

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - NPGQ
MESTRADO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DOS
PESTICIDAS PIRIMETANIL, PIRIMICARBE E
BUPROFEZINA EM ÁGUAS AMBIENTAIS POR
SPME E GC-MS**

CLÓVIS FERNANDES DA SILVA FILHO

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea
Orientador

**SÃO CRISTÓVÃO
2009**

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DOS PESTICIDAS PIRIMETANIL, PIRIMICARBE E BUPROFEZINA EM ÁGUAS AMBIENTAIS POR SPME E GC-MS

CLÓVIS FERNANDES DA SILVA FILHO

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea
Orientador

SÃO CRISTÓVÃO

2009

DeDico este t r a b a l h o
à minha esposa Zina r a Lins e à
minha Mãe Eul á l i a Pachêco

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Deus**, que pela sua infinita bondade me concedeu a oportunidade de mais uma conquista na minha vida, dando-me forças e esperança nos momentos mais difíceis da caminhada.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, professor Dr. Haroldo Silveira Dórea, pela orientação criteriosa, paciência e atenção, além da oportunidade que me deu de desenvolver este trabalho.

À Zinara Lins, minha esposa e companheira, que com sua presença inspira minha vida e que durante esta jornada esteve sempre ao meu lado, incentivando e apoiando com paciência, amor e carinho.

Às minhas filhas, Priscila Fernandes e Karina Fernandes, razões da minha vida, pelo apoio e incentivo.

Aos meus pais, Clóvis (em memória) e Eulália, que sempre me apoiaram em todos os desafios de minha vida.

Aos professores do NPGQ da UFS, pelo conhecimento e incentivo demonstrados durante o curso.

Ao professor Dr. Sandro Navickiene e professora Dr. Maria de Lara, pela incansável presteza e simpatia, incentivando em todos os momentos.

Aos colegas do LCP, que sempre estiveram dispostos a colaborar com toda a paciência e dedicação, ajudando e esclarecendo.

Aos amigos de mestrado, com quem partilhei dúvidas e conhecimentos e que, com a amizade, tornaram este período muito prazeroso.

Aos meus companheiros, em especial à Elissandro Emídio e ao Ricardo Bispo pela boa vontade e colaboração nesta etapa de minha vida.

CURRICULUM VITAE

Nome: Clóvis Fernandes da Silva Filho

Filiação: Clóvis Fernandes da Silva e Eulália Pacheco da Silva

clovis.silvafilho@univasf.edu.br

FORMAÇÃO

- Lato Sensu: Universidade de Pernambuco – UPE

Curso: Metodologia do Ensino Superior

Conclusão: 2004

- Graduação: Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Curso: Química Industrial

Conclusão: 1990

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Universidade Federal do Vale do São

Petrolina - PE

Francisco - UNIVASF

Período: Set/2008-Atual

Cargo: Químico

- Governo do Estado de Pernambuco– SE

Petrolina - PE

Cargo: Professor de Química

Período: Jun/2003-Atual

- Prefeitura Municipal de Arcoverde-PE

Arcoverde- PE

Cargo: Chefe do Deptº. de Meio Ambiente

Período: 1997 a 1999

- Companhia Alcooquímica Nacional

Cabo de S. Agostinho – PE

Cargo: Supervisor de Produção

Período: 1985 a 1992

ATIVIDADES DESENVOLVIDA NO MESTRADO

- Trabalho apresentado no 4º Encontro de pós graduação, em São Cristóvão-SE, de 09 a 11 de Setembro de 2008, de forma oral com o título: DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS AMBIENTAIS UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE SPME E GC-MS
- Trabalho apresentado no XII COLACRO Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, em Florianópolis-SC, de 28 a 30 de Outubro de 2008, na forma de pôster com o título: SPME PARA DETERMINAÇÃO DE PIRIMETANIL, PIRIMICARBE E BUPROFEZINA EM ÁGUAS AMBIENTAIS POR GC-MS.
- Professor de Química analítica Agrícola, no Departamento de Química da UFS, nos períodos de 2007.2 e 2008.1.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTAS DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - OBJETIVOS	05
2.1- GERAL	05
2.2 - ESPECIFICOS	05
3 - JUSTIFICATIVA	06
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	11
4.1- PESTICIDAS	11
4.1.1 - CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR PESTICIDAS	13
4.1.2 - SELEÇÃO DOS PESTICIDAS	15
4.2 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	18
4.3 - MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	20
4.3.1 - EQUILÍBRIO DE PARTIÇÃO EM SPME	26
4.3.2 - CINÉTICA DA SPME	33
4.3.3 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO	34
4.3.3.1 - RECOBRIMENTO DA FIBRA	36
4.3.3.2 - MODO DE EXTRAÇÃO	36
4.3.3.3 - TEMPO DE EXTRAÇÃO	37
4.3.3.4 - VELOCIDADE DE AGITAÇÃO	37
4.3.3.5 - INFLUÊNCIA DO pH	38
4.3.3.6 - ADIÇÃO DE SAL	38
4.3.3.7 - TEMPO DE DESSORÇÃO	38

4.4 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	39
4.4.1 - CURVA ANALÍTICA	40
4.4.2 - LINEARIDADE	41
4.4.3 - LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	41
4.4.4 - PRECISÃO	43
4.4.5 - ROBUSTEZ	44
5 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
6 - MATERIAIS E MÉTODO	59
6.1 - REAGENTES E MATERIAIS	59
6.2 - LIMPEZA DOS MATERIAIS	60
6.3 - PROCEDIMENTOS POR SPME	60
6.4 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	61
7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
7.1 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS POR SPME	64
7.1.1 - ESCOLHA DAS FIBRAS	64
7.1.2 - MODO DE EXTRAÇÃO	66
7.1.3 - VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DA AMOSTRA	66
7.1.4 - CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO	67
7.1.5 - INFLUÊNCIA DO pH	69
7.1.6 - TEMPO DE EXTRAÇÃO	71
7.1.7 - INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA	72
7.2 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO	74
7.2.1 - TESTE DE ROBUSTEZ	75
7.2.2 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO	79
7.2.3 - SENSIBILIDADE	82
7.2.4 - PRECISÃO	82
7.2.5 - LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)	84
7.2.6 – ANÁLISE DA AMOSTRA REAL	86
8 - CONCLUSÃO	90
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais rotas de transporte de agrotóxicos no ambiente	02
Figura 2 – Consumo Mundial de pesticidas em kg há ⁻¹	03
Figura 3 - Estrutura química do pirimetanil	15
Figura 4 - Estrutura química do pirimicarb	15
Figura 5 - Estrutura química da buprofezina	16
Figura 6 - Esquema de microextração em fase sólida (SPME)	22
Figura 7 - Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME)	24
Figura 8 - Diagrama demonstrando o ruído da linha de base, LD e LQ	42
Figura 9 - Cromatogramas das amostras do Platô de Neópoles-SE	62
Figura 10 - Cromatogramas das amostras do Distrito de irrigação Senador Nilo Coelho Petrolina-PE	65
Figura 9 - Cromatograma DI-SPME-GC-FID	62
Figura 10 - Avaliação de tipos de fibras quanto a eficiência de extração no modo direto	65
Figura 11 - Influência da velocidade de agitação sobre a extração	67
Figura 12 - Efeito do tempo de dessorção dos pesticidas	69
Figura 13 - Influência do pH sobre a extração dos pesticidas estudados utilizando a fibra de PDMS 100 µm	71
Figura 14 - Influência do tempo na extração dos pesticidas	72
Figura 15 - Efeito da concentração salina na extração dos pesticidas	74
Figura 16 - Gráfico de pareto para o pirimetanil – teste de robustez	78
Figura 17 - Gráfico de pareto para o pirimicarbe – teste de robustez	78
Figura 18 - Gráfico de pareto para a buprofezina – teste de robustez	79
Figura 19 - Curva analítica para o pirimetanil	80
Figura 20 - Curva analítica para o pirimicarbe	81

Figura 21 - Curva analítica para a buprofezina	81
Figura 22 - Cromatogramas das amostras do Platô de Neópolis-SE	88
Figura 23 - Cromatogramas das amostras do Distrito de irrigação Senador Nilo Coelho Petrolina-PE	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de pesticidas consumidos entre 2001 e 2004	04
Tabela 2 - Identificação dos pesticidas utilizados neste estudo	16
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos Pesticidas relacionados	17
Tabela 4 - Resumo das interações presentes nas fibras de SPME	26
Tabela 5 - Tempo de retenção e íons no modo SIM dos pesticidas	63
Tabela 6 - Variáveis usados no planejamento fatorial para teste de robustez	76
Tabela 7 - Matriz para o teste de robustez	77
Tabela 8 - Coeficiente de variação para os pesticidas no nível de concentração de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$	83
Tabela 9 - Limite de detecção, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método SPME	85
Tabela10 - Limite de quantificação, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método SPME	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CW – Carbowax

CX – Carboxen

DI-SPME – Modo direto de microextração em fase sólida, do inglês *Direct - Solid-phase microextraction*

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *Environmental Protection Agency US.*

EC – Comunidade Européia, do inglês *European Commission Regulation*

FID – Detector por ionização em chama, do inglês *Flame Ionization Detection*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a por Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

GC-FID – Cromatografia Gasosa com detector por Ionização em Chama, do inglês *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*

HS-SPME – Modo headspace de microextração em fase sólida, do inglês *headspace - Solid-phase microextraction*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HF-LPME – Microextração em fase líquida com fibras ocas, do inglês *Hollow Fiber- Liquid-Phase Microextraction*

IUPAC - do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LC – Concentração letal, do inglês *Lethal Concentration*

LD – Dose Letal, do inglês *Lethal dose*

LMR – Limite máximo de resíduo, do inglês *Maximum Limit of Residue*

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LPME – Microextração em fase líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*

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

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

MAC – Concentração máxima tolerável, do inglês *Tolerable Maximum concentration*

PA – Poliacrilato

PDMS – Polidimetilsilosano

PDMS/DVB – Polidimetilsilosano-Divinilbenzeno

PTFE – Politetrafluoretileno

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

r – Coeficiente de correlação

R^2 – Coeficiente de determinação

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid-phase microextraction*

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid-phase extraction*

SDME – Microextração em gota suspensa, do inglês *Single drop microextraction*

SIM – *selected ion monitoring*

TPR – Resina suportada

t_E – Tempo de Extração

t_D – Tempo de Dessorção

V_A – Velocidade de Agitação

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico por microextração em fase sólida (SPME) para a determinação de resíduos dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em matrizes aquosas ambientais por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC-MS). Através do planejamento univariado, o procedimento de SPME foi otimizado para possibilitar a extração dos analitos da matriz e os valores ótimos dos parâmetros que influenciam a extração por SPME foram definidos: tipo de fibra (PDMS 100 μm), concentração salina na amostra (0%), velocidade de agitação da amostra (900 rpm), pH = 6, tempo de extração (30 min.) e tempo de dessorção (7 min.). O método foi validado apresentando resultados satisfatórios de precisão intermediária (repetitividade) com R.S.D < 15% para os pesticidas. Os limites de detecção e quantificação variaram de 0,042 e 0,135 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (buprofezina); 0,048 e 0,150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (pirimetanil) e 0,446 e 1,361 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (pirimicarbe) respectivamente. A curva analítica foi feita utilizando a matriz contendo os pesticidas, de 0,1 a 4,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com coeficientes de determinação (R^2) > 0,991. Amostras de águas superficiais do Platô de Neópolis-SE e Distrito de irrigação Senador Nilo Coelho em Petrolina-PE, área de irrigação para diversas culturas dos referidos estados, foram analisadas e apresentaram os seguintes resultados para buprofezina < LQ ; 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ e < LQ para pirimicarbe, único pesticida não detectado nas amostras foi pirimetanil. O método analítico desenvolvido para extração de pirimimetanil, pirimicarbe e buprofezina em amostras de águas superficiais por DI-SPME/GC-MS mostrou-se rápido, sensível, robusto, seletivo, eficiente e com ausência de solventes orgânicos. As concentrações para a buprofezina e pirimicarbe das amostras reais estavam dentro do estabelecido pela legislação européia.

Palavras Chave: pesticidas; SPME; GC-MS

ABSTRACT

The aim of the work was to develop method for determining pyrimethanil, pirimicarb and buprofezin residues in environmental water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. To perform the SPME, a 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber was used for the extraction of the pesticides from water samples. Using univariate optimization process, the main factors affecting the SPME process, such as saline concentration (0 %), stirring rate (900 rpm), pH effect (6.0) and desorption time (7 min.) were studied. The method was validated for the pesticides and the intermediate precision ($< 15\%$) was shown to be satisfactory. The detection and quantification limits ranged from 0.058 to 0.231 ng L^{-1} . The linearity was studied in the range of 0.1 - 4.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtaining good correlation coefficients (> 0.991). The results obtained in the validation of SPME-GC-MS for the determination of 3 pesticides in water showed that the method is fast, simple, sensitive and very useful in routine laboratories. The developed method has been used to monitor pyrimethanil, pirimicarb and buprofezin contaminations in superficial water samples collected around irrigated areas of Platô de Neópolis (Neópolis/SE) and Senador Nilo Coelho (Petrolina/PE). The concentrations of buprofezin and pirimicarb ranged from undetectable to 0.013 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.20 to 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Pyrimethanil was not observed in the samples. The concentrations of the pesticides in the real samples were in accordance with European legislation.

Keywords: Pesticides; SPME; GC/MS

1- INTRODUÇÃO

Os pesticidas têm sido usados por décadas devido a sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que invadem as lavouras, garantindo assim uma maior produtividade e maior retorno econômico das atividades agrícolas. Sem o uso de pesticidas, a quantidade e a qualidade dos alimentos seriam bastante afetadas, ocasionando uma possível queda na produção de alimentos e promovendo uma alta nos preços dos produtos agrícolas. Entretanto, muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização destes produtos na agricultura para gerar uma maior produção de alimentos, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente (PRIMEL et al, 2005).

Com o crescimento da produção agrícola e da pecuária, a quantidade e a variedade de pesticidas aplicados aumentaram durante as últimas décadas. Ainda que seja admitida a necessidade do controle químico de pragas, uma vez que são inúmeros os exemplos de safras integralmente perdidas devido a ação predatória de pragas, os problemas ambientais poderiam ser reduzidos significativamente. O que se observa em muitos casos, entretanto, são aplicações sem controle de dosagens, e manuseios indevidos dos recipientes, sendo freqüente o descarte de produtos e lavagens de galões utilizados nas águas naturais. Os problemas de contaminação das águas devem ser resolvidos na fonte geradora, uma vez que atingidas as águas naturais, pouco se pode fazer no sentido de reverter os prejuízos de qualidade que, neste caso, são muito sérios (PRIMEL et al, 2005).

Os riscos causados pelo uso de pesticidas passam despercebidos pela sociedade diante dos benefícios econômicos gerados. Por isso, é importante utilizá-los na agricultura somente quando não existir outro recurso economicamente eficaz.

Ao longo dos anos observa-se que o uso indiscriminado dos pesticidas tem elevado a quantidade de resíduos desses compostos em diferentes compartimentos do meio ambiente (água, solo e ar) e em produtos alimentícios. Diante desse fato e da toxicidade que os pesticidas apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, deve-se intensificar os estudos que possibilitem um monitoramento eficiente desses compostos, visando à redução dos riscos de contaminação (DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001)

O comportamento dos pesticidas nos diferentes compartimentos ambientais pode ser verificado na Figura 1.

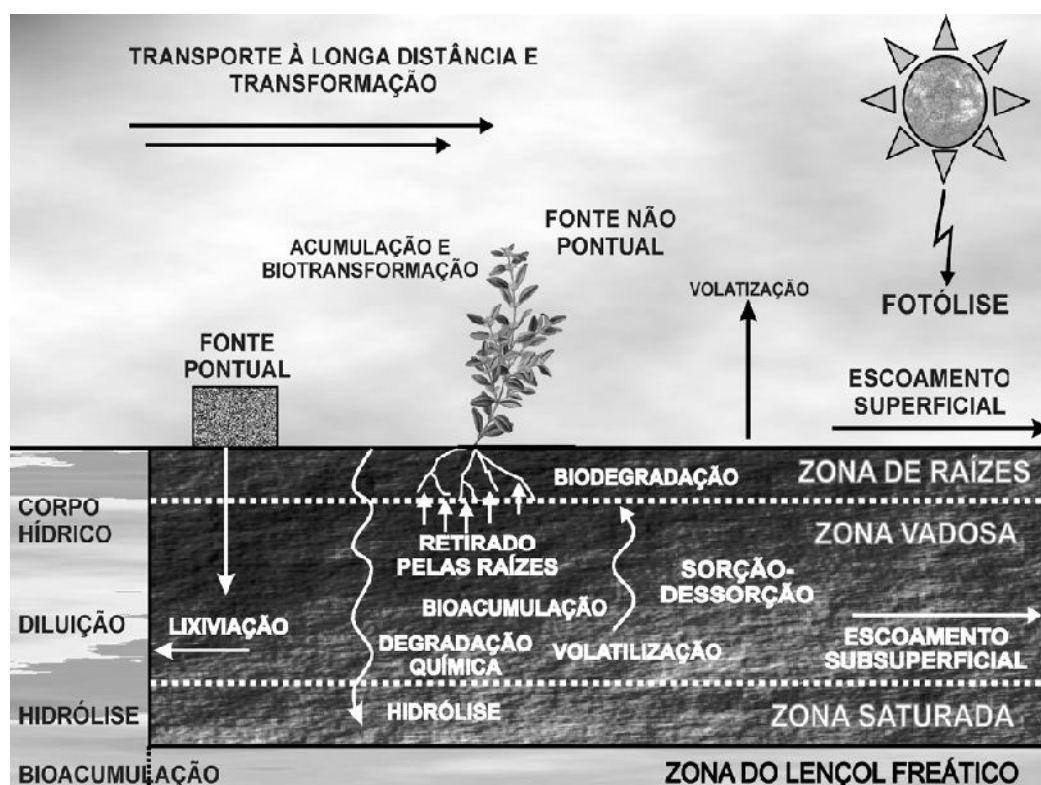


Figura 1: Principais rotas de transporte de agrotóxicos no ambiente.

Fonte: Jardim e Andrade (2009)

Devido às suas propriedades físico-químicas, os pesticidas podem ser encontrados nos diferentes compartimentos ambientais. No ar, são originários da pulverização. No solo, são encontrados devido a derramamentos ou descartes inadequados, que por lixiviação podem atingir lençóis de águas subterrâneas. Em águas superficiais são originários da lavagem por água de chuva, derramamentos ou uso em campanhas de saúde pública (KOMATSU & VAZ, 2004).

Quando se considera a quantidade de pesticidas consumida por hectare, o Brasil perde algumas posições, e, de acordo com os últimos dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), situa-se em 8º lugar no *ranking* mundial, utilizando aproximadamente, 3,2 kg de pesticida por hectare, conforme mostra a figura 2.

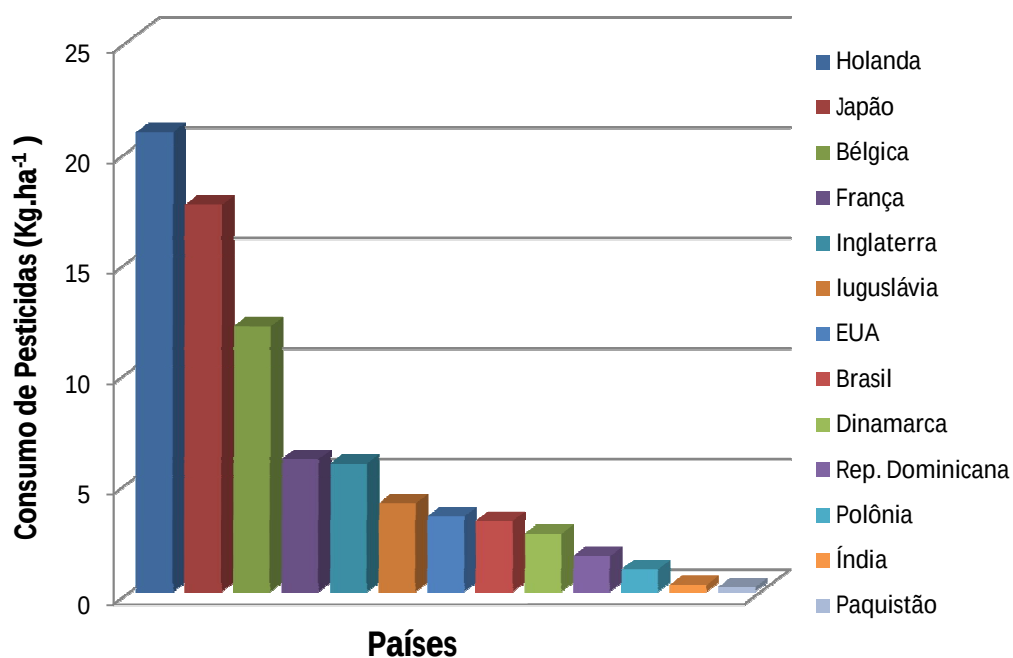


Figura 2 - Consumo mundial de pesticidas em kg ha⁻¹

Fonte: Sindag

Dados do SINDAG (2004) mostram ainda que o Brasil elevou o consumo de pesticidas de 30 mil para 80 mil toneladas de 1970 a 1980 e entre os anos de 1991 e 1998 apresentou um aumento nas vendas na ordem de 160%. Esse consumo continuou a se elevar e, como mostra tabela 1, apresentou um crescimento significativo entre 2001 e 2004.

Tabela 1 - Quantidade de pesticidas consumidos entre 2001 e 2004.

Quantidade total/Anual (Ton./Ano)				
CLASSE	2001	2002	2003	2004
HERBICIDAS	44.619.269	33.640.989	57.180.577	98.257.419
FUNGICIDAS	9.527.199	11.181.079	18.771.031	31.496.201
INSETICIDAS	17.309.837	14.815.515	2.358.398	31.570.649
ACARICIDAS	4.232.674	4.094.484	2.388.355	2.481.996
OUTROS	764.989	622.622	685.672	1.026.854
TOTAL	76.453.968	64.354.689	100.384.033	164.833.119

Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (2004)

Este cenário remete à necessidade de monitoramento de resíduos de pesticidas, devido ao fato de tais substâncias causarem contaminação de sistemas hidrológicos. É de suma importância monitorar áreas próximas a regiões agrícolas e lençóis subterrâneos, bem como em locais que usem como fontes primárias a água potável (DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Diante do exposto, observa-se também a necessidade em desenvolver métodos analíticos para determinação de pesticidas em amostras ambientais, empregando técnicas de extração que sejam simples, eficientes e sensíveis para a quantidade desses compostos que são encontrados nessas amostras (resíduos)

Uma opção que tem apresentado ótimos resultados na preparação de amostras é a microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*), que teve um rápido crescimento em seu uso devido ao vasto campo de aplicação como alternativa aos métodos tradicionais, sobretudo para amostras líquidas (CARASEK et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Desenvolver um método analítico por microextração em fase sólida para a determinação dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em matrizes aquosas ambientais, e analisar por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

2.2 – ESPECÍFICOS

a- Estabelecer condições cromatográficas para determinação simultânea dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina por GC-FID e GC/MS.

b- Otimizar os parâmetros para a microextração em fase sólida, utilizando técnica de planejamento univariado.

c- Validar o método analítico utilizando parâmetros de robustez, linearidade, sensibilidade, precisão, limites de detecção e quantificação.

d- Aplicar o método desenvolvido em amostras de águas superficiais.

3 – JUSTIFICATIVA

O uso de pesticidas tem gerado diversos problemas ambientais relacionados à saúde pública e ao desequilíbrio ambiental, tais como: intoxicação de agricultores, contaminação de alimentos, água, ar e solos.

Os pesticidas são compostos usados para controlar pragas, mas também atuam sobre outras espécies não-alvo causando sérios efeitos. Resíduos de pesticidas podem persistir em solos, águas, ar e alimentos, contaminando seres humanos e animais (CARVALHO, 2006). Diante da problemática exposta, o conhecimento da toxicidade, da decomposição no ambiente e o desenvolvimento de métodos de quantificação de resíduos de pesticidas em águas, solos, ar e alimentos tornaram-se de fundamental importância.

Em razão de alguns fatores como: grandes quantidades de pesticidas utilizados anualmente; ocorrência de toxicidade aguda e crônica; forma de transportes, manejo e aplicação, vários estudos destacam as intoxicações causadas por pesticidas como um problema de saúde pública, especialmente entre trabalhadores rurais e, principalmente, nos países em desenvolvimento. Contudo, no Brasil, são escassos os estudos nacionais de base populacional sobre as características do uso ocupacional ou sobre as intoxicações por pesticidas.

A exposição a pesticidas pode originar intoxicações agudas ou crônicas. São consideradas agudas quando os sintomas surgem rapidamente, poucas horas após a exposição excessiva e por curto período, a produtos que são extremamente tóxicos, podendo ocorrer de forma leve, moderada ou grave e com sinais claros e objetivos: náuseas, vômitos, convulsões, contrações musculares, dores de cabeça, desmaios, sangramentos nasais, convulsões, mal estar, sonolência, fraqueza, dor de estômago e dificuldade em respirar. Já as intoxicações crônicas são caracterizadas pelo surgimento tardio dos sintomas: dermatites de contato, hepáticas, efeitos neurotóxicos retardados, alterações

nos cromossomos, doença de Parkinson, cânceres e teratogêneses (STOPELLI, 2005).

A exposição está associada, em curto e em longo prazo, com vários sintomas de saúde, tais como dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele, câncer, depressão. Entretanto no meio ambiente, o uso intenso de agrotóxicos pode causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à ocorrência de desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos.

Pelo fato do perigo que podem representar para os seres humanos, os pesticidas podem ser agrupados em classes toxicológicas, que são estabelecidas levando-se em consideração os valores de doses letais dos compostos químicos. A dose letal 50% (DL_{50}) é definida como a quantidade de um produto químico, administrado de uma única vez, expressa em miligramas por quilo de peso corpóreo, que pode provocar a morte de 50% de um grupo de animais testados nas condições experimentais utilizadas (BARBOSA, 2004). Os valores da DL_{50} podem ser usados para demonstrar os riscos que estes produtos podem representar para os seres humanos.

As organizações internacionais como a “Environmental Protection Agency” (EPA) dos Estados Unidos e da Comunidade Européia (EC) iniciaram um controle estabelecendo limites máximos em relação às concentrações de pesticidas encontrados em água. Os níveis permitidos pela EC são determinados pela “Drinking Water Directive” (80/778/EEC) (European Commission Regulation; Official Journal of the European Communities, 1980, L 229) a qual estabelece que a concentração máxima de um pesticida individual não deve exceder $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e que a concentração total de pesticidas não deve exceder $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em água potável e 1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais (CARASEK et al, 2008).

A determinação do atendimento aos Critérios da EPA foi feita comparando-se as propriedades físicas e químicas dos pesticidas com os critérios estabelecidos: quando três dos quatro critérios foram atendidos, o composto foi classificado como potencial contaminante das águas subterrâneas (FERRACINI et al., 2001).

O Brasil apresenta uma legislação que regulamenta os níveis máximos de pesticidas em água potável baseados em sua periculosidade. Em 2004, a Portaria nº 518, de 25 de março, estabeleceu as concentrações máximas permitidas de alguns pesticidas organoclorados em água usada para o abastecimento público, além de determinar os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade (BRASIL. Portaria nº 380 518/2004; Diário oficial da União).

O estabelecimento desta portaria, decretos e leis, a partir da década de 80, permite inferir que, no Brasil, o controle de pesticidas vem se aprimorando. No que se refere à legislação que estabelece a concentração de pesticidas em água, a legislação brasileira se mostra ainda insuficiente, já que estabelecem Limite Máximo de Resíduos (LMRs) para um número restrito de pesticidas, 22 no total, enquanto existem 300 princípios ativos que entram na composição das 2000 formulações comerciais disponíveis para venda no Brasil (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA apud DOMINGUES *et. al.*, 2004).

Considerando estes documentos, os métodos que determinam tais compostos em matrizes aquosas devem apresentar grande sensibilidade, a fim de atender aos níveis de concentração estabelecidos pelas legislações (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A água potável de boa qualidade é fundamental para a saúde e o bem estar humano. Entretanto, a maioria da população mundial ainda não tem acesso a este bem essencial. Mais do que isto, existem estudos que apontam para uma escassez cada vez mais acentuada de água para a produção de alimentos, desenvolvimento econômico e proteção de ecossistemas naturais. Para exercer tais atividades, especialistas estimam que o consumo mínimo de água per capita deva ser de pelo menos 1000 m³ por ano. Cerca de 26 países, em sua maioria localizados no continente africano, já se encontram abaixo deste valor. Com o rápido crescimento populacional, acredita-se que inúmeras outras localidades deverão atingir esta categoria no futuro próximo. Várias regiões do planeta (Pequim, Cidade do México, Nova Deli e Recife, no Brasil) estão acima desse valor apenas devido à exploração de águas subterrâneas (Nebel e Wright, 2000).

No caso de amostras aquosas, a determinação de pesticidas é usualmente precedida por etapas de extração e pré-concentração antes de se efetuar a quantificação. Dentre as técnicas de extração mais empregadas podem ser destacadas a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Para a quantificação são empregadas técnicas de separação as mais comuns para amostras ambientais podem ser a cromatografia a gás (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KOMATSU & VAZ, 2004).

Em relação aos métodos de extração, as tendências atuais apontam no sentido da utilização de quantidades menores de amostras; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; aumento do potencial de automação ou utilização de método “on-line”, reduzindo assim a operação manual; desenvolvimento de método menos agressivos ao meio ambiente, com o uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos. Dentro deste contexto, técnicas de microextração que utilizam quantidades mínimas de solventes orgânicos e menos etapas na preparação das amostras vêm sendo desenvolvidas. Entre as principais técnicas de microextração existentes destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em gota suspensa (SDME) e a microextração em fase líquida (LPME) (BONATO et. Al, 2008).

Nos últimos anos, vários avanços na análise de resíduos de pesticidas foram descritos, dentre os quais a microextração em fase sólida. A técnica SPME teve um rápido crescimento em seu uso devido à sua simplicidade na preparação de amostras, isenta de solventes orgânicos, extremamente rápida, versátil, baixo custo, excelentes níveis de precisão, exatidão e vasto campo de aplicação como alternativa aos métodos tradicionais (CARASEK et al. 2008).

Para o desenvolvimento do método por SPME devem-se encontrar as condições de trabalho que assegurem o máximo desempenho. Por outro lado, quanto maior o número de fatores a investigar em um método analítico, maior também será o número de ensaios necessários para se chegar à conclusão sobre as melhores condições de trabalho (KOMATSU & VAZ, 2004).

Em vista aos problemas mencionados se faz necessário o monitoramento de pesticidas no meio ambiente por ser uma ferramenta de suma importância para a caracterização e o gerenciamento dos riscos ambientais

decorrentes do uso desses produtos tais como, pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina por sua significativa utilização na agricultura, tendo como o objetivo de verificar a sua provável presença no meio ambiente.

4 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1 – Pesticidas

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define agrotóxico como sendo 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 de 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, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2008).

Pesticidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas e biocidas são denominações diversas dadas a substâncias químicas ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas, com o objetivo de matar, controlar ou combater de alguma forma as diferentes pragas (ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal) que atacam, lesam ou transmitem doenças às plantas, aos animais e ao homem (SANCHES *et al.*, 2003; LOURENCETTI, 2005).

O conhecimento das características e propriedades dos pesticidas é necessário e permite prever suas interações com o solo e a possibilidade de contaminação e transporte, quando dissolvidos em água ou associados aos sedimentos. A necessidade da avaliação do risco de contaminação se deve ao fato de que a agricultura e a pecuária exigem considerável suprimento de água, o que conduz ao desenvolvimento dessas atividades próximo a rios e lagos (CARVALHO & PAULILLO, 2006).

Quando aplicados diretamente no solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, por fotólise ou por ação dos microrganismos. Entretanto, as moléculas com alta persistência, ou seja, baixa taxa de degradação pode permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração por um longo período. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo, desorvidas a partir dessas mesmas partículas, sofrer lixiviação e atingir os lençóis subterrâneos ou sofrer carreamento e atingir as águas superficiais (IBAÑEZ et al. 1996)

Nos ambientes aquáticos, os pesticidas podem sofrer adsorção ou desorção das partículas de sedimentos, serem degradados por vias químicas, biológicas ou fotólise, bem como ser volatilizados (IBAÑEZ et al. 1996)

No ar, as moléculas podem ser transportadas atingindo áreas a grandes distâncias da região de aplicação.

Com relação à contaminação dos recursos hídricos (água superficial), a volatilização de pesticidas possibilita transporte desses compostos através da atmosfera e, posteriormente, sua deposição nas águas superficiais (rios, lagos etc) através da chuva. Um estudo envolvendo 10 países europeus mostrou que 48 pesticidas de um total de 99 foram detectados na água da chuva. Outra conclusão importante desse estudo foi que alguns desses pesticidas não eram utilizados nas áreas agrícolas em que as amostras da água da chuva foram coletadas, evidenciando o transporte a grandes distâncias desses compostos pela atmosfera (MURTI, 1991).

A lixiviação corresponde ao transporte vertical dos pesticidas no perfil do solo juntamente com a água da chuva ou irrigação que desce pelos poros. Esta forma de transporte tem sido apontada como a principal causadora da contaminação de águas subterrâneas(lençol freático). Estudos têm demonstrado que, de uma maneira geral, o transporte de pesticidas por lixiviação chega a 1% da dose aplicada podendo, em casos excepcionais, chegar a 5%. É importante mencionar que diversos fatores relacionados ao solo, ao clima e a molécula do pesticida influenciam a infiltração no solo. Por exemplo, solos com maior teor de matéria orgânica tendem a reter maior quantidade de pesticidas na camada superficial, diminuindo assim a sua movimentação. Além disso, solos com maior teor de matéria orgânica possuem maior atividade microbiana, o que possibilita

uma degradação mais rápida dos pesticidas pela ação dos microorganismos. No entanto, alguns pesticidas possuem baixa afinidade com a matéria orgânica do solo e, portanto, apresentam um alto potencial de lixiviação, devido a uma menor retenção pelo solo. Diante disso, ao se analisar a possibilidade de contaminação do lençol freático por pesticidas é necessário que se leve em conta todos os fatores envolvidos (PRIMEL et al, 2005).

O carreamento superficial corresponde ao transporte dos pesticidas através da água de enxurrada na superfície do solo, que poderá ter como destino final os rios e lagos, ocasionando sua contaminação. Chuvas mais intensas podem causar perdas substanciais de pesticidas por escoamento superficial. Estudos têm mostrado que perdas em torno de 1 a 2% da dose aplicada de um pesticida têm sido comum, considerando-se apenas uma única chuva. Medidas que visam diminuir a formação de enxurradas terão efeito direto na diminuição do escoamento superficial de pesticidas e, conseqüentemente, na poluição dos rios e lagos (FARIA, 2004).

4.1.1 – Contaminação das águas por pesticidas

A água é um dos elementos de maior importância para todas as formas de vida na terra. Ela está presente em todos os organismos vivos, fazendo parte de uma infinidade de substâncias e órgãos. Além disso, transporta diversos nutrientes para o interior do solo, ajuda a controlar a temperatura da atmosfera e apresenta uma série de funções de extremo valor (FARIA, 2004).

O despejo de substâncias tóxicas pela agricultura é uma das fontes de contaminação das águas, pois cada vez mais se utilizam pesticidas. Mesmo que estas substâncias cheguem aos rios e lagos em pequenas quantidades, a bioacumulação fará com que a sua ação seja altamente prejudicial ao longo das cadeias alimentares, no final das quais estamos nós, seres humanos. (PRIMEL et al, 2005).

Na cadeia alimentar, os resíduos de pesticidas provocam o fenômeno conhecido como biomagnificação: acumulação destes resíduos nos organismos ao longo de determinada cadeia, à medida que existe a mudança de um nível

trófico para o outro, sendo o homem o componente final da cadeia alimentar. Pode-se citar como exemplo o estudo realizado por Clear Lake na Califórnia, que observou o aumento da concentração de um metabólito do DDT (o DDD), cuja concentração inicial na água era de 0,02 mg/L, passou para 5,3 mg/L nos microrganismos do lago (plâncton), 10 mg/L em peixes pequenos que se alimentavam destes microrganismos, 1.500 mg/L em peixes carnívoros e 1.600 mg/L em patos (MOREIRA, 2002). Desta forma, verifica-se que estes seres aquáticos podem ser considerados como uma fonte importante de contaminação tanto do homem como de outros consumidores destes animais.

Para agravar o quadro, em muitas regiões do Brasil são feitas aplicações de pesticidas diretamente nas águas superficiais, para combater as larvas de insetos transmissores de doenças como a malária. Muitas vezes são os próprios rios que abastecem as cidades.

4.1.2 – Seleção dos Pesticidas

A crescente demanda de alimentos tem motivado o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações para prevenir ou combater pragas, portanto muitos produtos são utilizados para eliminar formas de vida animal ou vegetal indesejáveis nas culturas agrícolas. Para tanto, têm sido desenvolvidos métodos analíticos com o intuito de avaliar os riscos de contaminação. Foram selecionados os pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina de grupos químicos e classes diferentes com o objetivo de verificar o risco de contaminação especialmente em águas superficiais. Os pesticidas citados são utilizados nas culturas mencionadas na tabela 2. Os inseticidas são utilizados quando se observa a presença de larvas e insetos ou, ainda, pela exigência da cultura. Fungicida é utilizado para prevenir a presença de fungos. São empregados acaricidas e inseticidas sempre que necessário.

Após a seleção dos pesticidas a serem estudados neste trabalho foram avaliados alguns parâmetros, tais como: Dados referentes aos pesticidas (tabela - 2) e as suas propriedades físico-químicas (tabela – 3), para que o método de análise desenvolvido possa ser avaliado de maneira mais completa. A seguir são listados os pesticidas escolhidos (Figura 3, 4 e 5):

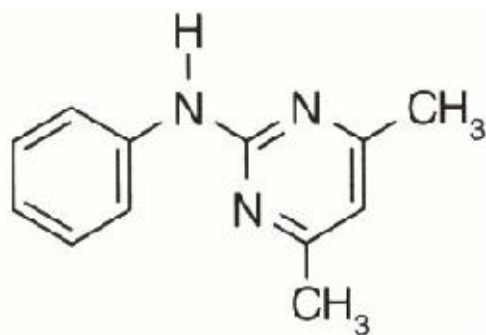


Figura 3 – Estrutura química do pirimetanil

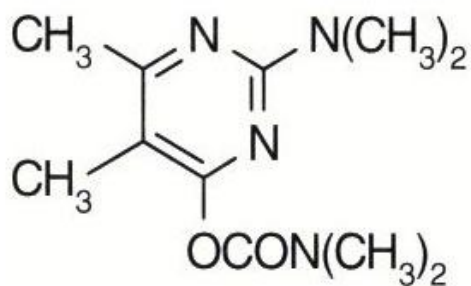


Figura 4 – Estrutura química do pirimicarbe

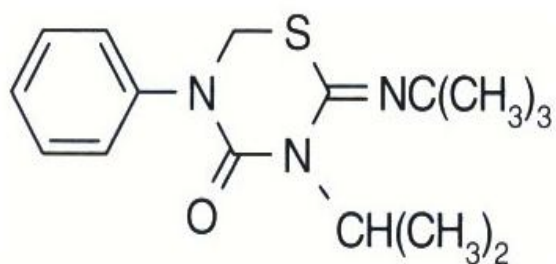


Figura 5 – Estrutura química da bupropione

Tabela 2 - Identificação dos pesticidas utilizados neste estudo.

Dados	Pirimetanil	Pirimicarbe	Buprofezina
Grupo químico	anilinopirimidina	dimetilcarbamato	Tiadiazinona
Nome químico	4,6-dimetil-N-fenil-2-pirimidinamina	2-(dimetilamino)-5,6-dimetil-4-pirimidinil	2-[(1,1-dimetiletil)imino] tetrahydro-3-(1-metiletil)-5-fenil-4H-1,3,5-diazin-4-ona
Fórmula Molecular	$C_{12}H_{13}N_3$	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	$C_{16}H_{23}N_3OS$
Classe	Fungicida	Inseticida	Inseticida-acaricida
Aplicação nas culturas	banana, batata, cebola, cenoura, maçã, melão e morango	Alface, batata, berinjela, couve e feijão	Algodão, citros, feijão, melão e pepino

Fonte: ANVISA

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas dos pesticidas relacionados.

PROPRIEDADES	PIRIMETANIL	PIRIMICARBE	BUPROFEZIN
Massa Molar (g/mol)	199,1	238,3	305,4
Ponto de fusão (°C)	96,3	90,5	105,1
Dissociação ácida 25°C (pKa)	3,52	4,53	-----
Tempo de meia vida em água DT ₅₀ (dias)	16,5	33,3	16,8
Solubilidade em água 20°C (mg/L)	121	3100	0,5
Solubilidade em solventes orgânicos (g/L , 20°C)	Acetona -389 n-hexan.-23,7 Tolueno -412 Act. Etila -617	Acetona 250 Metanol- 250 Xileno - 235 Act. Etila-226	Acetona -253 Clorofórm-520 Tolueno -336 Act. Etila -241
K _{o/w} (pH-7, 20°C)	2,84	1,7	4,3
Pressão de Vapor 25°C (mPa)	1,1	0,43	0,042

Fonte: IUPAC

4.2 – Preparação da amostra

É de fundamental importância assegurar a qualidade das águas que consumimos através do controle da sua qualidade, no que diz respeito aos resíduos de pesticida. Como se trata de quantidades muito pequenas de contaminantes é necessárias técnicas muito sensíveis para detectar e quantificar estes compostos.

Muitos contaminantes orgânicos estão presentes na água em níveis de traços. Devido a isso, nos últimos anos tem crescido o interesse em se desenvolver técnicas de preparo de amostra que possibilitem pré-concentrar os analitos da matriz para adequação ao sistema de detecção.

Com o objetivo de usar a técnica SPME no modo direto e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, se faz necessário a otimização dos parâmetros de pré concentração e extração dos pesticidas de interesse, visando alcançar os limites de detecção exigidos pela legislação.

Durante a implementação de métodos cromatográficos, estão associados diversas etapas prévias para preparação das amostras. Estas etapas contemplam fundamentalmente a extração e/ou concentração dos analitos na matriz, e em certos casos derivatização.

A técnica de extração líquido-líquido (LLE) é um procedimento de preparo de amostras que apresenta várias etapas, tais como: consumo de solventes orgânicos, tempo de extração e intenso trabalho do analista. A técnica de extração em fase sólida (SPE) possibilita a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas, utilizando pequenas quantidades de solvente para eluir os analitos do sorvente, pode apresentar problemas de entupimentos do sistema de extração e usa grandes volumes de amostra (QUEIROZ & LANÇAS, 2005).

A microextração em gota suspensa (SDME) foi introduzida a partir do desenvolvimento de uma técnica em que uma microgota de solvente orgânico imiscível em água (~50µL) era acomodada na porção final de um dispositivo de

politetrafluoretileno (PTFE), sendo então imerso na solução contendo a amostra. Após a extração sob agitação, o dispositivo era retirado da amostra e a fase orgânica injetada no cromatógrafo a gás. Posteriormente, a técnica foi modificada, passando-se a utilizar uma microsseringa como suporte, onde a fase orgânica era suspensa na ponta da agulha. No entanto, a microextração em gota suspensa não é tão robusta, ocorrendo perda de solvente durante a extração, além da necessidade de pré-tratamento de amostras bastante viscosas ou contendo material particulado (possível colisão com a microgota) (BONATO et. Al, 2008).

A extração em membrana, por sua vez, é mais robusta e apresenta como características mais importantes: o alto grau de seletividade, que possibilita a obtenção de extratos livres de interferentes, a capacidade de concentrar os analitos, permitindo a análise de substâncias em níveis de traços em matrizes complexas e a significativa redução no consumo de solventes orgânicos. As desvantagens em potencial dessa técnica incluem problemas de estabilidade da membrana e possibilidade de ocorrer “*carry-over*” (efeito memória), por serem utilizadas em várias extrações; por outro lado, podem ser facilmente utilizadas “on-line” com os equipamentos de análise (Queiroz et. Al, 2001).

A microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME), ou simplesmente, (LPME) pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes. Os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca) são impregnados com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com micro litros de uma fase aceptora. Com isso, a fase aceptora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo aplicar agitação constante durante a extração. Além disso, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez, evitando extração com membranas (BONATO et al, 2008).

4.3 – MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) consiste em duas etapas básicas; a absorção e a dessorção dos compostos em uma fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico. A etapa de absorção é realizada expondo a fibra diretamente na amostra ou em sua fase gasosa e a dessorção ocorre no próprio injetor do cromatógrafo a gás ou a líquido (BORGES et al, 2005).

A SPME difere das outras técnicas de extração para amostras aquosas pelo menor tempo de análise e pela não utilização de solventes, minimizando a geração de descartes e a exposição ocupacional. Em relação às outras, é uma técnica simples, rápida e de fácil manuseio, além da vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas, tais como farmacêutica, ambiental, alimentícia, aroma, forense e toxicológica, entretanto, embora seja uma técnica versátil, as condições de extração devem ser otimizadas para cada tipo de amostra. Neste caso, os principais parâmetros a serem avaliados são modos de extração (“headspace” ou imersão direta na amostra líquida), tipo de fibra, pH, velocidade de agitação, concentração iônica, temperatura e volume da amostra (KOMATSU & VAZ, 2004).

O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero (polidimetilsiloxano = PDM; poliacrilato = PA; Divinilbenzeno = DVB ou Carbowax = CW) ou de um sólido adsorvente (carvão ativado micro particulado= Carboxen) (Valente & Augusto, 1999).

A SPME preserva todas as vantagens da SPE, tais como simplicidade, baixo custo, fácil automação e facilidade de amostragem em campo e, ao mesmo tempo, elimina desvantagens da SPE, tais como o entupimento de cartucho e o uso de solvente por isso é considerada um aperfeiçoamento da extração em fase sólida (SPE) e foi criada com o intuito de simplificar a etapa de

preparação de amostras, diminuindo assim o tempo envolvido nas análises (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

Na extração por SPME os analitos contidos na amostra são deslocados para o recobrimento, até que se estabeleça um equilíbrio de partição do analito entre a fibra e o meio que a envolve. Por este motivo, a teoria do SPME baseia-se na transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (PAWLISZYN, 1997).

A amostragem é baseada no equilíbrio de absorção e/ou adsorção dos analitos entre uma micro fase de coleta, que pode ser sólida ou líquida, e a matriz contendo os analitos.

Dois modos de extração em SPME podem ser usados: microextração em fase sólida modo direto e microextração em fase sólida modo “headspace”. A melhor opção visa, principalmente, o estado físico da amostra, sua volatilidade e afinidade do analito pela matriz. Na extração direta, a fibra é colocada diretamente na amostra (líquida ou gasosa) e os analitos (voláteis ou não) são transferidos para fase extratora. No modo Headspace, a fibra é inserida acima da superfície do líquido ou sólido e os analitos (voláteis ou semivoláteis) são também transferidos para fase extratora. Em seguida, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo, onde os analitos são dessorvidos termicamente sob fluxo contínuo do gás de arraste e transportados para coluna cromatográfica. Por tratar-se de um método analítico cada vez mais rápido e que não polui o meio ambiente e nem prejudica a saúde do analista com o uso de solventes orgânicos, a SPME é muito utilizada e tem sido extensamente investigada como uma alternativa versátil e de baixo custo para a preparação de amostras para análise por cromatografia.

A sequência de procedimento para realizar a extração e a dessorção no injetor do cromatógrafo é ilustrada na figura 6.

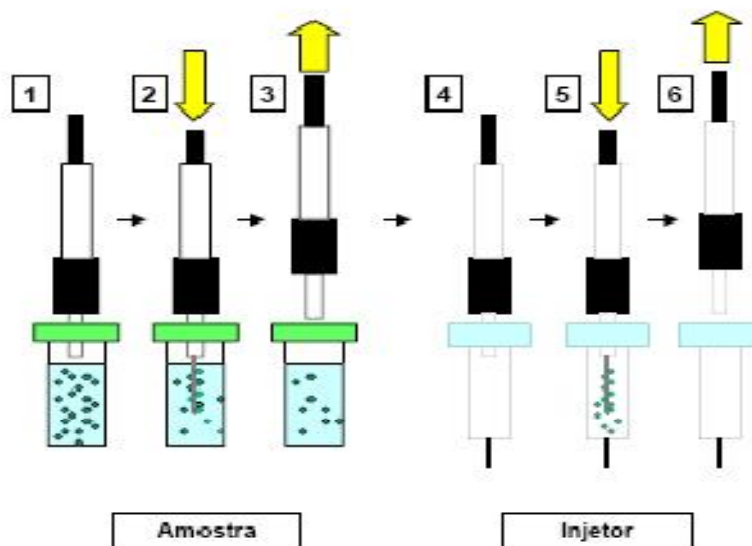


Figura 6 – Esquema de microextração em fase sólida (SPME). (1) Preparação do dispositivo de SPME; (2) Imersão da fibra na amostra e adsorção dos analitos à fibra; (3) Retração da fibra; (4) Introdução da agulha do dispositivo de SPME no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa; (5) Exposição da fibra no interior do injetor e dessorção dos analitos e (6) Retirada do dispositivo do injetor.

A SPME pode ser aplicada na amostragem de substratos ambientais aquosos, efluentes industriais, gasosas ou sólidas. A fase extratora é composta por filme líquido polimérico ou de um sólido poroso com grande superfície de adsorção. A agulha do dispositivo é introduzida no septo do vial contendo a amostra, a fibra de sílica é exposta diretamente na amostra aquosa onde ocorrerá a extração dos analitos ou, no caso de amostras gasosas, em contato com o gás, ou ainda em contato com o vapor em equilíbrio com a amostra líquida, que por partição, depois de certo período de tempo, concentra os analitos em sua superfície (sorvente). Realizada a extração, a fibra é recolhida

no interior da agulha e retirada da amostra. Posteriormente, o dispositivo é levado a um cromatógrafo gasoso, onde a fibra é introduzida no interior do injetor, ficando novamente exposta. Os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para coluna cromatográfica, depois do período de dessorção a fibra é recolhida para o interior da agulha, o dispositivo é retirado do injetor e o processo de separação/ quantificação tem início.

Numa extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (OLIVEIRA et. al, 2007).

O desenvolvimento da teoria da SPME baseia-se na aplicação dos fundamentos da termodinâmica e da transferência de massa. Para simplificar as relações matemáticas é conveniente, algumas vezes, assumir condições ideais. É um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Geralmente são consideradas três fases: a fibra extratora, a fase gasosa ou também conhecida como “headspace” e a matriz homogênea, entre as quais, durante a extração, os analitos migram até que o equilíbrio seja alcançado, onde se tem a igualdade dos potenciais químicos ($\mu_f = \mu_h = \mu_s$) entre as fases, respectivamente. Um tratamento matemático detalhado pode ser visto no item 4.3.1 e 4.3.2. A SPME tem aplicações diversas, em áreas como análise ambiental e de solos, água, alimentos, produtos naturais e farmacêuticos, análise clínica e forense. É uma técnica relativamente nova, tanto sob o aspecto de fundamentação teórica, quanto sob os de aplicação (COELHO & FONSECA, 2007).

Existem três tipos de dispositivos de SPME disponíveis no mercado, sendo um destinado a injeção manual, outro para amostragem em campo e o último, para injeção automática no GC ou para análise por cromatografia líquida (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

O dispositivo para injeção manual pode ser utilizado para a amostragem em campo. Na sua configuração mais comumente utilizada,

o comercial consiste de uma fibra de sílica fundida com dimensões capilares, da ordem de poucos micrômetros de diâmetro, inserida na agulha da seringa (figura 7).

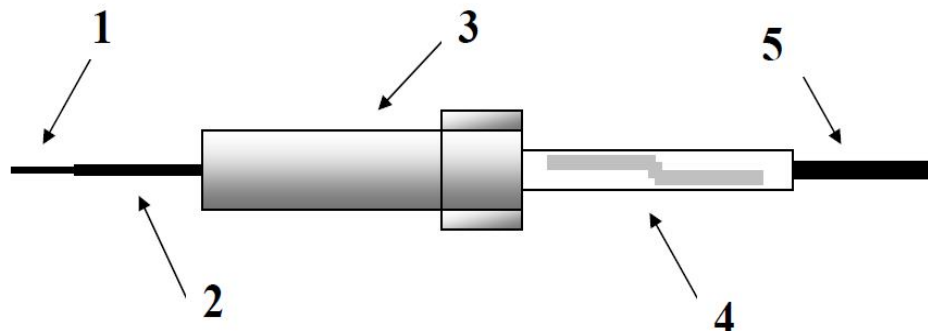


Figura 7 – Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME). (1) Fibra revestida com filme polimérico; (2) agulha de aço; (3) corpo do dispositivo; (4) guia do êmbolo e (5) êmbolo do dispositivo.

O sistema de SPME vem sofrendo modificações ao longo dos anos e, consiste de uma haste de sílica fundida de 10 mm de comprimento recoberta por 300 μm de espessura de fase sólida ou recoberta com uma micro-camada de um filme líquido polimérico seletivo, que apresenta diferentes espessuras. A fibra encontra-se posicionada dentro da agulha que tem a finalidade de protegê-la quando não está em uso, bem como de perfurar o septo de borracha, antes da exposição da fibra à amostra, ou na dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo (VALENTE & AUGUSTO, 1999).

Dependendo da fibra de SPME que está sendo utilizada, dois processos diferentes de coleta estão presentes, um processo é a absorção e o outro, a adsorção. Fibras absorventes extraem os analitos pelo processo de partição dentro de uma fase líquida. O processo de partição é baseado na distribuição do analito entre duas fases imiscíveis, a qual é determinada pela fugacidade de um composto em cada fase e, em equilíbrio pode ser descrito através de uma constante adimensional (coeficiente de partição – K):

$$K = C_o^e / C_s^e$$

Onde: C_o^e = concentração de equilíbrio de um composto na fase orgânica (ex: solvente, fibra e outros) e C_s^e = concentração de equilíbrio na amostra. (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

A habilidade de a fibra absorvente reter determinadas quantidades de analitos depende principalmente da espessura da camada líquida e do tamanho do analito. A polaridade da fibra pode aumentar a atração de determinado analito, mas é a espessura do filme líquido na fibra que retém o analito.

Fibras adsorventes extraem os analitos por interações físicas. A coleta ocorre por retenção dos analitos dentro dos poros internos. Os micro e mesoporos são ideais para analitos pequenos e intermediários e, normalmente os analitos ficarão retidos até que seja feita uma dessorção térmica ou por solventes. Macroporos podem adsorver moléculas maiores através de interações de Van der Waals ou pontes de hidrogênio. Nestes tipos de fibras há um número limitado de sítios de adsorção, portanto ocorre uma competição entre os analitos, ao contrário da fibra absorvente. (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

Um resumo das interações que estão presentes nas fibras disponíveis comercialmente é descrito na tabela 4 os dados de sílica fundida foram adicionados na tabela porque a superfície de sílica fundida também interage com os analitos através do processo de adsorção.

Tabela 4 - Resumo das interações presentes nas fibras de SPME

Fibra de SPME	Interação	Polaridade
Sílica fundida	Adsorção	polar
PDMS	Absorção	Apolar
PA	Absorção	Polar
PDMS/DVB	Absorção	Mista
CW/PDMS	Adsorção	Mista
CW/DVB	Adsorção	Polar
DVB/CX/PDMS	Adsorção	Mista
CW/TPR	Adsorção	Mista

Fonte: PARREIRA & CARDEAL, 2005.

4.3.1 - EQUILÍBRIO DE PARTIÇÃO EM SPME

Na SPME, em sistemas bifásicos, ocorre a partição do analito entre a fase estacionária (revestimento da fibra) e o meio no qual o analito se encontra (fase aquosa). Após algum tempo, característico de cada analito, o equilíbrio de partição é estabelecido. Nesse momento, a extração direta pode ser avaliada quantitativamente mediante equação fundamental. Sob o ponto de vista analítico não se deve esquecer que o polímero, que reveste a fibra para a microextração, pode ser considerado fase líquida imobilizada em contato com outra (a amostra), competindo entre si pela solubilização do analito. Logo, os fatores que afetam a eficiência das extrações líquidas convencionais LLE também atingem a SPME. Alguns desses fatores como volume, concentração e coeficiente de partição relacionam-se por uma equação analítica fundamental. Outros, apesar de independentes como a temperatura e o pH, afetam a eficiência da extração, pois agem diretamente nas propriedades do fenômeno de partição (QUINTEIRO et al, 2003)

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Um sistema trifásico ideal simples é o de uma fibra mergulhada numa matriz aquosa com um headspace; sistemas reais são mais complexos, pois nem o headspace nem a matriz são soluções ideais, os analitos podem interagir entre si, com as paredes do frasco e eventualmente com o bastão de sílica fundida da fibra. Os fundamentos da distribuição de massas na extração podem ser descritos a partir do que ocorreria num sistema ideal trifásico: antes da extração, n_0 moles do analito estariam presentes, com uma concentração C_0 , em um volume V_A da amostra; quando completada a extração, os n_0 moles se distribuiriam entre as fases, isto é, n^e_A na amostra aquosa (e equilíbrio), n^e_H no headspace e n^e_F na fibra (VALENTE & AUGUSTO, 1999).

Quando se usa microextração em fase sólida headspace tem-se um sistema trifásico, cujas fases (matriz, revestimento e headspace) competem entre si pelos analitos, em um sistema trifásico a quantidade total do analito nas três fases pode ser dada pela conservação de massa:

$$C_0 V_A = C^e_F V_F + C^e_H V_H + C^e_A V_A \quad (1)$$

Onde: C_0 = concentração inicial do analito na amostra; C^e_F , C^e_H , C^e_A são as concentrações do analito no equilíbrio, na fibra, headspace e amostra e V_F , V_H , V_A são os volumes da fibra, do headspace e da amostra.

A constante de distribuição do analito entre a fibra / headspace (K_{FH}) é dado por:

$$K_{FH} = \frac{C^e_F}{C^e_H} \quad (2)$$

Enquanto que a constante de distribuição do analito entre a fase headspace / amostra (K_{HA}) é definida como:

$$K_{HA} = \frac{C_H^e}{C_A^e} \quad (3)$$

A expressão que mostra a quantidade de analito recolhido na fibra extrativa é:

$$n = C_F^e V_F \quad (4)$$

onde: C_F^e = concentração em equilíbrio do analito na fibra extrativa e V_F = volume do recobrimento da fibra.

Usando as equações anteriores, podemos obter a equação para a quantidade de analito extraído:

$$n = \frac{K_{FH} K_{HA} V_F C_0 V_A}{K_{FH} K_{HA} V_F + K_{HA} V_H + V_A} \quad (5)$$

A constante de distribuição do analito na fibra/amostra é:

$$K_{FA} = K_{FH} K_{HA} \quad (6)$$

Assim:

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0 V_A}{K_{FA} V_F + K_{HA} V_H + V_A} \quad (7)$$

Como o tipo de extração utilizado neste trabalho foi o modo direto de extração, a parcela $K_{HA} V_H$ da equação (7) pode ser desprezada assumindo a forma da equação (8). Em sistemas bifásicos ocorre a partição do analito entre a fase estacionária (revestimento da fibra) e o meio no qual o analito se encontra (fase aquosa). Após algum tempo, característico de cada analito, o equilíbrio de partição é estabelecido. Nesse momento, a extração direta pode ser avaliada quantitativamente mediante equação fundamental (8).

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0 V_A}{K_{FA} V_F + V_A} \quad (8)$$

O volume da fase estacionária (V_F) geralmente é considerado como proporcional à espessura do revestimento, pois a área da fibra revestida é constante. Assim, V_F será máximo quando a espessura do revestimento for máxima e, quanto maior, maior será a quantidade extraída de analito. Já o volume de amostra (V_A) submetido à extração pode ser muito pequeno, da ordem de poucos mililitros, ou muito menos. Tais variáveis, junto com o coeficiente de partição (K_{FA}) relacionam-se de forma muito interessante e conveniente. O V_A deve ser sempre otimizado experimentalmente, mas recomenda-se que seja maior do que 100 mL quando forem usados, na extração, revestimentos com baixa afinidade pelo analito ($K_{FA} < 1.000$).

(QUINTEIRO et al, 2003). Nesse caso, tem-se aproximação na soma do denominador da equação fundamental: $K_{FA} V_F + V_A \cong V_A$, e, assim, a equação (8) é simplificada e transformada na equação (9), tornando n independente de V_A , o que é importante em amostragens ambientais in situ:

$$n = K_{FA} V_F C_0 \quad (9)$$

Há casos em que n pode depender, de forma direta, somente de duas variáveis: V_A e C_0 . Isso ocorre quando são usados revestimentos com alto V_F e alta afinidade pelo analito ($K_{FA} > 1.000$). Entretanto, o V_A precisa ser ao mesmo tempo, suficientemente, pequeno para se tornar variável desprezível na soma e ocorrer nova aproximação: $K_{FA} V_F + V_A \cong K_{FA} V_F$. Nessa situação a equação (8) é simplificada na equação (10), não ocorrendo, desse modo, a partição: o analito migra todo, rapidamente, para o revestimento da fibra. Isto é vantajoso quando extrações exaustivas são desejadas:

$$n = V_A C_0 \quad (10)$$

O coeficiente de partição representa a seletividade do revestimento com relação ao analito e sua interação com a matriz. A seletividade é baseada nas diferenças de polaridade e de volatilidade. A eficiência do processo de extração será sempre dependente da afinidade do analito pelas fases (K_{FA}). De acordo com PAWLISZYN, em sistema cuja agitação é perfeita, K é diretamente proporcional à quantidade extraída de analito. Essa constante pode ser

determinada pelas equações, assumindo que a extração entre rapidamente em equilíbrio, ou é estimada através do coeficiente de partição octanol/água (K_{OW}). Encontrado (tabela 3), K_{OW} é útil para prever a afinidade de polímeros não-polares, como o PDMS, por determinados compostos orgânicos.

No modo headspace, partindo da equação (7), pode-se considerar que as fases amostra/headspace apresentam o mesmo volume:

$$V_A = V_H \quad (11)$$

Podemos então usar a equação (7) que deve ser escrita da seguinte maneira:

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0 V_A}{K_{FA} V_F + (1 + K_{HA}) V_A} \quad (12)$$

O mesmo raciocínio utilizado para o modo direto com relação aos volumes é empregado no modo headspace:

$$K_{FA} V_F < (1 + K_{HA}) V_A \quad (13)$$

A equação (12) passa a ser:

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0}{(1 + K_{HA})} \quad (14)$$

Conclui-se então que a quantidade do analito coletado pela fibra, no modo *headspace*, segue também uma dependência linear com a concentração inicial do analito na amostra:

$$n = k^* C^0 \quad (15)$$

$$\text{Assim, } K^* = \frac{K_{FA} V_F}{(1 + K_{HA})}$$

Outra constatação interessante é o fato de que a quantidade extraída do analito independe do volume da amostra em análise. Assim, a coleta dos analitos pode ser feita diretamente no ambiente natural, expondo a fibra extrativa ao sistema em estudo, como a atmosfera, a água de um rio ou efluentes industriais (DÓREA et al, 2008).

4.3.2 - CINÉTICA DA SPME

A Equação 16, expressa o tempo para atingir o equilíbrio(t_e) em função da espessura do recobrimento (L_f) e do coeficiente de difusão do soluto nessa camada (D_f).

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_f^2}{2D_f} \quad (16)$$

Segundo esta equação, o tempo necessário para atingir o equilíbrio seria infinito, mas devido às incertezas experimentais inerentes às extrações por SPME, considera-se, como mostrado na Equação 16, um tempo de equilíbrio prático, t_{95} , que correspondente à extração de 95% da massa que seria extraída após um tempo infinito de extração. A correlação do modelamento pela Equação 16 com a situação experimental precisa ser avaliada com cautela, quando nela são substituídos os parâmetros para a fibra com o recobrimento mais espesso comercialmente disponível (VALENTE & AUGUSTO, 1999).

O tempo requerido para o equilíbrio (t_e) no modo direto, depende apenas da espessura do filme líquido da fibra (L_f) e do coeficiente de difusão do analito na fibra extrativa (D_f) .

A espessura do revestimento e a sua natureza (polar, apolar ou bipolar) são as principais características que governam a seletividade e a eficiência da extração. Tais características são facilmente encontradas na literatura e em notas técnicas dos fabricantes (Tabela 4). Normalmente, os revestimentos com grande afinidade pelo analito (alta seletividade) e mais espessos (extraem em maior quantidade) proporcionando ao método alta sensibilidade (QUINTEIRO et al, 2003). Por outro lado, alguns parâmetros de operação devem ser cuidadosamente avaliados, como a temperatura de extração e o nível de

agitação da amostra, a fim de otimizar o coeficiente de difusão do analito na fibra coletora. No desenvolvimento do método, o entendimento da cinética do processo é de grande importância para se alcançar os objetivos da análise (DÓREA et al, 2008).

4.3.3 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO

A otimização univariada é classificado como seqüencial, sendo portanto conhecida como método do fator único ou estratégia “um-fator-de-cada-vez”. Neste método, fixa-se um dos fatores que estão sendo estudado, menos um deles. Este último sofre variação até que se encontre a melhor resposta, passando esta resposta a ser fixada e um novo fator passa a sofrer variação. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido encontrados como sendo ótimos para fornecer a melhor resposta. No desenvolvimento do processo de otimização univariado, apenas um ciclo de variações não é suficiente para definir com precisão o ótimo. Assim, devem-se efetuar tantos ciclos quantos forem necessários até observar-se que não ocorre melhora no resultado da medição. Este tipo de procedimento é provavelmente o método de otimização mais comum em química.

Otimizar é melhorar as condições de extração até onde pudermos. No ideal, melhorar até o máximo. Melhorar só é possível se temos escolha. Escolher uma dentre várias alternativas. Se uma alternativa for capaz de introduzir alguma melhoria, ficamos com ela, caso contrário, o que temos em mãos já é a escolha ótima. A alternativa ótima seria aquela na qual o valor desta função atinge um valor extremo; ou seja, um máximo ou um mínimo. Acontece que nem sempre o “ótimo” sai de pronto, num único cálculo. É necessário um processo sistemático de busca. Um procedimento iterativo de cálculos que, passo a passo, de parâmetro a parâmetro, permita-nos ir melhorando a seleção. Até que o melhor resultado seja encontrado.

Em métodos de calibração multivariada duas ou mais respostas são relacionadas com a propriedade de interesse. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes e determinações simultâneas. Isso faz com que, modelos de calibração multivariada seja uma alternativa quando métodos univariados não podem ser aplicados. Como na calibração univariada, a primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada trata da aquisição de respostas instrumentais para uma série de padrões (amostras de calibração), em que o valor da propriedade de interesse é conhecido. Para que o método de otimização multivariada tenha sucesso, inicialmente, o comportamento independente de cada um dos fatores do sistema químico deve ser perfeitamente conhecido, pois a escolha dos valores iniciais das variáveis que influenciam a resposta é uma etapa crucial no planejamento dos experimentos e o objetivo principal será descobrir quais os valores (níveis) dos fatores (variáveis) que produzem a maior resposta possível. Segundo BRUNS (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 1996), mesmo que a aplicação da otimização multivariada se dê inicialmente, é preciso que se conheçam os valores iniciais das variáveis.

Este trabalho optou pela otimização univariada dos parâmetros experimentais (modo de extração, recobrimento da fibra, tempo de extração, velocidade de agitação, influência do pH, tempo de dessorção e adição de sal) e instrumentais (tempo de abertura do detector, tempo de retardo do detector, velocidade de varredura e banda espectral de passagem), já que não se dispunha de informações prévias que orientassem uma abordagem multivariada. Inicialmente foram otimizadas o modo de extração, velocidade de agitação, tempo de extração, tempo de dessorção, influência do pH e adição de sal e por último o recobrimento da fibra. A otimização foi realizada por meio da comparação dos sinais analíticos obtidos usando os três compostos de interesse em uma mesma concentração, pois o efeito destes parâmetros no sinal analítico emitido é um resultado da área, sendo maior a área maior a quantidade de analito extraída.

4.3.3.1 – RECOBRIMENTO DA FIBRA

As principais fibras disponíveis comercialmente são: o polidimetilsiloxano (PDMS), com diferentes espessuras do filme (7, 30 e 100 μ m); o poliacrilato (PA), com 85 μ m; o polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), com 60 e 65 μ m; o carboxeno-polidimetilsiloxano, com 75 μ m; o carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB), com 75 μ m e a carbowax-resina, com 50 μ m (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

Analitos apolares têm relativa afinidade pela fase apolar PDMS. A fase constituída de poliacrilato é mais polar e pode ser utilizada para compostos mais polares como compostos fenólicos. Fases combinadas são principalmente utilizadas para a extração de compostos voláteis (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000). A espessura do filme que recobre a fibra de SPME é selecionada de acordo com a eficiência desejada, o tempo de extração e a natureza do analito. Quanto mais delgada for a espessura do filme, mais rápido o equilíbrio de partição pode ser alcançado. Entretanto, os maiores rendimentos de extração geralmente estão associados com a utilização de filmes mais espessos.

4.3.3.2 – MODO DE EXTRAÇÃO

Há dois tipos de extração por SPME: a direta imersão da fibra na fase aquosa e a extração por *headspace* (HS-SPME). Neste último tipo, a fibra fica exposta aos vapores da amostra em sistema fechado. Neste sistema, a amostra é submetida a uma certa temperatura capaz de volatilizar os analitos de interesse que, por sua vez, entram em contato direto com a fibra de extração (MILLS & WALKER, 2000). A HS-SPME foi primeiramente descrita em 1993. Esse tipo de extração é preferível para compostos voláteis e proporciona maior seletividade, maior tempo de duração da fibra e menor possibilidade de contaminação, uma vez que não há contato direto com a amostra líquida (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; SNOW, 2000). Na HS-SPME, três

fases estão envolvidas no processo de extração: a fibra, os vapores da amostra (*headspace*) e a matriz (amostra). Portanto, a afinidade do analito pelas três fases determina o rendimento de extração. Qualquer que seja o tipo de extração escolhido (imersão direta da fibra ou *headspace*), as propriedades físico-químicas da fibra são essenciais para favorecer o processo de partição (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

4.3.3.3 – TEMPO DE EXTRAÇÃO

A eficiência também é melhorada com o aumento do tempo de permanência da fibra em contato com a amostra. Entretanto, o tempo de extração de diversos métodos desenvolvidos por SPME citados na literatura situa-se em torno de 1 a 60 minutos e é pré-estabelecido antes do sistema atingir o equilíbrio, uma vez que este pode demorar horas para ser alcançado (SNOW, 2000). Com relação à temperatura, no modo direto de extração geralmente observa-se que seu aumento causa diminuição do coeficiente de partição para a fase de extração (LORD & PAWLINSZYN, 2000).

4.3.3.4 – VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

A quantidade de analito extraído depende da velocidade na qual o método de SPME alcança o equilíbrio através da razão de transferência de massa da fase aquosa para a fibra. Usualmente essa transferência de massa pode ser melhorada através da agitação. A extração torna-se eficiente quando a agitação é utilizada para facilitar o transporte de massa entre a fase aquosa e a fibra. A agitação da amostra é recomendada, pois tende a diminuir o tempo de equilíbrio. Métodos de homogeneização incluem a agitação magnética e a aplicação de ultra-som. Essa última deve ser usada com cautela pois também pode danificar a fibra, diminuindo sua vida útil (KOMATSU & VAZ, 2004).

4.3.3.5 – INFLUÊNCIA DO pH

O pH afeta a extração por SPME do mesmo modo que a maioria dos procedimentos de extração líquido-líquido ou em fase sólida (SPE). O pH do meio de extração é particularmente importante para substâncias que possuem um grupamento químico dissociável dependente de pH como as substâncias de caráter ácido ou básico. O ajuste de pH é realizado com o objetivo de obter o analito na forma neutra, possibilitando maior afinidade com a fibra. Um cuidado especial deve ser tomado quando a imersão direta de fibra de SPME é utilizada, uma vez que valores extremos de pH (menores que 2 ou maiores que 10) podem danificar a fibra em curto prazo (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

4.3.3.6- ADIÇÃO DE SAL

A adição de sal como NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2CO_3 também pode melhorar a eficiência de extração através do fenômeno conhecido como “*salting out*” (JUNTING, PENG & SUZUKI, 1998; THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; LORD & PAWLINSZYN, 2000; SNOW, 2000). O que se observa normalmente é que o rendimento de extração aumenta com a concentração de sal na amostra até certo limite, seguida da diminuição da quantidade extraída com o posterior aumento na concentração de sal (LORD & PAWLINSZYN, 2000).

4.3.3.7 – TEMPO DE DESSORÇÃO

A fibra do dispositivo de SPME é inserida diretamente no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa. Neste compartimento, a fibra é exposta ao calor e os analitos são dessorvidos e introduzidos na coluna cromatográfica. Um *liner* de menor diâmetro interno é utilizado para uma dessorção mais rápida. Geralmente a fibra é mantida no injetor a uma temperatura de 250 °C por certo período de tempo suficiente para evitar o efeito de *carry-over*, pois a fibra é reutilizada para análises posteriores (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

4.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação de um método é um processo essencial para definir se o mesmo está adequado aos objetivos a que se destina, fornecendo resultados confiáveis. Através de estudos experimentais, pode-se assegurar que o método desenvolvido atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

A variabilidade associada a um procedimento analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, soluções de referência, calibrações, analista e ambiente (TOMLIN, 2000).

Na determinação de resíduos de pesticidas devem-se desenvolver métodos de extração eficientes, bem como procedimentos analíticos com alta seletividade, a fim de assegurar que, caso estes resíduos estejam presentes nas amostras analisadas, sejam possíveis a sua separação e quantificação (LANÇAS, 2004).

A validação de um procedimento que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do procedimento. Desta forma, todas as variáveis

devem ser consideradas, tais como a estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e avaliação dos dados (ZANELLA *et al.*, 2000).

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de métodos de separação são: curva analítica, linearidade, seletividade, precisão, limites de detecção e de quantificação e robustez.

4.4.1 - Curva analítica

A calibração é um dos estágios fundamentais em análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo. Cinco níveis de concentração, no mínimo, são sugeridos pela ANVISA para que seja construída uma curva analítica, sendo injetados em ordem crescente de concentração, por no mínimo três vezes cada. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda seis ou mais níveis de concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode-se construir a curva analítica utilizando-se soluções analíticas de referência em solvente ou no extrato obtido com a matriz. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a quantidade de analito, sem considerar a interferência da matriz. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser descrita pela equação da regressão linear: $y = ax + b$, onde b é a intersecção com o eixo y (coeficiente linear) quando $x = 0$ e a é a inclinação da curva (coeficiente angular) (RIBEIRO *et al.*, 2003).

4.4.2 – Linearidade

Define-se linearidade como a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração) (LANÇAS, 2004). A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas de diferentes concentrações, variando-se estas de acordo com a finalidade da análise (MISTURA, 2003).

A linearidade refere-se a capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica específica. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (avaliado pelo teste “t” de student), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação aproximadamente igual a um e coeficiente angular diferente de zero (LANÇAS, 2004).

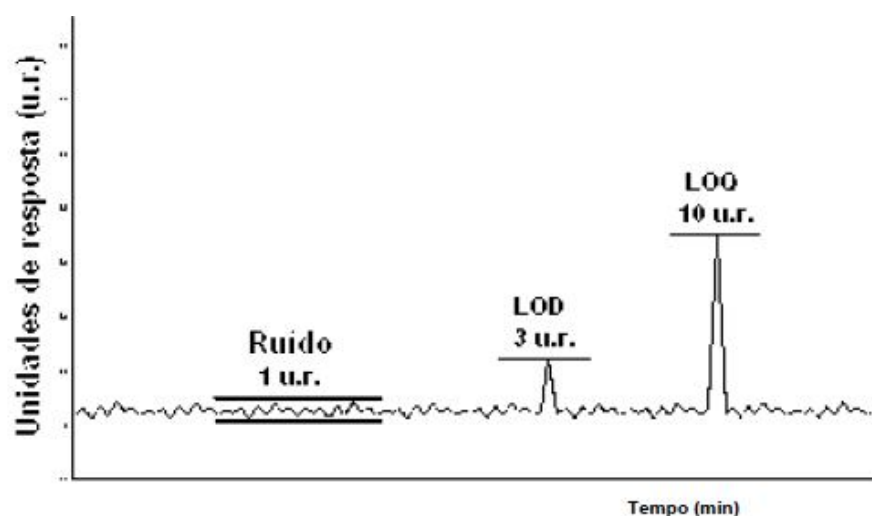
4.4.3 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2007).

O Limite de Detecção representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. É geralmente expresso em unidades de concentração e definido como a relação de 2:1 ou 3:1 entre o sinal e o ruído (RIBANI, 2004). Já o Limite

de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de precisão e veracidade. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração. (INMETRO, 2007).

Neste trabalho convencionou-se denominar como unidades de resposta (u.r.) as medidas realizadas para determinar os valores de LD, LQ e ruído da linha base, conforme desenho demonstrado pela Figura 8.



Fonte: MISTURA (2003).

Figura 8. Diagrama demonstrando o ruído da linha base, o LD e o LQ.

Assim, o ruído consiste na flutuação da linha base obtida no cromatograma sendo a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionando a nenhum composto detectado. Com o tempo, o ruído pode mudar, e conseqüentemente o LD e o LQ. Assim, os instrumentos necessitam ser averiguados rotineiramente e os dados reportados de acordo com a variação em cada aquisição.

4.4.4 – Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. É expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculado pela equação abaixo (RIBANI *et al.*, 2004) e pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária.

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{s}{\bar{x}_m} \times 100$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - \bar{x}_m)^2 / n - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

$\bar{x}_m$ = média de uma série de medidas (replicatas);

n = número de medidas.

A repetitividade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, realizadas sob as mesmas condições de medição, denominadas condições de repetitividade, com o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, no mesmo local e com repetições em curto intervalo de tempo (INMETRO, 2007). Já a precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A medida da precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, mais aconselhável

de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados depois que esteja finalizado (RIBANI *et al.*, 2004).

4.4.5 – Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações (INMETRO, 2007). Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (RIBANI *et al.*, 2004).

A robustez é a medida da sua capacidade de permanecer inalteradas em decorrência de pequenas variações, intencionalmente introduzidas nos parâmetros do método. Os testes de robustez indicam os fatores que devem influenciar de maneira significativa, a resposta do método em estudo. Tal fato mostra a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições, uma vez que ela mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método (LANÇAS, 2004).

5 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A técnica SPME investiga extensamente os principais aspectos deste métodos na preparação de amostras para análise.

Valente et. al (1998) investigaram a utilização da técnica de SPME em amostras aquosas para determinação de THM, os estudos feitos demonstraram que a SPME pode ser usada nas análise de matrizes aquosa tanto no modo “headspace” quanto diretamente na amostra, desde que não exista suspensão de materiais que possam contaminar ou danificar a fibra. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica de SPME utilizada para análise de THM em água potável, foi estabelecida adequada e operar-se com facilidade no modo headspace, que mantém a representatividade das concentrações no meio aquoso e evita contaminações da fibra por material particulado orgânico presente na amostra. Podendo viabilizar o cumprimento de dispositivo legal que determina o monitoramento dos THM em águas potáveis devido a falta de recursos orçamentários. Este trabalho procurou avaliar a aplicabilidade da técnica de SPME em análise de contaminantes voláteis em águas potáveis municipais. Um acompanhamento temporal da qualidade de água potável é previsto na legislação brasileira.

Arthur e Pawliszyn (1990) desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar algumas características da microextração em fase sólida como o tempo de extração, efeito da agitação da amostra sobre o tempo de extração, linearidade, seletividade, efeito de interferentes, efeito da força iônica e reprodutibilidade. As fibras de sílica fundida, sem qualquer tipo de recobrimento, foram usadas na extração de bifenilos policlorados e benzenos clorados, e eram recobertos com poliamida no caso da extração de haletos de alquila. A quantificação dos compostos foi feita a partir de um detector por captura de

elétrons (ECD). Foi feita uma adaptação de seringas utilizadas na injeção de amostras em cromatografia gasosa, para alojar a fibra no seu interior. Constatou-se que o tempo de extração é maior quando não se aplica qualquer tipo de agitação na amostra. A variação da concentração de NaCl nas amostras não provoca qualquer tipo de alteração significativa no sinal analítico obtido. Por outro lado, verificou-se baixa precisão dos dados obtidos. Dois fatos foram atribuídos a isto: o equilíbrio não foi completamente atingido em muitos dos ensaios e a mudança da posição da fibra na dessorção, gera diferenças marcantes na resposta obtida.

Valente e Augusto (1999) publicaram um trabalho que relatam as vantagens de um procedimento de preparo da amostra, procurando-se isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter um nível de limpeza que não comprometa a análise química, a SPME é um elo entre a matriz química e o instrumental analítico particularmente interessante para cromatografia gasosa. Como técnica analítica ela depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma matriz pode ser injetada diretamente num cromatógrafo gasoso. Principalmente tratando-se de matrizes de origem ambiental, que contém material particulado não volátil, termodegradáveis e água em quantidades incompatíveis com as colunas cromatográficas e detectores do GC. Na extração por SPME as moléculas do analitos penetram no recobrimento da fibra vencendo resistências e transferência de massa até que se estabeleça um equilíbrio de partição do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição. Para otimização de um método por SPME são avaliados alguns parâmetros como seleção do modo de extração, seleção do tipo de fibra, seleção da velocidade de agitação, seleção do tempo de extração e dessorção.

Barrionuevo e Lanças (2000) Publicaram um trabalho que consiste na comparação da eficiência e praticidade das técnicas de extração SPE e SPME, na análise de piretróides em água. Para extração por SPME foi preparada uma solução com os piretróides (bifentrina, cipermitrina, permetrina e deltapermitrina) e sob agitação, temperatura de (30°C) e após 40 min. de exposição da fibra na solução de piretróides, esta foi exposta no injetor do cromatógrafo por 14 min.

para dessorção dos analitos. Os valores obtidos em cada concentração foram lançados em gráfico e feitos a regressão linear, foi calculado o coeficiente de correlação r para cada reta, onde mostraram elevada correlação entre as concentrações das amostras e as áreas obtidas, com valores de r sendo maior que 0,99 para todos os compostos, exceto para a cipermetrina cujo coeficiente foi de 0,98. Na SPE foram realizadas comparações na capacidade de extração de diferentes sorventes (Florisil, Octadecil Silano- C_{18} e sílica). Para extração foram utilizadas amostras com água deionizada e enriquecida com piretróides nas concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$), porém o limite de detecção dos piretróides foi verificado como sendo de 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Calculou-se, então, qual volume necessário para que a concentração final da amostra extraída por SPE fosse igual ou superior a 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, e o tempo necessário para passagem da amostra pelo cartucho de SPE, preparado com 1 g de florisil (sorvente). Devido a baixa solubilidade dos piretróides em solventes polares (orgânicos), neste trabalho optou-se por hexano e acetronitrila, utilizados na maioria dos trabalhos com estes compostos. Foram testados cartuchos com diferentes sorventes (C_{18} , Florisil, Sílica) e a porcentagem de recuperação dos piretróides foi de 53,4% a 108,2% e mostrou maior eficiência de extração quando utilizou-se florisil. Comparando-se com a SPME, a SPE é muito mais demorada e é notório o custo ambiental e econômico mais elevado, devido ao descarte de solventes e ao tempo de extração da amostra.

Ribeiro et al (2003) Apresentaram definições dos parâmetros de validação de métodos analíticos, sugerindo roteiro para execução desse processo. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. As validações de métodos analíticos envolvem gráfico analítico, intervalo de trabalho, linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. O gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, equação da regressão linear, coeficiente de correlação ou determinação e a concentração estimada dos calibradores (solução-padrão), podendo ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados em um intervalo definido. O intervalo de trabalho consiste na faixa do maior ao menor nível de concentração do analito que desejam estudar e que

pode ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. A linearidade faz referência a capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais a concentração do analito, dentro da faixa analítica especificada, e pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1. A precisão avalia a proximidade entre várias medidas efetuada na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Normalmente, é expressa como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas. Para análise de pesticidas são aceitáveis coeficiente de variação de até 20%. A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade. A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, mesmo dia e condições ambientais) em pouco espaço de tempo. O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variação dentro do aceitável para cada nível de concentração (ppm – 16 a 32%; ppb – 45%). Limite de Detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, não necessariamente quantificada, pode ser determinado mediante o sinal/ruído, desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O limite de quantificação é a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitável, pode ser estimado por sinal/ruído, desvio-padrão e processos estatísticos. A robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações nos parâmetros do método durante o uso normal. O teste de robustez serve para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido para outro laboratório.

Quinteiro et. al (2003) publicaram um trabalho com o objetivo de apresentar os principais aspectos teóricos, funcionais e analíticos, da Microextração em Fase Sólida (SPME), dedicando um tópico especial para sua aplicação em análise de alimentos. São descritas as principais características da instrumentação, das etapas de extração e das formas operacionais. Mostrando o desenvolvimento de método de análise por SPME aliado à cromatografia a

gás (CG) e algumas aplicações em análise de alimentos, onde foram discutidas as principais vantagens oferecidas pela técnica. Concluiu-se que a SPME permite a extração, sem o uso de solventes, e a determinação de uma série de substâncias de matrizes sólidas, líquidas ou gasosas de modo prático e eficiente. O uso crescente da SPME-CG possibilita o uso na detecção de fraudes, adulterações e contaminações de alimentos que é de interesse dos órgãos fiscais responsáveis pela saúde pública.

Komatsu e Vaz (2004) Publicaram esse trabalho com o objetivo de desenvolver uma metodologia analítica multiresíduo para determinação dos pesticidas (trifluralina, simazina, atrazina, pentraclorofenol, bifentrina, cis-permetrina e trans-permetrina) em amostras de água, empregando microextração em fase sólida (SPME), seguida pela determinação por GC/MS. Na SPME se faz necessário otimizar os parâmetros de extração. Sendo assim foram realizados estudos para se definir qual a melhor fibra, modo de extração, tempo de extração, velocidade de agitação, concentração iônica e pH da amostra para que fosse atingida a maior sensibilidade possível. O método proposto neste trabalho foi aplicado em uma amostra de água bruta coletada em Cananéia. Apesar de ser uma região com intensa atividade agrícola, não foram detectadas presenças dos pesticidas estudados. Porém, para testar a eficácia do método proposto foi realizado um estudo onde foi adicionado a concentração de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada pesticida, recomendado pela Comunidade Européia como o máximo permitido para água potável, na mesma amostra de água bruta coletada em Cananéia. O método proposto apresentou faixas para recuperação, com boa reprodutibilidade, dentro dos intervalos recomendados por diferentes critérios de validação, mesmo em concentrações muito próximas ao limite de detecção. Por outro lado, os valores encontrados para os limites de detecção foram inferiores aos sugeridos ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) por organismos de regulação mundial para determinação de pesticidas em água potável.

A portaria nº. 518 do Ministério da Saúde (25 de março de 2004). Estabelece as responsabilidades por parte de quem produz a água, no caso, os sistemas de abastecimento de água e de soluções alternativas, o exercício de “controle de qualidade da água” e às autoridades sanitárias das diversas

instâncias de governo, a missão de “vigilância da qualidade da água para consumo humano”. Esta Portaria também ressalta a responsabilidade dos órgãos de controle ambiental no que se refere ao monitoramento e ao controle das águas brutas de acordo com os mais diversos usos, incluindo o de fonte de abastecimento de água destinada ao consumo humano. Em seu Artigo 14, tabela 3, a portaria em questão define o padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde, e entre estas substâncias estão os agrotóxicos.

Rocha & Carvalho (2004) estudaram os efeitos de alguns pesticidas sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, mediante a utilização da metodologia padrão adaptada, para estudos de seletividade. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com dez tratamentos e quatro repetições, sendo a parcela experimental constituída de uma gaiola de exposição dos parasitóides aos resíduos frescos e secos dos produtos. Utilizaram-se os seguintes compostos em g L⁻¹ em água: lufenurom (0,04), triflumurom (0,15), imidaclopride (0,28), ciromazina (0,11), pirimicarbe (0,25), metoxifenozone (0,12), abamectina (0,018), acefato (0,75) e esfenvalerato (0,019). A testemunha foi composta somente de água destilada. Avaliaram-se a capacidade de parasitismo, o número de indivíduos emergidos e a razão sexual. Todos os inseticidas avaliados, exceto ciromazina, reduzem o número de ovos parasitados. Os produtos abamectina, acefato e esfenvalerato são os mais prejudiciais a emergência e razão sexual desse parasitóide. A técnica da IOBC, mesmo adaptada, mostra-se viável para estudos de seletividade de inseticidas com o parasitóide *T. pretiosum*.

Primel et al (2005) Desenvolveram trabalho com o objetivo de avaliar o potencial teórico de lixiviação e o risco de poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. Objetivaram-se ainda comparar esta avaliação teórica com os resultados obtidos das análises de amostras de águas de rios, coletadas na região em estudo durante o período de cultivo do arroz irrigado. Esse trabalho demonstrou que a quantidade de herbicidas usados nas lavouras de arroz irrigado influencia diretamente os níveis de herbicidas que ocorrem nas águas de superfície das proximidades. Para reduzir a quantidade de herbicidas que atingem as águas de

superfície são necessários programas de gerenciamento e conscientização para minimizar a quantidade aplicada. Os herbicidas usados na cultura do arroz irrigado têm um efeito prejudicial para a vida aquática, pois a drenagem da água da lavoura de arroz irrigado coincide com a época de reprodução dos peixes. O estudo mostrou a grande importância de se conhecer o nível de herbicidas nas águas, pois os herbicidas podem ser prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, demonstrando esses efeitos mesmo em pequenas concentrações.

Queiroz & Lanças (2005) Descreveram um sistema simples SPME-HPLC "off-line", o qual não requer a utilização de interface, para determinação simultânea de lamotrigina, carbamazepina e 10, 11 epóxido carbamazepina em amostras de plasma. As análises realizadas por SPME-HPLC apresentam algumas limitações, tais como dificuldade no acoplamento da interface/HPLC, dessorção não eficiente dos compostos sorvidos pela fibra, análise manual, número limitado de fibras adequadas para análise de fármacos, principalmente os básicos e polares e baixa estabilidade destas fibras, quando exposta à fase móvel ou a solventes orgânicos. O novo sistema SPME/HPLC, denominado SPME "no tubo", foi desenvolvido para microextração e pré-concentração de fármacos menos voláteis e/ou termicamente instáveis. Utiliza um tubo capilar aberto de sílica fundida (dispositivo SPME), com a superfície interna revestida com a fase estacionária (quimicamente ligada), o qual tem sido acoplado em linha com o sistema HPLC. Permite automação do processo de extração, resultando em maior precisão e menor tempo de análise, quando comparado as técnicas "off-line" convencionais. Como as amostras biológicas são infectadas no sistema praticamente em seu estado fisiológico, diminui a exposição dos analistas a estas amostras, além de minimizar perdas do analito durante o processo de extração, todo o analito extraído é introduzido no sistema analítico. Para obtenção de eficiente processo SPME-HPLC "no tubo", as variáveis comprimento e fase estacionária do capilar, volume e ciclos de amostra aspirada/dispersada e velocidade linear da vazão deverão ser otimizadas durante o desenvolvimento de novas metodologias.

Parreira e Cardeal (2005) Publicaram um trabalho para amostragem de compostos orgânicos voláteis utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) como método alternativo. As técnicas atuais de pré-concentração

requerem equipamentos de custo elevado, utilizando solventes tóxicos e consomem muito tempo. A técnica de SPME combina amostragem e pré-concentração dos analitos num único processo, além de possibilitar a dessorção direta no sistema cromatográfico. Quando aplicada à amostragem de compostos no ar, a fibra de SPME pode ser utilizada recolhida dentro da agulha da seringa ou exposta diretamente ao ar. A preservação da amostra coletada na fibra é fundamental pois o tempo e a temperatura de armazenamento podem ser cruciais para a qualidade dos resultados, especialmente na coleta de COV. As duas formas de prevenir a perda de COV após amostragem são a utilização de septo na ponta da agulha e, ao mesmo tempo, resfriamento da fibra. A seleção da melhor fibra que será utilizada num trabalho de amostragem depende de vários fatores, de um modo geral a eficiência da absorção/adsorção e da dessorção depende dos seguintes fatores: peso molecular e tamanho do analito; ponto de ebulição e pressão de vapor do analito; polaridade do analito e fibra; grupos funcionais do analito e da fibra e faixa de concentração. Fases mais espessas (maior volume) mostram maior capacidade de extrair os compostos orgânicos. A redução da espessura do filme de revestimento de 100 para 7 μm produz uma fase mais estável a altas temperaturas e permite a análise de compostos com maior ponto de ebulição. O processo de dessorção é também mais rápido em fibras menos espessas, devido à facilidade de transferência do analito da fibra para o injetor. A técnica de SPME possibilita a obtenção de menores tempos de amostragem e análise, com sensibilidade maior que os métodos de referência atual. A principal interferência observada quando se utiliza fibra porosa foi a saturação e competição por sítios ativos da fase devido a presença de vários COV na matriz. O trabalho recomenda que para uma boa amostragem e exatidão, a umidade do local estudado deve ser considerada no processo de quantificação de COV.

A resolução do CONAMA 357 (17 de março de 2005). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Em sua Seção I, Artigo 4º determina a classificação das águas doces, e respectivo tipo de tratamento necessário para que possam ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, sendo

então classificadas como classe especial as que têm necessidade de desinfecção, classe 1, de tratamento simplificado, classe 2, de tratamento convencional e classe 3 as que necessitam de tratamento convencional ou avançado. Após classificá-las, esta resolução define os padrões de qualidade destas águas, estabelecendo limites individuais para substâncias químicas, e determina entre os parâmetros orgânicos os valores máximos permitidos para alguns agrotóxicos.

De acordo com o Guia para Água Potável da OMS, (WHO - Guidelines for Drinking Water, 2006), diz que a água é essencial para o sustento da vida e um suprimento satisfatório (adequado, seguro e acessível) deve estar disponível para todos, pois a melhora ao acesso a água de consumo segura pode resultar em benefícios tangíveis para a saúde. As preocupações com a saúde associadas com os constituintes químicos da água para consumo humano, dentre os quais fazem parte os agrotóxicos e seus metabólitos, diferem das preocupações que dizem respeito à contaminação microbiana e, elas surgem primariamente em decorrência da habilidade destes constituintes químicos em causar efeitos adversos à saúde humana depois de prolongados períodos de exposição, levando a uma contínua exposição subaguda para seres humanos, fauna e flora. O monitoramento químico da água para consumo humano é, portanto, uma ferramenta primordial para prevenção de doenças e bem estar humano, além de ser um indicativo de poluição ambiental, já as que as águas de consumo provêm das águas superficiais e em alguns casos de águas subterrâneas.

Vários estudos (Konstantinou et al., 2005; Claver et al., 2006; Maloschik et al., 2006; Veiga et al., 2006) têm relatado a presença de agrotóxicos nas águas, tanto superficiais como profundas, no solo, no ar, e em alimentos, colocando grandes segmentos da população humana expostos a estes agentes através do ambiente em geral, ou devida à manipulação destas substâncias no ambiente de trabalho e ou ao consumo de alimentos potencialmente contaminados.

Veiga et al (2006), realizou um extenso estudo sobre o impacto das mudanças climáticas sobre o destino e comportamento de agrotóxicos em

águas superficiais e subterrâneas. Em relação às águas superficiais ressalta principalmente que altas temperaturas podem aumentar a volatilização de agrotóxicos e a degradação destes no solo e em águas superficiais. Diz também que solos mais úmidos oferecem maior condutividade e, portanto, agrotóxicos mais solúveis poderiam mover-se mais rapidamente através do solo, mas também poderiam ter maiores taxas de degradação. E finalmente enfatiza que quanto mais freqüentes e intensos forem os eventos de chuva, poderiam levar a um maior fluxo de águas, aumentando a probabilidade de movimento de agrotóxicos para águas superficiais. Entretanto, se o período de chuvas for curto, existirá uma menor oportunidade de transporte de agrotóxicos através do solo com perdas para águas superficiais. Outros estudos descrevem a ocorrência e volume de chuvas como fator crucial para a contaminação de águas superficiais por agrotóxicos (Ferreira et al., 2006; Veiga et al., 2006; Arias et al., 2007).

Berton et al (2007) Procurou estudar o efeito dos fungicidas ciprodinil, pirimetanil, propineb, trifloxistrobin no controle da sarna da macieira. A sarna da macieira é uma doença de ocorrência mundial, no Brasil ela ocorre em todos os Estados produtores, principalmente aqueles que estão localizados em regiões altas e frias, podendo causar danos superiores a 80% na produção. A principal medida de controle da sarna é o uso de fungicidas. O estudo constatou que no sul do Brasil, o período crítico para a ocorrência da sarna inicia-se com a brotação da macieira, coincidindo com setembro/outubro, e prolongando-se até o final de novembro a meados de dezembro, quando cessa a liberação ascóporos. A principal medida de controle da sarna é o uso de fungicidas, os sistêmicos inibem, seletivamente, processos metabólicos específicos, em grupos restritos de fungos e podem conter o avanço da doença no campo. Os fungicidas ciprodinil, propineb e trifloxistrobin (maior dosagem) aplicados preventivamente reduzem a incidência da sarna da macieira em folhas. Já o ciprodinil, pirimetanil e propineb, aplicados preventivamente, reduzem a severidade da sarna da macieira em folhas em todas dosagens testadas.

Oliveira et. al (2007) desenvolveram uma técnica analítica por Microextração em Fase Sólida para detecção de voláteis do flavor. Os objetivos deste trabalho foram analisar qualitativa e quantitativamente os componentes do

flavor dos sucos de laranja in natura, concentrado a 22° Brix e a 65° Brix; adequar os aspectos que alteram a sensibilidade do método da SPME. O método de análise consistiu em expor a fibra durante 20 minutos, para a adsorção dos analitos e, posterior exposição no injetor do cromatógrafo por 4 minutos para a dessorção. Para o estudo do efeito do sal, a concentração selecionada foi 30% de NaCl, por aumentar a eficiência da extração. Sobre a influência do volume foi escolhida uma amostra de 3mL. Na comparação dos tipos de fibra, a selecionada foi a PDMS 100, por possuir revestimento não-polar muito eficiente tanto para analitos apolares quanto polares. O pH ácido de 4,3 tornou os analitos disponíveis a extração pela fibra de SPME, afetando positivamente a eficácia do processo de adsorção. No suco in natura, foram identificados e quantificados sete dos principais componentes voláteis. No suco de 22° Brix foram detectados e quantificados apenas o limoneno (21,9 ppm) e linalol (0,17 ppm). No concentrado a 65° Brix somente o limoneno (16,1 ppm), e sua perda foi de aproximadamente 70%.

Carasek et al (2008) Propuseram avaliar, através da técnica de SPME e quantificação por GC-ECD, a presença dos herbicidas alaclor, propanil e atrazina em amostras de água dos rios que abastecem os municípios de Turvo e Meleiro, localizados na região sul de Santa Catarina, os quais são utilizados para cultivo de arroz irrigado. As extrações dos herbicidas foram realizadas com fibra de poliacrilato (PA) 85 μm , sendo usado o modo de extração direto. O pH da amostra foi ajustado para 4 e a força iônica em 10% pela adição de NaCl. A amostra foi mantida sob agitação (700 rpm) e em temperatura de 70 °C. O volume da amostra foi de 15 mL e os tempos de extração e dessorção foram 40 e 5 min, respectivamente. Todas as amostras de água analisadas apresentaram contaminação por pelo menos um dos herbicidas, e os níveis variam de 0,14 a 072 $\mu\text{g L}^{-1}$ para alaclor e 0,02 a 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para propanil. Mesmo que não tenha sido detectada concentração acima da permitida pela Legislação Brasileira, cabe a importância de monitorar estes herbicidas. Daí a necessidade da aplicação de métodos simples, rápido e prático, como a SPME em análise de rotina.

Bonato et al (2008) Publicou um trabalho demonstrando os fundamentos da técnica microextração em fase líquida (LPME), relacionou

também as mais importantes aplicações da técnica em matrizes biológicas descrita na literatura. O trabalho procurou relacionar outras técnicas de extração e/ou pré-concentração tradicional como extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), e também as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), microextração em gota suspensa (SDME) e a extração em membranas “supported liquid membrane” (SLM). A LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito. No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana passando para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora), presente no lúmen da fibra. No modo de três fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa (fase aceptora), presente no lúmen da fibra. Os parâmetros que afetam a extração em LPME devem ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como ajuste do pH da fase doadora (amostra), força iônica, membrana hidrofóbica, tipo de solvente orgânico, tempo e temperatura de extração, composição da solução aceptora e velocidade de agitação do sistema. A técnica é compatível com uma grande variedade de amostras biológicas (sangue total, plasma, urina, saliva e leite materno) ou não (análise de água, solo e alimentos).

Pinheiro & Rosa (2008) Publicaram trabalho com objetivo de estimar o risco de degradação das águas superficiais e subterrâneas da bacia do rio Itajaí, mais especificamente na região do Alto Vale do Itajaí, ocasionado pela utilização de pesticidas pelos produtores rurais. O estudo envolveu o levantamento das culturas desenvolvidas na região e suas respectivas áreas, levantamento dos produtos comerciais utilizados e suas características e, a avaliação de risco de degradação das águas superficiais e subterrâneas da parte superior da bacia do rio Itajaí. Constatou-se que são utilizados cerca de 39 princípios ativos de herbicidas, 33 de inseticidas e 32 de fungicidas nos cultivos de milho, cebola, fumo, arroz, feijão e pastagem. Na cultura de cebola são utilizados cerca de 50 princípios ativos de pesticidas. Segundo o método aplicado, poucos princípios ativos foram classificados com risco alto ou muito alto de degradação das águas superficiais e de águas subterrâneas. O herbicida

Diurom e o inseticida Carbofurano são os ingredientes ativos com risco muito alto de degradação das águas superficiais.

Navickiene et. al (2008) Desenvolveram um método baseado na extração em dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) para determinar dimetoato, malation, lufenuron, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, tiabendazol, difenoconazol e triclofom em polpa de coco utilizando cromatografia gasosa / espectrometria de massa (GC / MS, SIM). Diferentes parâmetros do método foram avaliados, tais como o tipo de fase sólida (C_{18} , alumina, sílica-gel e florisil), a quantidade de sólidos em fase eluente (diclorometano, acetona, acetato de etila, acetonitrila n-hexano e n-hexano: acetato de etila (1:1, v / v)). Os melhores resultados foram obtidos com 0,5 g de polpa de coco, 1,0 g de C_{18} como dispersante sorvente, 1,0 g de florisil sorvente como de limpeza e acetonitrila saturada com n-hexano como solvente eluição. O método foi validado utilizando polpa de coco amostras fortificadas com pesticidas em diferentes níveis de concentração (0.25-1.0 mg kg⁻¹). Média recuperações (quatro repetições) variou de 70,1% para 98,7%, com desvio padrão relativo entre 2,7% e 14,7%, exceto para lufenuron e difenoconazol, para os quais foram recuperados 47,2% e 48,2%, respectivamente. Limites de detecção e quantificação de coco polpa variou de 0,02 a 0,17 mg kg⁻¹ e de 0,15 a 0,25 mg kg⁻¹, respectivamente.

Baptistal et al (2009) Procurou avaliar a toxicidade de inseticidas/acaricidas utilizados em cultura de citros para operárias africanizadas de *Apis mellifera* Linnaeus. A exposição das abelhas aos compostos foi realizada usando-se técnicas de pulverização, contaminação da dieta e contato em superfícies tratadas (folhas de citros e placas de Petri), empregando-se as doses máximas recomendadas para a cultura. Os bioensaios foram realizados em laboratório a 25±2°C, UR 70±10% e fotofase de 12h, sendo os dados de mortalidade submetidos à análise estatística, e as médias comparadas por contraste, obtendo-se grupos de efeitos semelhantes. Independente do modo de exposição, o acefato foi extremamente tóxico, matando mais de 90% das abelhas 24h após a aplicação. Os produtos espirodiclofeno e piriproxfem, quando aplicados diretamente sobre as abelhas, causaram níveis de mortalidade de 11 e 15%, respectivamente; os compostos buprofezina, enxofre

e tetradifona apresentaram níveis de mortalidade ainda menores, com média de 5% entre eles. Para os ensaios de contaminação de superfície (folhas de citros e placas de Petri) e contaminação de alimento, foram obtidos dois grupos de toxicidade, um grupo somente com acefato e outro, com buprofezina, enxofre, espiroclorfenol, piriproxifen, tetradifona e água. A mortalidade média para esse segundo grupo, após 96h do início da exposição, foi de 31; 8,3 e 15,7%, respectivamente, para cada método de contaminação.

Jardim & Andrade (2009) Desenvolveram método considerando principalmente o número elevado de resíduos de agrotóxicos encontrados em alimentos, observando o desenvolvimento, a otimização e validação de métodos analíticos. Estes métodos são empregados, não somente para determinar uma ou duas substâncias na matriz de interesse, mas sim, para a determinação simultânea de muitos compostos de classes diferentes em uma única análise, denominada de “determinação de multirresíduos de agrotóxicos”. Neste trabalho, os autores utilizaram um método multirresíduo, que foi otimizado e validado, para a determinação de 140 tipos de agrotóxicos, aplicados nas amostras estudadas. Dentre os procedimentos analíticos empregados na determinação de multirresíduos de agrotóxicos, a extração dos analitos é considerada uma das etapas mais importante, realizada antes da determinação de um composto em uma amostra ambiental. Assim no método multirresíduo, a extração dos compostos deve ser acompanhada do desenvolvimento e da otimização das condições experimentais, para cada matriz estudada. A microextração em fase sólida (SPME), extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), vem sendo aplicado para a extração de multirresíduos de agrotóxicos. Os agrotóxicos e o seu emprego no cultivo de diversos alimentos, contribuem para a toxicidade e a acumulação desses compostos em diversos compartimentos ambientais, sobretudo nos seres humanos, conclui-se que é de suma importância a realização de pesquisas que esclareçam à sociedade a pertinência do desenvolvimento de programas que monitorem resíduos de agrotóxicos em alimentos e compartimentos ambientais.

6- MATERIAIS E MÉTODO

6.1 – REAGENTES E MATERIAIS

Balão Volumétrico (2, 5 e 10 ml), Becker (50 e 100 ml), proveta, balança analítica da Mettler Toledo modelo nº AL 204, agitador magnético Fisher Scientific e barras de agitação de 10 mm recobertas com Teflon, micropipeta com capacidade máxima de 100µL da Jecons, dispositivos (holder) para microextração em fase sólida, fibras de Polidimetilsiloxano (PDMS) com (7 e 100 µm), Poliacrilato (PA) 85 µm, Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65µm todas da Supelco e liner com diâmetro interno de 0,8 mm da Supelco (Bellefonte,PA, USA).

Cloreto de sódio p.a (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), Acetona, p.a (Merck, Darmstadt, Alemanha), água ultra pura (Milli-Q) e soluções de NaOH ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e HCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) para correção do pH na solução de extração.

Os padrões foram preparados individualmente em acetona com as seguintes concentrações: Pirimetanil 100 µg.mL^{-1} , Pirimicarbe 280 µg.mL^{-1} , Buprofezina 150 µg.mL^{-1} , e guardadas à 4°C, para evitar degradação da amostra.

A solução padrão dos pesticidas foram preparadas para uma concentração final de 10 µg.L^{-1} por diluição, partindo-se dos padrões de Pirimetanil, Pirimicarbe e Buprofezina, em acetona para um balão volumétrico de 2 mL completando-se o volume de aferição.

As amostras foram preparadas minutos antes de cada extração, a partir de 40 µL da solução padrão dos pesticidas de concentração 10 µg.L^{-1} e diluída com água ultra pura (milli-Q) para um volume final de 5 ml.

6.2 – LIMPEZAS DOS MATERIAIS

A limpeza das vidrarias utilizadas no trabalho obedeceu aos seguintes passos: Enxaguar com água corrente por várias vezes, deixar os materiais por no mínimo três horas e no máximo doze horas em solução de Extran a 2 %, enxaguar novamente com água corrente até retirada de todo o Extran, lavar por duas vezes com água destilada, borrifar com acetona, hexano e diclorometano e levar para estufa durante uma hora a 70 °C. O material volumétrico foi seco fora da estufa, em seguida todo o material foi coberto com papel filme e guardado em armário fechado.

6.3 – PROCEDIMENTOS SPME

As amostras de 5 mL foram acondicionadas em vial de 10 mL contendo uma barra de agitação magnética de 10 mm. Fechou-se o vial com tampa de septo silicone/teflon. A temperatura de trabalho foi a ambiente (26°C). A agulha do dispositivo SPME perfurou o septo do vial contendo a amostra, ligado o agitador magnético na velocidade de 900 rpm e a fibra foi exposta no modo direto, no centro da solução o mais próximo possível da barra magnética, de modo que, não danifique a fibra. O sistema permaneceu deste modo durante 30 min. Após o tempo de extração, a fibra foi recolhida dentro da agulha e o dispositivo foi imediatamente levado ao GC-MS para dessorção dos analitos e permaneceu no injetor do equipamento durante 7 min a 250°C.

6.4 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas do GC-FID, utilizado para otimização do método de extração, Shimadzu 17 A (Kyoto, Japão), foram: tempo de *splitless* 2 min, temperatura do injetor *split/splitless*, 250 °C, detector FID 300 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,3 mL.min⁻¹ (99,999 % pureza) e velocidade linear de 31,4 cm.s⁻¹ na coluna, adquirida da SUPELCO, MDN-5 (30m × 0,25mm × 0,25µm). Foi empregado gás hidrogênio (H₂) de alta pureza como combustível da chama do detector FID, com pressão de 55 KPa, ar sintético como agente oxidante, com pressão de 45 KPa. Como gás auxiliar foi empregado nitrogênio de alta pureza na pressão de 45 KPa. A vazão total dos gases foi igual a 71 mL.min⁻¹ e pressão de 75 KPa. Programação de temperatura para a coluna 80 °C, 10 °C min⁻¹ até 280 °C (0 min), com tempo total de corrida de 20 min. As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo software shimadzu GC solution[®].

As condições cromatográficas do GC-MS, utilizado para determinação da amostra real e validação do método, Shimadzu QP5050A (Kyoto, Japão), foram: tempo de *splitless* 2 min, temperatura do injetor *split/splitless*, 250 °C, detector interfase, 280 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,3 mL min⁻¹ (99,999 % pureza) e coluna adquirida da SUPELCO, DB-5 (30m × 0,25mm × 0,25µm). O espectrômetro de massas foi operado no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). Modo de ionização impacto de elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80 °C, 10 °C min⁻¹ até 280 °C (0 min), com tempo total de corrida de 20 min. As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo software shimadzu GC solution[®].

7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos iniciais procuraram definir as melhores condições cromatográficas para separação dos analitos, buscando-se a melhor resolução dos picos e o menor tempo de análise, a partir de trabalhos desenvolvidos no laboratório e estudos anteriores. Para otimização dos parâmetros como tipo de fibra, modo de extração, velocidade de agitação, condições de dessorção, pH, tempo de extração e força iônica utilizou-se o GC-FID, enquanto que a validação do método analítico e análise da amostra real foi realizada no GC-MS. Para as condições apresentadas no item 6.5 os tempos de retenção foram: pirimetanil 13,7min.; pirimicarbe 14,1 min. e buprofezina 17,9 min. conforme o cromatograma apresentado na figura 9.

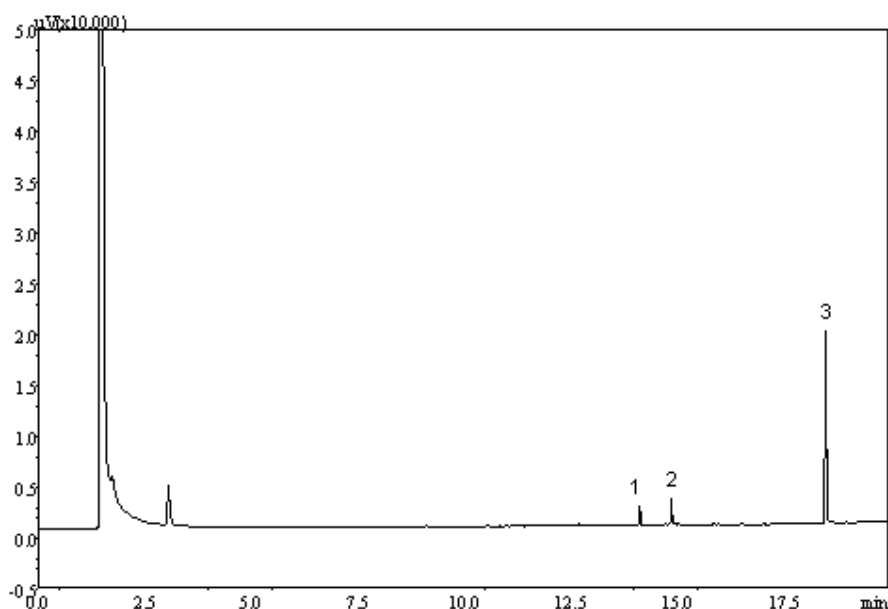


Figura 9. Cromatograma DI-SPME-GC-FID. 1-Pirimetanil, 2-Pirimicarbe, 3-Buprofezina, na concentração de $10 \mu\text{gL}^{-1}$. Para condições cromatográficas ver item 6.4

Através do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa foi possível realizar uma varredura na amostra, ou seja, no modo *full scan* de todos os íons gerados nas fragmentações das moléculas eluídas da coluna, exibindo-os ao operador sob forma de um espectro de massas. Porém, neste modo de operação a sensibilidade é prejudicada, sendo necessárias concentrações na ordem de mg L^{-1} para a detecção das substâncias. Desse modo, foi necessária a utilização do modo SIM onde foram selecionados íons específicos para serem monitorados, nos respectivos tempos de retenção obtidos no modo *scan*, possibilitando a quantificação dos compostos de interesse presentes no extrato da amostra em análise em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 5 exibe os compostos estudados com os dados utilizados para sua identificação por GC-MS.

Tabela 5 – Tempo de retenção e íons no modo SIM dos pesticidas.

Pesticida	Tempo de Retenção (t_r)	Íons
Pirimetanil	13, 748	183; 198 e 199
Pirimicarbe	14, 013	72; 166 e 238
Buprofezina	17, 858	105; 172 e 305

7.1 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS POR SPME

Como todas as técnicas de extração, que possuem princípios físico-químicos, é necessário otimizar o procedimento por SPME para possibilitar a extração dos analitos, a fim de se obter melhor eficiência. Foram realizados ensaios para definir o melhor modo de extração, a fase sólida da fibra, concentração salina da amostra, temperatura, velocidade de agitação da amostra, tempo de extração, efeito de memória e tempo de dessorção.

7.1.1 – ESCOLHA DAS FIBRAS

Para analisar a sensibilidade de um método de SPME dois aspectos devem ser levados em consideração: a espessura de recobrimento e a natureza do material empregado para extrair os analitos (polar, apolar e bipolar) estas são as principais características que influenciam na seletividade e eficiência da extração. Películas de menor espessura geram menores tempos de extração, porém obtém-se uma menor quantidade de analitos extraídos, o que proporciona ao método uma baixa sensibilidade (OLIVEIRA et al, 2007).

Neste estudo, as fibras de PDMS (100 μ m), PDMS (7 μ m), PA (85 μ m) e PDMS/DVB (65 μ m) tiveram suas eficiências de extração comparadas para soluções onde foram adicionadas concentrações conhecidas de pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em água ultrapura, sob agitação constante de 900 rpm, temperatura ambiente e tempo de extração de 30 min. No modo direto, a fibra foi inserida na fase líquida da amostra (5 mL). Antes do uso, as fibras foram condicionadas no injetor do cromatógrafo de acordo com o tempo e temperatura recomendados pelo fabricante, específicos para cada tipo de fibra.

Conforme testes realizados com as diferentes fibras, foi avaliado a eficiência de extração de cada fibra em relação aos analitos estudados. Como parâmetro de comparação usou-se a área dos picos nos cromatogramas. Para cada tipo de fibra foram avaliados o modo direto e headspace, nenhuma das fibras avaliadas apresentou resultado para as extrações no modo headspace.

No modo direto, a única fibra que apresentou resposta para os pesticidas em estudo, principalmente para a buprofezina, foi PDMS-100 μ m, conforme mostra figura 10, a qual foi selecionada para os experimentos posteriores, por apresentar uma melhor afinidade pelos analitos, pois quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior será a quantidade extraída (BONATO et. Al, 2008).

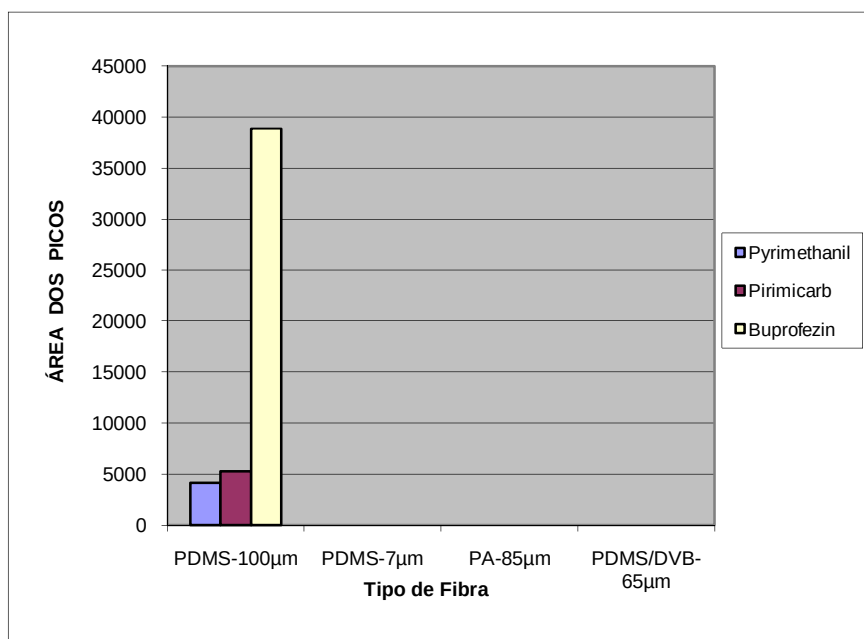


Figura 10 – Avaliação de tipos de fibras quanto a eficiência de extração no modo direto

7.1.2 – MODO DE EXTRAÇÃO

Neste trabalho o modo de extração direto (DI-SPME) e de headspace (HS-SPME) foram investigados. O modo headspace não apresentou resultados para os pesticidas estudados, devido a baixa volatilidade dos compostos, pois esse modo de extração é utilizado quando o analito é volátil ou em matrizes muito sujas ou sólidas. O modo de extração direto com fibra PDMS-100µm foi selecionado por apresentar resultados satisfatórios, já que os analitos não são voláteis e a extração foi realizada em amostra aquosa.

A eficiência de cada modo depende das propriedades dos analitos e da matriz. Em geral, o DI-SPME é mais sensível que a HS-SPME para analitos presentes em amostras líquidas. No entanto, compostos não voláteis presentes na amostra ficam retidos na fibra, podendo reduzir a sua vida útil e a repetitividade de extração. (LORD & PAWLISZYN, 2000).

7.1.3 – VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DA AMOSTRA

A velocidade de agitação é utilizada para facilitar o transporte de massa entre a fase aquosa e a fibra (GONÇALVES & ALPENDURADA, 2002). Assim, o aumento da agitação da amostra favorece o processo de extração, pois minimiza os problemas de transferência do analito para a fibra, principalmente nos casos em que os analitos não são muito voláteis ou no modo direto de extração. A quantidade de analito extraída depende da velocidade na qual o processo de SPME alcança o equilíbrio através da razão de transferência de massa da fase aquosa para fibra (KATAOKA et al, 2000).

A influência da velocidade de agitação foi determinada empregando-se a fibra de PDMS-100 µm no modo direto. Neste estudo foi avaliada a influência da velocidade de agitação da amostra em 300, 900 e 1200 rpm. O gráfico da figura 11 demonstrou que a eficiência da extração foi melhor em velocidade de

agitação de 900 rpm, para velocidade de agitação superiores a esta verificou-se uma diminuição na extração do pirimicarbe para o pirimetanil não foi observada praticamente nenhuma alteração da eficiência da extração em função da velocidade de agitação. A buprofezina apresentou um aumento na extração entre 300 – 1200 rpm, o qual foi selecionado 900 rpm, pois velocidades superiores não melhorou a eficiência da extração dos outros constituintes.

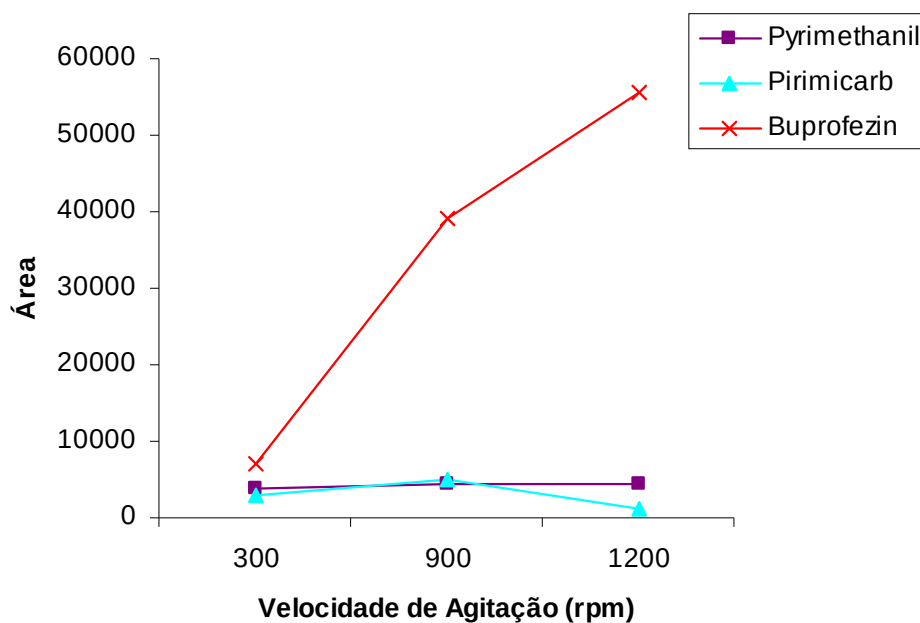


Figura 11 – Influência da velocidade de agitação sobre a extração

7.1.4 – CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO

A condição desejável no momento de dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo é conseguida usando-se um liner de pequeno diâmetro interno.

Quando a fibra está inserida no liner é criada uma região de restrição favorecendo dessa maneira a um aumento da velocidade do gás de arraste sem necessidade de modificar a sua pressão, onde os analitos são rapidamente conduzidos, sem que haja tempo suficiente para que suas moléculas se dispersem no meio. Devido a ausência de solventes orgânicos no processo SPME, não há o fenômeno de expansão do solvente no liner do injetor, não sendo necessário o emprego de liner de maior volume. A opção por liner de pequeno diâmetro interno tem o objetivo de minimizar a dispersão dos analitos dentro do injetor, melhorando dessa forma a sensibilidade do método. Neste estudo foi utilizado um liner com diâmetro interno de 0,8 mm da Supelco (Bellefonte, PA, USA) próprio para SPME. A fibra deve estar centralizada no liner, o qual deve ser aquecido a temperatura que seja permitida pela fibra e adequada para volatilização dos analitos. O aumento de temperatura de dessorção contribui para diminuir o tempo de exposição da fibra ao calor do injetor. Nas análises, realizadas para otimização o injetor foi mantido aquecido a 250 °C e o melhor tempo de dessorção para os testes apresentados foi de 7 min.

O método baseado na técnica por SPME pode estar sujeito a efeito de memória (efeito “carry-over”). Este efeito é caracterizado pela dessorção incompleta dos analitos adsorvidos na fibra, podendo ser mais acentuada em compostos com maior afinidade pelo recobrimento da fibra (CARASEK et al, 2007). Nesse estudo foi verificado efeito de memória com relação a bupropiona. Para verificar este efeito de memória foram testados 3 diferentes tempos de dessorção: 5, 7 e 10 min. na temperatura de 250 °C. Com 5 min de dessorção os resíduos apresentados já foram menores que 5%. No entanto, para garantir a completa dessorção foi padronizado o tempo de 7 min.

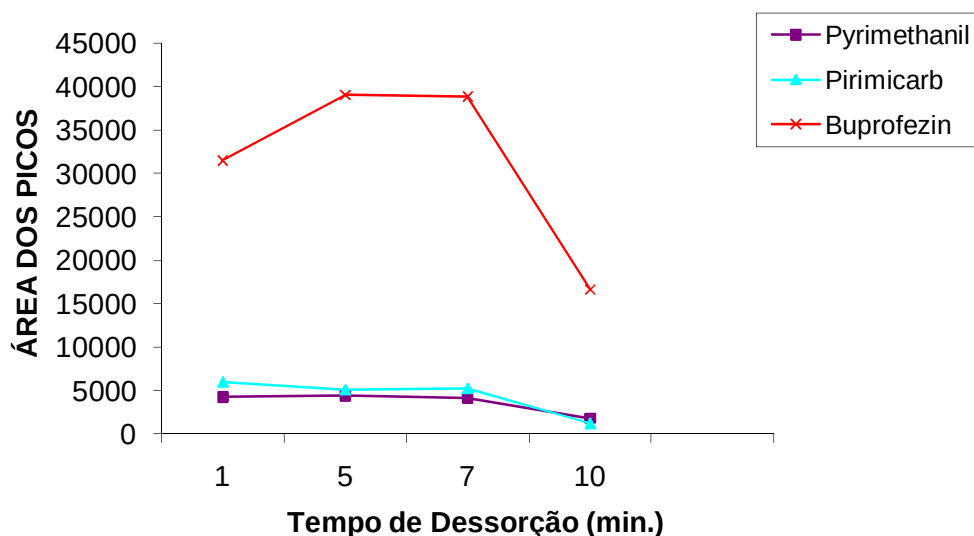


Figura 12 - Efeito do tempo na dessorção dos pesticidas

7.1.5 – INFLUÊNCIA DO pH

O estudo do pH é relevante, pois pode ampliar a sensibilidade da técnica, com valor de pH que permitam o acréscimo da concentração das espécies neutras dos componentes presentes na amostra (PAWLISZYN 1997), neste caso os pesticidas estudados.

A definição de ácido é ter a capacidade de ceder seu íon positivo expresso como o íon hidrogênio H^+ (VOGEL, 1986). Em valores de pH baixos, a concentração de H^+ é alta, e por ter mais prótons disponíveis, a quantidade espécies neutras HA é diminuída. Desta forma, o pH da amostra afeta os equilíbrios de dissociação da solução. Um acréscimo no pH pode resultar num acréscimo da concentração de espécies neutras (HA) de componentes ácidos presentes na amostra e, portanto, ocorre o acréscimo na quantidade extraída. A forma não dissociada (HA) que é extraída pelo revestimento da fibra.

O pH é uma variável que influencia tanto na eficácia como na seletividade da extração. Um dos caminhos que aumenta a quantidade de analitos retidos no revestimento da fibra é o ajuste do pH. O pH da amostra pode ser ajustado para valores que aumentam a presença da forma neutra na extração de analitos ácidos ou básicos como os fenóis e aminas (PEÑA-ALVAREZ et al, 2006). Assim, para fibras cujo processo de extração dos analitos se deve principalmente a um processo de absorção (PDMS e PA) a forma ionizada deve ser a menor possível afim de viabilizar o processo de extração. É preciso ter especial atenção quando se utiliza pH 2 ou 10, que são extremos, pois podem danificar a fibra. (BORGES et al, 2005)

A influência do pH neste trabalho foi testada com os valores: 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Empregou-se a fibra PDMS no modo direto com velocidade de agitação de 900 rpm e tempo de dessorção de 7 min. A figura 13 demonstra que os pesticidas mais afetados pela variação de pH foram o pirimetanil e buprofezina, os quais não foram extraídos com pH mais ácido (≤ 5). O pH ácido tornou os analitos (pirimetanil e buprofezina) indisponíveis para a absorção na fibra de PDMS, com valores superior a 7,0 houve uma queda de eficiência de extração para o pirimicarb e buprofezina. A absorção obedece a uma faixa de pH, para que possua a esperada eficácia. As extrações realizadas em pH próximo do neutro (6 e 7) apresentaram os melhores resultados, sendo o pH 6 selecionado, por tratar-se do pH medido na água ultrapura (OLIVEIRA, E. R. M. et al. 2007).

A respeito de valores altos de pH não são aconselhados, em virtude de causar a predominância da forma iônica do analito, afetando de forma negativa a extração do mesmo. Por sua vez, valores muito ácido de pH para o pirimetanil e buprofezina proporcionaram um efeito de redução na eficiência de extração.

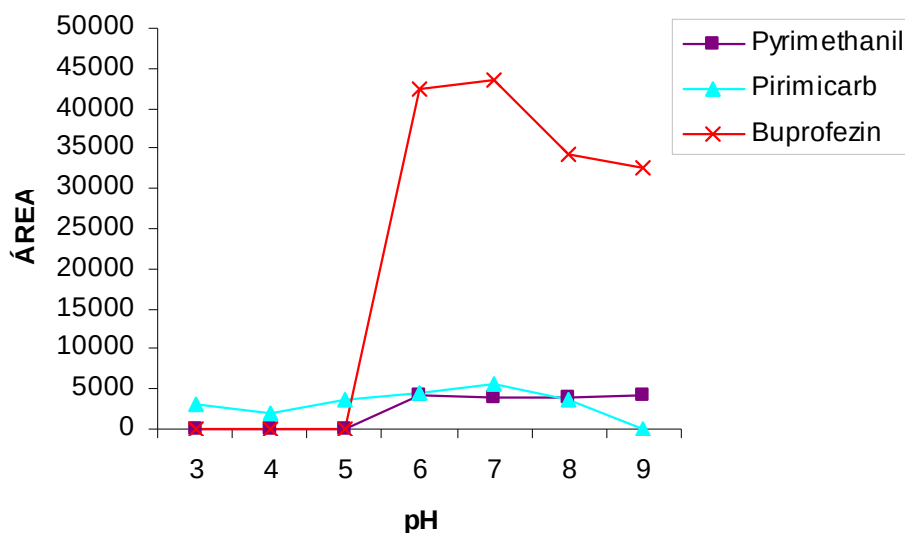


Figura 13 – Influência do pH sobre a extração dos pesticidas estudados utilizando a fibra de PDMS (100 µm)

7.1.6 – TEMPO DE EXTRAÇÃO

O tempo de extração (t_E) corresponde ao tempo de contato entre a fase extratora e a fase extraída até que o analito alcança uma condição de equilíbrio entre as fases envolvidas, após este instante, a concentração do mesmo na fibra extrativa permanece constante com o passar do tempo.

Após a otimização do tipo de fibra, modo de extração, velocidade de agitação, tempo de dessorção e pH, foram verificados os tempos de extração em 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min. O resultado deste estudo, que estão demonstrados na figura 14, indicaram que mesmo após 60 min o equilíbrio do sistema não foi alcançado para a buprofezina, enquanto que para o pirimicarbe e o pirimetanil o equilíbrio é alcançado com um tempo de extração de 10 min. Devido ao fato

que o equilíbrio não é necessário desde que as condições de extração sejam rigorosamente mantidas, e considerando a possibilidade da implantação do método em análise de rotina, foi feita a opção pelo tempo de extração de 30 min.

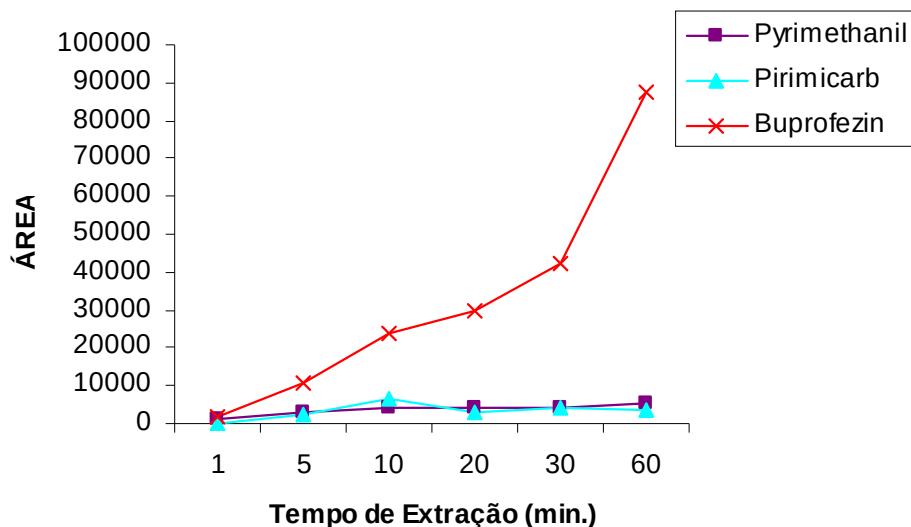


Figura 14 – Influência do tempo de extração sobre os pesticidas

7.1.7 – INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA

Muitos estudos mostraram um aumento da sorção dos analitos no revestimento da fibra de SPME pela adição de sal, usualmente cloreto de sódio, na matriz da amostra. No entanto, a presença de solventes orgânicos na amostra aquosa usualmente reduz a quantidade de analito extraído devido à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fibra de SPME (PEÑALVER, *et al.*, 1999).

Geralmente a presença de um eletrólito pode influenciar a adsorção de diferentes maneiras, como, por exemplo, alterando as propriedades do revestimento da fibra e reduzindo a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa. Este último chamado de efeito salting out. Em muitos casos, a sensibilidade da SPME muda significativamente com o aumento da força iônica, ou seja, da concentração de sal, geralmente, ampliando a sua eficiência (PAWLISZYN, 1997).

A adição de sais para aumentar a força iônica do meio, como o cloreto ou sulfato de sódio pode promover a extração levando a redução na solubilidade dos analitos que são mais facilmente retidos pela fibra, sendo que as naturezas do revestimento do analito da matriz (fase aquosa) e da própria concentração de sal devem ser levadas em consideração. Em uma fibra revestida com material apolar, geralmente o efeito da adição de sal é ampliado com o acréscimo da polaridade do componente (OLIVEIRA, 2007).

A influência da adição de cloreto de sódio em concentrações de 1% e 3% sobre a eficiência de extração dos pesticidas foi verificada neste trabalho. Os pesticidas estudados não apresentaram um efeito significativo na eficiência de extração com adição do cloreto de sódio. Portanto, foi feita a opção pela extração sem adição de sal, ou seja, a concentração de 0% de NaCl foi utilizada para os demais experimentos. Na figura 15 é mostrado o efeito da adição de sal na absorção da SPME, para os pesticidas estudados no trabalho.

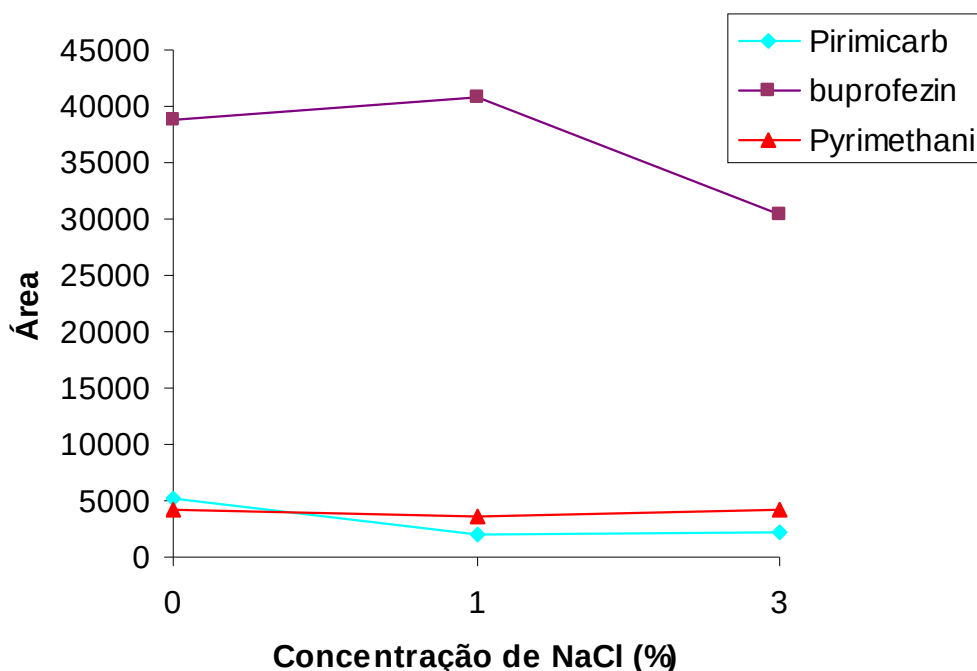


Figura 15 – Efeito da concentração salina na extração dos pesticidas

7.2 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Um método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré requisitos estabelecidos. Portanto, deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (RIBEIRO et al, 2003). Neste trabalho foram avaliados os parâmetros robustez, a linearidade, a sensibilidade, a precisão do método e os limites de detecção e quantificação.

7.2.1 – TESTE DE ROBUSTEZ

Robustez de um método analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal. Os testes de robustez servem para indicar quais os parâmetros pode influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições (RIBEIRO et al, 2003).

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (INMETRO, 2007).

Na determinação da robustez deve-se realizar um planejamento fatorial no qual os parâmetros são variados dentro de um domínio estreito de estudo. A análise do gráfico de pareto nos mostra se existe, ou não, significância dos fatores no domínio em estudo.

Neste trabalho, foi avaliado os efeitos do tempo de extração; tempo de dessorção e velocidade de agitação da amostra, os níveis de variação e mostrado na tabela 6. No caso da concentração salina como não apresentou um efeito significativo na eficiência de extração por isso não foi avaliado. Portanto o método é seguramente robusto em relação a estes parâmetros.

Tabela 6 – Variáveis usados no planejamento fatorial para teste de robustez

VARIÁVEIS	MÍNIMO (-)	PONTO CENTRAL	MÁXIMO (+)
Temp. de Extração (min)	29	30	31
Tempo de Dessorção (min)	6	7	8
Vel. de Agitação (rpm)	800	900	1000
pH	5	6	7

Os ensaios foram realizados conforme é apresentado na tabela 7, mantendo-se constante o volume da amostra. A análise dos gráficos de pareto (figuras 16 a 18) gerados pelo STATISTICA[®] mostrou que para os analitos estudados as estimativas dos efeitos encontram-se abaixo do limite delimitado por **p** e, portanto, nenhum dos fatores avaliados dentro deste domínio, modifica significativamente o sinal analítico gerado, ou seja, a área dos picos cromatográficos.

Tabela 7 - Matriz para o teste de robustez.

Ensaio	V _A (rpm)	pH	t _E (min)	t _D (min)	Sinal analítico (área)		
					Pirimetanil	Pimicarbe	Buprofezina
1	800,000	5,000000	29,00000	6,000000	69616	7551	179752
2	1000,000	5,000000	29,00000	6,000000	25257	3438	25383
3	800,000	7,000000	29,00000	6,000000	40417	6429	152148
4	1000,000	7,000000	29,00000	6,000000	77773	7711	57280
5	800,000	5,000000	31,00000	6,000000	62556	6475	662852
6	1000,000	5,000000	31,00000	6,000000	81168	9601	269000
7	800,000	7,000000	31,00000	6,000000	70164	8031	140461
8	1000,000	7,000000	31,00000	6,000000	70276	6707	123779
9	800,000	5,000000	29,00000	8,000000	72551	9047	164946
10	1000,000	5,000000	29,00000	8,000000	13797	3411	22387
11	800,000	7,000000	29,00000	8,000000	79509	6604	344920
12	1000,000	7,000000	29,00000	8,000000	39228	6155	174432
13	800,000	5,000000	31,00000	8,000000	84345	7867	108667
14	1000,000	5,000000	31,00000	8,000000	70795	7903	186161
15	800,000	7,000000	31,00000	8,000000	54939	5996	144575
16	1000,000	7,000000	31,00000	8,000000	39107	7600	285272
17©	900,000	6,000000	30,00000	7,000000	79478	9309	704498
18©	900,000	6,000000	30,00000	7,000000	74559	9687	227552

© = Planejamento do composto central

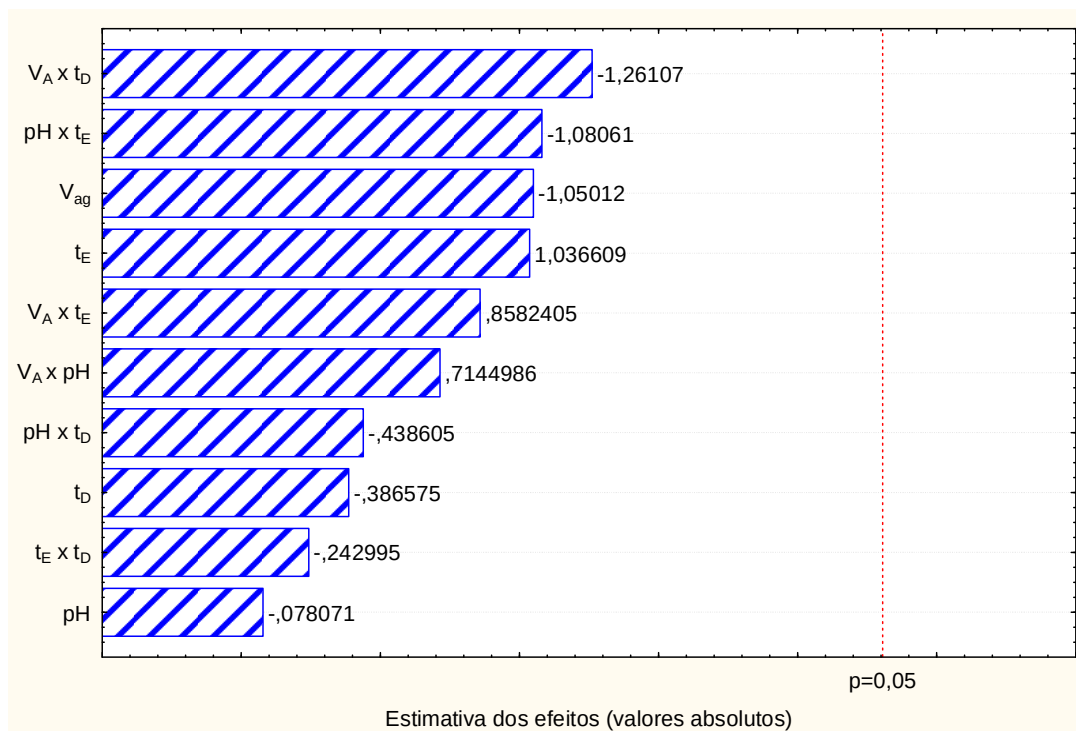


Figura 16 - Gráfico de Pareto para pirimetanil – teste de robustez

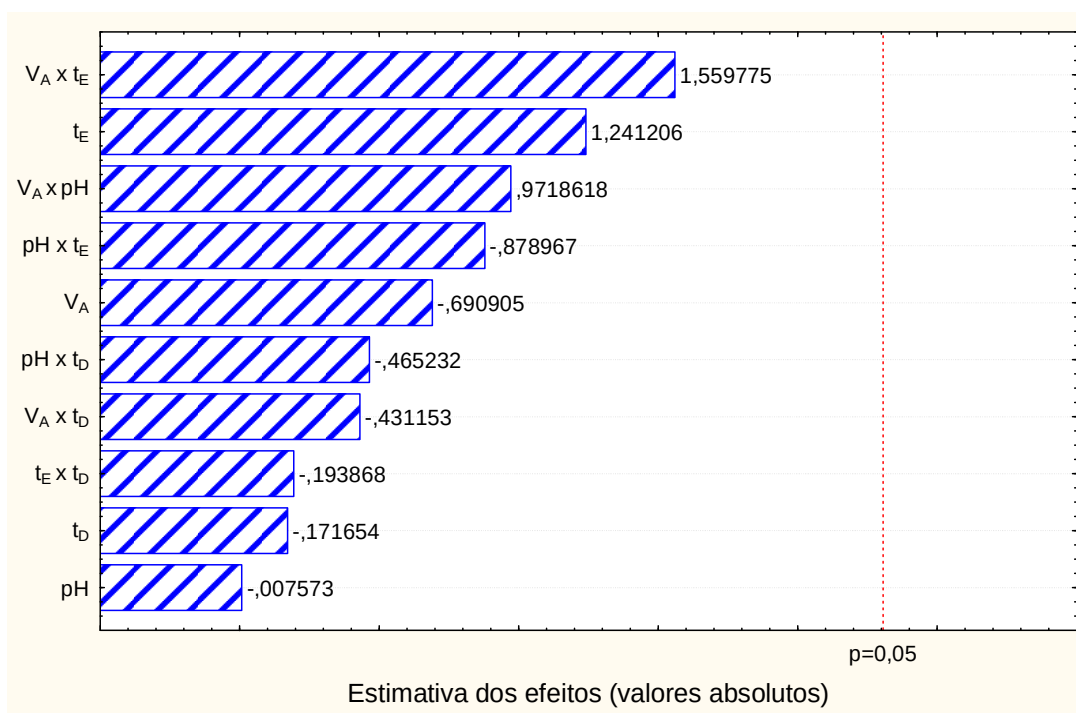


Figura 17 - Gráfico de Pareto para pirimicarbe – teste de robustez

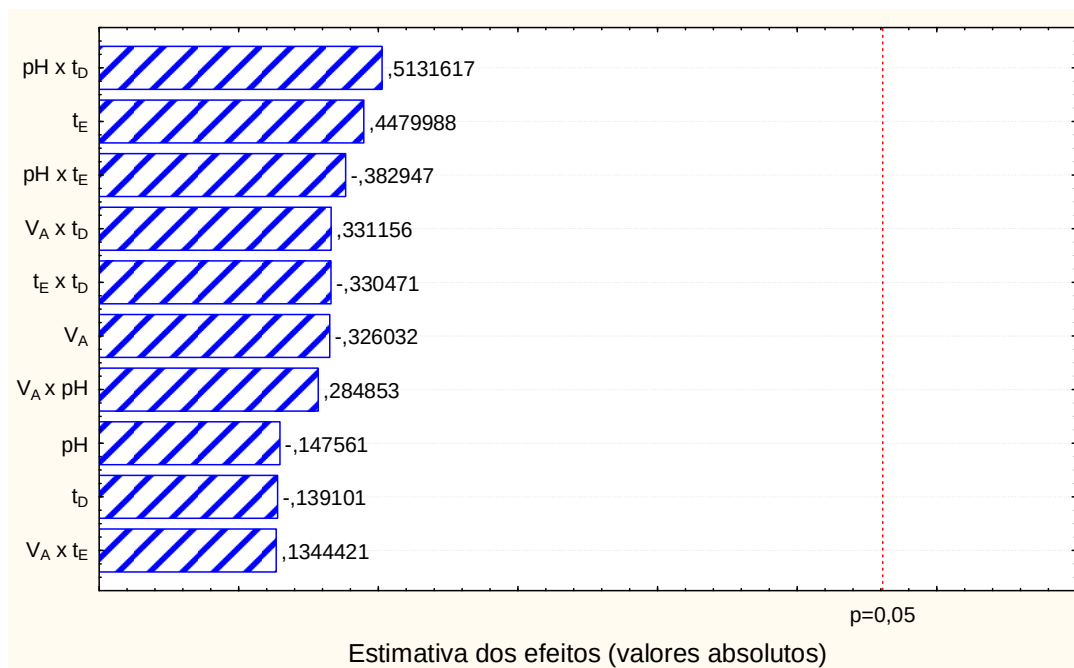


Figura 18 - Gráfico de Pareto para buprofezina – teste de robustez

7.2.2 – LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada é determinada por uma relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie em interesse. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta, chamada curva de calibração.

O coeficiente de correlação é um parâmetro que permite uma estimativa da linearidade da curva obtida, pois quanto mais próximo for o valor de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que

0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al, 2004).

Neste trabalho foi avaliada se a linearidade do método era adequada ao nível de concentração que se desejava verificar. Assim, para construção da curva analítica (Figuras 19, 20 e 21) foram injetadas amostras de pesticidas a 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2) das curvas do pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina foram respectivamente 0,999; 0,997 e 0,991 demonstrando uma boa relação de linearidade entre a concentração e o sinal analítico.

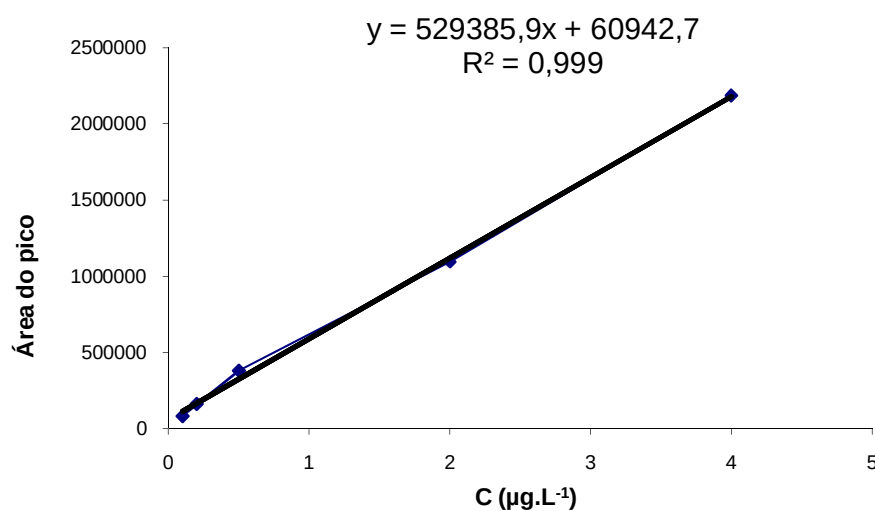


Figura 19 - Curva analítica para o pirimetanil.

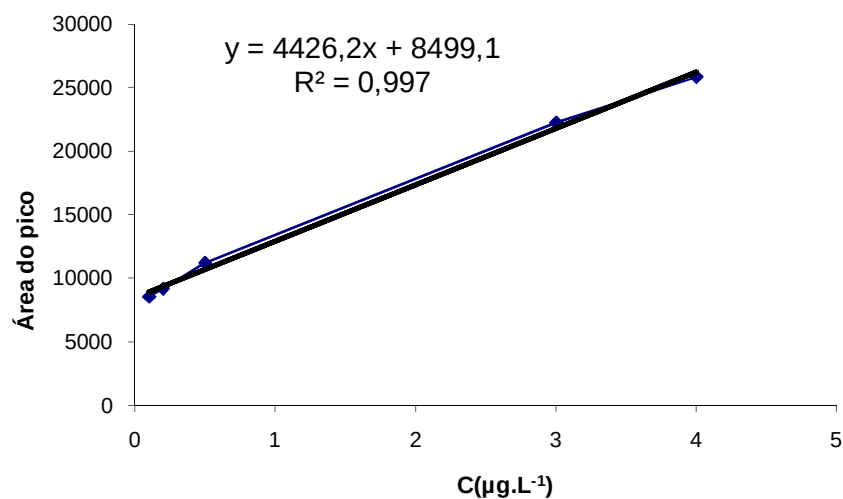


Figura 20 - Curva analítica para o pirimicarbe.

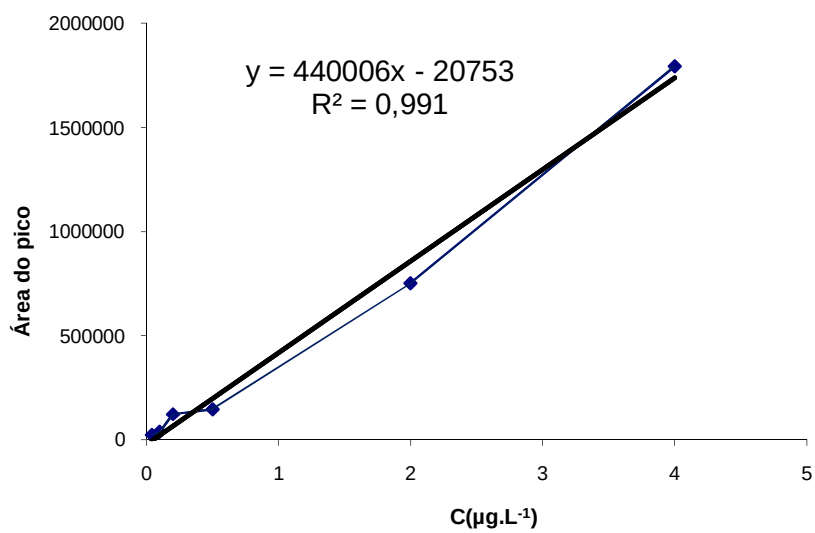


Figura 21 - Curva analítica para a buprofezina.

7.2.3 – SENSIBILIDADE

A sensibilidade de um método indica sua capacidade em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular da curva de calibração. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido (RIBEIRO et al, 2003).

A sensibilidade pode ser determinada por intermédio da inclinação da curva de calibração. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método. Outra forma de determinar isso é comparando as equações das duas curvas de calibração. A que apresentar maior coeficiente angular representará o método mais sensível (LANÇAS, 2004).

O método apresenta maior sensibilidade para perimetanil, pois o coeficiente angular da equação da reta é maior para este composto.

7.2.4 – PRECISÃO

O parâmetro que avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente, é expressa como estimativa do desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas.

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

sendo, s=estimativa do desvio-padrão e $\bar{X}$ = média aritmética das medidas

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade e reprodutividade. A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesma condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. Repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios, pode ser avaliada com no mínimo nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste. A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, diferentes condições, outro equipamento ou analista, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias. O método será considerado preciso quando apresentar coeficiente de variação dentro do aceitável para cada nível de concentração (ppm – 16%, ppb – 45%) (RIBEIRO et al, 2003).

Neste trabalho foi determinada a precisão para uma concentração 0,2 µg L⁻¹ e repetidas sete vezes no mesmo dia. Os coeficientes de variação foram inferiores a 15 %, verificando-se uma boa precisão da técnica.

Tabela 8 - Coeficiente de variação para os pesticidas no nível de concentração de 0,2 µg L⁻¹.

Analitos	ÁREA	CV %
Pirimetanil	158554,00	5,02
Pirimicarbe	4092,29	14,72
Buprofezina	61808,71	9,63

7.2.5 – LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de duas maneiras diferentes: método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Para determinar a relação sinal ruído, foi feita a comparação entre a medição dos sinais do padrão em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse em padrões e um branco desta amostra. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI et al 2004). Para o método baseado em parâmetros da curva analítica, foram realizadas sete corridas com soluções contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção e empregou-se a equação abaixo para o cálculo do LD:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde: LD= limite de detecção, s = a estimativa do desvio padrão da resposta (área dos picos cromatográficos) e S = o coeficiente angular da curva analítica.

Outro método consiste em determinar, o desvio padrão da concentração que gera picos cerca de três vezes maior que o ruído. As áreas dos picos são convertidas em concentração e calcula-se o desvio padrão. A equação utilizada foi:

$$LD = t_{98\%} \times s$$

Onde: LD= limite de detecção, s= estimativa do desvio padrão das concentrações e $t_{98\%}$ = fator t de student para um nível de confiança de 98% (t unilateral).

As curvas de calibração para os analitos foram determinadas em baixos níveis de concentração (0,1 a 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e os limites de detecção para todos os compostos, calculados pelos dois métodos, ficaram abaixo de 0,050 $\mu\text{g L}^{-1}$ exceto para o pirimicarbe (tabela 9)

Tabela 9 - Limite de detecção, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método SPME.

Analitos	$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$LD = t_{98\%} \times s (\mu\text{g.L}^{-1})$
Pirimetanil	0,050	0,048
Pirimicarbe	0,449	0,446
Buprofezina	0,045	0,042

O Limite de Quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, foi testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO, 2007). A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ.

Para o cálculo do limite de quantificação foram utilizadas as seguintes relações:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

$$LQ = 10 \times s$$

Tabela 10 - Limite de quantificação, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método SPME

Analitos	$LQ = 10 \times \frac{s}{S} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$LQ = 10 \times s (\mu\text{g.L}^{-1})$
Pirimetanil	0,150	0,150
Pirimicarbe	1,361	1,361
Buprofezina	0,135	0,135

Para os pesticidas analisados os limites de quantificação são inferiores a $1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, (tabela 10), portanto o método atende as especificações estabelecidas pela união Européia.

7.2.6 – ANÁLISES DA AMOSTRA REAL

A amostra real foi avaliada pelo método de SPME. Foram coletadas amostras do Platô de Neópolis-SE, dia 01/08/2008, nos tanques de irrigação dos lote 01 (Frutase) que irriga culturas de banana e goiaba; no lote 02 (União) que

irriga culturas de coco orgânico, mamão e pimenta do reino; lote 03 (Frutecs) que irriga culturas coco, manga e mamão; lote 04 (Frutese) que irriga culturas de banana, laranja, maracujá e tangerina; lote 05 (Samam) que irriga culturas de coco e cana de açúcar e por fim no lote 06 (São Francisco) que irriga Culturas de laranja pêra, limão Taiti, tangerina.

As amostras foram coletadas e armazenadas em geladeira a uma temperatura de 4°C, sendo detectada apenas a presença da buprofezina nos tanques de irrigação dos lotes 04 e 06. O resultado das análises estão representados nos cromatogramas das amostras figura 22.

Foram coletadas amostras do Distrito de irrigação do projeto Senador Nilo Coelho na cidade de Petrolina-PE, dia 06/04/2009, nos seguintes pontos de coleta: canal de distribuição (N-11) que irriga culturas de manga, acerola, uva e coco; na lagoa natural (N-10 e N11) que irriga culturas de coco, banana e goiaba; estação de bombeamento (EB-25) que irriga culturas coco, manga, banana, goiaba e acerola; estação de bombeamento (EB-30) que irriga culturas de banana, acerola e uva.

As amostras foram coletadas e armazenadas em geladeira a uma temperatura de 4°C, sendo detectada apenas a presença do pirimicarbe nos pontos de coleta da estação de bombeamento EB-25 e EB-30. O resultado das análises estão representados nos cromatogramas das amostras figura 23.

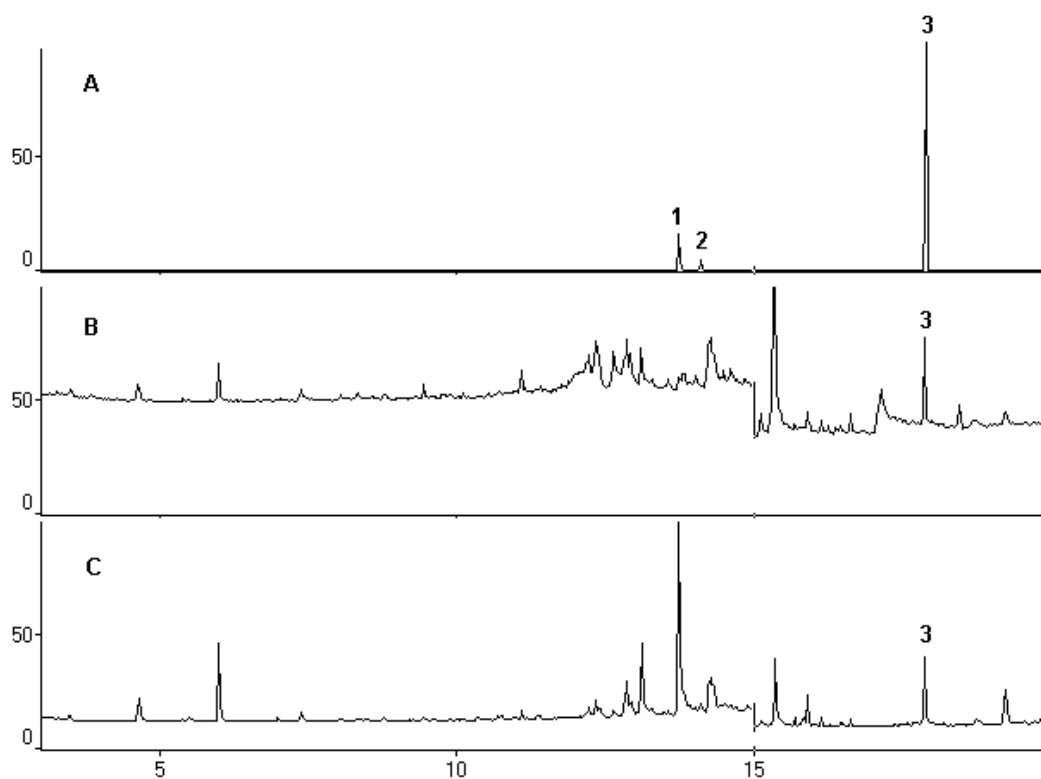


Figura 22 – Cromatogramas amostra Platô Neópolis-SE: (A) Padrão dos pesticidas 20µg.L⁻¹: 1- pirimetanil; 2-pirimicarbe; 3-buprofezina. Amostras reais (B) < LQ e (C) 0,14 µg.L⁻¹

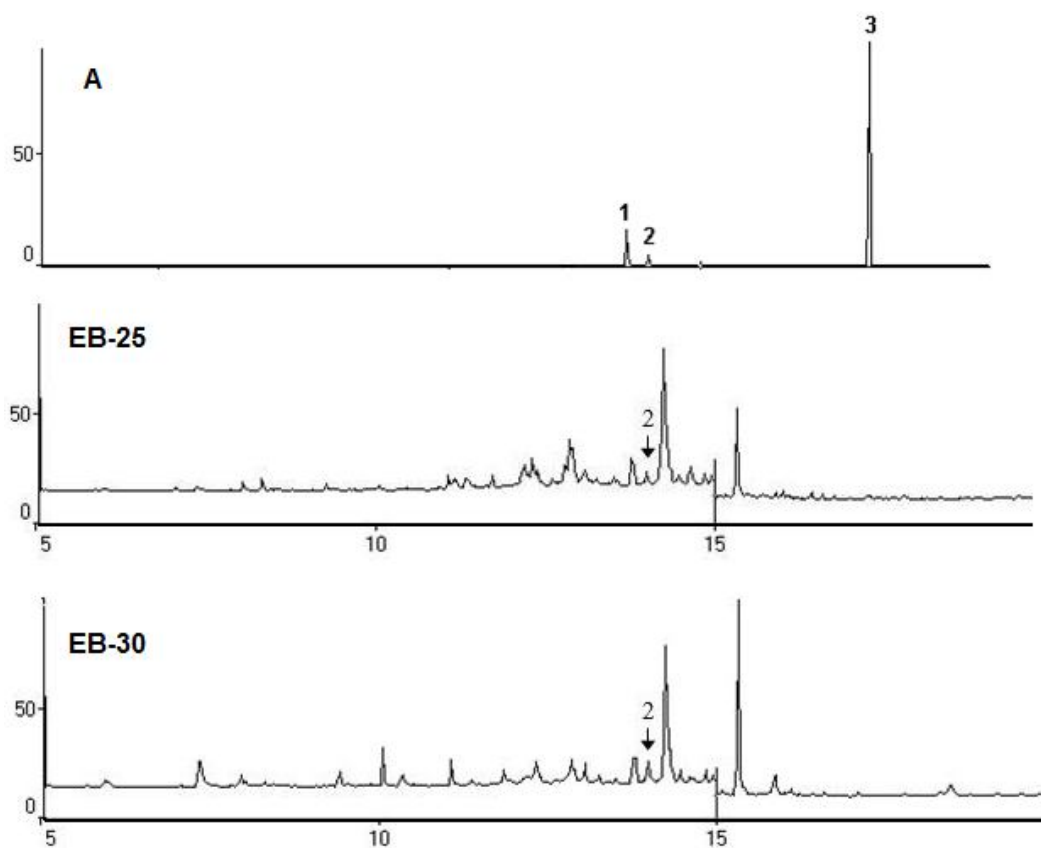


Figura 23 – Cromatogramas amostras Distrito de irrigação Senador Nilo Coelho Petrolina-PE: (A) Padrão dos pesticidas $20\mu\text{g.L}^{-1}$: 1- pirimetanil; 2- pirimicarbe; 3-buprofezina. Amostras reais (EB-25) < LQ e (EB-30) < LQ

8 – CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a microextração em fase sólida (SPME), sob condições otimizadas, foi eficiente na extração e no estudo dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico por microextração em fase sólida (SPME) para a determinação de resíduos dos pesticidas em matrizes aquosas ambientais por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC-MS).

Através do planejamento univariado, o procedimento de SPME foi otimizado para possibilitar a extração dos analitos da matriz e os valores ótimos dos parâmetros que influenciam a extração por SPME foram definidos: tipo de fibra (PDMS 100 μm), concentração salina na amostra (0%), velocidade de agitação da amostra (900 rpm), pH = 6, tempo de extração (30 min) e tempo de dessorção (7 min).

O método foi validado apresentando resultados satisfatórios de precisão (repetitividade) com CV < 15% para os pesticidas. A curva analítica foi feita utilizando a matriz contendo os pesticidas passando por 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 com coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,991. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,042 e 0,135 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (buprofezina); 0,048 e 0,150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (pirimetanil); 0,446 e 1,361 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (pirimicarbe) respectivamente.

O método desenvolvido para extração de pirimimetanil, pirimicarbe e buprofezina em amostras de águas superficiais por DI-SPME/GC-MS mostrou-se rápida, eficiente e com ausência de solventes orgânicos. As concentrações para o pirimicarbe e a buprofezina (pesticidas detectado) das amostras reais estavam dentro do estabelecido pela legislação europeia.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Relatório de atividades 2001 a 2006. acesso em 23/04/2008.

<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

ARIAS, A. R. L; BUSS, D. F; ALBUQUERQUE, C; INÁCIO, A. F; FREIRE, M. M; EGLER, M; MUGNAI, R; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12 (1), p.61-72, (2007).

BARBOSA, L. C. **Pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, p. 57-106, 2004.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, 2a ed., Editora Unicamp, Campinas, SP, 1996, 60-131.

BAPTISTAL, A. P. M; CARVALHO, G. A; CARVALHO, S. M; CARVALHO, C. F; BUENO FILHO, J. S. S. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ver. Cienc. Rural**, v 03, 2009.

BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; CONCHA-GRAÑA, E.; GUIMARAES, A.; GONÇALVES, A.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; ALPENDURADA, M. F. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 165-173, 2007.

BERTON, O.; MAY-DE-MIO, L. L.; SANTOS, H. A. A. Cyprodinil, pyrimethanil, propineb e trifloxystrobin no controle da sarna da macieira. **Scientia Agrária**, v. 8, n. 2, p. 173-178, 2007.

BONATO, P. S.; OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

BORGES, J. H.; DELGADO, M. A. R.; MONTELONGO, F. J. G. Microextracción em fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas. **CTA**, v. 26(1), 2005.

BRASIL. Portaria nº 380 518/ 2004, de 25 de março de 2004. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2004.

CARVALHO M. S. PAULILLO L. F. O suco orgânico e as governanças alternativas para os citricultores no Brasil. In: PAULILLO *et al.* (Coord.). **Agroindústria no Brasil: diferenças e dominância**. Rio de Janeiro: Papers, cap.8, pag. 321-341, 2006.

CLAVER, A, ORMAD, P; RODRÍQUEZ, L; OVELLEIRO, J. L. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). **Chemosphere**, v.64, p. 1437–1443, 2006.

CARASEK, E; COSTA, L. L.; SANT'ANA, E. S.; SUCHARA, E. A.; BENATO, V. S. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p 79-83, 2008.

COELHO, G. L. V; FONSECA, D. B. Determinação do coeficiente de atividade na diluição infinita (γ^∞) através da microextração em fase sólida (SPME). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p 1606-1608, 2007.

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

DELGADO, M. J. S ; BAROSO, S. R. ; FERNANDEZ-TOSTADO, G. T. ; POLO-DÍEZ. Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 287-296, 2001.

DÓREA, H. S; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, v.4, n.7, p.1-7, 2008.

DÓREA, H. S; LOPES, W. G. Determinação de pesticidas em feijão por dispersão da matriz em fase sólida. **R. Ecotoxicol e Meio Ambiente, Curitiba**, v. 13, p. 73-82, jan./dez. 2003.

DÓREA, H. S; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química nova**, v. 27, n. 6, p. 892-896, 2004.

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

European Commission Regulation. Drinking Water Guideline 80/779/EEC, **Official Journal of the European Communities** 1980, L 229.12. <http://www.andev.gov.br>: acessado em 14.05.2008.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia.** 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Unicamp. Campinas, São Paulo, 2004.

FERREIRA, A. P. Pesticide impacts in the microbial soil activity and on farmers healthy. **Revista Baiana de Saúde Pública.** Salvador, v. 30(2), p. 309-321, jul-dez, 2006.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P.; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. Análise de riscos de contaminação de águas superficiais e subterrâneas da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 1 – 16, 2001.

FONSECA, S. G. C.; DA SILVA, L. B. L.; CASTRO, R. F.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 157-159, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/Legis/pdfs/portarias_m/pm_518_2004.pdf>. Acesso em 25 março 2009.

GAUJAC, A. **Otimização e validação de método para determinação de BTEX em amostras ambientais aquosas empregando microextração em fase sólida e GC-FID.** 2006. 106 f. (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2006.

GAUJAC, A; EMÍDIO, E. S; NAVICKENE, S; FERREIRA, S. L. C; DÓREA, H. S. Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, p. 99–104, 2008.

GONCALVES, C.; ALPENDURADA. M. F. Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. **Journal of Chromatography A**, v.963, p.19-26, 2002.

IUPAC FOOTPRINT PESTICIDES PROPERTIES DATABASE. Acesso em 24/05/2009.

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/573.htm>

IBAÑEZ, M.; PICÓ, Y.; MÃNES, J. On-line liquid chromatographic trace enrichment and high-performance liquid chromatographic determination of diquat, paraquat and difenzoquat in water J. **Journal of Chromatography A**, v.728, p.325-331, 1996.

INMETRO, **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Rev. 02. Junho/2007.

JUNTING, L.; PENG, C.; SUZUKI, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. **Forensic** ., Amsterdam, v.97, p.93-100, 1998.

JARDIM, I. C. S. F; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012,2009.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.35-62. 2000.

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multirresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.

KONSTANTIOU, I. K; HELA, D. G; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v.141, p. 555-570, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: Editora Rima, 2004. 93 p.

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

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.

LOPES, T. M. N. **Avaliação de pesticidas em água utilizada para o consumo humano no município de Dourados (MS)**. 2006. 161 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LOURENCETTI, C; SPADOTTO, C. A; SANTIAGO-SILVA, M. RIBEIRO, M. L. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p.1- 14. 2005.

MALOSCHIK, E; ERNST, A; HEGEDÜS, G; DARVAS, B; SZÉKÁES, A. Monitoring water-polluting pesticide in Hungary. **Microchemical Journal**, 0762; p. 10, 2006.

MESTER, Z; STUERGEON, R ; PAWLISZYN, J. Solid-Phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v.56, p. 233-260, 2001.

MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem do capingüí, RS, empregando GC-ECD e GC-MS**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2003, 208f.

MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography A** , v.902, p.267-287, 2000.

MURTI, C. R. K., D. NAG. **“Human Health Impact of Pesticides in the Environment”**. In **Chemistry, Agriculture and the Environment**, M. L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 491, 1991.

MOREIRA, J. C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**. V. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

NAVICKIENE, S; DÓREA, DANTAS SILVA, M. G; AQUINO, A. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. **Talanta**, v. 76, p. 680-684, 2008.

OLIVEIRA, E. R. M.; MOURA, B. S.; COELHO, G. L. V. Análise de flavor por microextração em fase sólida (SPME). **Rev. Univ. Rural**, v. 27, n 1, p. 1-10, 2007.

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**, 1ª ed., Wiley-VCH: New York, 1997.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 646-654, 2005.

PEÑA-ALVAREZ, A., CAPELLA, S., JUAREZ, R., LABASTIDA, C.; Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v 1134, p 291-297, (2006).

PEÑALVER, A., POCURULL, E., BORRULL, F., MARCÉ, R.M., Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n.8, 557, (1999).

PINHEIRO, A; ROSA, F. C. Classificação dos pesticidas usados na bacia hidrográfica do ITAJAÍ (SC) quanto ao risco de degradação dos recursos hídricos, **Rev. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 18, p. 45-58, 2008.

POLETTI, M; COLLETTE, L. P; OMOTO, E. C. Compatibilidade de agrotóxicos com os ácaros predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Sociedade Entomológica do Brasil**, Bioassay (2008), <http://www.bioassay.org.br/articles>: acessado em 06/04/09.

PRIMEL, E. G; ZANELLA, R; KURZ, M. H. S; GONÇALVES, F. F; MACHADO, S. O; MARCHEZANE, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo o arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v.28, n.4, 2005.

QUEIROZ, M. E.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, S. C. N; CAROL C. H; JARDIM I. C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 68-76, 2001.

QUINTEIRO, L. M. C; NOBRE, A. L. R; FERREIRA, A. B. B; GODOY, R. L. O; CASTRO, I. M. Microextração em fase sólida: Fundamentos e aplicações em análise de alimentos. **B. Ceppa**, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, M. L; POLESE, L; JUNIOR O. P. A; BRITO, N. M. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. **R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

ROCHA, L. C. D; CARVALHO, G. A. Adaptação da metodologia padrão da IOBC para estudos de seletividade com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de laboratório. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 3, p.315-320, 2004.

SANCHES S. M; SILVA, C. H. T. P; CAMPOS, S. X; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.53-58, 2003.

SANTOS, A. P. **Determinação de compostos organoclorados e hidrocarbonetos poliaromáticos na Lagoa de Carapicuíba – SP.** 2007. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. 2007.

SANTOS, T. F. S; AQUINO, A; DÓREA, H. S; NAVICKIENE, S. MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography–mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 390, p. 1425–1430, 2008.

SILVA, M. G. D.; AQUINO, A.; NAVICKIENE, S; DÓREA, H. S; Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. **Talanta**, v. 76, p. 680–684, 2008.

SINDAG - SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Importações de defensivos agrícolas**. 2004. Disponível em: <<http://www.sindag.br>>. Acesso em: 25 março 2009.

SNOW, N. H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.445-455, 2000.

STOPELLI, I; M. A. **Agricultura, ambiente saúde e: uma abordagem sobre o risco de contato com os agrotóxicos a partir de um registro hospitalar de referência regional**. (Tese Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, 2005.

TOMITA. R. Y; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**. v. 64, n.2, p.135-142, set. 2003.

TOMLIN, C. **The e-Pesticide Manual**, The British Crop Protection Council Versão Eletrônica 3.1, 2003. www.bcp.org/publications/Pesticide_Manual_2003.htm

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M; JONG, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. **Journal of Chromatography A**, v.745, p.49-82, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 1999.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; MONTEIRO, L.; ROCHA, E. C.; PAWLISZIN, J. Aplicação de SPME (solid phase micro-extraction) na análise de águas potáveis de três localidades do estado de São Paulo. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 6, 1998.

VEIGA, M. M; SILVA, D. M; VEIGA, L. B. E; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22(11), p. 2391-2399, 2006.

VOGEL, A. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1986, 690p.

WHO- Guidelines for Drinking-water Quality (2006). Incorporating first addendum. **Recommendations**. v. 1, 3rd edition. Disponível no site: www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3rev/en/print.html, acessado em 30/03/2009.