadas diferentes proporções da mistura dos solventes dispersores acetona e acetonitrila e dos solventes extratores clorofórmio e monoclorobenzeno nas seguintes proporções: CLF:MCB (1:1, v/v):ACT:ACN (1:1, v/v), CLF:MCB (3:1, v/v):ACT:ACN (1:1, v/v), CLF:MCB (5:1, v/v):ACT:ACN (1:1, v/v), CLF:MCB (1:1, v/v):ACT:ACN (3:1, v/v), CLF:MCB (1:1, v/v):ACT:ACN (5:1, v/v). Os experimentos foram realizados utilizando 10 mL de amostra acidificada a pH 3 com H₃PO₄ 1:1 (v/v), 150 µL da mistura de solvente extrator e 2 mL da mistura de solventes dispersores.

4.7.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2³

Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), a fim de modelar os experimentos e estabelecer as condições ótimas de extração

das seguintes variáveis no processo de extração por DLLME: volume de solvente extrator e solvente dispersor e pH.

Neste tipo de planejamento, as variáveis são estudadas em um número maior de níveis e, desta forma, viabiliza o estabelecimento de um modelo empírico e a geração de uma superfície de resposta, permitindo estabelecer as melhores condições de trabalho (SILVA *et al.*, 2012).

Na Tabela 6 são apresentadas as variáveis e os níveis que foram avaliados no DCCR. As variáveis selecionadas para este estudo e os seus respectivos níveis foram estabelecidas em função dos dados existentes na literatura e dos conhecimentos prévios obtidos em um trabalho anterior do grupo (CALDAS *et al.*, 2010), que empregou a mesma técnica de extração para a determinação de agrotóxicos multiclasse em amostras de água de subterrânea.

Tabela 6. Variáveis e níveis avaliados no DCCR para otimização da extração de agrotóxicos por DLLME.

Fatores/Variáveis	Níveis				
	(-1.68)	(-1)	0	(+1)	(+1.68)
Volume de solvente dispersor (mL)	1	1,4	2	2,6	3
Volume de solvente extrator (µL)	50	100	150	200	250
pH	2	2,4	3	3,6	4

Como se trata de um DCCR foram realizados 17 experimentos, sendo 14 combinações entre os níveis avaliados e três experimentos no ponto central para avaliar o desvio padrão entre os experimentos. Os pontos axiais foram calculados de acordo com a equação (4).

$$\alpha = \left(2^n\right)^{1/4} \quad (4)$$

onde α representa a distância dos pontos axiais e n o número de variáveis independentes.

Para avaliar a validade dos modelos de superfície de resposta, foi utilizada a ANOVA, através de um teste F de Fisher, com nível de confiança de 95%. O modelo foi simplificado em situações onde os termos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Adicionalmente, foi feito o cálculo dos desvios relativos do modelo, representado pela razão entre a

diferença entre os valores preditos e observados e os valores observados pelo experimento, conforme equação (5).

$$DR = \frac{Y - \hat{Y}}{Y} \times 100 \quad (5)$$

onde DR representa o desvio relativo (%), Y o valor de recuperação observado pelo experimento e \hat{Y} o valor de recuperação predito pelo modelo (SOARES, 2012).

4.7.2.1 Otimização do preparo de amostra por DLLME-SFO

O procedimento otimizado para o método da DLLME-SFO baseia-se na injeção de uma mistura apropriada do solvente extrator e do solvente dispersor, na solução aquosa que se encontra em um tubo cônico com auxílio de uma seringa. Após leve agitação, uma solução turva (solução aquosa/ solvente extrator/ solvente dispersor) com microgotas é formada. Após centrifugação, a gota formada, flutua na solução e o tubo é colocado em banho de gelo para resfriar. O solvente extrator solidifica e, após é retirado com auxílio de uma espátula e colocado em um frasco para ser quantificado por LC-ESI-MS-MS. O procedimento empregado na DLLME-SFO pode ser observado na Figura 2.

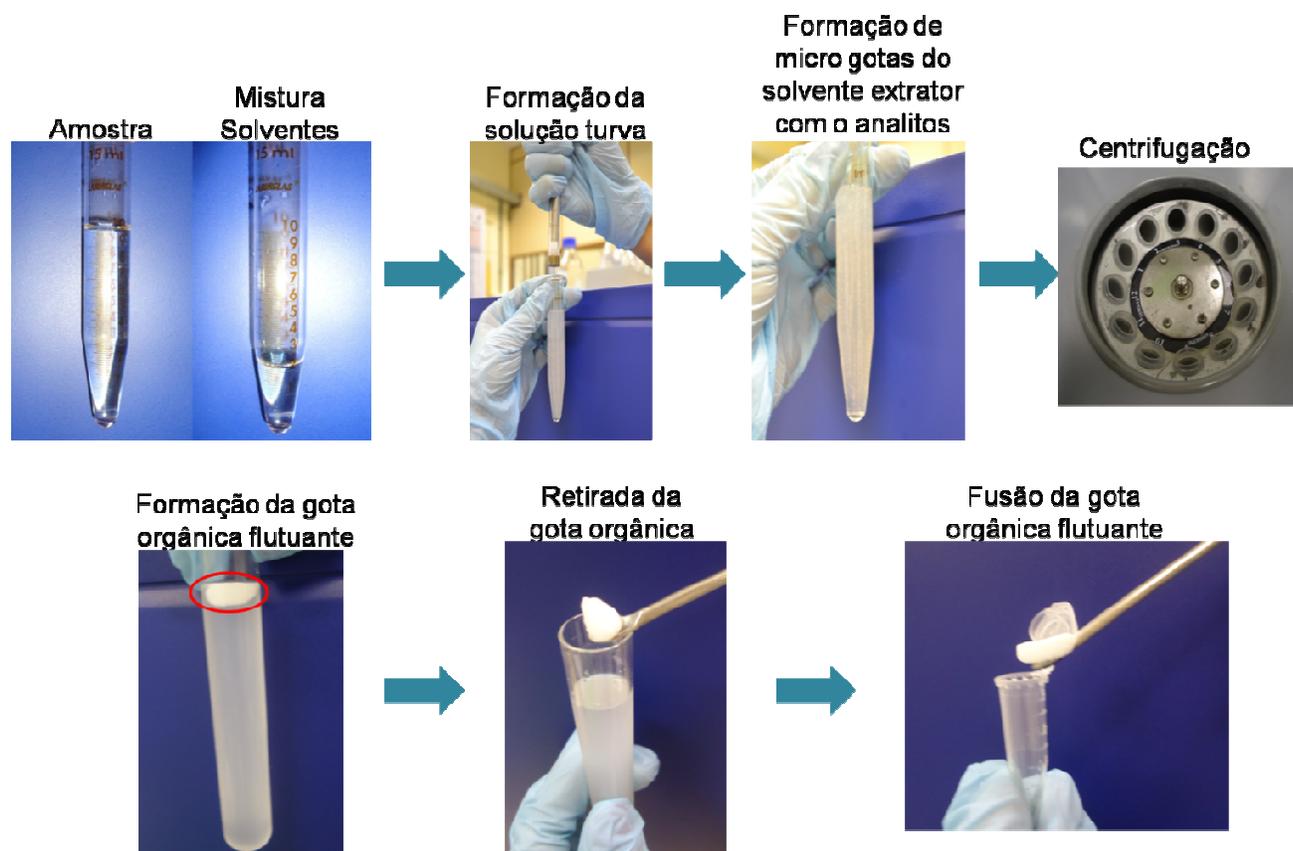


Figura 2. Procedimento DLLME-SFO para a concentração dos agrotóxicos

4.7.2.2 Seleção do solvente extrator

Entre os solventes com menor densidade que a água, 1-dodecanol (DDC) e 1-undecanol (UDC) foram testados com o objetivo de escolher o solvente extrator mais apropriado para a DLLME-SFO. Para a escolha do solvente foram realizados experimentos utilizando 10 mL de amostra de água mineral acidificada a pH 3 com H_3PO_4 1:1 (v/v) e 250 μL do solvente extrator combinado individualmente com 2 mL de cada um dos seguintes solventes dispersores: acetonitrila, acetona e metanol. Na Tabela 7 são apresentadas as densidades, ponto de fusão e solubilidades dos solventes avaliados.

Tabela 7. Propriedades dos solventes

Solventes	Forma	Ponto de	Densidade
	Molecular	Fusão (°C)	(g cm ⁻³)
1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	22-24°C	0,83
1-Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	13-15°C	0,83

4.7.2.3 Seleção do solvente dispersor

Os solventes dispersores testados neste estudo foram a acetonitrila, acetona e metanol. Para a escolha do solvente dispersor foram realizados experimentos utilizando 10 mL de amostra de água mineral acidificada a pH 3 com H₃PO₄ 1:1 (v/v), 250 µL de solvente extrator e 2 mL do solvente dispersor.

4.7.2.4 Planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹

O planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ foi empregado com o objetivo de realizar a triagem das variáveis que podem influenciar no processo de extração por DLLME-SFO. As variáveis avaliadas foram o volume do solvente dispersor e do solvente extrator, concentração de NaCl e pH. As variáveis e as faixas de estudo foram escolhidas de acordo com os dados da literatura (Wang et al., 2011, Chang et al., 2010). Na Tabela 8, são apresentadas as variáveis e os valores reais e codificados que foram avaliados no planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹.

Tabela 8. Variáveis e seus respectivos níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹.

Fatores/Variáveis		Níveis		
		(-1)	0	(+1)
Volume de solvente dispersor (mL)	X ₁	1	2	3
Volume de solvente extrator (µL)	X ₂	50	100	150
pH	X ₃	2	5	8
Concentração de NaCl (%)	X ₄	0	1	2

O planejamento fatorial foi composto por 11 experimentos, sendo 8 combinações entre os níveis avaliados e 3 experimentos no ponto central para

avaliar o desvio padrão entre os experimentos. A análise de efeitos foi feita considerando um nível de confiança de 90%.

4.7.2.5 Delineamento composto central rotacional 2²

Após realizar a triagem das variáveis que influenciam significativamente no processo de extração dos agrotóxicos em estudo por DLLME-SFO, foi aplicado um planejamento fatorial completo, caracterizado por um DCCR, a fim de modelar o experimento e estabelecer as condições ótimas de extração das variáveis estudadas. Na Tabela 9, são apresentadas as variáveis e os valores reais e codificados que foram estudados no DCCR.

Tabela 9. Variáveis e seus respectivos níveis avaliados no DCCR.

Fatores/Variáveis		Níveis				
		(-1.41)	(-1)	0	(+1)	(+1.41)
Volume de solvente dispersor (mL)	X ₁	0,5	0,7	1,25	1,8	2
Volume de solvente extrator (µL)	X ₂	150	165	200	235	250

O planejamento experimental aplicado foi composto por 11 experimentos, sendo oito combinações entre os níveis avaliados e três experimentos no ponto central para avaliar o desvio padrão entre os experimentos. A distância entre os pontos axiais e o cálculo dos desvios relativos do modelo foram calculados de acordo com as equações 4 e 5 descritas no item 4.7.1.3.

A validade dos modelos de superfície de resposta foi avaliada utilizando a ANOVA, através de um teste F de *Fisher*, com nível de confiança de 95%.

4.8 Validação dos métodos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. A validação é um conjunto de ensaios que se destinam a verificar se um determinado método analítico é apto a produzir resultados confiáveis e adequados aos objetivos a que se propõe, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e muitos outros prejuízos irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004, CASSIANO *et al.*, 2009).

Após serem definidas as melhores condições de separação cromatográficas do método e da otimização das técnicas de preparo de amostra, foi realizada a validação dos métodos. Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação dos métodos analíticos foram: o limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica (calibração externa no solvente, superposição na matriz e curva trabalho), linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz. Estes parâmetros são sugeridos para validação de métodos analíticos pelo INMETRO, ANVISA e pelo guia de validação para análise de resíduos de pesticidas em alimentos da Comissão Europeia (SANCO, 2013).

4.8.1 Limite de detecção e quantificação

O LOD do instrumento (LOD_i) e o LOQ do instrumento (LOQ_i) foram estimados a partir da relação sinal/ruído calculada pelo “software” do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Para isso foi utilizada a padronização externa no solvente, com preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em metanol.

Como o método da DLLME e da DLLME-SFO apresentam um fator de concentração de 100 e 40 vezes respectivamente, o LOD do método (LOD_m) e o LOQ do método (LOQ_m) foram calculado dividindo o limite de detecção e o limite de quantificação do instrumento pelo fator de concentração de cada método.

4.8.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

A linearidade do instrumento e dos métodos foi avaliada pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por padronização externa no extrato branco da matriz. Também foi construída a curva trabalho, na qual as amostras de água mineral foram fortificadas em cada nível com a solução padrão dos analitos, passando então pela etapa de preparo de amostra otimizada e em seguida analisada por LC-ESI-MS/MS. Esta curva é aplicada para avaliar a performance dos métodos propostos, na

validação dos métodos e nos cálculos de recuperação (TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010).

Para a construção das curvas analíticas e trabalho, foram preparados três conjuntos de soluções:

1. Soluções preparadas através de diluições da solução padrão trabalho no solvente (metanol);
2. Soluções preparadas a partir de diluições da solução padrão de trabalho no extrato branco da matriz, extraído pelos métodos da DLLME e DLLME-SFO (pós fortificação);
3. Soluções obtidas a partir da extração das amostras de água mineral fortificadas com a solução padrão de trabalho (pré fortificação).

Os conjuntos das soluções 1 e 2 foram utilizados para calcular o efeito de matriz. E o conjunto de soluções 3 foi utilizado para calcular o desempenho dos métodos propostos (recuperação).

De acordo com as características de cada analito, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por isso, foi preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos 8 analitos com diferentes concentrações para cada um (descritas no item 4.4), e através de diluições sucessivas desta solução trabalho, foram construídas as curvas analíticas (no solvente, no extrato da matriz e curva trabalho). Tais curvas foram preparadas a partir do LOQ_i de cada analito, conforme descrito a seguir:

- 0,05; 0,25; 0,50; 0,75; 1,25 e 1,50 mg L⁻¹ para imidacloprido;
- 0,001; 0,005; 0,010; 0,015; 0,025 e 0,030 mg L⁻¹ para ciproconazol;
- 0,0005; 0,0025; 0,0050; 0,0075; 0,0125 e 0,0150 mg L⁻¹ para epoxiconazol e tebuconazol;
- 0,005; 0,025; 0,050; 0,075; 0,125 e 0,150 mg L⁻¹ para atrazina, simazina, imazapirique e imazetapir.

Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r), obtendo assim a linearidade do instrumento e do método.

4.8.3 Exatidão

Para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo, de acordo com as determinações da ANVISA e do ICH (do inglês, *International Conference Harmonisation*) (RIBANI *et al.*, 2004). Foram realizadas três fortificações das amostras “branco” em diferentes níveis de concentração. A recuperação dos compostos foi avaliada nas concentrações de 0,05; 0,25; 0,50 mg L⁻¹ para imidacloprido; 0,001; 0,005; 0,010 mg L⁻¹ para ciproconazol; 0,0005; 0,0025; 0,0050 mg L⁻¹ para epoxiconazol e tebuconazol e nas concentrações 0,005; 0,025; 0,050 mg L⁻¹ para atrazina, simazina, imazapique e imazetapir. As amostras foram fortificadas e submetidas ao processo de extração pelos métodos da DLLME e DLLME-SFO. As extrações referentes a cada nível de concentração foram realizadas em triplicata e cada extrato foi injetado três vezes no LC-ESI-MS/MS.

Para determinar as concentrações, substituiu-se os valores de área encontrados em cada nível na equação da curva trabalho. Para calcular as recuperações, substituiu-se os valores na equação 6:

$$\text{Recuperação(\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

C1= concentração do analito na amostra fortificada;

C2= concentração do analito na amostra não fortificada;

C3= concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

4.8.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis em triplicata, seguindo todo o procedimento de extração para os métodos da DLLME e DLLME-SFO, e injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das nove determinações foi calculado o desvio padrão relativo (RSD(%)). A precisão intermediária RSD_{pi}(%) foi realizada da mesma forma que a

repetibilidade, porém as amostras foram fortificadas em dois níveis de concentração e o procedimento foi avaliado em diferentes dias. Para os cálculos dos RSD% utilizou-se a equação 7, apresentada a seguir:

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.8.5 Efeito de matriz

Para o desenvolvimento do método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração.

Para a avaliação do efeito de matriz (EM), realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em metanol e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009). O cálculo foi efetuado através da equação 8:

$$EM \% = \frac{\text{inclinação } (X1) - \text{inclinação } (X2)}{\text{inclinação } (X2)} \times 100 \quad (8)$$

onde:

EM = efeito matriz

X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz (água mineral);

X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no solvente (metanol);

Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou entre +20 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.9 Aplicabilidade

Após a validação, os métodos foram aplicados em 5 diferentes amostras de água mineral, provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram extraídas empregando os métodos validados e avaliadas quanto a presença dos compostos em estudo.

5 Resultados e Discussões

5.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS

5.1.1 Otimização das condições cromatográficas

A separação cromatográfica dos oito analitos (atrazina, ciproconazol, epoxiconazol, imidacloprido, imazapique, imazetapir, simazina, tebuconazol) por LC-ESI-MS/MS, foi realizada utilizando a coluna XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 µm). Para a escolha da fase móvel foi comparado o uso de metanol, acetonitrila e água ultrapura. Utilizando acetonitrila e água ultrapura foi verificada melhor resolução cromatográfica, menor retenção na coluna, bem como uma maior sensibilidade. Quanto ao modo de eluição foi necessário utilizar a eluição por gradiente para garantir a separação cromatográfica dos analitos, além disso, cabe salientar que de acordo com COLLINS *et al.*, (2006) a eluição por gradiente permite obter maior simetria dos picos cromatográficos, melhor resolução e detectabilidade em menor tempo de análise. A Tabela 10 apresenta as condições do modo gradiente selecionado.

Tabela 10. Modo gradiente otimizado para a separação por LC-ESI-MS/MS

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	H ₂ O %	ACN %
	0,2	85	15
5	0,4	5	95
6	0,2	85	15
11	0,2	85	15

Quanto ao uso de modificadores orgânicos foram realizadas comparações entre a acidificação com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e acético. Porém a utilização de ácido fórmico mostrou-se mais eficiente para garantir a ionização dos analitos, proporcionando desta forma um aumento na sensibilidade das análises. A acidificação da fase móvel com ácido fórmico, considerado um aditivo orgânico mais volátil, é indicada para evitar que ocorra cristalização na interface do sistema LC-ESI-MS/MS. A acidificação da fase móvel também

influencia a fragmentação dos compostos a serem determinados melhorando a eficiência da ionização (CALDAS, 2009).

Na Figura 3 é apresentado o cromatograma total obtido para a separação dos agrotóxicos em estudo.

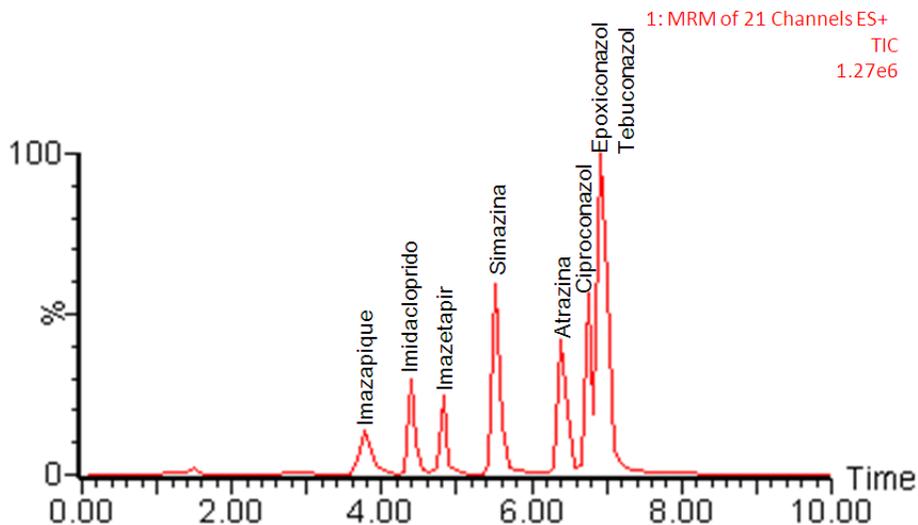


Figura 3. Cromatograma total da separação dos analitos por LC-ESI-MS/MS na concentração 1 mg L⁻¹.

5.1.2 Otimização dos parâmetros para a fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: temperatura da fonte ionização de 100 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 400 °C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L h⁻¹ e voltagem do capilar de 4 kV.

A Tabela 11 apresenta para os agrotóxicos determinados por LC-ESI-MS/MS, o modo de ionização (ESI+), os íons precursores e íons produtos. Para cada analito foram selecionadas duas transições características, o fragmento mais intenso (mais estável) foi utilizado para a quantificação e o segundo mais intenso para a confirmação. A voltagem do cone, a energia de colisão e o tempo de retenção dos analitos também são apresentados na Tabela 11. A Figura 4 ilustra os cromatogramas no modo MRM para a transição escolhida na quantificação dos agrotóxicos no sistema LC-ESI-MS/MS.

Quando os analitos são monitorados no modo positivo, suas moléculas são ionizadas através da adição de um próton de hidrogênio, dando origem aos

íons moleculares $[M+H]^+$ e em alguns casos, pela adição de sódio $[M+23]^+$ ou de um íon amônio $[M+18]^+$. A adição de um próton ou de um íon amônio é resultado da fase móvel, e a adição de sódio é resultado de sódio na fase móvel, no padrão ou na amostra analisada (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; TOMASINI, 2011a).

Tabela 11. Condições de fragmentação para determinação dos analitos no espectrômetro de massas e tempo de retenção (t_R)

Analitos	ESI	MRM transição (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	t_R (min)
Atrazina	+	216>174*	33	20	6,4
		216>104	31	31	
Imazapique	+	276>231*	9	21	3,8
		276>215,8	40	20	
Imazetapir	+	290>230*	40	20	4,8
		290>177	40	20	
Simazina	+	202>132*	35	18	5,6
		202>124	35	18	
Imidacloprido	+	256>209*	30	14	4,4
		256>175	11	27	
Ciproconazol	+	292>70*	35	20	6,8
		292>125	35	30	
Tebuconazol	+	308>70*	28	22	7,0
		308>125	40	20	
Epoconazol	+	330>121*	27	30	7,0
		330>123	27	30	

Tempo de permanência para cada transição monitorada: 0,3 s. (*)Transições utilizadas para a quantificação.

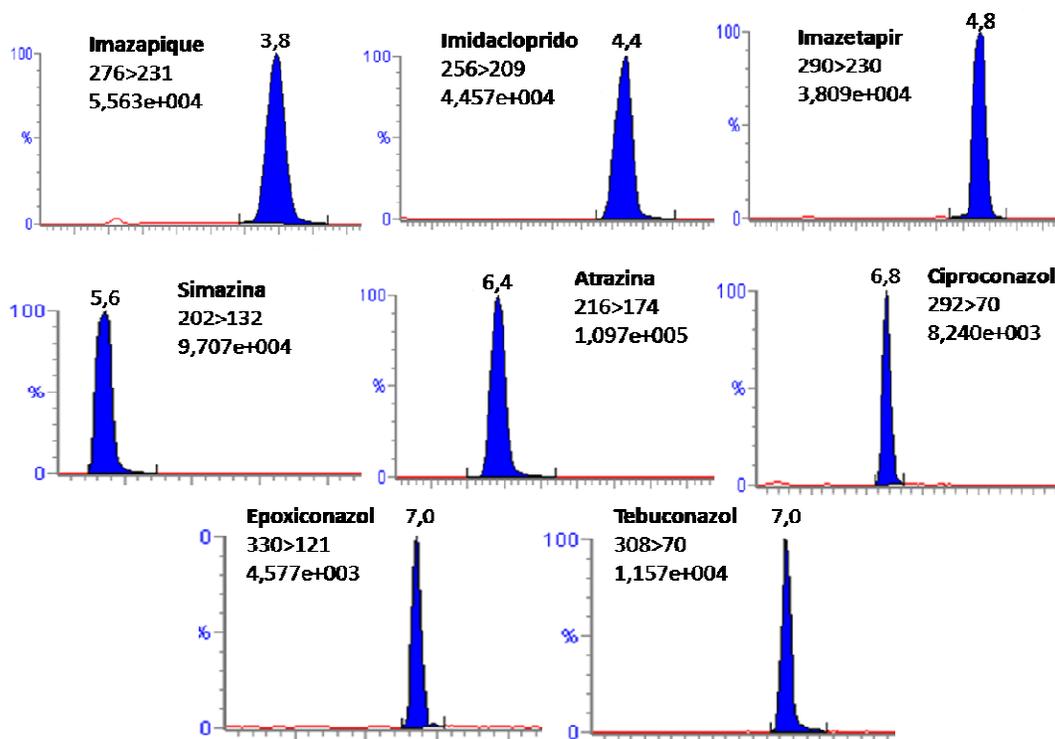


Figura 4. Cromatograma no modo MRM da transição monitorada para a quantificação.

5.2 Otimização do preparo de amostra por DLLME

5.2.1 Seleção do solvente extrator

De acordo com os resultados, o solvente extrator clorofórmio apresentou melhores percentuais de recuperação para imazapique, imazetapir e imidacloprido empregando a acetonitrila como solvente dispersor (Figura 5). Utilizando o diclorobenzeno obteve-se boas recuperações para atrazina, tebuconazol e epoxiconazol com a acetona como solvente dispersor (Figura 6). No entanto para a simazina melhores recuperações foram obtidas utilizando o monoclórobenceno (Figura 5) e para o ciproconazol o solvente extrator mais adequado foi o dicloroetano (Figura 6) ao utilizar a acetonitrila e a acetona como solventes dispersores, respectivamente. Menores percentuais de recuperação foram obtidos quando foi empregado o tetracloreto de carbono e tetracloreto de etileno como solventes extratores. Para todos os ensaios foram observados valores de RSD menores que 6%.

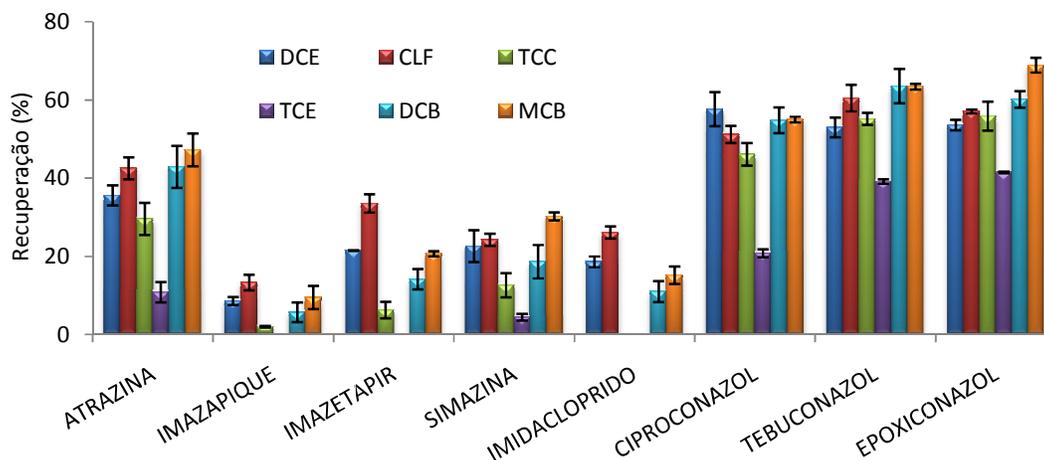


Figura 5. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetonitrila com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%). (DCE: Dicloroetano; CLF: Clorofórmio; TCC: Tetracloreto de Carbono; TCE: Tetracloetileno; DCB: Diclorobenzeno; MCB: Monoclorobenzeno). Para os analitos que não apresentam barras de recuperação não ocorreu à extração pelo respectivo solvente extrator.

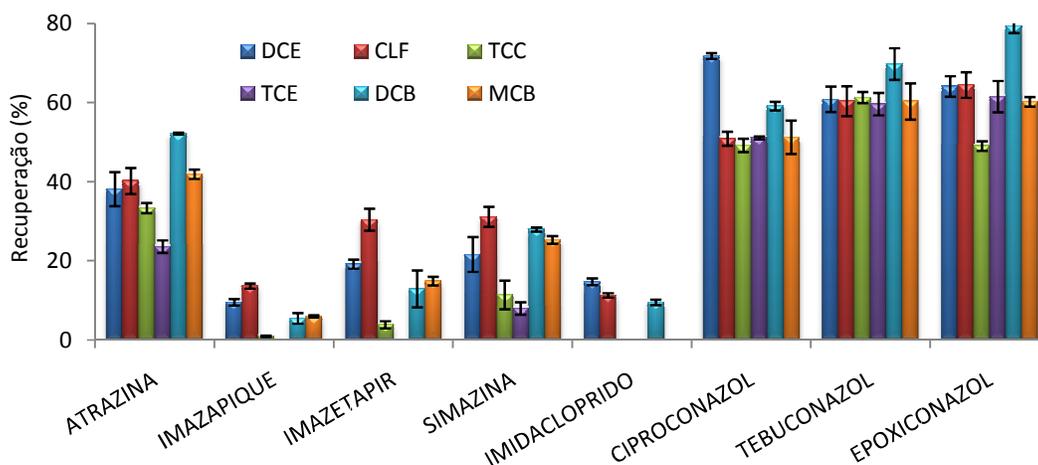


Figura 6. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetona com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%). (DCE: Dicloroetano; CLF: Clorofórmio; TCC: Tetracloreto de Carbono; TCE: Tetracloetileno; DCB: Diclorobenzeno; MCB: Monoclorobenzeno). Para os analitos que não apresentam barras de recuperação não ocorreu à extração pelo respectivo solvente extrator.

O comportamento heterogêneo observado para estes agrotóxicos pode ser explicado pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}). Esse coeficiente define a tendência dos agrotóxicos em distribuir-se entre o octanol e a água

(Andreu *et al.*, 2004). Os compostos em estudo apresentam ampla faixa de variação de K_{OW} , cujo intervalo apresenta-se entre 0,5 e 3,7(Tabela 4). Alguns desses analitos apresentam alta hidrofobicidade, com características mais apolares ($K_{OW} > 2,5$) outros são mais hidrofílicos, apresentando características mais polares ($K_{OW} < 2,5$). Esta diferença do valor de K_{OW} indica que pode ser encontrado um comportamento variado nas extrações de compostos pertencentes a diferentes classes químicas (MARTINS *et al.*, 2012).

Em função destes resultados optou-se por realizar novos ensaios utilizando a mistura dos solventes extratores dicloroetano, clorofórmio, monoclorobenzeno e diclorobenzeno empregando a acetonitrila como solvente dispersor.

Utilizando as misturas, a combinação de diclorobenzeno:monoclorobenzeno favoreceu a extração do tebuconazol e epoxiconazol 79 – 81%, respectivamente. No entanto a utilização de dicloroetano:diclorobenzeno aumenta a eficiência de extração do ciproconazol (80%). Para a atrazina, simazina, imazapique, imazetapir e imidacloprido melhores resultados foram obtidos utilizando a mistura de clorofórmio:monoclorobenzeno 43, 27, 24, 20, respectivamente (Figura 7). Para todos os ensaios foram observados valores de RSD menores que 4%.

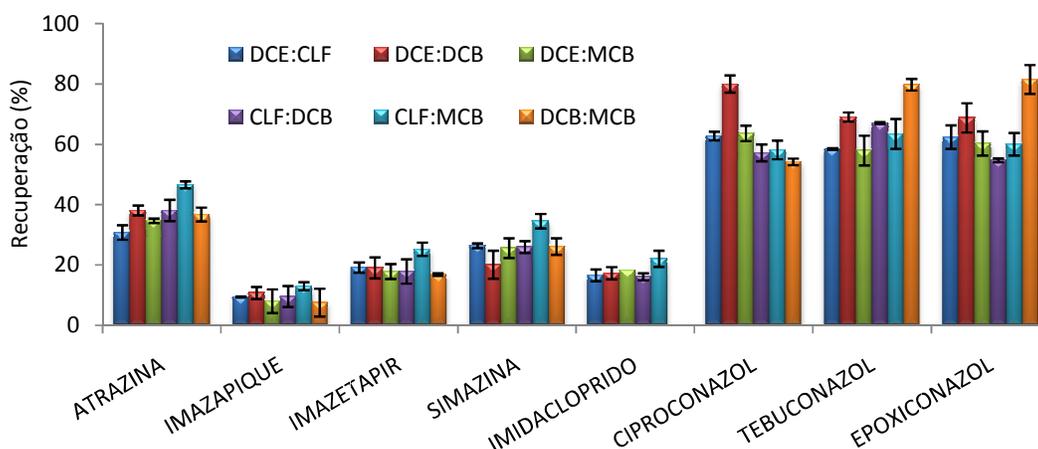


Figura 7: Efeito da mistura de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando a acetonitrila com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%).(DCE: Dicloroetano; CLF: Clorofórmio; DCB: Diclorobenzeno; MCB: Monoclorobenzeno). Para os analitos que não apresentam barras de recuperação não ocorreu à extração pelo respectivo solvente extrator.

Estes resultados foram submetidos ao teste de ANOVA (Teste de Tukey) com o objetivo de verificar se existe diferença significativa na recuperação dos analitos. Na Tabela 12 são apresentados os resultados.

Os resultados da análise de variância complementada pelo teste de Tukey, apontaram que existem diferenças extremamente significativas entre os solventes extratores utilizados, com valor de $p < 0,05$, isso indica que a mistura de clorofórmio:monoclorobenzeno é mais adequada para a extração da maioria dos compostos.

Por esta razão a mistura de clorofórmio:monoclorobenzeno foi selecionada como solvente extrator por proporcionar melhores percentuais de recuperação para a atrazina, simazina, imazapique, imazetapir e imidacloprido. Embora esta não tenha sido a melhor combinação de solventes extratores para tebuconazol, ciproconazol e epoxiconazol, recuperações superiores a 50% foram alcançadas utilizando estes solventes.

Tabela 12. Teste de Tukey para a seleção do solvente extrator

Agrotóxicos	DCE: CLF	DCE:DCB	DCE: MCB	CLF:DCB	CLF:MCB	DCB:MCB
Atrazina	1628,4 ^c	2014,5 ^b	1832,3 ^{b,c}	2014,9 ^b	2463,9 ^a	1943,5 ^b
Imazapique	235,3 ^{b,c}	268,2 ^{a,b}	200,3 ^{c,d}	239,2 ^{b,c}	323,4 ^a	188,4 ^d
Imazetapir	316,3 ^b	314,2 ^b	294,1 ^b	295,2 ^b	416,4 ^a	277,9 ^b
Simazina	454,1 ^b	346,4 ^c	440,4 ^b	446,3 ^b	593,9 ^a	449,3 ^b
Imidacloprido	39,1 ^b	40,7 ^b	43,1 ^b	38,0 ^b	52,0 ^a	-
Ciproconazol	2044,8 ^{b,c}	2606,2 ^a	2073,2 ^b	1862,9 ^{b,c}	1894,1 ^{b,c}	1766,1 ^c
Tebuconazol	6911,7 ^d	8166,0 ^b	1854,8 ^e	7929,0 ^{b,c}	7504,0 ^c	9432,8 ^a
Epoxiconazol	1918,9 ^a	2115,7 ^a	1854,8 ^a	1682,5 ^a	1846,7 ^a	2507,6 ^a

*Os valores correspondem à área do pico para cada uma das extrações. * Letras iguais, os valores não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Os melhores percentuais de recuperação obtidos, utilizando a mistura clorofórmio:monoclorobenzeno, podem ser justificados pelo fato destes agrotóxicos apresentarem polaridade variando entre polar a mediamente apolar, logo, a mistura de um solvente mais apolar como o monoclorobenzeno com outro solvente que apresenta características mais polares como o clorofórmio favorece a extração de agrotóxicos pertencentes a diferentes

classes químicas. Além disso, de acordo com BERIJANI *et al.*, (2006) os melhores resultados obtidos empregando a mistura clorofórmio:monoclorobenzeno podem ser explicados pelas interações entre o anel benzeno do monoclorobenzeno com o anel benzeno presente na estrutura dos analitos, o qual contribui para o aumento da eficiência de extração.

Em outros trabalhos, como o realizado por MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, (2011) o clorofórmio também foi utilizado para a extração carbamatos em amostra de suco. Já NAGARAJU *et al.*, (2007) utilizaram o monoclorobenzeno como solvente extrator para a determinação dos agrotóxicos pertencentes à classe das triazinas em amostras de água.

5.2.2 Seleção do solvente dispersor

Com relação à seleção do solvente dispersor a acetonitrila apresentou melhores resultados para a extração do imazapique, imazetapir, imidacloprido e simazina (Figura 5) e a acetona mostrou-se mais adequada para a extração da atrazina, tebuconazol, epoxiconazol e ciproconazol (Figura 6). Ao utilizar o metanol obtiveram-se menores recuperações para todos os analitos (8 – 81%) (Figura 8). Para todos os ensaios foram observados valores de RSD menores que 8%.

Devido aos resultados heterogêneos obtidos, optou-se por realizar novos ensaios utilizando uma mistura dos solventes dispersores acetona e acetonitrila em diferentes proporções. A Figura 9 apresenta as recuperações obtidas para cada um dos agrotóxicos utilizando a mistura dos solventes extratores e dispersores em diferentes proporções.

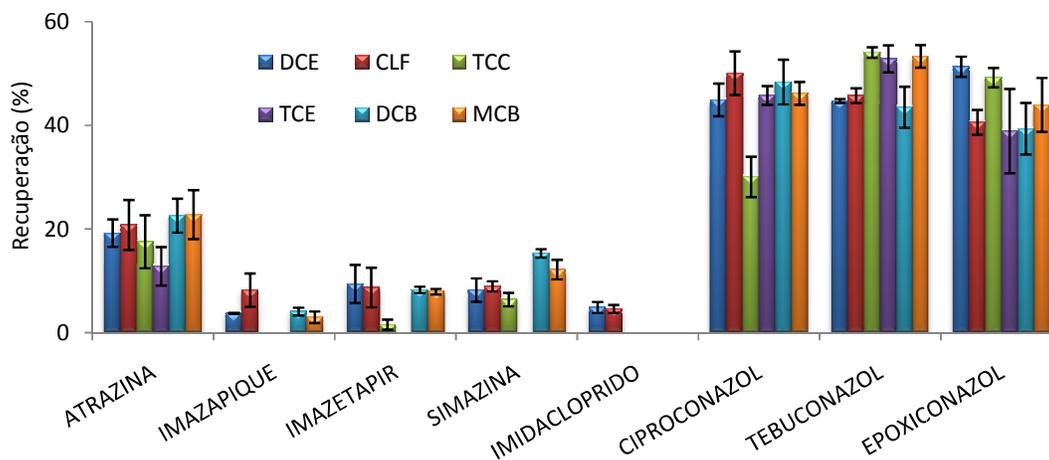


Figura 8. Efeito de diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos utilizando o metanol com solvente dispersor. Barras de erros indicam valores de RSD(%).(DCE: Dicloroetano; CLF: Clorofórmio; TCC: Tetracloreto de Carbono; TCE: Tetracloetileno; DCB: Diclorobenzeno; MCB: Monoclorobenzeno). Para os analitos que não apresentam barras de recuperação não ocorreu à extração pelo respectivo solvente extrator.

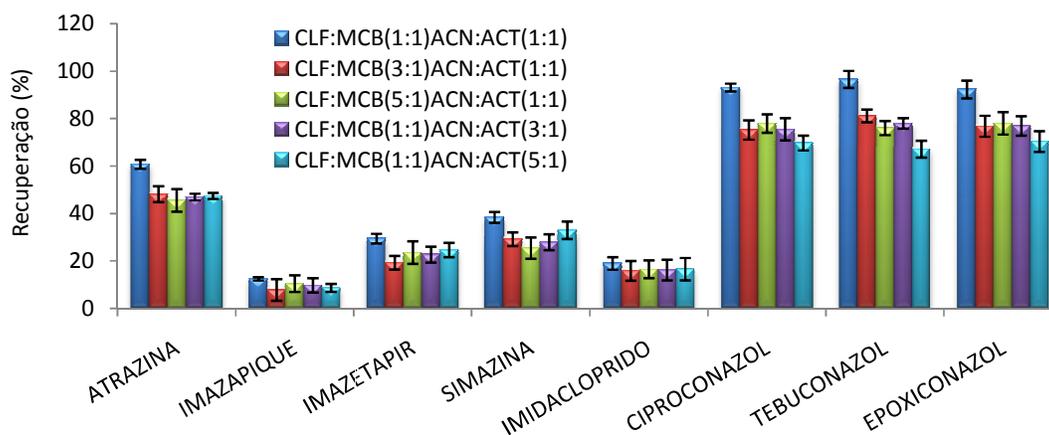


Figura 9. Efeito de diferentes proporções de solventes extratores e dispersores na recuperação dos analitos. Barras de erros indicam valores de RSD (%), (CLF: Clorofórmio; MCB: Monoclorobenzeno, ACN: Acetonitrila; ACT: Acetona).

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey para avaliar se havia diferença significativa entre os dados. De acordo com a Tabela 13 existe diferença extremamente significativa entre os solventes utilizados, com valor de $p < 0,05$, essa diferença indicou que as misturas de clorofórmio:monoclorobenzeno e acetona:acetonitrila ambas na proporção 1:1 (v/v) são mais adequadas para a extração de todos os compostos. Por esta

razão a mistura destes solventes na proporção 1:1 (v/v) foi selecionada como solventes extratores e dispersores para este estudo.

Tabela 13. Teste de Tukey para a seleção de diferentes proporções de solvente extrator e dispersor

Agrotóxicos	CLF:MCB(1:1):	CLF:MCB(3:1):	CLF:MCB(5:1):	CLF:MCB(1:1):	CLF:MCB(1:1):
	ACT:ACN(1:1)	ACT:ACN(1:1)	ACT:ACN(1:1)	ACT:ACN(3:1)	ACT:ACN(5:1)
Atrazina	7953019 ^a	6519326 ^b	6129613 ^b	6146072 ^b	6209325 ^b
Imazapique	1192143 ^a	832209 ^b	1157156 ^a	1057681 ^a	1170243 ^a
Imazetapir	1593008 ^a	1215716 ^c	1425960 ^b	1375717 ^{bc}	1473323 ^{ab}
Simazina	2498074 ^a	1991404 ^b	1871545 ^b	2004510 ^b	2155248 ^{ab}
Imidacloprido	146659 ^b	148273 ^b	167857 ^{ab}	173207 ^{ab}	193145 ^a
Ciproconazol	1372695 ^a	1073234 ^{a,b,c}	1072586 ^{a,b,c}	910058 ^{b,c}	744482 ^c
Tebuconazol	3167912 ^a	2401865 ^b	2373754 ^b	2072764 ^b	1786051 ^b
Epoxiconazol	1710240 ^a	1287283 ^b	1220383 ^b	1122727 ^b	911314 ^b

*Os valores correspondem à área do pico para cada uma das extrações. * Letras iguais, os valores não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Na literatura foi verificado que CORTADA *et al.*, (2009) utilizaram a acetona como solvente dispersor para a extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água. A acetonitrila também já foi empregada como solvente dispersor para a determinação de triazófos e carbaril em amostra de água por FU *et al.*, (2009).

5.2.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2³

O planejamento fatorial completo DCCR foi aplicado com o objetivo de definir as condições ótimas de extração através das superfícies de resposta. As variáveis avaliadas foram o volume das misturas dos solventes dispersores, extratores e pH. O DCCR foi composto por 17 ensaios com 6 experimentos nos pontos axiais (-1.68 como o nível mais baixo e 1.68 como o nível mais alto) e 3 experimentos nos pontos centrais, como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial completo 2³, com os resultados em área do pico para os analitos em estudo.

Ensaio	Variáveis										Área do pico				
	V ₀ mL	V _E µL	pH	Atrazina	Imazapique	Imazetapir	Simazina	Imidacloprido	Ciproconazol	Tebuconazol	Epoxiconazol				
1	-1 (1,4)	-1 (100)	-1 (2,4)	11836	1006	1709	2675	107	8506	24621	12848				
2	-1 (1,4)	-1 (100)	1 (3,6)	12285	547	1061	3295	89	8121	20153	12814				
3	-1 (1,4)	1 (200)	-1 (2,4)	15919	2220	2812	4958	224	9421	23571	13037				
4	-1 (1,4)	1 (200)	1 (3,6)	15705	996	1646	5161	176	9278	21884	13724				
5	1 (2,6)	-1 (100)	-1 (2,4)	8657	792	1238	1877	77	6346	30323	8435				
6	1 (2,6)	-1 (100)	1 (3,6)	13475	340	839	2870	66	10326	27459	18554				
7	1 (2,6)	1 (200)	-1 (2,4)	17826	1920	2809	4790	199	12322	32734	18509				
8	1 (2,6)	1 (200)	1 (3,6)	20252	1171	2225	5678	184	12590	30506	20326				
9	-1,68 (1)	0 (150)	0 (3)	14683	1593	2172	3964	135	76.28	19872	12587				
10	1,68 (3)	0 (150)	0 (3)	15431	945	1596	3307	89	10252	27812	18995				
11	0 (2)	-1,68 (50)	0 (3)	6118	179	383	909	22	6249	20746	15370				
12	0 (2)	1,68 (250)	0 (3)	25004	2247	3321	7187	211	14150	33597	22310				
13	0 (2)	0 (150)	-1,68 (2)	9846	1539	2364	2372	159	8633	30966	9018				
14	0 (2)	0 (150)	1,68 (4)	23051	771	1613	5918	145	13351	32284	22901				
15	0 (2)	0 (150)	0 (3)	22278	1726	2744	5650	170	13945	33298	22784				
16	0 (2)	0 (150)	0 (3)	20193	1677	2512	5291	156	12207	28981	20987				
17	0 (2)	0 (150)	0 (3)	17512	1571	2224	4729	132	9869	25504	17908				

V₀= Volume Solvente Dispensor, V_E= Volume Solvente Extrator

As condições ótimas de extração podem ser verificadas através do estudo das variáveis isoladamente. O volume de solvente dispersor apresentou um efeito significativo negativo (Tabela 15) para imazapique, imazetapir, simazina, imidacloprido, ciproconazol e epoxiconazol ($p < 0.043$), isso denota que, ao passar do maior nível para o menor nível de solvente dispersor há um aumento na área do pico, resultado numa melhor eficiência de extração. A Figura 10 apresenta algumas das superfícies de contorno, onde é possível constatar que o volume de solvente dispersor adequado para estes analitos é de 2 mL. No entanto o tebuconazol apresentou efeito significativo positivo ($p < 0.043$) e a atrazina não apresentou significância estatística. A utilização de 2 mL de solvente dispersor pode ser justificada pela densidade intermediária de um dos solventes extratores que compõe a mistura (clorofórmio $1,48 \text{ g cm}^{-3}$), devido a densidade apresentar reflexo direto na qualidade da emulsão formada e na subsequente separação das fases. Para solventes com uma densidade muito superior a da água, é necessário utilizar uma quantidade maior de solvente dispersor para provocar a emulsificação das fases, enquanto os solventes com densidades mais próximas da água poderão formar uma emulsão estável com uma menor quantidade do solvente dispersor (ALVES, 2010).

O estudo da variável volume de solvente extrator mostrou que os analitos atrazina, simazina, imazapique imazetapir, imidacloprido e ciproconazol apresentaram efeito significativo positivo (Tabela 15) ($p < 0.004$), indicando que a utilização de maior volume de solvente extrator proporciona melhor resultado. Através da superfície de contorno (Figura 10) é possível observar que o volume de solvente extrator adequado é de 250 μL .

Com relação à variável pH e com base no planejamento fatorial, imazapique e imazetapir apresentaram um efeito significativo negativo ($p < 0.006$), no entanto atrazina, simazina e epoxiconazol apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0.03$) e os analitos ciproconazol, imidacloprido e tebuconazol não apresentaram significância estatística (Tabela 15). O comportamento heterogêneo observado para estes analitos frente às mudanças de pH, pode ser justificado pela variação na polaridade destes compostos. De acordo com RAMEZANI *et al.*, 2009 a acidificação da amostra de água a valores de pH mais baixos que os valores dos pKa favorece a

extração dos agrotóxicos pertencentes a classe das imidazolinonas, como é o caso do imazapique e imazetapir. No entanto segundo WANG *et al.*, (2011) o efeito significativo positivo encontrado para atrazina e simazina é justificado pela diminuição da solubilidade em água das triazinas quando é utilizado valores de pH mais alto, devido as triazinas se manterem na forma desionizada, ou seja, menos polar, a qual aumenta a eficiência da extração por solventes orgânicos menos polares.

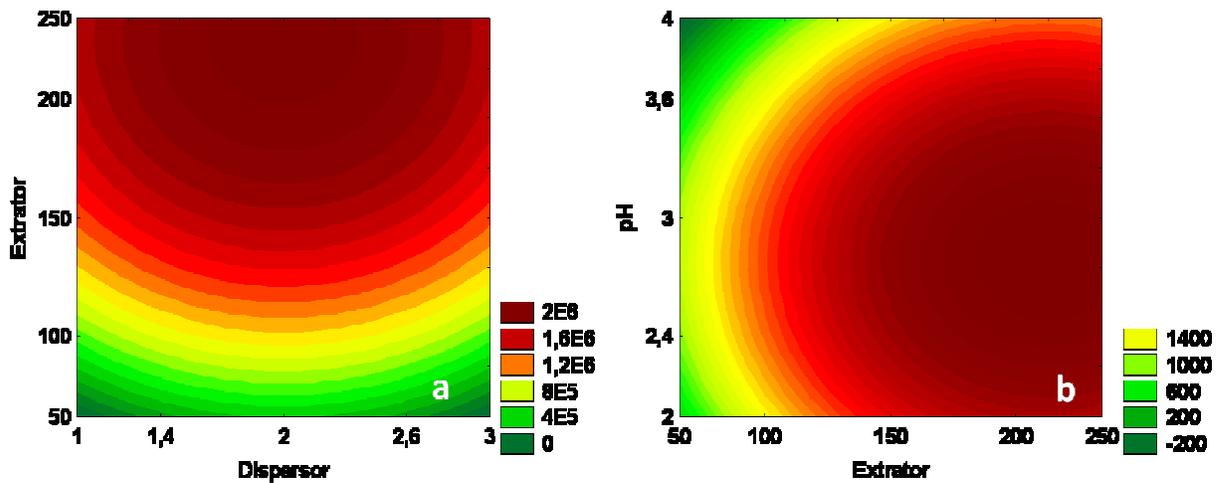


Figura 10. Superfície de contorno que representam a extração do imazapique (a) e imazetapir (b)

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) empregando o Fisher F -tests. Conforme os dados contidos na Tabela 16, o modelo é adequado dentro da faixa avaliada, devido aos valores de F_{cal} serem superiores aos valores do F_{tab} ($p < 0,043$). Estes resultados significativos permitiram construir as seguintes equações, considerando-se somente as variáveis com significância estatística.

$$AR_{Atrazina}: 20054,80 + 8085,49b + 4347,45c$$

$$AR_{Imazapique}: 1662,264 - 302,27a^2 - 341,678b^2 - 382,95c^2 + 1039,72b - 611,492c$$

$$AR_{Imazetapir}: 2498,665 - 466,246a^2 - 488,849b^2 + 1404,050b - 594,291c$$

$$AR_{Simazina}: 5220,42 - 1101,46a^2 + 2991,85b + 1269,36c$$

$$AR_{Imidacloprido}: 151,9005 - 21,6088a + 111,4289b$$

$$AR_{Ciproconazol}: 12027,06 - 2306,69a^2 + 3456,43b$$

$$AR_{Tebuconazol}: 29327,94 + 6465,27a$$

$$AR_{Epoconazol}: 20679,55 - 4196,96a^2 - 4077,92c^2 + 5262,89c$$

Onde AR é a área relativa detectada, “a” é o volume do solvente dispersor, “b” é o volume de solvente extrator e “c” o pH. Os resultados do teste F, cujo o F_{cal} foi entre 1,03 a 13,88 vezes superior ao F_{tab} , (Tabela 16), permitiram que o modelo expresso nas equações fosse utilizado para gerar as superfícies de contorno. O coeficiente de determinação (R^2) foi mais um dos indicativos utilizados para verificar a adequação ao modelo, pois os mesmos variaram entre 0,87 a 0,98, além disso, ambos os modelos gerados apresentaram valores consoantes com os obtidos experimentalmente (Tabela 17), sugerindo que os modelos são preditivos e significativos, sendo adequados para a obtenção da metodologia de superfície de resposta (RSM).

Tabela 16. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.

Fonte	Atrazina				Imazapique			
	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}
Variação								
Regressão	2,8. 10 ¹⁴	2	13,2	3,73	5,9. 10 ¹²	5	21	3,2
Resíduo	1,5. 10 ¹⁴	14			6,2. 10 ¹¹	11		
Total	4,4. 10 ¹⁴	16			6,5. 10 ¹²	16		
	Imazetapir				Simazina			
	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	8,7. 10 ¹²	4	17,98	3,25	3,7. 10 ¹³	3	23,8	3,41
Resíduo	1,4. 10 ¹²	12			6,8. 10 ¹²	13		
Total	1,1.10 ¹³	16			4,4. 10 ¹³	16		
	Imidacloprido				Ciproconazol			
	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	4,3. 10 ¹⁰	2	51,7	3,73	5,1. 10 ¹³	2	7,1	3,73
Resíduo	5,9. 10 ⁹	14			5,1. 10 ¹³	14		
Total	4,9. 10 ¹⁰	16			1,1. 10 ¹⁴	16		
	Tebuconazol				Epoconazol			
	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	1,4. 10 ¹⁴	1	9,47	4,54	1,7. 10 ¹⁴	3	3,87	3,73
Resíduo	2,2. 10 ¹⁴	15			1,9. 10 ¹⁴	13		
Total	3,6. 10 ¹⁴	16			3,6. 10 ¹⁴	16		

SQ: Soma quadrática; GL: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática; F_{CAL}: Valor de F calculado; F_{TAB}: Valor de F tabelado.

Tabela 17. Valores em área do pico preditos pelos modelos e os desvios relativos para cada analito

Ensaio	Área do pico																	
	Atrazina		Imazapique		Imazetapir		Simazina		Imidacloprido		Ciproconazol		Tebuconazol		Epoxiconazol			
	Valor Predito	Erro																
1	9670	18	935	7	1420	17	1951	20	93	13	8284	3	24080	2	13209	3		
2	14018	14	323	20	826	20	3220	2	93	4	8284	2	24080	20	18472	19		
3	17756	12	1974	11	2824	1	4943	1	204	9	11740	20	24080	2	13209	1		
4	22103	20	1363	20	2230	18	6212	19	204	16	11740	17	24080	10	18472	20		
5	9670	12	935	18	1420	15	1951	4	71	8	8284	18	30545	1	13209	18		
6	14018	4	323	5	826	2	3220	12	71	8	8284	20	30545	11	18472	0		
7	17756	1	1974	3	2824	1	4943	3	183	8	11740	5	30545	7	13209	16		
8	22103	9	1363	16	2230	1	6212	9	183	1	11740	7	30545	1	18472	9		
9	15887	8	1235	19	1839	15	3398	14	156	16	8377	10	21876	10	14293	14		
10	15887	3	1235	20	1839	15	3398	3	120	20	8377	18	32749	18	14293	19		
11	9088	19	305	18	627	16	1939	18	44	18	8000	19	27313	20	19375	18		
12	22686	9	2053	9	2988	10	6971	3	232	10	13813	2	27313	19	19375	13		
13	12231	20	1635	6	2443	3	3388	19	138	13	10906	20	27313	12	10035	11		
14	19543	15	606	21	1443	11	5523	7	138	5	10906	18	27313	15	18887	18		
15	15887	20	1662	4	2499	9	4455	21	138	19	10906	22	27313	18	19375	15		

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que ao utilizar a amostra acidificada a pH 3, 2 mL de solvente dispersor e 250 µL de solvente extrator obteve-se melhores áreas relativas do pico para todos os analitos, indicando que o emprego destas condições favorece a obtenção de melhores percentuais de recuperação para os agrotóxicos em estudo. Dos ensaios realizados o experimento 12 representa as condições ótimas de extração. No entanto, cabe ressaltar que as decisões sobre estas condições foram tomadas em função da maioria dos analitos, uma vez que, ao trabalhar com analitos multiclasse os mesmos possuem tendência de apresentar um comportamento variado nas extrações.

5.2.4 Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME

O procedimento otimizado baseou-se na injeção da mistura de 250 µL de clorofórmio:monoclorobenzeno (1:1, v/v) como solventes extratores e 2 mL de acetona:acetonitrila (1:1, v/v) como solventes dispersores em 10 mL de amostra aquosa acidificada a pH 3 com H₃PO₄ (1:1, v/v). No momento da mistura, uma solução turva é formada e as micro gotas do solvente extrator são dispersas na fase aquosa. Após realizar a centrifugação, durante 5 minutos a 2000 rpm, ocorre a sedimentação das micro gotas no fundo do tubo cônico.

Como a mistura de clorofórmio e monoclorobenzeno não apresenta um bom comportamento cromatográfico, a fase sedimentada foi removida com o auxílio de uma seringa, transferida para um frasco onde foi evaporada com o auxílio de nitrogênio e redissolvida em metanol. O volume utilizado para a redissolução foi de 100 µL, com o objetivo de se obter maior fator de concentração.

5.3 Otimização do preparo de amostra por DLLME-SFO

5.3.1 Seleção do solvente extrator e do solvente dispersor

De acordo com os resultados, o solvente extrator 1-undecanol favoreceu a extração da simazina, ciproconazol e epoxiconazol utilizando o metanol como solvente dispersor. Para o tebuconazol o solvente extrator mais apropriado também foi o 1- undecanol, porém para este analito o melhor solvente dispersor foi a acetonitrila. Já para a atrazina o solvente extrator que apresentou melhores percentuais de recuperação foi o 1-dodecanol utilizando o metanol como solvente dispersor (Figura 11). Para todos os ensaios foram observados valores de RSD menores que 10%.

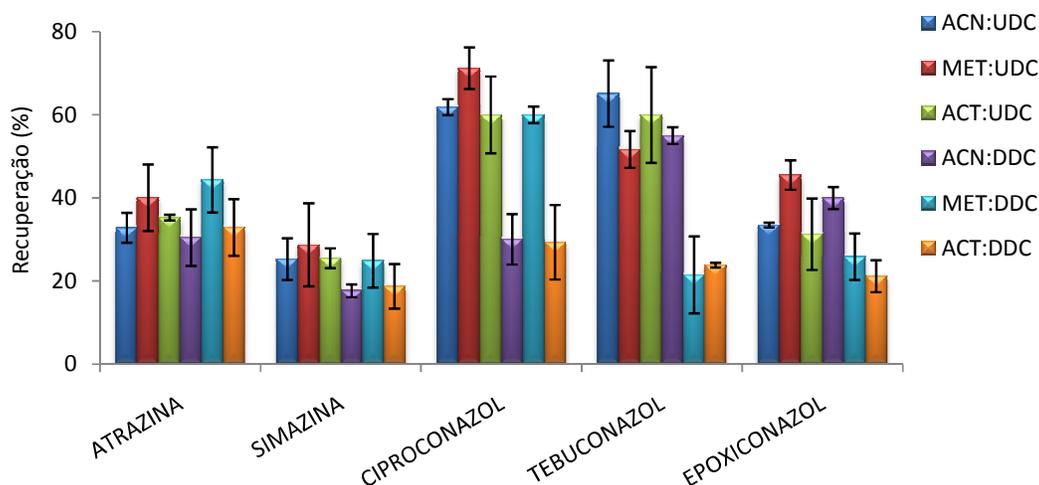


Figura 11. Seleção do solvente extrator e dispersor. Barras de erros indicam, valores de RSD(%) (UDC: 1-Undecanol; DDC: 1-Dodecanol; ACN: Acetonitrila; MET: Metanol; ACT: Acetona).

Estes resultados foram submetidos ao teste de Tukey para verificar a diferença significativa entre os dados. O teste de Tukey permite comparar as diferenças entre um conjunto de médias resultantes de uma extração, pois o mesmo leva em consideração o desvio padrão relativo, o qual é muito difícil de ser avaliado visualmente. Os resultados do teste de Tukey apresentados na Tabela 18 apontaram o 1-dodecanol como o solvente extrator mais adequado

para a extração de todos os analitos, motivo pelo qual este solvente foi selecionado para as análises subsequentes.

Tabela 18. Teste de Tukey para a seleção do solvente extrator e dispersor

Analitos	ACN:DDC	ACN:UDC	MEOH:DDC	MEOH:UDC	ACT:DDC	ACT:UDC
Atrazina	1417735 ^c	1820682 ^b	2064413 ^{a,b}	2223105 ^a	1531804 ^c	1956880 ^{a,b}
Simazina	636168 ^d	729166 ^{b,c,d}	896478 ^a	827826 ^{a,b}	674855 ^{c,d}	735125 ^{b,c}
Ciproconazol	734011 ^b	615179 ^{b,c}	1039979 ^a	708547 ^{b,c}	716842 ^{b,c}	596602 ^c
Tebuconazol	1964346 ^a	1806683 ^{a,b}	1346351 ^c	1433491 ^{b,c}	1493822 ^{b,c}	1788695 ^{a,b}
Epoxiconazol	1695642 ^a	370306 ^d	1335151 ^b	516649 ^c	151552 ^e	354824 ^d

*Os valores correspondem à área do pico para cada uma das extrações. * Letras iguais, os valores não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Além disso, o solvente extrator selecionado apresenta as seguintes vantagens: ponto de fusão entre 22 e 24°C e a formação de uma gota uniforme. O ponto de fusão entre 22 e 24°C favorece a solidificação da gota orgânica flutuante em menor tempo e a formação de uma gota uniforme contribui para a manipulação da técnica.

O 1-dodecanol já foi utilizado como solvente extrator em outros trabalhos como o desenvolvido por WANG *et al.*, (2011) para a determinação de triazóis em amostras de água.

Para a seleção do solvente dispersor o teste de Tukey indicou que o metanol foi mais adequado para a extração da atrazina, simazina ciproconazol e a acetonitrila favoreceu a extração do tebuconazol e do epoxiconazol (Tabela 18). Porém o metanol foi selecionado como solvente dispersor para esta técnica porque o mesmo favorece a extração das triazinas que apresentavam menores recuperações e desta forma a seleção deste solvente pode contribuir para obtenção de melhores resultados para estes analitos.

5.3.2 Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

Foi aplicado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com o objetivo de verificar quais variáveis podem influenciar significativamente no processo de extração por DLLME-SFO. As variáveis avaliadas foram o volume de solvente extrator e dispersor, pH e a concentração de NaCl. Na Tabela 19 é apresentada a matriz do planejamento e os valores em área do pico cromatográfico para cada um dos analitos após a aplicação do planejamento

fatorial fracionado. As respostas dos respectivos experimentos foram analisadas modo erro puro com 90% de significância e $p\text{-valor} < 0,1$. Na Tabela 20, estão apresentados os efeitos de cada variável independente avaliada. Com base no planejamento aplicado, somente a atrazina, simazina, ciproconazol e tebuconazol apresentaram algum efeito significativo. Isso significa que os demais analitos não dependem dos fatores em estudo, ou seja, com qualquer uma das condições empregadas para estas variáveis serão observados bons resultados.

Tabela 19. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com os resultados em área do pico para os analitos em estudo.

Ensaíos	Variáveis				Área do pico				
	Dispensor	Extrator	pH	NaCl	Atrazina	Simazina	Ciproconazol	Tebuconazol	Epoxiconazol
1	-1 (1)	-1(50)	-1(2)	-1(0)	1636	576	746	1316	488
2	1(3)	-1(50)	-1(2)	1(2)	1130	408	599	2310	579
3	-1(1)	1(150)	-1(2)	1(2)	2530	1257	1175	2527	801
4	1(3)	1(150)	-1(2)	-1(0)	480	290	127	819	247
5	-1(1)	-1(50)	1(8)	1(2)	3181	931	1371	2276	782
6	1(3)	-1(50)	1(8)	-1(0)	175	53	176	1411	65
7	-1(1)	1(150)	1(8)	-1(0)	2932	1321	1115	1385	612
8	1(3)	1(150)	1(8)	1(2)	1428	650	313	1320	311
9	0(2)	0(100)	0(5)	0(1)	2574	1166	1219	3715	1369
10	0(2)	0(100)	0(5)	0(1)	2419	1043	1307	3204	959
11	0(2)	0(100)	0(5)	0(1)	2372	992	1082	3256	1624

Tabela 20. Efeitos estimados das variáveis independentes na extração dos agrotóxicos

Variáveis	Atrazina			Simazina		
	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Solvente Dispensor	-1766,8	74,5	0,001	-671,1	63,3	0,008
Solvente Extrator	312,1	74,5	0,052	387,2	63,3	0,025
pH	484,9	74,5	0,022	105,7	63,3	0,236
NaCl	761,7	74,5	0,009	251,7	63,3	0,057
	Ciproconazol			Tebuconazol		
	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Solvente Dispensor	-798,2	80,4	0,010	-410,8	199,0	0,175
Solvente Extrator	-40,5	80,4	0,664	-315,5	199,0	0,253
pH	82,0	80,4	0,415	-145,1	199,0	0,541
NaCl	323,4	80,4	0,056	875,2	199,0	0,048

Valores em negrito apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$)

Quanto a análise individual dos efeitos observou-se que a variação do volume de solvente dispersor de 1 a 3 mL apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,01$) para atrazina, simazina e ciproconazol isso significa que a diminuição da proporção de solvente dispersor leva ao aumento da eficiência da extração. Assim sendo, no planejamento fatorial seguinte (item 5.3.3) foi avaliada uma nova faixa (0,5 a 2 mL). Já o aumento de 50 para 150 μL de solvente extrator apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,052$) para atrazina e simazina indicando que a utilização de maior volume de solvente extrator proporciona melhores resultados. Por isso o volume de solvente extrator foi estudado entre 150 e 250 μL no planejamento fatorial seguinte. A variação da concentração de NaCl (0 a 2%) apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,057$) para atrazina, simazina, ciproconazol e tebuconazol, isto mostra uma tendência em aumentar a área do pico ao utilizar altas concentrações de NaCl. No entanto optou-se por fixar esta variável em 2% pois de acordo com FERNÁNDEZ-ALBA, (2005) não é indicada a utilização de altas proporções de compostos não voláteis no LC-MS, pois os mesmos podem cristalizar na interface. Além disso, segundo WANG *et al*, (2011) a utilização de altas quantidades de NaCl pode causar a degradação da coluna cromatográfica. Quanto a variável pH a mesma apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,022$) somente para a atrazina, evidenciando que quanto maior for o valor de pH melhores serão os resultados para este analito. Porém optou-se por não ampliar a faixa de estudo, e sim fixar o pH em 7 pois de acordo com WANG *et al.*, (2011) alcalinização da amostra acima deste valor pode causar a hidrólise dos triazóis.

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionado, foi aplicado um planejamento fatorial completo, apenas com as variáveis de maior influência na extração, o volume de solvente extrator e dispersor. Já as variáveis pH e concentração de NaCl foram fixadas pois nestes casos não é recomendada a ampliação da faixa de estudo.

5.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2^2

O delineamento composto central rotacional foi aplicado a partir dos resultados do planejamento fatorial fracionado com o objetivo de definir as

condições ótimas de extração do método DLLME-SFO através das superfícies de contorno.

As variáveis avaliadas foram o volume do solvente dispersor e do solvente extrator. Na Tabela 21 estão apresentadas a matriz do planejamento fatorial e as áreas do pico obtidas após os experimentos para cada um dos analitos. As variáveis fixadas foram a concentração de NaCl (2%) e o pH (7).

Tabela 21. Matriz do DCCR, com as áreas do pico obtidas para cada analito em estudo.

Ensaio	Variáveis		Área do pico				
	Volume Dispersor	Volume Extrator	Atrazina	Simazina	Ciproconazol	Tebuconazol	Epoxicinazol
1	-1 (0,7)	-1 (165)	3992638	1804681	1480768	5896921	1515504
2	-1 (0,7)	1 (235)	3842304	1983503	1360778	4439896	1332894
3	1 (1,8)	-1 (165)	3680228	1638845	1268334	3758526	1448043
4	1 (1,8)	1 (235)	3924974	1902287	1269139	3593698	1407821
5	-1,41 (0,5)	0(200)	3966116	2051324	1338180	4401984	1612625
6	1,41 (2)	0 (200)	3588397	1793715	1284890	3268763	1222411
7	0 (1,25)	-1,41 (150)	4248372	1882133	1396418	3629865	1361436
8	0 (1,25)	1,41 (250)	4168768	2380781	1481127	3289837	1303106
9	0 (1,25)	0 (200)	4051936	2069158	1445194	3233901	1352898
10	0(1,25)	0(200)	3861833	1975626	1303929	3116625	1252811
11	0 (1,25)	0 (200)	4012168	1960519	1374540	3355081	1272042

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA empregando o Fisher *F*-tests, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no modo MS residual.

Na Tabela 22 pode ser observado que somente atrazina e simazina apresentaram efeito significativo e o volume do solvente extrator apresentou efeito significativo positivo para a simazina. O valor positivo apresentado indica que quando se passa do nível mínimo para o nível máximo desta variável, ocorre um aumento na resposta analítica, e quanto maior o valor mais significativa é a variável. Já o volume do solvente dispersor apresentou efeito significativo negativo para a atrazina. O valor negativo indica que um volume menor de solvente dispersor deveria ser utilizado.

Tabela 22. Efeitos estimados das variáveis independentes na extração dos analitos

Variáveis	Atrazina			Simazina		
	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Dispensor(L)	-190979	85064	0,074735	-152841	96473	0,173981
Dispensor(Q)	-264494	101247	0,047534	-176578	114826	0,184712
Extrator(L)	-4541	85064	0,959493	286865	96473	0,031031
Extrator(Q)	166819	101247	0,160344	32360	114826	0,789377

Valores em negrito apresentaram efeito significativo

A partir dos dados de ANOVA (teste F de *Fisher*) foi possível concluir que os valores dos coeficientes de regressão (R^2) 0,89 para a atrazina e 0,86 para a simazina são significativos e preditivos. Estes resultados permitiram construir as seguintes equações, considerando-se somente as variáveis com significância estatística.

$$AR_{Atrazina}: 3975312,6 - 264494,4a^2$$

$$AR_{Simazina}: 2001768 + 286864,6b$$

Onde AR é a área relativa detectada, “a” é o volume do solvente dispensor, “b” é o volume de solvente extrator.

A partir da análise dos dados contidos na Tabela 23 foi possível perceber valores de F calculado maiores em relação aos valores de F tabelado, onde a razão entre F_{cal}/F_{tab} foi de 12,4 e 15,3 para a atrazina e simazina respectivamente. Isso evidencia um ajuste em ambos os modelos gerados para otimização do sistema. Além disso, também foram calculados através da equação 5 os desvios relativos dos modelos de regressão (Tabela 24), onde pode-se perceber desvios abaixo de 10% para todos os tratamentos. A boa concordância entre os valores preditos e os observados, juntamente com os resultados positivos da ANOVA, permitem plotar as superfícies de contorno (Figura 12), possibilitando a análise dos dados de uma forma global. Pode-se notar através destas superfícies que o volume de solvente dispensor adequado para este estudo deve ser de 1,25 mL. Já o volume de solvente extrator indicado é de 250 µL. Dos ensaios realizados o experimento oito representa as condições ótimas de extração.

Tabela 23. Parâmetros de ANOVA no modo MS residual.

Fonte	Atrazina					Simazina				
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	1,51, 10 ¹¹	1	1,52, 10 ¹¹	6,91	0,49	1,64, 10 ¹¹	1	1,65, 10 ¹¹	7,54	0,49
Resíduo	2,23, 10 ¹¹	9	2,49, 10 ¹⁰			1,96, 10 ¹¹	9	2,18, 10 ¹⁰		
Total	3,75, 10 ¹¹	10				3,61, 10 ¹¹	10			

SQ: Soma quadrática; GL: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática; F_{cal}: Valor de F calculado; F_{tab}: Valor de F tabelado.

Tabela 24. Valores em área do pico preditos pelos modelos e os desvios relativos para cada analito

	Área do pico			
	Atrazina		Simazina	
	Valor Predito	Desvio Relativo	Valor Predito	Desvio Relativo
1	3740629	6	2151797	10
2	3740629	4	1746853	7
3	4054139	3	1805728	1
4	4054139	1	2092922	6
5	4054139	5	2092922	10
6	4054139	5	1805728	10
7	4054139	1	1949325	9
8	3896446	2	1949325	5
9	3896446	1	1949325	6
10	3896446	6	1949325	1
11	3896446	1	1949325	1

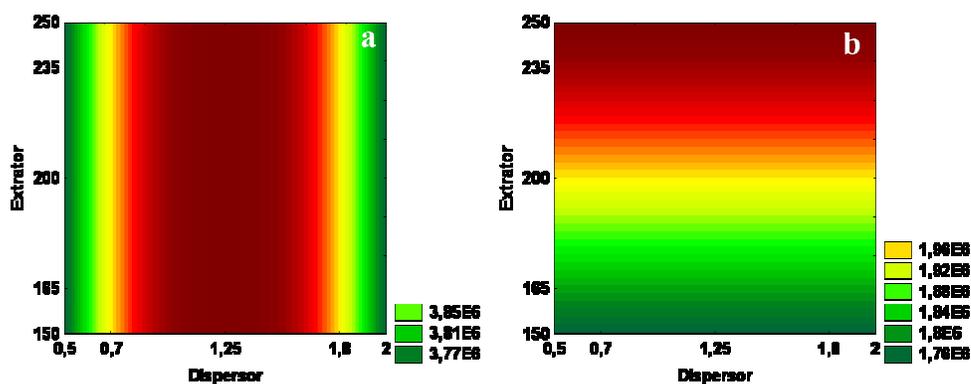


Figura 12. Superfícies de contorno que representam a extração de atrazina (a) e simazina (b).

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que ao utilizar 1,25 mL de solvente dispersor, 250 µL de solvente extrator e a amostra neutralizada a pH 7 contendo 2% de NaCl, (condições fixadas no planejamento fatorial fracionado, item 5.3.2), obtêm-se melhores áreas relativas do pico para todos os analitos, indicando que o emprego destas condições favorece a obtenção de melhores percentuais de recuperação para os agrotóxicos em estudo.

De acordo com CHANG *et al.*, (2010) e LEONG *et al.*, (2008) o aumento da eficiência da extração empregando baixo volume de solvente dispersor ocorre porque a utilização de maiores volumes de solvente dispersor aumenta a solubilidade dos analitos e do solvente extrator na amostra aquosa e diminui a eficiência da extração. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, pois LIU *et al.*, (2010) realizaram a determinação de piretróides em amostra de água e também utilizaram 1,25 mL de solvente dispersor.

5.3.4 Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME-SFO

O procedimento otimizado baseou-se na injeção da mistura de 250 µL de 1-dodecanol como solvente extrator e 1,25 mL de metanol como solvente dispersor em 10 mL de amostra aquosa contendo 2% de NaCl e neutralizada a pH 7 com H₃PO₄ (1:1, v/v). No momento da mistura, uma solução turva é formada e as micro gotas do solvente extrator são dispersas na fase aquosa. Posteriormente a solução é centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm e em seguida é colocada em banho de gelo por 5 minutos. Após a gota orgânica flutuante é removida com o auxílio de uma espátula e injetada no sistema cromatográfico para a sua determinação.

5.4 Validação dos métodos

5.4.1 Limite de Detecção e de Quantificação

Na Tabela 25, são apresentados os valores do limite de detecção do instrumento, o limite de quantificação do instrumento, o limite de detecção do método e o limite de quantificação do método para a DLLME e DLLME-SFO

respectivamente. Na determinação do LOQ pelo método da DLLME, foi considerado um fator de concentração de 100 vezes, e para a DLLME-SFO 40 vezes. Os valores de LOQ do instrumento foram entre 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considerando a etapa de concentração, os valores do LOQ para o método da DLLME ficaram entre 5 e 500 ng L^{-1} e para a DLLME-SFO 12,5 a 125 ng L^{-1} .

Tabela 25. Limites detecção e quantificação instrumental ($\mu\text{g L}^{-1}$) e dos métodos (ng L^{-1})

Agrotóxicos	LOD _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD _m (ng L^{-1})		LOQ _m (ng L^{-1})	
			DLLME		DLLME-SFO	
Atrazina	1,5	5	15	50	37,5	125
Imazapique	1,5	5	15	50	-	-
Imazetapir	1,5	5	15	50	37,5	125
Simazina	1,5	5	15	50	37,5	125
Imidacloprido	15	50	150	500	-	-
Ciproconazol	0,35	1	3,5	10	8,75	25
Tebuconazol	0,15	0,5	1,5	5	3,75	12,5
Epoxiconazol	0,15	0,5	1,5	5	3,75	12,5

A legislação que regulamenta o controle da qualidade da água mineral no Brasil é a Resolução de Diretoria Colegiada Nº, 274, de 22 de Setembro de 2005. Nesta resolução somente atrazina e simazina dentre os 8 agrotóxicos selecionados para este estudo estão registrados. Estes herbicidas apresentam um limite máximo permitido de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, os métodos desenvolvidos neste estudo são adequados para o monitoramento de resíduos dos agrotóxicos estudados em amostras de água mineral, pois os níveis de quantificação atingidos estão abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

5.4.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

A faixa linear de todas as curvas analíticas foram construídas a partir do LOQ do método de cada composto em seis níveis de concentração (LOQ, 5, 10, 15, 25 e 30 vezes superior ao LOQ) para os métodos da DLLME e DLLME-SFO. Nas Tabelas 26, 27 e 28 estão apresentadas as faixas lineares, as equações das retas e os valores do coeficiente de correlação linear (r) para as curvas no solvente, no extrato e a curva trabalho, as quais foram avaliadas neste estudo para ambos os métodos.

Tabela 26. Resultados obtidos para as curvas analíticas

Agrotóxicos	Faixa Linear $\mu\text{g L}^{-1}$	DLLME		DLLME-SFO	
		Curva Analítica Solvente	r	Curva Analítica Solvente	r
Atrazina	5-150	$y = 167018,66x - 74,05$	0,999	$y = 530592,58x + 149,89$	0,999
Imazapique	5-150	$y = 109828,86x - 145,75$	0,999	-	-
Imazetapir	5-150	$y = 68653,01x - 33,66$	0,999	$y = 144265,79x - 292,96$	0,999
Simazina	5-150	$y = 180997,03x - 349,34$	0,999	$y = 368405,32x - 421,97$	0,999
Imidacloprido	50-1500	$y = 9623,4x - 29,1$	0,999	-	-
Ciproconazol	1-30	$y = 47030,10x - 12,73$	0,999	$y = 151885,70x - 118,06$	0,999
Tebuconazol	0,5-15	$y = 129235,75x + 28,03$	0,999	$y = 1301103,22x + 554,72$	0,999
Epoxiconazol	0,5-15	$y = 50196,62x - 1,40$	0,999	$y = 1346658,96x - 58,81$	0,999

Tabela 27. Resultados obtidos para a curvas no extrato e curva trabalho para a DLLME

Agrotóxicos	DLLME			
	Curva Analítica Extrato	r	Curva Trabalho	r
Atrazina	$y = 170680,32x - 82,67$	0,999	$y = 299929,35x - 1585,87$	0,999
Imazapique	$y = 111100,80x + 121,02$	0,999	$y = 32813,76x - 116,73$	0,999
Imazetapir	$y = 68771,24x + 60,55$	0,999	$y = 43565,76x - 31,26$	0,999
Simazina	$y = 174818,65x + 150,58$	0,999	$y = 151056,87x - 693,42$	0,999
Imidacloprido	$y = 466915,84x - 109,22$	0,999	$y = 29472,14x - 55,18$	0,999
Ciproconazol	$y = 42998,06x - 5,00$	0,999	$y = 151852,68x - 109,46$	0,999
Tebuconazol	$y = 123704,29x + 76,53$	0,999	$y = 574736,24x + 126,02$	0,999
Epoxiconazol	$y = 47798,23x - 12,04$	0,999	$y = 237980,84x - 29,10$	0,999

Tabela 28. Resultados obtidos para as curvas no extrato e curva trabalho para a DLLME-SFO

Agrotóxicos	DLLME-SFO			
	Curva Analítica Extrato	r	Curva Trabalho	r
Atrazina	$y = 538436,61x + 452,58$	0,998	$y = 340051,38x + 968,75$	0,997
Imazapique	-		-	-
Imazetapir	$y = 140800,23x + 103,55$	0,997	$y = 1440,64x + 12,61$	0,998
Simazina	$y = 364160,84x + 816,66$	0,999	$y = 163533,80x + 423,03$	0,999
Imidacloprido	-		-	-
Ciproconazol	$y = 151059,12x + 22,22$	0,999	$y = 577146,85x + 230,43$	0,998
Tebuconazol	$y = 1341181,19x + 1016,16$	0,997	$y = 2381023,98x + 743,31$	0,998
Epoxiconazol	$y = 1261463,56x + 500,54$	0,999	$y = 1050473,70x + 466,76$	0,998

A partir dos resultados obtidos pelas equações das retas para o método da DLLME e da DLLME-SFO, pode-se concluir que o modelo linear é adequado, já que os coeficientes de determinação (r) foram maiores que 0,997 para todas as curvas analíticas construídas. Além disso, todos os valores de r estão de acordo com os valores recomendados segundo as orientações da ANVISA e INMETRO, os quais sugerem valores de r igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente. A curva trabalho foi construída com a finalidade de verificar a linearidade de todo o método analítico, abrangendo desde a etapa de preparo de amostra até as análises no LC-ESI-MS/MS, e verificou-se boa linearidade para todos os compostos estudados utilizando-se ambos os métodos.

5.4.3 Exatidão (Recuperação)

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação, em três níveis de concentração. O processo de extração foi realizado empregando os métodos DLLME e DLLME-SFO. Os valores de recuperação foram calculados a partir das concentrações adicionadas antes da extração e obtidas utilizando a curva trabalho.

Para ambos os métodos a exatidão foi avaliada ao nível do LOQ, 5 e 10 vezes maior que o LOQ de cada composto. Na Tabela 29 estão apresentados os valores de recuperação para cada nível de concentração. As recuperações para os agrotóxicos em estudo foram entre 102 e 120%, com RSD variando

entre 1,5 a 10% para o método da DLLME e recuperações entre 70 e 118%, com RSD menores que 19% para a DLLME-SFO, indicando que ambos os métodos proposto apresentaram resultados satisfatórios e estão de acordo com a faixa estabelecida (de 70 à 120% com precisão de até $\pm 20\%$) (ANVISA e INMETRO).

Tabela 29. Nível de fortificação, recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para cada analito

Agrotóxicos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DLLME		Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DLLME-SFO	
		R (%)	RSD (%)		R (%)	RSD (%)
Atrazina	0,05	119	10	0,125	75	5
	0,25	114	7	0,625	96	4
	0,5	102	3	1,25	94	5
Imazapique	0,05	119	10	-	-	-
	0,25	114	8	-	-	-
	0,5	106	7	-	-	-
Imazetapir	0,05	119	9	0,125	70	2
	0,25	111	4	0,625	93	11
	0,5	102	2	1,25	85	14
Simazina	0,05	119	9	0,125	81	10
	0,25	109	5	0,625	97	4
	0,5	104	3	1,25	100	6
Imidacloprido	0,5	120	4	-	-	-
	0,25	116	3	-	-	-
	5	107	2	-	-	-
Ciproconazol	0,01	120	10	0,025	89	14
	0,05	117	6	0,125	104	12
	0,1	110	2	0,25	98	4
Tebuconazol	0,005	120	10	0,0125	118	11
	0,025	117	7	0,0625	112	13
	0,05	109	5	0,25	95	7
Epoxiconazol	0,005	118	10	0,0125	100	19
	0,025	110	9	0,0625	109	15
	0,05	105	4	0,25	93	7

5.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada para os métodos empregando DLLME e DLLME-SFO em termos de repetibilidade (RSD_r), e precisão intermediária (RSD_{pi}). A estimativa destes parâmetros seguiu as recomendações da validação de métodos cromatográficos, no qual as recuperações devem ser entre 70 e 120% e, para a faixa de trabalho avaliada, a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (IMMETRO e ANVISA).

A repetibilidade foi avaliada em três níveis de fortificação para cada analito ao nível do LOQ, 5 e 10 vezes maior que o LOQ e a precisão intermediária foi avaliada ao nível de 5 e 10 vezes maior que o LOQ para ambos os métodos.

Os valores de RSD para os estudos de repetibilidade (RSD_r) ficaram na faixa de 2 - 10% e 2 - 18% para o método empregando DLLME e DLLME-SFO respectivamente (Tabela 29), e para a precisão intermediária os valores de (RSD_{pi}) variaram de 1 - 8% e 2- 13% para o método da DLLME e da DLLME-SFO respectivamente (Tabela 30).

Tabela 30. Nível de fortificação, recuperação (R%) e precisão intermediária (RSD_{pi}%) para os analitos

Agrotóxicos	Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	DLLME		Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	DLLME-SFO	
		R (%)	RSD _{pi} (%)		R (%)	RSD _{pi} (%)
Atrazina	0,25	98	3	0,625	88	2
	0,5	92	4	1,25	86	4
Imazapique	0,25	110	2	-	-	-
	0,5	108	4	-	-	-
Imazetapir	0,25	98	6	0,625	76	13
	0,5	96	2	1,25	80	2
Simazina	0,25	108	3	0,625	95	2
	0,5	104	4	1,25	90	2
Imidacloprido	0,25	107	1	-	-	-
	5	102	1	-	-	-
Ciproconazol	0,05	95	8	0,125	90	10
	0,1	92	3	0,25	86	6
Tebuconazol	0,025	106	4	0,0625	92	9
	0,05	100	6	0,25	82	4
Epoxiconazol	0,025	100	3	0,0625	89	9
	0,05	97	1	0,25	86	4

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a repetibilidade e a precisão intermediária foram adequadas para as determinações analíticas em estudo, portanto, os métodos estão de acordo com os parâmetros cromatográficos sugeridos pelas agências reguladoras.

5.4.5 Efeito de Matriz

A existência de efeito matriz para ambos os métodos da DLLME e DLLME-SFO foi avaliado através das inclinações das curvas de calibração no solvente e no extrato da matriz, de acordo com a equação descrita por ECONIMOU *et al.*, (2009) (item 4.8.5).

O efeito matriz foi diferente para cada analito, sendo observado enriquecimento ou supressão de sinal para ambos os métodos (Figura 13 e 14). No entanto de acordo com ECONOMOU (2009) os valores de efeito de matriz (EM) entre -20% e 20% que foram observados são considerados baixos. Estes resultados encontrados podem ser justificados pelas características da

água mineral devido a mesma ser caracterizada por apresentar elevado grau de pureza, uma vez que a sua infiltração no solo e o seu longo tempo de permanência no subsolo reduz significativamente a quantidade de matéria orgânica (PETRACCIA *et al.*, 2005).

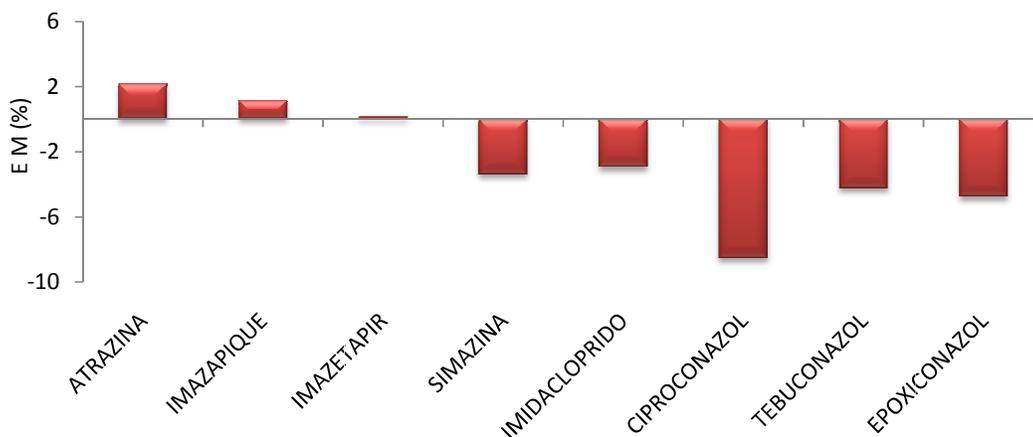


Figura 13. Efeito de matriz para o método da DLLME

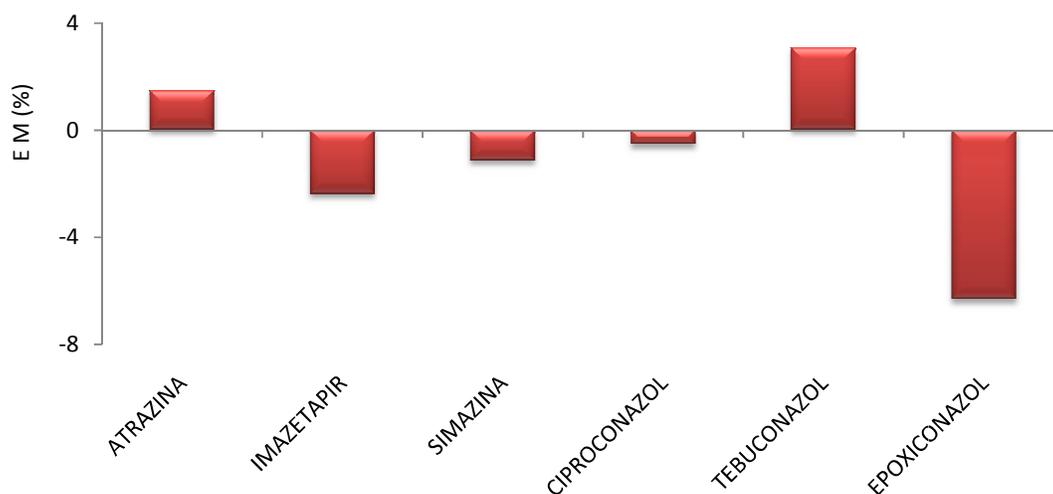


Figura 14. Efeito matriz para o método da DLLME-SFO

O efeito matriz também pode ser observado através da inclinação das curvas preparadas no solvente e no extrato da matriz. Quando há sobreposição das curvas não é observado efeito matriz; se a inclinação da curva no extrato for menor, indica supressão de sinal; e se a inclinação da curva no extrato for maior, indica enriquecimento de sinal (GOSETTI *et al.*, 2010; TOMASINI, 2011a). Pode ser observada na Figura 16 (Apêndice A) a sobreposição da

curva analítica para todos os analitos indicando um baixo efeito de matriz, ou seja, os componentes presentes no extrato da matriz não interferem significativamente na análise cromatográfica. Estes resultados indicam mais uma vantagem das técnicas de DLLME comparadas a outros métodos multiresíduos como a SPE onde geralmente é observado alto efeito de matriz (LISSALDE *et al.*, 2011).

Dessa maneira para a quantificação de resíduo de agrotóxico em amostra de água mineral por LC-ESI-MS/MS não é necessário utilizar a curva analítica preparada no extrato branco da matriz.

5.4.6 Aplicabilidade dos métodos

Os métodos desenvolvidos foram aplicados para a determinação de resíduos de atrazina, simazina, imazapique, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol e epexiconazol em 5 amostras de água mineral provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

As amostras de água mineral foram preparadas conforme os métodos validados. Não foram encontrados resíduos destes agrotóxicos nas amostras analisadas.

5.4.7 Resultados da comparação entre a extração na água mineral não gaseificada e gaseificada por DLLME

Foi realizado um comparativo entre a extração dos agrotóxicos na água mineral gaseificada e não gaseificada. As amostras de água mineral foram fortificadas no nível de concentração de 5 vezes superior ao LOQ de cada composto. Na Figura 15 estão apresentadas as recuperações para os agrotóxicos com cada uma das amostras.

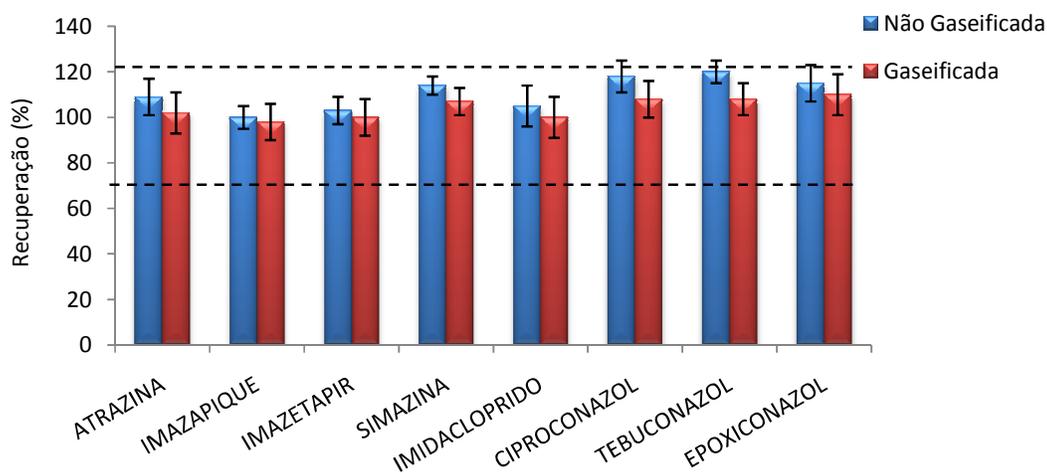


Figura 15. Recuperação dos analitos pela DLLME na água gaseificada e não gaseificada. Barras de erros indicam valores de RSD(%).

Foram alcançados bons percentuais de recuperação e baixos valores de RSD para todos os compostos utilizando as duas amostras de água mineral. Estes resultados indicam que o método da DLLME otimizado pode ser empregado tanto na água mineral gaseificada e não gaseificada.

5.4.8 Comparação entre os métodos da DLLME e DLLME-SFO

A Tabela 31 relaciona as principais diferenças dos métodos otimizados por DLLME e DLLME-SFO. A quantificação dos agrotóxicos foi realizada pela curva trabalho para ambos os métodos.

Tabela 31. Principais diferenças entre os métodos

Parâmetros	DLLME	DLLME-SFO
LOQ (ng L ⁻¹)	5 - 500	12,5 - 125
LOD (ng L ⁻¹)	1,5 - 150	3,75 - 37,5
Recuperação (%)	102 - 120	70 - 118
RSD (%)	2 - 10	2 - 18
Adição de sal	-	2%

Com relação aos limites de detecção e quantificação a DLLME apresentou limites mais baixos que a DLLME-SFO devido ao volume do extrato

final da DLLME ser menor que o da DLLME-SFO, isso resulta em um maior fator de concentração e conseqüentemente limites de detecção e quantificação mais baixos.

Quanto aos percentuais de recuperação a DLLME apresentou melhores resultados com recuperações variando entre 102 a 120% em comparação a DLLME-SFO cujos resultados variaram na faixa de 70 a 118%. Além disso, pelo método da DLLME foi possível extrair com sucesso todos os analitos, obtendo-se boas recuperações para os compostos pertencentes à classe das imidazolinonas, imazetapir e imazapique, os quais são muitos difíceis de serem extraídos por métodos multiresíduos. Já pelo método da DLLME-SFO não foi possível extrair os compostos imazapique e imidacloprido. É provável que isso tenha acontecido porque a faixa de pH avaliada neste estudo não é adequada para a extração destes analitos. O imazapique possui pK_{a1} igual a 2,2 e pK_{a2} igual a 3,6, isso indica que a amostra deveria ter sido acidificada a pH entre 2,3 e 3,5 para este analito, pois quando o pH da solução está entre os valores de pK_a o imazapique está na forma neutra e portanto solubilizado na fase orgânica. Porém, quando o pH da solução for maior que o pK_a do analito, o mesmo está na forma ionizada e solubilizado na fase aquosa (MARTINS, 2010). Já para o imidacloprido o pH deveria ter sido avaliado na faixa de 5 a 11, pois nesta faixa este analito é estável e não sofre hidrólise. Além disso, SECCIA *et al.*, (2006) realizaram a extração do imidacloprido em amostra de água e verificaram que quando a amostra foi alcalinizada a pH 11 favoreceu a extração do mesmo.

Os valores de RSD variaram entre 1 e 10% para o método da DLLME e entre 2 e 18% para o método da DLLME-SFO. Os melhores resultados obtidos para a DLLME podem ser explicados porque o extrato final é evaporado e redissolvido em metanol, o qual apresenta bom comportamento cromatográfico por isso não ocorrem variações entre as injeções da triplicata de uma mesma amostra. Já para a DLLME-SFO o 1-dodecanol não pode ser evaporado devido ao alto ponto de ebulição necessitando ser injetado diretamente no LC-ESI-MS/MS. Além disso, o 1-dodecanol não apresenta bom comportamento cromatográfico e causa uma variação entre as injeções da amostra resultando em valores de RSD mais altos.

A adição de sais para o método da DLLME não foi avaliada porque na literatura a maioria dos trabalhos já comprovou que este parâmetro não influencia na eficiência da extração (ZANG et al., 2008, LI et al., 2008). Já para o método da DLLME-SFO este parâmetro foi avaliado verificando-se a necessidade da adição de 2% de NaCl.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que os métodos empregando DLLME e DLLME-SFO para a determinação simultânea de atrazina, simazina, imazapique, imazetapir, imidacloprido, ciproconazol, tebuconazol e epoxiconazol em amostras de água mineral apresentam como principais vantagens baixo consumo de solventes orgânicos e de amostra, altos fatores de concentração e recuperações dentro da faixa aceitável.

As condições cromatográficas otimizadas para o LC-ESI-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de determinação de 10 minutos. A determinação dos analitos por LC-ESI-MS/MS permitiu a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM.

A utilização dos planejamentos fatoriais para a otimização dos métodos resultou em uma diminuição significativa do número de experimentos, permitindo estudar combinações que não seriam possíveis de serem avaliadas de forma univariada. Com isso pôde ser observada uma considerável redução do tempo e do custo vinculado às etapas de otimização. Além disso, através da aplicação dos planejamentos fatoriais foi possível verificar que os modelos gerados foram preditivos e permitiram a geração das superfícies de contorno, através das quais foi possível estabelecer as condições ótimas de extração para os métodos da DLLME e da DLLME-SFO.

Na validação do método foram obtidos resultados de acordo com o INMETRO e a ANVISA. Os valores do LOQ do instrumento ficaram entre 0,5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e dos métodos variaram entre 5 e 500 ng L^{-1} para o método da DLLME e 12,5 e 125 ng L^{-1} para o método da DLLME-SFO, evidenciando que o método de detecção por MS/MS utilizado permitiu a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água mineral em baixos níveis de concentração.

Em relação aos valores máximos permitidos pela Resolução da Diretoria Colegiada n° 274, os métodos otimizados apresentaram limites de quantificação menores que os valores estipulados pela legislação. Os métodos desenvolvidos podem auxiliar a estabelecer limites máximos permitidos na

legislação brasileira para todos os compostos estudados, pois não há limites para a maioria dos agrotóxicos, resultando num avanço enorme no sentido de preservação da saúde da comunidade.

As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,997 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. A partir da construção da curva trabalho foi possível calcular os valores de recuperação corrigindo possíveis erros sistemáticos da etapa do preparo de amostra, além de avaliar a linearidade dos métodos.

Os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de concentração variaram na faixa de 102 a 120% para DLLME e 70 a 118% para DLLME-SFO e os valores de RSD foram menores que 20% em ambos os procedimentos. Os métodos otimizados também apresentaram resultados satisfatórios para a precisão intermediária, estando de acordo com os valores determinados pelas agências reguladoras. A avaliação do efeito de matriz mostrou que os componentes da matriz não afetaram a eficiência da ionização dos analitos por LC-ESI-MS/MS, indicando que não é necessária a construção da curva no extrato para a correção do efeito matriz.

Os métodos empregando DLLME e DLLME-SFO após validados foram aplicados em amostras de água mineral provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul e não foram encontrados resíduos dos agrotóxicos estudados.

Os métodos propostos são sensíveis, precisos, exatos e possibilitam a identificação e quantificação dos agrotóxicos em estudo em amostra de água mineral, podendo serem empregados na rotina de laboratórios para a determinação de resíduos de agrotóxicos em baixos níveis de concentração em amostras ambientais, visto que todos os parâmetros da validação encontram-se dentro dos limites exigidos para a validação de métodos cromatográficos.

7 Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **"Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br

ALVES, A.C.H., **Determinação de Pesticidas em Águas por Micro-extração em Fase Líquida Associada à Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestrado em Bioorgânica) – Universidade de Lisboa, Portugal.

ANDREU, V. *et al.* Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 772–789, 2004.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Huddersfield, 2003.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.

BARCELÓ, D.; Hennion, M.C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2ª ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BARRETO. J.C.F., **Água Mineral na Região Metropolitana do Recife: Risco de Contaminação dos Aquíferos**. 2011. 27 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – UFPE, Recife, PE

BERIJANI, S., *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v.1123, p. 1–9, 2006.

BIDARI, A., *et al.*, Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v.126, p. 1840–1844, 2011.

BIPARVA, P., *et al.*, Application of dispersive liquid–liquid microextraction and spectrophotometric detection to the rapid determination of rhodamine 6G in industrial effluents. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 56–62, 2010.

BORGHETTI, N.R.B.; BORGHETTI, J.R.; ROSA FILHO, E.F. **O Aquífero Guarani: a verdadeira integração dos países do Mercosul**, 2004. 214p.

BOX, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, Ltd. New York, 1978, 645 p.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada N^o, 274, de 22 de Setembro de 2005 que regulamenta o controle da qualidade da água mineral no Brasil. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acessado em novembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n^o 173, de 13 de setembro de 2006. Regulamento técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e Água Mineral Natural e Água Natural. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de agosto de 2006.

BRASIL. Decreto n^o 7841 de agosto de 1945 que dispõe sobre o Código de Águas Minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília DF, 20 de agosto de 1945. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/decreto_lei/7841_45.pdf> Acessado em 20 de abril de 2010.

BRASIL Decreto n^o 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei n^o 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 14 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n^o 54, de junho de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 de junho de 2000.

CABRERA, L.A. **Estudo do Efeito Matriz na Determinação de Agrotóxicos em Diferentes tipos de Arroz pelo Método de QuEhERS modificado e LC-MS/MS**. 2012. 59p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

CALDAS, S.S, **Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Água subterrânea**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

CALDAS, S.S., *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CALDAS, S.S.; Costa, F.P.; Primel, E.G.; Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection **Analytica Chimica Acta**, v.55. p. 665-671, 2010.

CASSIANO, M.N, *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CHANG, C., *et al.* Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 39–43, 2010.

CHIARADIA, M. C. *et al.*, O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CORTADA, C., *et al.* Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 218–221, 2009.

COSTA, F.P., **Estudo do Método Quechers para Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos em Pêssego Em Calda** 2012. 44 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC, **Official J. European Communities, November 3, 1998**. Council Directive 98/83/EC, Official J. European Communities, November 3, 1998.

COUTINHO, C.F.B. *et al.* Pesticidas: Mecanismos de degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de eco toxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.

CUNHA, S.C., *et al.* Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid–liquid microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 8835–8844, 2009.

DAÍ, L. *et al.*, Dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet for the determination of polychlorinated biphenyls in aqueous samples. . **Analytica Chimica Acta**, v. 625, p. 28 -34, 2010.

DEMOLINER, A., **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasse de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 2, 43 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

DIAS. M. F. F., **Qualidade Microbiológica de Águas Minerais em Garrafas Individuais Comercializadas em Araraquara-SP**. 2008. 18 p. Dissertação (Ciência de Alimento e Nutrição) Universidade Estadual Paulista, ARARAQUARA-SP

ECONOMOU, A., *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009

FARAJZADEH, M.A., *et al.* Development of a new dispersive liquid-liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. . **Analytica Chimica Acta**, v. 713, p. 70-78, 2012.

FARD, E. M. G. P., **Avaliação da Qualidade da Água Mineral e do Processo de Envase em Duas Fontes Comerciais**. 2007. 5 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – UFPR, Curitiba, PR

FARINA, L., *et al.* Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 46-50, 2007

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FU, L., *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 289-295, 2009.

GONZÁLEZ, R. R., *et al.* Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211 – 225, 2008.

GOSETTI, F., *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

GUIMARÃES, B.S., **Desenvolvimento de Processos Oxidativos Avançados para Degradação de Agrotóxicos em Meio Aquoso**. 2012. 30 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

GUO, J.H., *et al.* Determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 3038 - 3043, 2009.

HARRIS, Daniel.C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010. Diretoria de Geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Coordenação de Geografia, **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**, Brasil 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro. 2014.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2011**. IBGE, 2011. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 15 de dezembro 2013.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, 2010. 20p.

ISMAIEL, O.A. *et al.*, Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 333–343, 2008.

JARDIM, I.C.S.F. *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, No.4, p. 996-1012, 2009

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LEONG, M., *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v.1211, p. 8–12, 2008.

LEONG, M.I. *et al.*, Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 7645 - 7650, 2009.

LIU, L., *et al.* Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples. **Chromatographia**, 72, p. 1017–1020, 2010.

LIU, Z.M., *et al.*, Novel method for the determination of five carbamate pesticides in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 213 - 216, 2009.

MACIEL, A., **Desenvolvimento de Método para a Determinação de Ferro e Cobre em Vinho por Espectrofotometria Empregando DLLME**. 2013. 11 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

MALTEZ, H.F., **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas Baseadas em Sistemas de Concentração Empregando Extração em Fase Sólida e Microextração com Gota Única para Determinação de Metais-Traço em Amostras Aquosas Ambientais**. 2007. 24 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSC, Florianópolis, SC.

MARTINI, L. F. D. *et al.*, Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.42, n.10, p.1715-1721, 2012.

MARTINS, G.L., **Determinação de Resíduos de Pesticidas em Solo de Lavoura de Arroz Irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS. Orgânicos em Água por Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e GC(TQ)MS/MS**. 2010. 92 p. Tese (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

MARTINS, M.L., **Determinação de Resíduos de Compostos Orgânicos em Água por Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e GC(TQ)MS/MS**. 2010. 25 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

MARTINS, M.L., *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e Aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 35-41, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: www.extranet.agricultura.gov.br Acesso em: novembro de 2013.

MORENO-GONZÁLEZ, D., *et al.* Use of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of carbamates in juice samples by sweeping-micellar electrokinetic chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 1329-1338, 2011.

MORGANO, M.A. *et al.*, Avaliação físico-química de águas minerais comercializadas na região de Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.239-243, 2002.

NAGARAJU, D., *et al.* Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1161, p. 89-97, 2007.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE – PPDB. University of Hertfordshire, 2013. Disponível em: www.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/ Acesso em: novembro de 2013.

PETRACCIA, L., *et al.* Water, mineral waters and health. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 377-385, 2006.

PINHO, G. P. *et al.* Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913, 2010.

PRESTES, O. D., *et al.* QuEChERS- Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

RAMEZANI, M., *et al.* Improved extraction and clean-up of imidazolinone herbicides from soil solutions using different solid-phase sorbents. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 5092–5100, 2009.

RAVELO-PÉREZ, L.M., *et al.* Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 2387–2395, 2009.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Cárita editora. Campinas, 2005, 325 p.

RODRIGUES, S. A., *et al.* A simple, efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta** v. 678, p. 82–89, 2010.

SANCHES, S.M. *et al.*, Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água, **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Document nº SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Uppsala, Suécia. 01/01/2014.

SCHREIBER, A. Introduction into LC/MS/MS Technology – LC/MS/MS in Food and Environmental Analysis. Applied Biosystems. 2º Br MASS Conference – Campinas/SP 2007.

SILVA, A.S.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R.; Determinação Espectrofotométrica por Injeção em Fluxo de Glifosato em Formulações Comerciais de Herbicidas. **Química Nova** v. 35. p. 114-118, 2012

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente.** Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004, p. 400.

SILVEIRA, M.A.K., **Otimização de Método para Determinação de PPCPs em Água Empregando SPE E LC-ESI-MS/MS**. 2012. 26 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

SINDAG. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola**, 2011. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 5 de janeiro. 2014.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

SLOBODNÍK, J. *et al.* Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic systems with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 239-258, 1997.

SOARES, B.M., **Desenvolvimento de Método para Determinação de Espécies de Mercúrio Empregando MSPD e GC-MS**. 2012. 23 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

SPADOTTO, C.A. *et al.* **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p. (Documentos 42).

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–Eletronebulização–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328– 334, 2005.

TOMASINI, D., **Otimização e Validação de Método de Extração (QuEChERS) e de Análise (LC-DAD E LC-APCI-MS/MS) para Determinação Simultânea de Agrotóxicos e Hidroximetilfurfural em Mel**. 2011a. 55,71 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

TOMASINI, D., *et al.*, Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 1893 - 1900, 2011b.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TSAI, W. H., *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 56–62, 2009.

VÉKEY, 2001 Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 921, p.227, 2001.

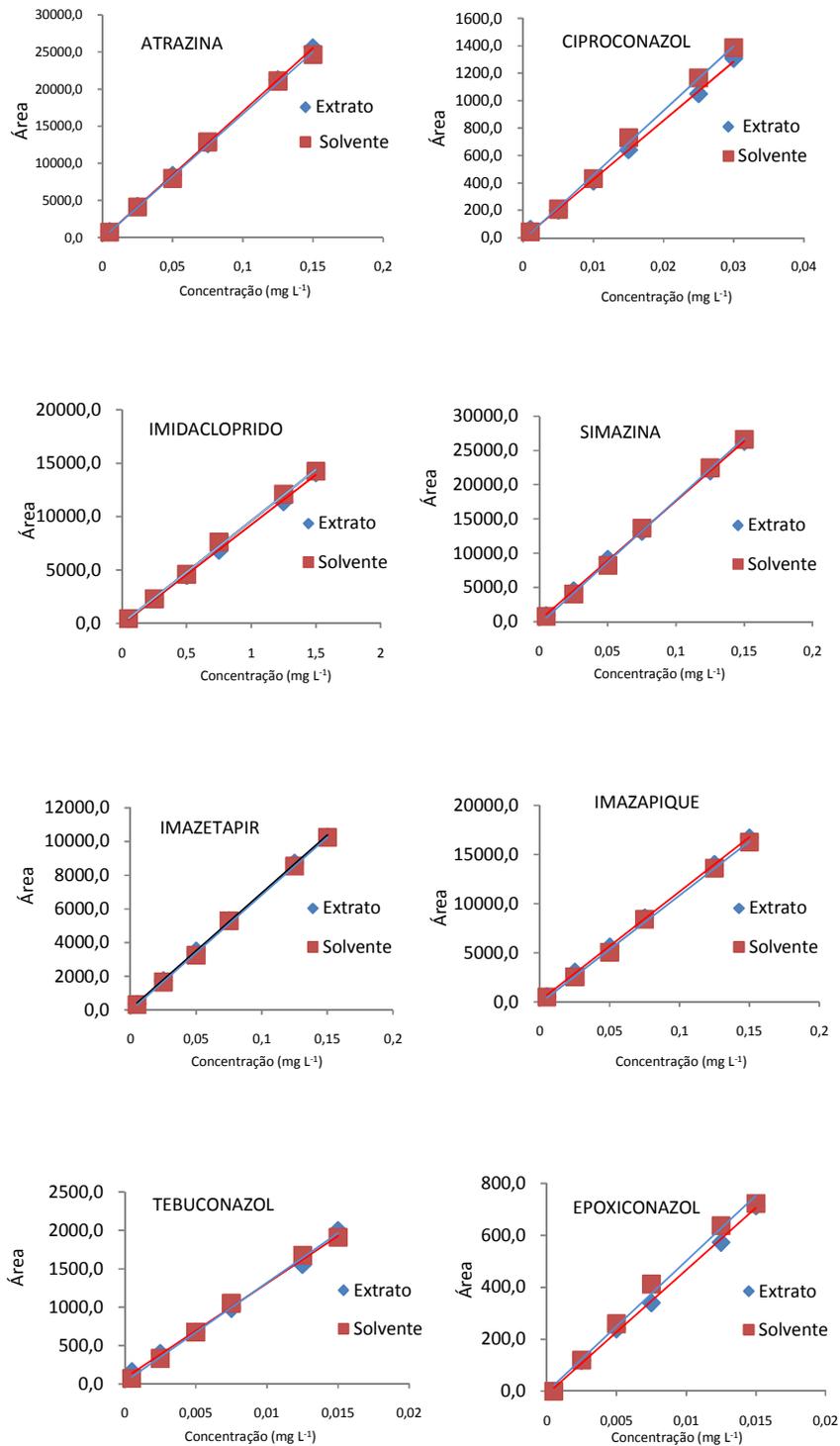
WANG, C., *et al.* Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 71–76, 2011.

WANG, Y., *et al.* Determination of triazines in honey by dispersive liquid–liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4241-4246, 2010

WU. Y., *et al.*, Application of DLLME Based on the Solidification of Floating Organic Droplets for the Determination of Dinitrobenzenes in Aqueous Samples. **Chromatographia**, v.72, p. 695 - 699, 2010.

XIA, j., *et al.* Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, p. 28 -34, 2008.

Apêndice A: Avaliação do efeito matriz para o método da DLLME



Apêndice B: Avaliação do efeito matriz para o método da DLLME-SFO