



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BÁRBARA LUISA SOARES DOS REIS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA MINERAL
ENGARRAFADA PRODUZIDA EM SERGIPE**

**DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF
PESTICIDE RESIDUES IN BOTTLED MINERAL WATER
PRODUCED IN SERGIPE**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BÁRBARA LUISA SOARES DOS REIS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA MINERAL
ENGARRAFADA PRODUZIDA EM SERGIPE**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

Coorientador: Prof. Dr. Débora Santos Silva Bezerra

**DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF
PESTICIDE RESIDUES IN BOTTLED MINERAL WATER
PRODUCED IN SERGIPE**

*Master dissertation presented to the
Graduate Program in Chemistry of the
Federal University of Sergipe to obtain
MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237d	Santos, Bárbara Luisa Soares dos Reis
	Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em água mineral engarrafada produzida em Sergipe = development of method for determination of pesticide residues in bottled mineral water produced in Sergipe / Bárbara Luisa Soares dos Reis Santos ; orientador Sandro Navickiene. – São Cristóvão, 2018.
	106 f. : il.
	Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.
	1. Química. 2. Águas minerais. 3. Água - Sergipe - Analise. 4. Produtos químicos agrícolas. I. Navickiene, Sandro, orient. II. Título.
	CDU: 54:663.6(813.7)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE
Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Bárbara Luisa Soares dos Reis Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 30/07/2018.

Sandro Navickiene

Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Debora Santos Silva Bezerra

Prof.ª Dr.ª Debora Santos Silva Bezerra
Departamento de Química- UFS

Luciane Pimenta Cruz Romão

Prof.ª Dr.ª Luciane Pimenta Cruz Romão
Departamento de Química – UFS

Jandyson Machado Santos

Prof. Dr. Jandyson Machado Santos
UFRPE

*Aquela que não cabe em palavras
à representatividade em minha
vida. Minha querida avó Maria São
Pedro (in memoriam).*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gratidão à força maior, Deus, por ter me presenteado com essa oportunidade e sempre me fortalecido durante a caminhada até aqui.

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene, por sua valiosa orientação cercada de muita dedicação, paciência, cuidado e disposição a todo o momento em aconselhar e ajudar tanto no desenvolvimento deste trabalho como no meu crescimento profissional. Tais qualidades o fazem um exímio orientador e pesquisador.

À minha coorientadora Prof. Dr. Débora Bezerra e ao MSc. Luís Fabrício, por os belíssimos laços criados no trajeto do trabalho, bem como desmedida contribuição e apoio prestados para concretização do trabalho.

À minha família, por ser um porto seguro. Independente das marés me incentivaram, apoiaram e confiaram nos meus sonhos.

Ao meu namorado Cássio Júnior, por todo zelo, carinho, amizade, amor e compreensão nos momentos de ausência, cansaço e silêncio. Por continuamente cuidar de mim e não duvidar da minha capacidade.

Aos meus colegas do LCP e LABORGANICS pela agradável convivência e companheirismo. Aos meus amigos (as), que mesmo não ligados á área química festejaram minhas conquistas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Química pela valorosa transmissão de conhecimentos e experiências.

À Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química e Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo custeio do projeto e pela bolsa concedida.

RESUMO

A água mineral engarrafada é um produto largamente consumido no Brasil por ser considerada fonte confiável de água potável. Em contrapartida, há o grande uso de agrotóxicos, que podem atingir e contaminar águas subterrâneas, principal fonte de água mineral. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método para determinação de resíduos de agrotóxicos em água mineral engarrafada, utilizando a técnica de extração em fase sólida com adsorvente alternativo a base de óxido de grafeno e cromatografia líquida/espectrometria de massas. Para tanto, foram realizados testes para otimizar as condições instrumentais e de extração para análise de 6 agrotóxicos (alacloro atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam). Os analitos foram extraídos com óxido de grafeno e uma mistura de metanol e acetonitrila, apresentando valores de recuperação satisfatórios ($76\pm1,6$ e $100\pm2,4\%$) em um intervalo de concentração $0,5$ a $2,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Sob condições ótimas foi obtida boa linearidade e sensibilidade em um intervalo de 1 a $1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação superiores a $0,99$. Os desvios padrão relativos para determinações em triplicata foram inferiores a 12% e os limites de detecção e quantificação ficaram no intervalo de $0,0003$ – $0,017\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e $0,001$ – $0,05\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação de resíduos de agrotóxicos em água mineral engarrafada produzida em Sergipe.

Palavras-chave: Água Mineral. Agrotóxicos. SPE. Adsorventes. Óxido de grafeno. LC-MS.

ABSTRACT

Bottled mineral water is a widely consumed product in Brazil because it is considered a reliable source of drinking water. On the other hand, there is the great use of pesticides, which can reach and contaminate groundwater, the main source of mineral water. The present research had the objective of developing a method for the determination of residues of pesticides in bottled mineral water, using the technique of solid phase extraction with alternative adsorbent to the base of graphene oxide and liquid chromatography/mass spectrometry. For that, tests were performed to optimize the instrumental and extraction conditions for the analysis of 6 pesticides (alachlor, atrazine, carbaryl, carbofuran, pyrimicarb and endosulfan sulfate). The analytes were extracted with graphene oxide and a mixture of methanol and acetonitrile, presenting satisfactory recovery values (76 ± 1.6 and $100 \pm 2.4\%$) in a concentration range of 0.5 to $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$. In optimal conditions good linearity and sensitivity were obtained in a range of 1 to $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ with determination coefficients above 0.99. The relative standard deviations for triplicate determinations were less than 12% and the limits of detection and quantification were in the range of 0.0003 - $0.017 \mu\text{g L}^{-1}$ 0.001 - $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The proposed method was applied in the determination of pesticides residues in bottled mineral water produced in Sergipe.

Keywords: Mineral Water. Pesticides. SPE. Adsorbents. Graphene Oxide. LC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos agrotóxicos em estudo.....	10
Figura 2 – Etapas envolvidas na SPE: (1) condicionamento do sorvente, (2) adição da amostra, (3) remoção dos interferentes e (4) eluição do analito.....	14
Figura 3 – Estrutura e aplicações do grafeno e óxido de grafeno em SPE.....	17
Figura 4 - Localização das fontes de água mineral testadas. Identificação: 4A: fonte água mineral A, lat -10.99874° long -37.27242°; 4B: fonte água mineral B, lat -10.97481° long -37.16271°. 4C: fonte água mineral C, lat -11.10698° long – 37.39419.....	30
Figura 5 – Cromatogramas da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, Gradientes 1 (Figura 4A) e 2 (Figura 4B).....	42
Figura 6 – Cromatogramas e espectros de massas individuais obtidos em análise da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, gradiente	43
Figura 7 – Cromatogramas e espectros de massa individuais obtidos em análise da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, gradiente 2.....	45
Figura 8 –Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de Florisil, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.....	49
Figura 9 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de alumina neutra, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.....	50
Figura 10 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.....	49
Figura 11 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de sílica, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.....	51
Figura 12 – Cromatograma e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e 10 mL de acetonitrila.....	53
Figura 13 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e diferentes volumes de acetonitrila.....	54
Figura 14 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 3 mL de acetonitrila, 500 mL de amostra e diferentes massas de C18.....	55

Figura 15 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes massas de óxido de grafeno parcialmente oxidado, 100 mL de amostra e 3 mL de solvente eluição acetonitrila.....	57
Figura 16 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes volumes de acetonitrila, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.....	58
Figura 17 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes de eluição, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.....	60
Figura 18 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes de eluição, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.....	60
Figura 19 – Cromatograma e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 50 mg de GOp, 500 mL de amostra e 5 mL de metanol e acetonitrila (50:50).....	63
Figura 20 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 50 mg de GO e GOr, 100 mL de amostra e 5 mL da mistura metanol acetonitrila (50:50).....	65
Figura 21 – Curvas analíticas preparadas em metanol obtidas das análises dos agrotóxicos em LC-MS no intervalo de concentração de 0,001 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$	68
Figura 22 – Cromatograma da corrente total de íons em modo negativo e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 50 mg de GOp, 100 mL de amostra e 5 mL de metanol e acetonitrila (50:50).....	72
Figura 23 – Cromatogramas da análise em modo SIM e espectros de massas da análise em modo SCAN das amostras de água mineral.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Culturas agrícolas predominantes no estado de Sergipe e no Brasil e proporção de áreas colhidas em hectare.....	6
Tabela 2 – Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo.....	7
Tabela 3 – Características físico-químicas dos agrotóxicos em estudo.....	8
Tabela 4 – Trabalhos publicados utilizando as técnicas de extração em fase sólida e cromatografia acoplada a espectrometria de massas.....	24
Tabela 5 – Condições instrumentais de análise no LCMS-2020.....	28
Tabela 6 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização eletrospray.....	34
Tabela 7 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização química a pressão atmosférica.....	35
Tabela 8 – Resumo da quantidade de agrotóxicos que foram detectados com uso da ESI como fonte de ionização.....	37
Tabela 9 – Resumo da quantidade dos agrotóxicos que foram detectados com uso da APCI como fonte de ionização.....	38
Tabela 10 – Áreas dos sinais obtidas pela análise exploratória de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas fontes ESI e APCI.....	39
Tabela 11 – Tempos de retenção, porcentagem de metanol e relação m/z dos agrotóxicos, obtidos pela análise exploratória de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).....	40
Tabela 12 – Gradiente de eluição elaborados para sistema LC-MS modo SIM....	41
Tabela 13 – Tempos de retenção dos agrotóxicos ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) nos Gradientes 1 e 2.....	47
Tabela 14 – Comparaçāo entre os três adsorventes a base de grafeno em relação aos agrotóxicos recuperados.....	66
Tabela 15 – Equações da reta e coeficiente de determinação (r^2) dos agrotóxicos estudados.....	69
Tabela 16 – Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os agrotóxicos.....	71
Tabela 17 - Resultados de recuperação média (%) e desvios padrão relativos (DPR%) para os três níveis de fortificação testados ($n = 3$).....	73
Tabela 18 - Resultados para teste de precisão intermediária expressos por meio do desvio padrão relativo (DPR%).....	74
Tabela 19 – Limites de detecção e quantificação dos agrotóxicos em estudo.....	75
Tabela 20 – Comparaçāo do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas.	76

Tabela 1 – Culturas agrícolas predominantes no estado de Sergipe e no Brasil e proporção de áreas colhidas em hectare.....	6
Tabela 2 – Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo.....	7
Tabela 3 – Características físico-químicas dos agrotóxicos em estudo.....	8
Tabela 4 – Trabalhos publicados utilizando as técnicas de extração em fase sólida e cromatografia acoplada a espectrometria de massas.....	24
Tabela 5 – Condições instrumentais de análise no LCMS-2020.....	28
Tabela 6 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização eletr spray.....	33
Tabela 7 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização química a pressão atmosférica.....	34
Tabela 8 – Resumo da quantidade de agrotóxicos que foram detectados com uso da ESI como fonte de ionização.....	36
Tabela 9 – Resumo da quantidade dos agrotóxicos que foram detectados com uso da APCI como fonte de ionização.....	37
Tabela 10 – Áreas dos sinais obtidas pela análise exploratória de soluções padrão de agrotóxicos em metanol (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nas fontes ESI e APCI.....	38
Tabela 12 – Gradiente de eluição elaborados para sistema LC-MS modo SIM....	40
Tabela 13 – Tempos de retenção dos agrotóxicos (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nos Gradientes 1 e 2.....	46
Tabela 14 – Comparação entre os três adsorventes a base de grafeno em relação aos agrotóxicos recuperados.....	65
Tabela 15 – Equações da reta e coeficiente de determinação (r^2) dos agrotóxicos estudados.....	68
Tabela 16 – Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os agrotóxicos.....	70
Tabela 17 - Resultados de recuperação média (%) e desvios padrão relativos (DPR%) para os três níveis de fortificação testados (n = 3).....	72
Tabela 18 - Resultados para teste de precisão intermediária expressos por meio do desvio padrão relativo (DPR%).....	73
Tabela 19 – Limites de detecção e quantificação dos agrotóxicos em estudo.....	74
Tabela 20 – Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LMR	– Limite Máximo de Resíduo
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
GC	– <i>Gas Chromatography</i> ; Cromatografia Gasosa
LC	– <i>Liquid Chromatography</i> ; Cromatografia Líquida
SPE	– <i>Solid Phase Extraction</i> ; Extração em Fase Sólida
ABINAM	– Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais
IBWA	– <i>International Bottled Water Association</i> ; Associação Internacional de Águas Engarrafadas
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IDA	– Ingestão Diária Aceitável
LC-MS	– <i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> ; Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas
ESI	– <i>Electrospray Ionization</i> ; Ionização por Eletronebulização
APCI	– <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> ; Ionização Química a Pressão Atmosférica
SCAN	– Modo de Aquisição por Varredura de Íons
SIM	– <i>Selected Ion Monitoring</i> ; Monitoramento do Íon Selecionado
<i>m/z</i> –	– Relação Massa Carga
HPLC	– <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IUPAC	– <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; União Internacional de Química Pura e Aplicada
PPDB	– <i>Pesticides Properties DataBase</i> ; Base de Dados de Propriedades dos Pesticidas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LLE	– <i>Liquid Liquid Extraction</i> ; Extração Líquido-Líquido

TICC	– <i>Chromatogram of Total Ion Current</i> ; Cromatograma da Corrente Total de íons
AOAC	- <i>Association of Official Analytical Chemists</i> , Associação Oficial de Químicos Analíticos
GO	– Óxido de Grafeno
GO _p	– Óxido de Grafeno Parcialmente Oxidado
GO _r	– Óxido de Grafeno Reduzido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Água Mineral	3
1.2	Agrotóxicos.....	4
1.3	Extração em Fase Sólida.....	14
1.3.1	Adsorventes comerciais.....	15
1.3.2	Adsorventes alternativos	16
1.3.3	Aplicação da Extração em Fase Sólida (SPE)	18
1.4	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas	19
1.5	Validação do Método Analítico.....	20
1.6	Revisão de Literatura.....	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Reagentes e Materiais.....	26
3.2	Equipamentos.....	26
3.3	Padrões certificados dos agrotóxicos.....	27
3.4	Preparo de soluções padrão dos agrotóxicos	27
3.5	Procedimento de Extração por SPE utilizando adsorvente comercial	27
3.6	Procedimento de Extração por SPE utilizando adsorvente alternativo	28
3.7	Condições instrumentais de análise	28
3.8	Validação do método analítico	29
3.9	Coleta de amostras e localização das fontes de água mineral.....	29
3.10	Limpeza da vidraria	30
3.11	Descartes dos reagentes	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	Obtenção das condições instrumentais de análise	31
4.1.1	Ensaios para escolha da fonte de ionização	32
4.2	Desenvolvimento do método por LC-MS em modo SIM.....	40
4.3	Otimização do procedimento de extração por SPE	48
4.3.1	Seleção do adsorvente e solvente de eluição	49
4.3.2	Seleção do volume do solvente de eluição	53
4.3.3	Seleção da quantidade do adsorvente C18	55
4.4	Avaliação do adsorvente alternativo óxido de grafeno parcialmente oxidado (GO _p)	56
4.4.1	Seleção da quantidade do adsorvente alternativo	57
4.4.2	Seleção do volume do solvente de eluição	58

4.4.3	Seleção do tipo de solvente de eluição.....	59
4.4.4	Qualidade do extrato obtido empregando adsorvente alternativo	63
4.5	Avaliação dos adsorventes alternativos óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (GOr)	64
4.6	Validação do método analítico	67
4.6.1	Linearidade e sensibilidade	67
4.6.2	Seletividade não específica (efeito matriz).....	70
4.6.3	Exatidão e Precisão.....	73
4.6.4	Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	75
4.7	Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em água.....	76
4.8	Aplicação do método em amostras comerciais de água mineral engarrafada produzidas em Sergipe	77
5	CONCLUSÕES	79
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO	80
7	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos minerais indispensáveis para manutenção da vida no planeta, visto que todas as formas de vida dependem dela. Cada ser humano necessita consumir diariamente alguns litros de água doce para manter-se vivo. Contudo, uma proporção relativamente pequena, menos de 0,01% do suprimento total de água, está disponível em fontes acessíveis de água potável, sendo a maior parte dela encontrada no subsolo (aquéferos) denominando-se de água subterrânea [1,2].

As águas subterrâneas são consideradas uma forma pura de água, devido à sua filtração através do solo e ao longo tempo de permanência no subsolo. O Brasil está entre os países que possuem um dos maiores volumes deste recurso hídrico, que é destinado a diversos fins como irrigação, uso doméstico, abastecimento público, turismo, indústria e comércio. No que diz respeito ao último, vem se intensificando a comercialização de água subterrânea por meio da venda de água mineral engarrafada, sendo um produto conhecido pela população como fonte de hidratação saudável por ser proveniente de fontes seguras e confiáveis de água potável [3,4].

Em contrapartida a essas considerações, têm-se as diversas atividades humanas que afetam a qualidade e a potabilidade das águas, especialmente quando em áreas onde os lençóis subterrâneos estão mais vulneráveis à contaminação [3]. Entre as atividades fontes de contaminação está a agricultura, que possui altas taxas de utilização de agrotóxicos fazendo o Brasil ocupar a primeira posição como maior consumidor mundial [5].

Os agrotóxicos podem provocar efeitos prejudiciais aos seres humanos, devido as suas propriedades como toxicidade e a persistência no meio ambiente (água/solo), de modo que podem migrar para camadas mais profundas por meio de águas da chuva ou irrigação, alcançando às águas subterrâneas. Em vista disso, estudos recentes demonstram a presença de agrotóxicos em águas subterrâneas, bem como em amostras de água mineral [6,7,8].

Para avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos na água, é necessário a utilização de metodologias analíticas eficazes. Uma vez que os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 274, de 23 de setembro de 2005, sobre as águas minerais naturais e águas naturais, apontam concentrações de agrotóxicos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ [9,10].

Entre as técnicas tradicionalmente aplicadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em água estão a Cromatografia Gasosa (GC) e a Cromatografia Líquida (LC). A LC tem se destacado para esta finalidade, em virtude das características de polaridade (média a alta), termolabilidade e/ou baixa volatilidade dos agrotóxicos [11]. Aliada a estas possibilidades, está a espectrometria de massas que pode atuar como um detector de grande seletividade e sensibilidade, auxiliando na identificação dos compostos de interesse [12,13].

Embora seja fundamental o uso de métodos e instrumentos analíticos para se obter resultados confiáveis, o preparo da amostra ainda permanece como uma das etapas mais importantes de um método analítico, sobretudo em uma matriz como água mineral, em que a pré-concentração dos analitos é praticamente obrigatória. Entre as técnicas de preparo de amostras, está a extração em fase sólida (SPE) largamente empregada em análises ambientais, farmacêuticas e de alimentos nas quais os analitos se encontram em baixas concentrações [14].

Assim, diante do exposto, o presente trabalho pretende desenvolver um método para determinação de resíduos de agrotóxicos em água mineral engarrafada produzida no estado de Sergipe, utilizando as técnicas de extração em fase sólida, com adsorventes comerciais e alternativos a base de óxido de grafeno, e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

1.1 Água Mineral

De acordo com o Artigo 1º do Código de Águas Minerais, Lei nº 7.841, de 8 de agosto de 1945: águas minerais são aquelas provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas que possuam composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns, com características que lhes confiram uma ação medicamentosa [15].

São diferenciadas das águas potáveis de mesa, que de acordo com o mesmo código possuem composição normal provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas que preencham tão somente as condições de potabilidade para a região [15]. Tal distinção é relevante e por isso deve estar contida no rótulo da água engarrafada para que o consumidor tenha conhecimento da informação.

Em síntese, a água mineral tem uma ação medicamentosa enquanto a água de mesa é uma simples água potável. Esta característica benéfica é especialmente por conta da sua composição enriquecida em sais minerais, retirados das rochas e sedimentos por onde percolaram muito vagarosamente no decorrer dos anos [16].

O consumo de águas minerais engarrafadas vem aumentando ano a ano no Brasil, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais (ABINAM), a população não confia em uma “água de torneira filtrada”, e se preocupa com a saúde dando maior credibilidade às águas engarrafadas. Assim, contribuem para aumentar as estatísticas do mercado nacional de águas engarrafadas, que cresceu tão substancialmente atingindo a produção de 13 bilhões de litros de água mineral no ano de 2013. [17,18].

O Brasil ocupa a quinta posição no mercado mundial de água engarrafada, de acordo com a Associação Internacional de Águas Engarrafadas (IBWA), consumindo mais água mineral do que países como Alemanha, França e Itália [19]. Com relação à expressão de consumo local, o estado de Sergipe conta atualmente com oito fontes de distribuição de água mineral engarrafada, nove marcas de comercialização e aproximadamente 200 pontos de revenda

somente na capital, representando um número expressivo levando em consideração que Sergipe é o menor estado da federação [20,21].

O panorama nacional pode facilmente ser transferido para o estadual, visto que estes dados dão à dimensão do quanto o brasileiro, como também o sergipano, dá importância à qualidade da água que consome. Por isso é importante a fiscalização das fontes que são exploradas comercialmente, as quais não devem estar sujeitas a influência de águas superficiais ou suscetíveis a contaminação [15].

Contudo, alguns aquíferos possuem grande extensão geográfica fato que compromete uma fiscalização eficiente, tornando as águas subterrâneas vulneráveis a possíveis fontes de contaminação, sobretudo antrópicas, como esgotos, indústrias e agricultura [3].

1.2 Agrotóxicos

Na agricultura, os produtos cultivados não são fonte de nutrientes exclusivas dos seres humanos. São também para uma variedade de seres vivos, como por exemplo, insetos-pragas. Assim, para evitar, controlar e/ou combater diversos tipos de pragas que podem devastar plantações, são utilizados produtos/substâncias denominados de agrotóxicos.

Agrotóxicos e afins são definidos de acordo com Lei Federal Nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Nº 98816, como: produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas nas pastagens de florestas, nativas ou implantadas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais com finalidade de alterar a composição da fauna ou a flora a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos nocivos [22].

Atualmente, da maneira como é feita a produção agrícola no Brasil, existe uma dependência do uso de agrotóxicos para produção em larga escala. A lógica de mercado do agronegócio praticamente não permite aos produtores

outra forma de cultivo, por isso o uso recorrente destas substâncias coloca o Brasil como líder mundial de consumo [5].

Apesar da vultosa importância e considerável cobertura legal, na qual a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMR) e a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para todos os ingredientes ativos de agrotóxicos autorizados no Brasil, o comportamento do agrotóxico no ambiente é bastante complexo [23]. As substâncias podem sofrer transformações físicas e químicas, inclusive com a formação de subprodutos com propriedades absolutamente distintas do produto inicial e cujos danos à saúde e ao meio ambiente também são diferenciados [24].

Além disso, qualquer que seja o percurso do agrotóxico no meio ambiente, invariavelmente o homem é seu potencial receptor. O uso indiscriminado dessas substâncias pode provocar intoxicações em diferentes graus, tornando-se um problema de saúde pública e contaminação no meio ambiente [23]. Esses problemas são resultados das características dos agrotóxicos, como toxicidade, bioacumulação, persistência no meio ambiente e mobilidade, visto que por meio das correntes atmosféricas ou ação erosiva da chuva podem mover-se no ecossistema e atingir rios, lagos e aquíferos [25].

A possibilidade de contaminação das águas torna necessária a avaliação da presença de agrotóxicos em diversas amostras de água. Desse modo, para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionados 17 agrotóxicos: atrazina, aldrin, alacloro, ametrina, β -ciflutrina, carbofuran, carbaril, deltametrina, diuron, endosulfam, sulfato de endosulfam, lindano, parationa metílica, pirimicarbe, permetrina, piraclostrobina e 2,4 D.

A escolha destes agrotóxicos foi realizada de acordo com a sua utilização nas culturas agrícolas predominantes no estado de Sergipe [26] e no Brasil [27] (Tabela 1). Partindo do princípio que são as culturas com maior proporção de área cultivada, há um maior volume destes agrotóxicos sendo utilizados nelas e maior é a probabilidade de estarem presentes no ambiente.

Tabela 1 – Culturas agrícolas predominantes no estado de Sergipe e no Brasil e proporção de áreas colhidas em hectare [26,27].

Principais lavouras de Sergipe	Área colhida em hectare (ha)	Principais lavouras do Brasil	Área colhida em hectare (ha)
Milho	150 935	Soja	18 882 969
Cana-de-açúcar	54 097	Milho	11 598 576
Laranja	47 628	Cana-de-açúcar	5 679 833
Coco-da-baía	37 641	Arroz	2 415 582
Mandioca	24 463	Mandioca	1 703 555

Após a seleção dos agrotóxicos é importante conhecer as características dos analitos em estudo, para isso foram obtidas informações gerais e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, as quais estão apresentadas nas Tabelas 2, 3 e Figura 1.

Tabela 2 – Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo. Fonte: RDC nº 274, CONAMA, IUPAC PPDB; ANVISA; [10, 28, 29,30].

Princípio Ativo	Grupo Químico	Fórmula Molecular	Modo de Ação	Utilização na Cultura Agrícola	Classe Toxicológica	LMR ¹ (µg L ⁻¹)
Atrazina	Triazina	C ₈ H ₁₄ CIN ₅	Herbicida	Milho; Cana-de-açúcar	III	2* **
Aldrin	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	Inseticida	Milho	I	0,03
Alacloro	Cloroacetamida	C ₁₄ H ₂₀ CINO ₂	Herbicida	Soja; Cana-de-açúcar	III	20* **
Ametrina	Triazina	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	Herbicida	Milho	III	-
β- Ciflutrina	Piretróide	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	Inseticida	Legumes de raiz	II	7 **
Carbofurano	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	Inseticida	Arroz; Soja; Milho	I	-
Carbaril	Carbamato	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	Inseticida	Frutas Cítricas	II	-
Deltametrina	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	Inseticida	Milho	III	-
Diuron	Felilamida	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	Herbicida	Cana-de-açúcar	III	90 **
Endosulfam	Organoclorado	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Inseticida; Acaricida	Soja; Milho	I	20*
Sulfato de Endosulfam	Metabolito	-	-		-	20 **
Lindano	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆	Inseticida; Acaricida	Frutas Cítricas	I	2* **
Parationa Metílica	Organofosforado	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	Inseticida	Soja	I	9 **
Pirimicarbe	Carbamato	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	Inseticida	Frutas Cítricas	II	-
Piraclostrobina	Estrobilurina	C ₁₉ H ₁₈ CIN ₃ O ₄	Fungicida	Frutas Cítricas; Soja	II	-
Permetrina	Piretróide	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	Inseticida	Soja	III	20* **
2,4 D	Ácido ariloxialcanóico	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	Herbicida	Cana-de-açúcar; Soja	I	30* **

* LMR's estabelecidos pela RDC nº 274 para água mineral. ** LMR's estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 396 para água subterrânea.

I- Extremamente Tóxico, II- Altamente Tóxico, III- Moderadamente Tóxico, IV- Pouco tóxico.

Tabela 3 – Características físico-químicas dos agrotóxicos em estudo. Fonte: IUPAC PPDB; ANVISA, PubChem. [29, 30, 31].

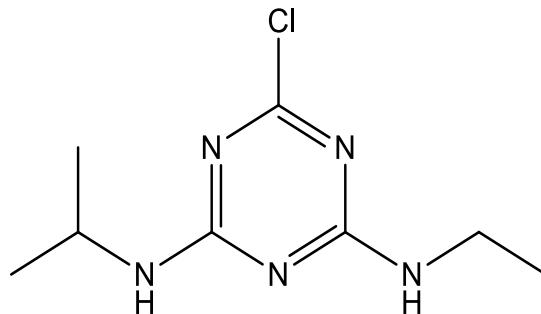
Agrotóxico	MM (g mol ⁻¹)	Temperatura de ebulação (°C)	Solubilidade em H ₂ O (mgL ⁻¹)	Solubilidade solvente Orgânico (mg L ⁻¹)	pKa	Log K _{ow}
Atrazina	215,68	205	35	Acetato de Etila (2,4x10 ⁴) Hexano (1,1x10 ²)	1,7	2,70
Aldrin	364,90	145	0,027	Acetona (6,0x10 ⁶) Benzeno (6,0x10 ⁶)	ND	6,50
Alacloro	269,77	100	240	Acetona (NE) Etanol (NE)	0,62	3,09
Ametrina	227,12	337	200	Acetona (5,69x10 ⁴) Hexano (1,40x10 ³)	10,07	2,63
β- Ciflutrina	434,29	100	0,0012	Diclorometano (2,0x10 ⁵) Hexano (1,0x10 ⁴)	ND	5,90
Carbofurano	221,26	254	322	Acetona (1,05x10 ⁵) Metanol (7,17x10 ⁴)	ND	1,80
Carbaril	201,22	210	120	Acetato de Etila (1,7x10 ⁵) Metanol (8,75x10 ⁴)	10,4	2,36
Deltametrina	505,20	300	0,0002	Acetona (4,5x10 ⁵) Metanol (8,15x10 ³)	ND	4,6
Diuron	233,09	356	35,6	Acetona (5,36x10 ⁴) Acetato de Etila (2,1x10 ⁴)	ND	2,87

Tabela 3 – Continuação.

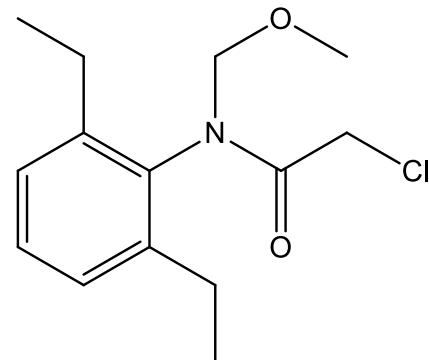
Agrotóxico	MM (g mol ⁻¹)	Temperatura de ebulação (°C)	Solubilidade em H ₂ O (mg L ⁻¹)	Solubilidade solvente Orgânico (mg L ⁻¹)	pKa	Log Kow
Endosulfam	406,93	158	0,32	Acetato de Etila (2,0x10 ⁵) Etanol (6,5x10 ⁴)	NE	4,75
Sulfato de Endosulfam	422,90	NE	0,22	Acetona (NE) Metanol (NE)	NE	3,66
Lindano	288,00	323	8,52	Acetona (4,35x10 ⁵) Metanol (2,9x10 ⁴)	NE	3,50
Parationa Metílica	263,21	375	55	Hexano (1,5x10 ⁴) Diclorometano (2,0x10 ⁵)	NE	3,00
Pirimicarbe	238,39	373	3100	Acetona (2,5x10 ⁵) Metanol (2,5x10 ⁵)	4,4	1,70
Piraclostrobina	387,80	200	1,9	Acetona (5,0x10 ⁵) Metanol (1,0x10 ⁵)	ND	3,99
Permetrina	416,30	200	0,2	Hexano (1,0x10 ⁶) Metanol (2,5x10 ⁵)	NE	6,1
2,4 D	221,04	273	24300	Acetona (2,1x10 ⁵) Metanol (8,1x10 ⁵)	3,40	-0,82

MM= Massa Molar; pKa= constante de acidez; Kow= constante de partição octanol-água; ND= não dissocia; NE=não encontrado.

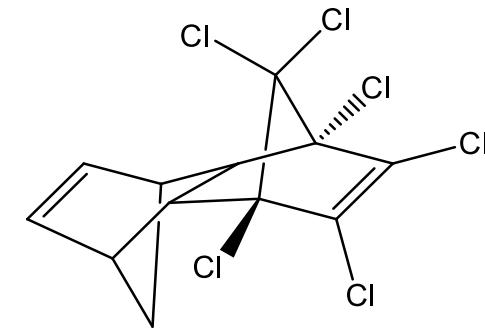
Figura 1 – Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos agrotóxicos em estudo. **Fonte:** IUPAC PPDB; ANVISA [29,30].



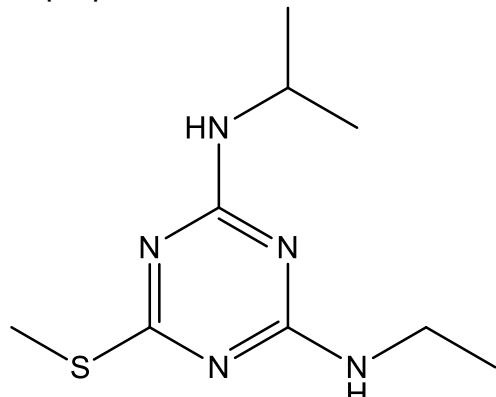
Atrazina: 2-cloro-4-ethylamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina



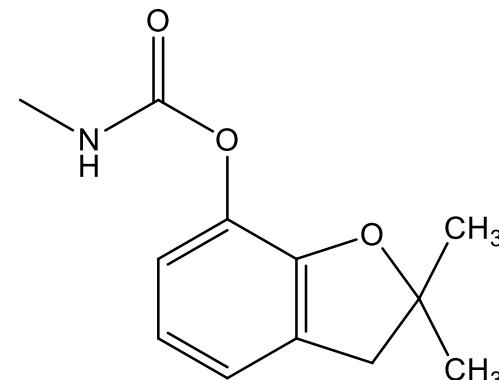
Alacloro: 2-cloro-2,6-diethyl-N-(metoximethyl)-acetanilida



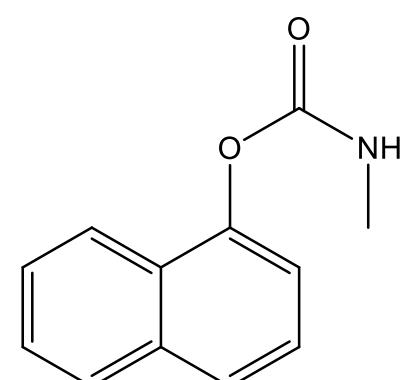
Aldrin: 1,2,5,10,10,hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro 1,4-endo-exo-5,8-dimetano-naftaleno



Ametrina: 2-ethylamino-4-isopropilamino-6-metiltio-S-triazina

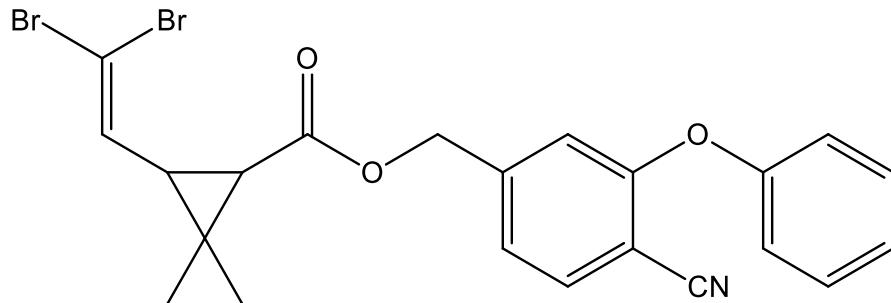


Carbofurano: 2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato

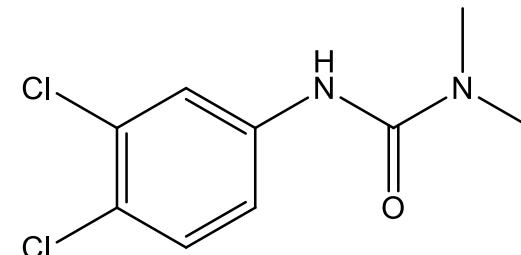


Carbaril: 1-naftil-N-metilcarbamato

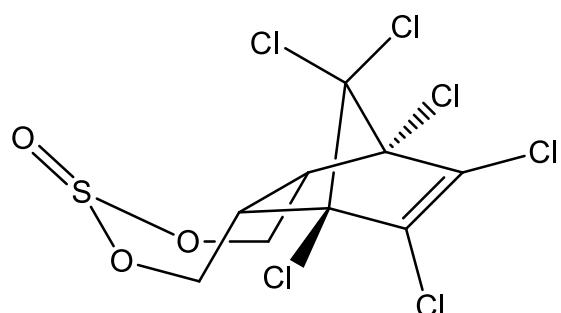
Figura 1 – Continuação **Fonte:** IUPAC PPDB; ANVISA [29,30].



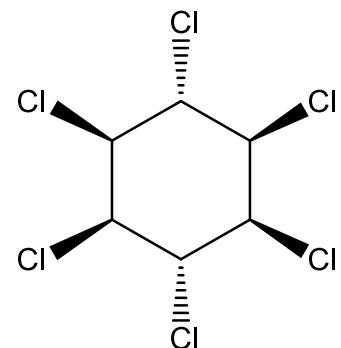
Deltametrina: (S)-alfa-ciano-m-fenoxibenzil- (1R- 3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato



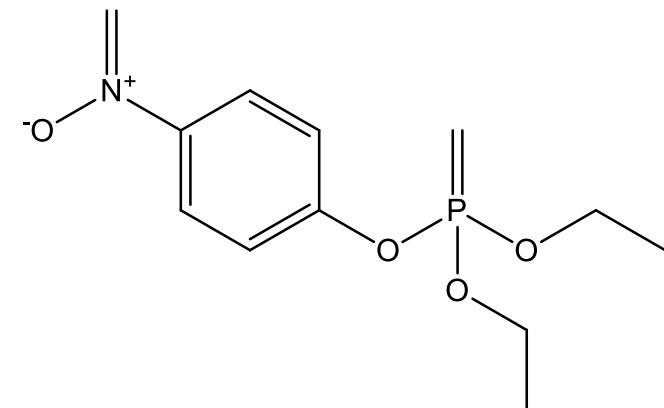
Diuron: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia



Endosulfan: 1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo (2,2,1) hepteno-2,5,6,bis(metileno) sulfito

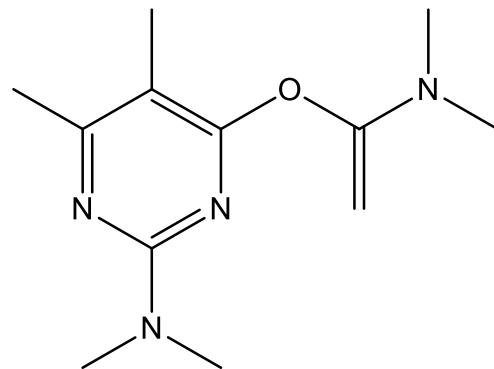


Lindano: 1-alfa,2-beta,3-beta,4-alfa,5-alfa-hexaciclohexano

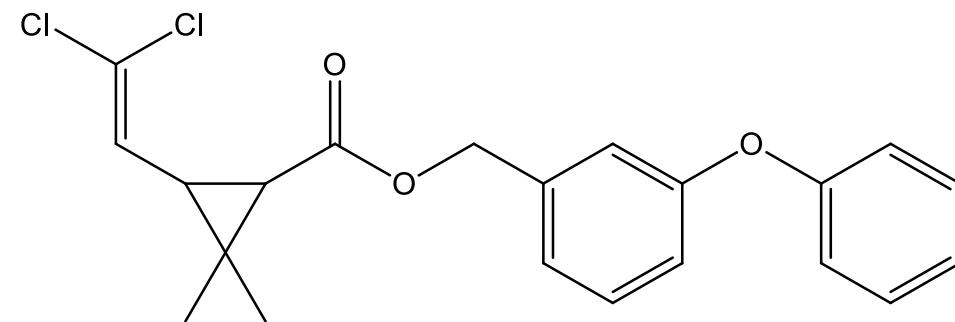


Parationa Metílica: O,O-dimetil-O-(4-nitrofenil) fosforotionato

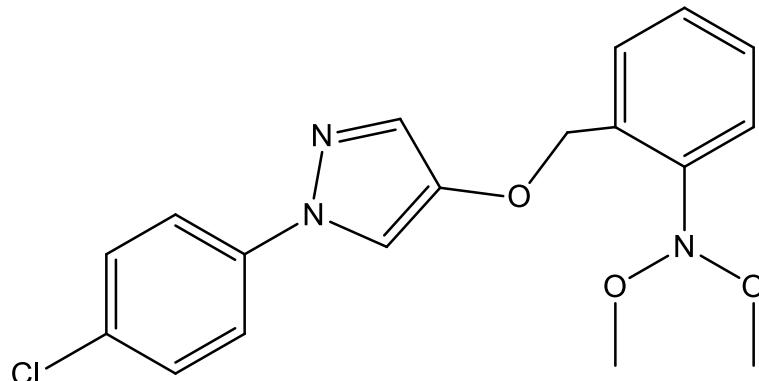
Figura 1 – Continuação **Fonte:** IUPAC PPDB; ANVISA [29,30].



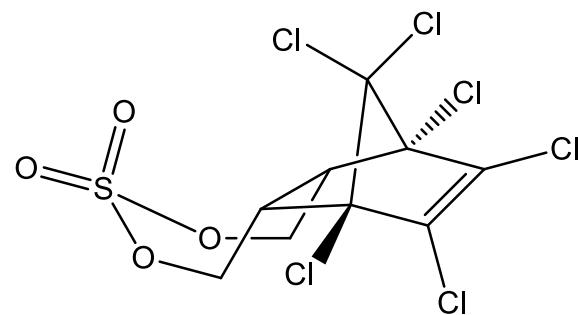
Pirimicarbe: 2-dimethylamino-5,6-dimethyl-4-pirimidil-N,N-dimethyl-carbamato



Permetrina: 3-fenoxibenzil cis, trans 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2 dimethylcyclopropano-1-carboxilato

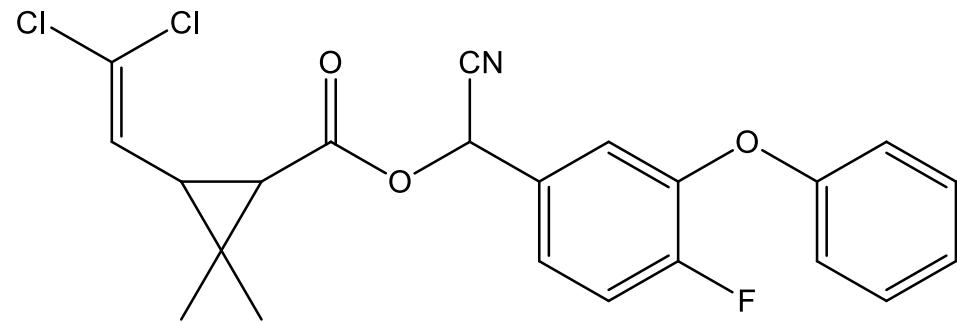


Piraclostrobina: metil {2-[1-(4-clorofenil)pirazol-3-iloximetil]fenil}(metoxi)carbamato

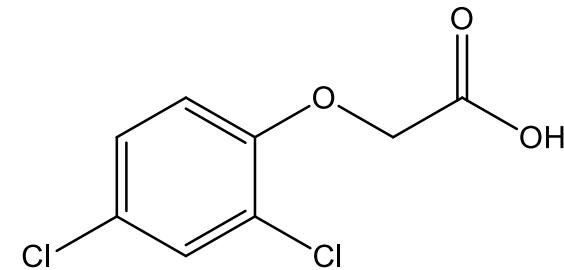


Sulfato de Endosulfan: 1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo (2,2,1) hepteno-2,5,6,bis(metileno) sulfato

Figura 1 – Continuação **Fonte:** IUPAC PPDB; ANVISA [29,30].



β - Ciflutrina: ciano-(4-flúor-3-fenoxifenil)-metil-3-(2,2-dicloroetil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato)



2,4 D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

A análise de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes químicas em água é difícil de ser executada, uma vez que esses compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas (como elencado nas Tabelas 2 e 3) e ocorrem em concentrações extremamente baixas na presença de altas concentrações de compostos interferentes [32].

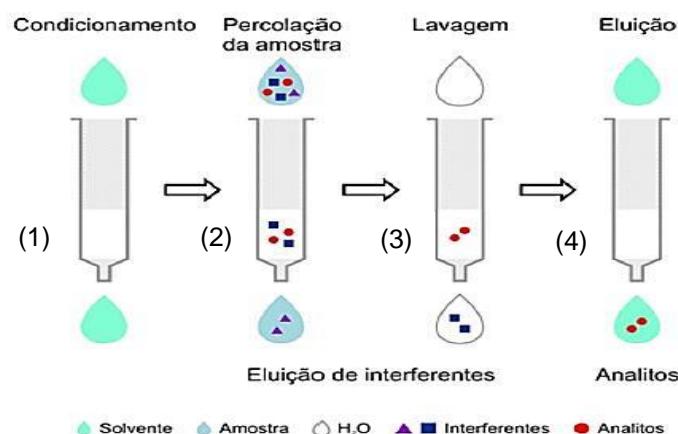
Por isso, a determinação de agrotóxicos em água geralmente requer um pré-tratamento da amostra, com uma etapa de pré-concentração dos analitos [33] e uma das técnicas mais utilizadas para pré-concentração de agrotóxicos em matrizes aquosas é a extração em fase sólida (SPE).

1.3 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida é uma técnica de preparo de amostra bem estabelecida e uma das mais utilizadas quando se trata de preparo de amostras para cromatografia líquida [34]. É uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica, pois, em sua forma mais simples, emprega uma pequena coluna aberta, denominada de cartucho de extração, a qual contém a fase sólida [35].

Em resumo, as etapas envolvidas neste procedimento de extração são: (1) condicionamento ou ativação do sorvente com solvente adequado; (2) introdução ou percolação da amostra; (3) limpeza para retirar interferentes; (4) eluição do analito [14] (Figura 2).

Figura 2 – Etapas envolvidas na SPE: (1) condicionamento do sorvente, (2) adição da amostra, (3) remoção dos interferentes e (4) eluição do analito [33].



Deve-se ter atenção a alguns parâmetros para selecionar um procedimento eficiente de extração por SPE: tipo de sorvente, volume de amostra, volume e tipo de solvente para eluição dos analitos [36]. Dentre estes fatores, um dos mais críticos é a escolha do sorvente, podendo-se optar por adsorventes comerciais ou alternativos.

1.3.1 Adsorventes comerciais

É comum a divisão dos sorventes para SPE em três grupos: óxidos inorgânicos; sorventes de baixa especificidade; e, sorventes específicos para determinados compostos e classes químicas [37]. Entre estas classes químicas, os sorventes mais comumente empregados para extração de agrotóxicos em amostras ambientais pertencem aos óxidos inorgânicos (sílica, alumina neutra e Florisil®) e sorventes de baixa especificidade (C18) [35,38].

A sílica $((\text{SiO}_2)_n\text{OH})$ e o silicato de magnésio (Florisil® $\text{MgAl}(\text{SiO}_4)_n$) apresentam características polares. O mecanismo de retenção entre estes adsorventes e os analitos de interesse se dá majoritariamente por adsorção [39]. As principais forças químicas atuantes são forças iônicas como ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, devido à presença de átomos e grupos funcionais com alta densidade eletrônica.

No caso da alumina neutra $(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$ caracteriza-se como um adsorvente anfótero, ou seja, pode interagir com compostos tanto de caráter ácido como básico, agrupando agrotóxicos de diversas classes químicas e, consequentemente colaborando para um processo de extração multirresíduo.

No grupo dos sorventes de baixa especificidade, encontram-se as fases baseadas em sílica quimicamente ligada no qual se destaca o octadecilsilano (C18) [40]. Com ampla gama de aplicações em amostras ambientais, sobretudo na extração de agrotóxicos multiclasse em água, o C18 possui propriedades apolares e mecanismo de retenção por partição [41]. As principais forças químicas e físicas que atuam entre as moléculas do analito e este sorvente são as interações de Van der Waals, por meio das ligações carbono-hidrogênio do analito com o grupo funcional da superfície da sílica.

Entretanto, considerando a extensa produção científica utilizando estes adsorventes, foram observados alguns problemas relacionados aos atuais coeficientes de partição que não favorecem a transferência dos analitos, a sorção irreversível de compostos e a dificuldade no isolamento de espécies altamente polares [42]. Por estes motivos, o interesse no desenvolvimento de novos materiais adsorventes para SPE tem crescido como alternativa a estes impasses bem como o melhoramento da técnica de extração, visando um aumento na eficiência.

1.3.2 *Adsorventes alternativos*

Nos últimos anos, entre os estudos que mais avançaram para síntese de novos materiais adsorventes estão os nanomateriais. Tais materiais tem atraído interesse quando comparados aos materiais comerciais clássicos (sílica, alumina neutra, C18) devido à sua grande área superficial, estabilidade química, durabilidade e resistência à corrosão [43].

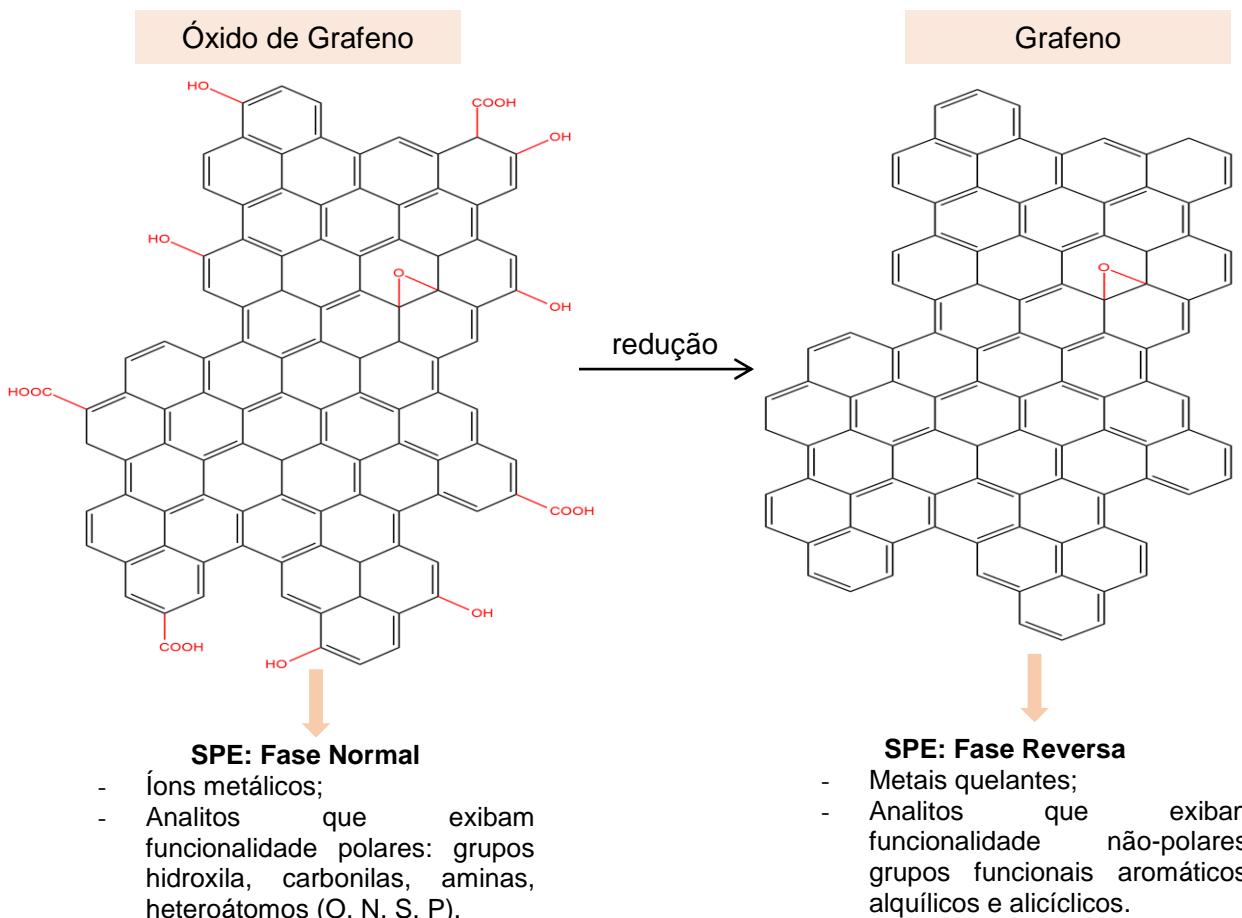
Em geral, os nanomateriais podem ser divididos em três grupos de acordo com sua natureza química: baseados em carbono, partículas inorgânicas e compostos orgânico-inorgânicos. Com foco voltado para utilização em preparo de amostra, os mais populares incluem nanopartículas de carbono: fulerenos, nanotubos de carbono e, mais recentemente, o grafeno (G) [44].

O método mais popularmente aceito para síntese do grafeno, devido ao seu baixo custo e larga escala de produção [45], é o método químico baseado na oxidação de grafite ao óxido de grafeno (GO) e subsequente redução química de óxido para grafeno utilizando um agente redutor adequado (método Hummers) [46].

O crescente interesse em grafeno e óxido de grafeno, sobretudo em SPE, deve-se as ideais propriedades adsorventes em virtude da sua grande área superficial, matrizes hexagonais de átomos de carbono em folhas de grafeno consideradas ótimas para interações fortes com outras moléculas, baixo consumo de adsorvente (20-100 mg) e solvente orgânico e a reprodutibilidade satisfatória [47].

Graças as propriedades hidrofóbicas do grafeno, ele se mostra adequado para compostos não polares, podendo ser aplicado em SPE de fase reversa. Para substâncias polares e de polaridade intermediária o mais indicado é o óxido de grafeno devido à presença de vários grupos funcionais que lhe conferem uma maior polaridade, sendo, portanto, aplicado em SPE de modo de fase normal [48]. As estruturas moleculares do grafeno e óxido de grafeno bem como suas aplicações em SPE podem ser vistas na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura e aplicações do grafeno e óxido de grafeno em SPE.



Fonte: Adaptado de Sitko *et al.*, 2013 [45].

Em termos de aplicações, estes materiais têm sido utilizados diretamente como adsorvente em SPE para extração de vários analitos em amostras ambientais, entre eles, agrotóxicos. Shi *et al.*, (2014) [49], utilizaram o grafeno para extração em fase sólida de seis agrotóxicos carbamatos (pirimicarbe, propoxur, carbaril, isoprocarbo, fenobucarbe e dietofencarbo) em amostras de águas ambientais, com posterior análise por sistema UPLC-MS/MS. A eficiência do grafeno foi comparada a diversos materiais adsorventes

comercialmente disponíveis e teve as maiores recuperações entre os adsorventes estudados.

Han *et al.*, (2014) [50] desenvolveram um procedimento para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos organofosforados (diclorvós, dimetoato, parationa metílica, malationa e parationa) em sucos de maçã. Para tanto, utilizaram SPE com grafeno como adsorvente e posterior determinação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Sob condições otimizadas, as recuperações médias dos analitos variaram de 70 a 106% com baixos coeficientes de variação.

1.3.3 *Aplicação da Extração em Fase Sólida (SPE)*

A SPE é comumente empregada na análise de amostras ambientais, sendo uma das mais utilizadas quando se trata do desenvolvimento de métodos para determinação de agrotóxicos em amostras líquidas [51]. Isso é devido ao baixo consumo de solvente, se comparada à extração líquido-líquido, ao tempo reduzido para obtenção dos extratos, à facilidade de automatização, limpeza das amostras e, principalmente, por permitir a pré-concentração dos analitos [52].

O fator de concentração é obtido entre volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume do extrato final. A concentração pode ser aumentada por um fator de 100 a 5000, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa em níveis extremamente baixos [53].

Um estudo realizado por Caldas *et al.* (2012), [33] sugeriu que há uma tendência em se utilizar SPE em conjunto com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Visto que a SPE é um dos principais métodos de preparo de amostras para extração de agrotóxicos em água, e a LC-MS é uma técnica de grande seletividade, e sensibilidade. Como já havia sido relatado por Ferrer e Barceló desde 1998 [54], essa união permite alcançar as concentrações dos analitos estabelecidos pelas legislações que definem os valores dos limites máximos de resíduos [10].

1.4 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

Nos últimos anos, a técnica cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC-MS) experimentou um progresso significativo, tanto em termos de desenvolvimento tecnológico quanto de aplicação, se tornando uma das técnicas preferidas para determinação de agrotóxicos [55]. Isso decorreu principalmente do desenvolvimento de novas interfaces de ionização compatíveis ao acoplamento LC-MS e ao aperfeiçoamento de analisadores de massas [56].

Entre as fontes de ionização que se mostraram mais adequadas e por isso tornaram-se mais populares estão: a ionização por electrospray – *electrospray ionization* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica – *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) [57].

A ESI é recomendada para ionização de compostos de média a alta polaridade, iônicos e termolábeis, enquanto a APCI apresenta melhor desempenho para analitos pouco polares ou de polaridade intermediária [58,59]. Ambas as interfaces operam em modo positivo e negativo de ionização. No caso da fonte ESI, no modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e o eletrodo receberá elétrons, ocorrendo oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá [60].

Na APCI, em modo positivo, o analito (M) precisa ter afinidade por prótons maior que o eluente (BH^+), de maneira que o analito irá abstrair o próton dele, formando um íon que corresponde à molécula original protonada $(\text{M}+\text{H})^+$. No modo negativo, ocorre o inverso, de maneira que o analito doará o próton para o eluente e, neste caso, o íon corresponderá ao analito desprotonado $(\text{M}-\text{H})^-$ [60].

Com relação aos analisadores de massas, parte fundamental do MS, um dos mais empregados é do tipo quadrupolo. Nele, é possível operar no modo varredura de íons (*SCAN mode*), que possibilitará o monitoramento de íons com diferentes razões massa-carga (m/z) dentro de um intervalo de massas predefinido o que resultará em um cromatograma da corrente total de íons (TICC). Ainda, pode-se realizar o monitoramento de íon selecionado (*SIM*

mode) em que as voltagens são mantidas constantes e o analisador quadrupolar atua como um filtro de massas, fazendo com que somente íons de *m/z* específicos alcancem o detector e sejam monitorados [61].

Com a utilização crescente da técnica é importante realizar um levantamento dos trabalhos na literatura sobre a determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas, utilizando cromatografia líquida/espectrometria de massas e procedimentos de pré-concentração, conforme realizado na seção 1.6.

1.5 Validação do Método Analítico

Após o desenvolvimento de um método analítico, e antes de sua aplicação na análise de amostras de interesse, esse método precisa ser validado de forma a assegurar que, nas condições em que será utilizado, gere os resultados esperados [62]. É a validação que fornecerá evidências objetivas de que os requisitos específicos para a utilização do método para o uso pretendido são atendidos [63].

Existem diferentes diretrizes recomendadas por várias instituições internacionais para realização da validação, tais como *Food and Drug Administration (FDA)* e a *Environmental Protection Agency (EPA)*. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) dispõem de diretrizes próprias [63,64].

Contudo, de um modo geral, alguns parâmetros são comuns entre estas diretrizes e normalmente são incluídos no processo de validação: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade e especificidade são descritas pela ANVISA como sinônimos, embora o INMETRO não traga esta similaridade e alguns autores refutem tal ideia, considerando o termo seletividade o mais apropriado [62]. Este preceito é definido como capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos

de degradação e componentes da matriz [65]. A seletividade de um método deve garantir que os efeitos dos interferentes no sinal do analito sejam insignificantes.

O termo linearidade diz respeito à capacidade do método em produzir uma relação linear entre a área do sinal de um analito e a concentração deste analito em amostras contendo componentes da matriz [66], podendo ser obtida por meio de uma curva analítica. Recomenda-se para avaliação da linearidade o mínimo de 6 níveis de concentração, as quais são analisados pelo menos em duplicata [67,68].

A sensibilidade é similarmente à linearidade associada ao gráfico de calibração. Define-se como à capacidade do método identificar com fidelidade duas concentrações muito próximas [69]. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da curva analítica, ou seja, quanto maior esse valor, maior a sensibilidade do método, sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade.

A precisão caracteriza a proximidade entre os valores obtidos por medições em replicata sob condições específicas, ela diz respeito ao erro aleatório de um sistema de medição e é um componente da incerteza da medição [70]. A exatidão de um método refere-se à proximidade de um resultado de medição entre o valor medido e o valor de referência [66].

Limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade ou concentração de um analito, em uma amostra, que pode ser detectada e identificada de forma confiável [68], porém, isso não implica necessariamente a quantificação do resultado. O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração de analito que pode ser determinado com um valor aceitável de veracidade e repetibilidade. Diversos métodos podem ser aplicados para determinar tanto o LD como o LQ, a exemplo da relação sinal ruído (S/N), o método baseado em parâmetros da curva analítica, método visual, entre outros. [65,71].

1.6 Revisão de Literatura

A partir da revisão de literatura foi possível realizar um levantamento de trabalhos recentes que utilizam a SPE em conjunto com técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos de diferentes classes químicas em água (Tabela 4). De maneira geral, a literatura descreve a crescente utilização de adsorventes alternativos para o desenvolvimento de método em SPE, mas ainda com recorrência na utilização de materiais comerciais. No caso da LC-MS, é mais utilizada em fase reversa e fase móvel composta por metanol:água ou acetonitrila:água, com adição de aditivos voláteis para auxiliar no processo de ionização. A interface mais empregada é a ESI, frequentemente em modo positivo e com parâmetros de fonte bastante variáveis a depender dos agrotóxicos.

Maldane e Jardim, 2012 [72] determinaram 9 agrotóxicos (entre eles carbofurano, carbaril, atrazina e diuron) e 9 fármacos em águas ambientais. O procedimento de extração por SPE para os agrotóxicos utilizou adsorvente C18, condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura (0,1% de ácido fórmico). Os analitos foram eluidos com uma mistura (1:3) de acetato de etila e metanol, que foram secos e retomadas para metanol. A fonte de ionização utilizada foi ionização por ESI com os agrotóxicos analisados em modo positivo.

Mann *et al.*, 2016 [73] determinaram 24 agrotóxicos (incluindo diuron, atrazina e 2,4 D) em diferentes matrizes aquosas. Para isso foi utilizada SPE-*online* como técnica de extração, que utilizou cartuchos de C18 que foram condicionados com 2 mL de metanol e acetonitrila. Os analitos foram eluídos com gradiente utilizado no LC-MS, o qual foi composto de água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e acetonitrila. A fonte de ionização foi a ESI e grande parte dos agrotóxicos teve melhor resposta em modo positivo.

Shi *et al.*, 2014 [49] sintetizaram o grafeno e utilizaram como material adsorvente em SPE para extração de 6 carbamatos em amostras de água. O adsorvente foi condicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de acetona, 3 mL de acetonitrila e 9 mL de água ultrapura. A eluição foi feita com 5 mL de acetona, o eluato foi seco e redissolvido em solução de 20% (v/v) acetonitrila:água. A

detecção dos analitos foi feita em modo positivo com utilização da ESI no UPLC-MS/MS.

Sun *et al.*, 2016 [74] sintetizaram por redução química do óxido de grafeno um aerogel de grafeno, que foi utilizado para extração em fase sólida de 6 agrotóxicos organofosforados. A eluição dos analitos foi feita com tetrahidrofurano, o eluato foi seco e redissolvido em acetona para ser analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método estabelecido foi aplicado com sucesso para determinação dos analitos alvo em águas ambientais.

Katsumata *et al.*, 2010 [75] desenvolveram um método com a pré-concentração de atrazina e simazina com utilização de nanotubos de carbono em SPE. O adsorvente foi condicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de acetona, 3 mL de acetonitrila, 3 mL de tetrahidrofurano e 10 mL de água ultrapura. A eluição foi feita com tetrahidrofurano, o eluato foi seco e redissolvido em acetona para ser analisado por GC-MS.

Radovié *et al.*, 2015 [76] desenvolveram um método analítico baseado na SPE seguido da análise dos extratos por LC-MS/MS para a determinação de 12 agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas. O processo de extração fez uso de cartuchos Oasis HLB, condicionados com metanol (5 mL), água deionizada (5 mL) e água deionizada com pH ajustado para amostra de água (5 mL), eluídos com a mistura de metanol-diclorometano (1:1) (5 mL). Os analitos foram analisados em modo positivo em fonte de ionização por ESI.

Chiarello *et al.*, 2017 [77] desenvolveram um método analítico capaz de avaliar a presença de 70 princípios ativos, entre eles: 2,4 D, ametrina, carbofurano, diuron e parationa-metílica em águas superficiais. Utilizando cartuchos StrataTMX. A eluição dos analitos foi realizada com metanol (1 mL), acetonitrila (1 mL) e água (1 mL). Os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução que teve como fase móvel metanol:água com adição de 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v) em ambos solventes.

Tabela 4 – Trabalhos publicados utilizando as técnicas de extração em fase sólida e cromatografia acoplada a espectrometria de massas.

Referência	Matriz	Analitos	Técnica de Extração	Adsorvente	Volume de amostra (mL)	Solvente de Condicionamento	Solvente de Eluição	Técnica Instrumental
Maldaner e Jardim 2012 [72]	Água mineral	9 agrotóxicos 8 fármacos	SPE	C18	140	MeOH; H ₂ O	MeOH+Acetato etila (1:3)	LC-MS/MS
Mann <i>et al.</i> , 2016 [73]	Água mineral, subterrânea e superficial	24 agrotóxicos	SPE	C18	-	MeOH; ACN	ACN; H ₂ O	LC-MS/MS
Shi <i>et al.</i> , 2014 [49]	Água superficial e subterrânea	6 agrotóxicos	SPE	Grafeno	50	MeOH; ACN; ACT; H ₂ O	ACT	UPLC-MS/MS
Sun <i>et al.</i> , 2018 [74]	Água superficial	6 agrotóxicos	SPE	Grafeno	40	MEOH; ACT; ACN THF; H ₂ O	THF	GC-MS
Katsumata <i>et al.</i> , 2010 [75]	Água superficial	2 agrotóxicos	SPE	Nanotubos de carbono	200	-	ACT	GC-MS
Radovié <i>et al.</i> , 2015 [76]	Águas superficial e subterrânea	12 agrotóxicos	SPE	Copolímero	200	MeOH; H ₂ O	MeOH:DCM (1:1)	LC-MS/MS
Chiarello <i>et al.</i> , 2017 [77]	Água superficial	70 agrotóxicos	SPE	Copolímero	200	MeOH; H ₂ O	MeOH; ACN; H ₂ O	LC-HRMS

SPE= extração em fase sólida; LC-HRMS= cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução; GC-MS/MS= cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem; UPLC= cromatografia líquida de ultra eficiência; MeOH= metanol; ACN= acetonitrila; H₂O= água ultrapura; DCM=diclorometano; THF= tetrahidrofuran; ACT= acetona; Copolímero= StrataTMX

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método para determinação de resíduos de agrotóxicos em água mineral engarrafada produzida no estado de Sergipe, utilizando as técnicas de extração em fase sólida, com adsorventes comerciais e alternativos, e cromatografia líquida/espectrometria de massas.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar os agrotóxicos que podem estar presentes em água mineral a partir das culturas agrícolas predominantes no estado de Sergipe;
- Obter as condições instrumentais de análise para determinação dos agrotóxicos por LC-MS.
- Desenvolver um método analítico rápido, seletivo e sensível para determinação de agrotóxicos em água mineral engarrafada utilizando extração em fase sólida com adsorventes comerciais e alternativos.
- Avaliar a eficiência dos materiais óxido de grafeno parcialmente oxidado, óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido como adsorventes pela técnica de extração em fase sólida;
- Validar o método analítico desenvolvido por SPE e LC-MS;
- Aplicar o método em amostras comerciais de água mineral engarrafada produzidas em Sergipe.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Materiais

- Metanol grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha), Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, Estado do México, México), Acetato de Etila grau HPLC (Sigma-Aldrich, pureza 95%, Saint Louis, EUA), Água ultrapura obtida em sistema de ultrapurificação Milli-Q, modelo Gradient (Milipore – Merck, Darmstadt, Alemanha), Formiato de Amônio (Neon, pureza 98%, São Paulo, Brasil), Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, pureza 95%, Saint Louis, EUA), Cartucho SPE Supelclean LC-18 500 mg/6 mL (Supelco, Bellefonte, EUA), Cartucho SPE Spe-edTM Florisil 500 mg/6 mL (Applied Separations, Allentown, EUA), Alumina (Sorbent Technologies, Atlanta, EUA), Sílica (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), Óxido de Grafeno, Óxido de Grafeno Parcialmente Oxidado, Óxido de Grafeno Reduzido (fornecidos em parceria com a Dra. Kaline Amaral do Instituto de Química, da Universidade de Brasília).

3.2 Equipamentos

- Balança analítica AL 204 (Mettler Toledo, Ohio, EUA);
- Evaporador rotatório 802D (Fisatom, São Paulo, Brasil); Sistema para SPE vacuum manifold (Varian, Califórnia, EUA).
- Cromatografo líquido Nexera UC (Shimadzu, Quioto, Japão) composto por: Módulo de comunicação CBM-20A, Sistema binário de bombas LC-20AD_{XR}, Bomba para CO₂ LC-30AD_{SF}, Desgaseificador DGU-20A_{5R}, Auto injetor SIL-30AC, Controlador de Pressão SFC-30, Forno de colunas CTO-20AC, Detector PDA SPD-M20A, Espectrômetro de massas MS-2020, Coluna Analítica Luna C18 (100 x 3mm x 2,5 µm, Phenomenex, Califórnia, EUA) com coluna de guarda contendo a mesma fase estacionária da coluna e software de gerenciamento Lab Solution.

3.3 Padrões certificados dos agrotóxicos

Foram obtidos padrões certificados dos agrotóxicos: Alacloro (Fluka Analytical, pureza 99,2 %), Atrazina (Fluka Analytical, pureza 97,5%), Aldrin (Dr. Ehrenstorfer GMbH, pureza 98%), Ametrina (Riedel-de-Haen, pureza 98,5%), Carbofurano (Fluka Analytical, pureza 99,9%), Carbaril (Fluka Analytical, pureza 99,8%), Deltametrina (Fluka Analytical, pureza 99,7%), Diuron (Fluka Analytical, pureza 99,5%), Endosulfan (Fluka Analytical, pureza 99,4%), Sulfato de Endosulfan (Dr Ehrenstorfer GMbH, pureza 98,8%), Lindano (Chem Service, 99%), Parationa Metílica (Riedel-de-Haen, pureza 99,8%), Pirimicarbe (Fluka Analytical, pureza 99%), Permetrina (Fluka Analytical, pureza 98%), 2,4 D (Fluka Analytical, pureza 99,8%), β - Ciflutrina (Fluka Analytical, pureza 99,8%), Piraclostrobina (Riedel-de-Haen, pureza 99,9%).

3.4 Preparo de soluções padrão dos agrotóxicos

Para o preparo das soluções estoque individuais foram pesadas as massas dos padrões sólidos a fim de se obter uma concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 10 mL de metanol grau HPLC, a partir destas soluções foram produzidas soluções intermediárias individuais de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ com o mesmo solvente. Soluções conjuntas e de trabalho também foram feitas em metanol. Estas soluções foram utilizadas por no máximo 30 dias. As soluções preparadas foram armazenadas em frascos de vidro com tampa com rosca e mantidas sob refrigeração.

3.5 Procedimento de Extração por SPE utilizando adsorvente comercial

No sistema para SPE, com fluxo de aproximadamente $2,5 \text{ mL min}^{-1}$, o cartucho contendo 300 mg de adsorvente C18 foi condicionado por meio da percolação de 2 mL de metanol seguido de 2 mL de água ultrapurificada. Em sequência, foi realizada a percolação de 500 mL de água mineral. Após a passagem do volume de amostra, foram aguardados 5 minutos para secagem do cartucho. Os agrotóxicos foram eluídos com 3 mL de acetonitrila, coletando o eluato em um balão de fundo redondo, que foi concentrado em um evaporador rotatório (50°C e 120 rpm) até aproximadamente 1 mL. O volume

do eluato foi ajustado em um balão volumétrico de 1 mL e filtrado com uma membrana de 0,20 µm para análise em LC-MS.

3.6 Procedimento de Extração por SPE utilizando adsorvente alternativo

No sistema para SPE, com fluxo de aproximadamente 2 mL min⁻¹, o cartucho contendo 50 mg de adsorvente a base de óxido de grafeno foi condicionado por meio da percolação de 3 mL de metanol seguido de 3 mL de acetonitrila, 3 mL de acetona e 9 mL de água ultrapurificada. Em sequência, foi realizada a percolação de 100 mL de água mineral. Após a passagem do volume de amostra, foram aguardados 5 minutos para secagem do cartucho. Os agrotóxicos foram eluídos com 5 mL de uma mistura metanol e acetonitrila (50:50), coletando o eluato em um balão de fundo redondo, que foi concentrado em um evaporador rotatório (50 °C e 120 rpm) até aproximadamente 1 mL. O volume do eluato foi ajustado em um balão volumétrico de 1 mL e filtrado com uma membrana de 0,20 µm para análise em LC-MS.

3.7 Condições instrumentais de análise

A Tabela 5 apresenta as condições instrumentais de análise otimizadas para o cromatografo líquido acoplado ao espectrômetro de massas (LCMS-2020).

Tabela 5 – Condições instrumentais de análise no LCMS-2020.

Condições do Cromatógrafo Líquido
Fase estacionária analítica: Luna C18 2,5 µm (100 x 3 mm)
Fluxo da fase móvel: 0,5 mL min ⁻¹
Modo de eluição: Eluição Gradiente, 50%B (0,00-0,01 min), 100%B (0,01-8 min), 100%B (8-10 min), 50%B (10-13 min)
Fase móvel: A: Água (5 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃) ; B: Metanol (5 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃)
Temperatura do Forno de colunas: 40 °C
Volume de injeção: 5 µL

Condições do Espectrômetro de Massas

Interface: ESI

Modo MS: SIM, Modos positivo e negativo

Temperatura da interface: 350 °C

Temperatura da DL: 250 °C

Fluxo do gás de nebulização: N₂, 1,5 L min⁻¹

Fluxo do gás de secagem: N₂, 10 L min⁻¹

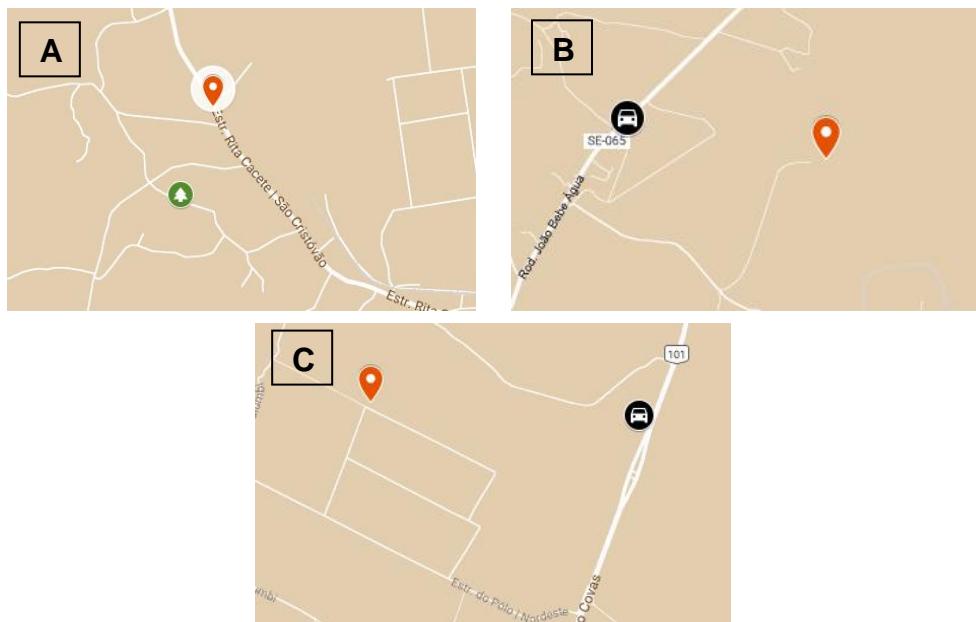
3.8 Validação do método analítico

Para garantir a confiabilidade do método foi realizada a validação do mesmo. Para este trabalho foram adotados os parâmetros de linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e a influência do efeito matriz na exatidão do método. Os parâmetros foram escolhidos com base nos critérios estabelecidos por documentos oficiais para validação de métodos analíticos entre as instituições consultadas estão nacionais (ANVISA e INMETRO) e internacionais (AOAC e IUPAC) [63, 63, 68, 69].

3.9 Coleta de amostras e localização das fontes de água mineral

As amostras de água mineral engarrafada foram adquiridas comercialmente em pontos de revenda da capital e do município de São Cristóvão (minimercados). As três amostras adquiridas provêm de diferentes fontes localizadas no estado de Sergipe. Duas delas estão situadas no município de São Cristóvão, nos povoados Rita Cacete e Tebaída, Figuras 4A e 4B, respectivamente. E a terceira localiza-se no município de Estância, Povoado Grotão (Figura 4C). As amostras foram armazenadas em seu próprio frasco de comercialização, e mantidas a temperatura ambiente.

Figura 4 – Localização das fontes de água mineral testadas. Identificação: 4A: fonte água mineral A, lat -10.99874º long -37.27242º; 4B: fonte água mineral B, lat -10.97481º long -37.16271º. 4C: fonte água mineral C, lat -11.10698º long -37.39419.



3.10 Limpeza da vidraria

A lavagem da vidraria seguiu procedimento padrão utilizado no Laboratório de Análises e Compostos Poluentes Orgânicos (LCP), como segue:

- Enxágue com água corrente, por duas vezes;
- Lavagem com solução detergente neutro 5%;
- Enxágue da solução detergente com água corrente até a completa retirada;
- Lavagem com água destilada;
- Enxágue com acetona;
- Secagem em estufa a 100°C (exceto as vidrarias volumétricas).

3.11 Descartes dos reagentes

As soluções descarte de agrotóxicos foram estocadas em frascos de vidro e armazenadas no laboratório. Os solventes utilizados nas análises e lavagem das vidrarias foram armazenados em recipientes de descarte de solventes devidamente identificados para posterior coleta realizada por empresa responsável.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das condições instrumentais de análise

Soluções individuais dos 17 agrotóxicos (atrazina, aldrin, alacloro, ametrina, β -ciflutrina, carbofurano, carbaril, deltametrina, diuron, endosulfam, sulfato de endosulfam, lindano, parationa metílica, pirimicarbe, permetrina, piraclostrobina e 2,4 D) foram preparadas em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e analisadas no LC-MS em modo exploratório de eluição.

A forma mais rápida de se investigar o comportamento de uma solução de agrotóxicos, frente à técnica de cromatografia líquida, visando decidir o tipo de eluição (isocrático ou gradiente) e o tipo de modificador orgânico da fase móvel é realizar uma análise cromatográfica usando um amplo gradiente, com uma variação entre 5 e 100%, do modificador orgânico. Dessa maneira pode-se examinar uma ampla faixa de força do eluente, o que permite conhecer o tempo de retenção de cada analito e por consequência a proporção de solvente orgânico necessária para sua eluição da coluna, além de possíveis co-eluições [78].

Para análise exploratória foi utilizado um gradiente com variação linear do percentual de solvente orgânico (5 a 100%) na composição da fase móvel constituída de solvente orgânico:água. Os solventes orgânicos investigados foram metanol e acetonitrila, já que são solventes adequados para serem utilizados na cromatografia em fase reversa, modalidade em que a fase estacionária é apolar enquanto a fase móvel é solvente de caráter polar.

Nesta etapa foram analisados também dois tipos de fonte de ionização, ESI e APCI. Tais testes justificam-se devido a diversidade das moléculas dos agrotóxicos e dificuldade em prever o processo de ionização que ocorrerá em cada tipo de interface. Por isso, no desenvolvimento de método não há um protocolo a ser seguido para escolha da interface de ionização, a seleção é realizada experimentalmente por ser particularmente difícil a seleção quando há uma variedade de classes químicas a serem analisadas [33].

Os ensaios para escolha da fonte de ionização foram realizados em modo varredura de íons (SCAN), com um intervalo de m/z entre 100 e 800 em um tempo total de corrida de 25 minutos. Este intervalo m/z foi escolhido, pois os agrotóxicos selecionados possuem massas moleculares entre 200 e 500 g mol⁻¹, dado que pode ser observado na Tabela 4. Também foi avaliado o modo ionização a fim de verificar se os agrotóxicos ionizavam em modo positivo ou negativo. A descrição detalhada sobre as análises em cada fonte bem como seus resultados estão descritas no item 4.2.1.

4.1.1 *Ensaios para escolha da fonte de ionização*

Na análise exploratória realizada com as interfaces ESI e APCI foram testados dois tipos de aditivos voláteis formiato de amônio (5 mmol L⁻¹) e ácido fórmico (0,1% v/v) nas composições da fase móvel (metanol:água e acetonitrila:água). Deve-se considerar que o processo de ionização na ESI é intermediado pela fase móvel, e as propriedades físico-químicas dos solventes e aditivos empregados influenciarão diretamente no processo de ionização [58]. Na APCI não há obrigatoriedade direta do uso de aditivos na fase móvel, no entanto há relatos na literatura de casos em que ocorreram acréscimos na área e na intensidade do sinal com seu uso na composição da fase móvel [79].

Nesta etapa também foram determinados quais íons (m/z) seriam monitorados para cada agrotóxico, já que a ionização pode ir além da protonação ou desprotonação dos analitos, é comum ocorrer a formação de adutos. Por exemplo, o uso de aditivos a base de amônia pode resultar na formação de adutos de amônio $[M+NH_4]^+$ em vez da molécula protonada com hidrogênio $[M+H]^+$. São frequentemente formados também adutos de sódio $[M+Na]^+$, mesmo que o sódio não esteja presente na fase móvel propositalmente, ele pode advir de impurezas derivadas de frascos, tubulação ou solventes (até mesmo os de grau LC-MS) [79].

Por isso, em modo positivo foram verificados os íons referentes a protonação com hidrogênio $[M+H]^+$, amônio $[M+NH_4]^+$ e sódio $[M+Na]^+$. Em modo negativo, a desprotonação $[M-H]^-$, bem como a possível formação de adutos de formiato $[M+HCOO]^-$.

Os processos de ionização ocorridos na ESI e APCI são complexos e existem vários parâmetros instrumentais que influenciam drasticamente para a eficiência da ionização [80]. Assim, para alcançar maior sensibilidade nas fontes e permitir justa comparação entre os resultados encontrados por meio delas parâmetros típicos de cada interface foram otimizados com base em testes experimentais e notas de aplicação divulgadas pela Shimadzu referentes a cada fonte de ionização [81, 82, 83].

As notas de aplicação foram utilizadas como referência com interesse em diminuir a quantidade de testes que teriam de ser realizados para solução dos 17 agrotóxicos, haja vista que o equipamento em uso não apresenta alternativa de operação com infusão direta no espectrômetro de massas, o que condiciona necessidade de realização de uma corrida cromatográfica completa para investigar o comportamento dos parâmetros relacionados ao MS. A consulta aos materiais possibilitou a redução no uso de solventes orgânicos e de tempo na otimização do método.

Para a ESI os melhores parâmetros para a maioria dos agrotóxicos foram: temperatura da interface 350°C, temperatura da DL 250°C, fluxo do gás de nebulização (N_2) 1,5 L min^{-1} , fluxo do gás de secagem (N_2) 10,0 L min^{-1} e temperatura do heat block 250°C. Na APCI os mesmos parâmetros tiveram seus valores ajustados em: temperatura da interface 400°C, temperatura da DL 250°C, fluxo do gás de nebulização (N_2) 2,5 L min^{-1} , fluxo do gás de secagem (N_2) 5,0 L min^{-1} e temperatura do heat block 200°C.

Os resultados obtidos a partir da análise exploratória das soluções padrão de agrotóxicos dos 17 agrotóxicos em metanol (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com as fontes de ionização (ESI e APCI) foram compilados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização eletrospray. n.d.= não detectado.

ELETROSPRAY			T_R (min) usando diferentes modificadores na fase móvel (min)			
Agrotóxicos	Ionização	m/z	MeOH:H ₂ O		ACN:H ₂ O	
			5 mM NH ₄ HCO ₃	0,1% CH ₂ O ₂	5mM NH ₄ HCO ₃	0,1% CH ₂ O ₂
Atrazina	+	[M+H] ⁺ – 216,0	14,15	14,26	10,74	9,55
Aldrin			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alacloro	+	[M+OH] ⁺ – 238,0	16,87	17,04	n.d.	n.d.
Ametrina	+	[M+H] ⁺ – 228,0	15,54	12,51	11,90	8,55
β - Ciflutrina			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbofurano	+	[M+H] ⁺ – 222,0	12,57	12,63	10,02	8,87
Carbaril	+	[M+H] ⁺ – 202,0	13,09	13,87	4,70	9,17
Deltametrina			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diuron	+	[M+H] ⁺ – 233,0	19,85	n.d.	n.d.	n.d.
Endosulfam			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfato de Endosulfam	-	[M-H] ⁻ – 421,0	17,83	17,93	n.d.	n.d.
Lindano			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Parationa Metílica			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pirimicarbe	+	[M+H] ⁺ – 239,0	13,90	8,91	10,35	5,76
Piraclostrobina	+	[M+H] ⁺ – 388,0	17,85	18,02	15,50	15,67
Permetrina			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,4 D	-	[M-H] ⁻ – 219,0	11,41	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 7 – Resultados das análises de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização química a pressão atmosférica. n.d.= não detectado.

IONIZAÇÃO QUÍMICA A PRESSÃO ATMOSFÉRICA			T _R (min) usando diferentes modificadores na fase móvel (min)			
Agrotóxicos	Ionização	m/z	MeOH:H ₂ O		ACN:H ₂ O	
			5 mM NH ₄ HCO ₃	0,1%CH ₂ O ₂	5mM NH ₄ HCO ₃	0,1% CH ₂ O ₂
Atrazina	+	[M+H] ⁺ – 216,0	14,27	14,21	10,72	10,72
Aldrin	+	[M+H] ⁺ – 366,0	n.d.	n.d.	n.d.	4,40
Alacloro	+	[M+OH] ⁺ – 238,0	16,94	16,94	n.d.	n.d.
Ametrina	+	[M+H] ⁺ – 228,0	15,82	12,44	11,97	8,42
β- Ciflutrina	+	[M+H] ⁺ – 435,0	n.d.	n.d.	n.d.	7,40
Carbofurano	+	[M+H] ⁺ – 222,0	12,62	12,57	10,01	10,02
Carbaril	+	[M+H] ⁺ – 202,0	13,51	13,15	4,67	10,15
Deltametrina	+	[M+NH ₄] ⁺ – 523,0	20,29	n.d.	10,45	n.d.
Diuron			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Endosulfam	+	[M+NH ₄] ⁺ – 425,0	0,88	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfato de Endosulfam	-	[M-H] ⁻ – 421,0	17,90	17,93	15,78	15,83
Lindano	+	[M+H] ⁺ – 292,0	n.d.	n.d.	7,10	n.d.
Parationa Metílica			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pirimicarbe	+	[M+H] ⁺ – 239,0	13,90	8,09	10,35	5,58
Piraclostrobina	+	[M+H] ⁺ – 388,0	17,80	17,92	15,49	n.d.
Permetrina	+	[M+NH ₄] ⁺ – 434,0	7,35	n.d.	6,72	n.d.
2,4 D	-	[M-H] ⁻ – 219,0	11,31	15,14	6,94	11,00

Por meio da observação das informações nas Tabelas 6 e 7, foi possível inferir que os tempos de retenção dos analitos tendo acetonitrila na fase móvel foram inferiores àqueles apresentados quando a fase foi composta por metanol, independente da interface.

Na cromatografia em fase reversa em que a fase estacionária (C18) é mais apolar que a fase móvel, a retenção de um componente é controlada pela partição dos analitos entre a fase móvel polar e a fase estacionária apolar [84]. Para uma determinada composição de fase móvel o resultado é uma retenção diferencial dos analitos de acordo com sua hidrofobicidade.

Além disso, a retenção também é controlada pela força do solvente, que é medida pela sua polaridade [85]. Para o caso dos solventes empregados, o metanol apresenta valor de polaridade igual a 5,1 enquanto o da acetonitrila é 5,8, ou seja, a acetonitrila possui valor de polaridade ligeiramente maior que metanol o que lhe confere maior força para eluição, explicando assim os valores de retenção inferiores quando se foi utilizada acetonitrila na composição da fase móvel.

Analizando somente a Tabela 6, que contém dados obtidos com a fonte ESI, foi notado que o número de agrotóxicos detectados utilizando metanol:água 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (10 agrotóxicos) foi maior que quando se empregou outras composições de fase móvel, metanol:água 0,1% ácido fórmico (8 agrotóxicos), acetonitrila:água 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (6 agrotóxicos) e acetonitrila:água 0,1% ácido fórmico (6 agrotóxicos). A diferença no número de moléculas detectadas pode estar relacionada a fatores como polaridade e viscosidade do solvente que impactam diretamente o processo de ionização quando se utiliza uma fonte de ionização do tipo ESI [58].

Houveram também agrotóxicos que não responderam a qualquer das condições testadas na ESI, os quais foram: aldrin, β -ciflutrina, deltametrina, endosulfam, lindano, parationa metílica e permetrina. Este comportamento das moléculas pode ser correlacionado a própria fonte de ionização, pois, para detecção de agrotóxicos da classe dos organoclorados (aldrin, endosulfam, lindano), organofosforados (parationa metílica) e alguns piretróides (β -ciflutrina,

deltametrina, permetrina) a interface mais comumente relatada pela literatura é a APCI [86]. Além disso, as moléculas que não foram detectadas não se ionizam em solução, isso limita a resposta quando se utiliza a ESI, uma vez que os analitos neutros são menos sensíveis nesta fonte de ionização [87].

Em resumo, foi possível notar que a melhor condição conseguida na fonte de ionização ESI foi obtida com metanol:água 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio, com a detecção de um total de 10 agrotóxicos. O detalhamento acerca dos agrotóxicos que foram detectados nos testes da análise exploratória utilizando a ESI como fonte de ionização podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 – Resumo da quantidade de agrotóxicos que foram detectados com uso da ESI como fonte de ionização.

INTERFACE: ELETROSPRAY			
Condições da fase móvel	Nº agrotóxicos detectados	Agrotóxicos detectados	
MeOH:H ₂ O + 5mM NH ₄ HCO ₃	10	Atrazina; Carbaril; Pirimicarbe; Piraclostrobina; 2,4-D	Alacloro; Ametrina; Carbofurano; Endosulfam;
MeOH:H ₂ O + 0,1%CH ₂ O ₂	8	Atrazina; Carbaril; Pirimicarbe; Piraclostrobina	Alacloro; Ametrina; Carbofurano; Endosulfam;
ACN:H ₂ O + 5mM NH ₄ HCO ₃	6	Atrazina; Pirimicarbe; Piraclostrobina	Carbofurano; Carbaril;
ACN:H ₂ O + 0,1%CH ₂ O ₂	6	Atrazina; Pirimicarbe; Piraclostrobina	Carbofurano; Carbaril;

Em se tratando das informações expostas na Tabela 7, os analitos que não haviam sido detectados na fonte ESI obtiveram resposta na APCI, corroborando a ideia anteriormente comentada de que esta interface é mais apropriada para algumas classes de agrotóxicos, como organoclorados, organofosforados e piretróides.

Ademais, os dados sugeriram comportamento similar aos da Tabela 6 em termos de melhor composição da fase móvel. A condição mais favorável também foi encontrada com a fase móvel metanol:água 5 mmol L⁻¹ de formiato

de amônio (12 agrotóxicos) em detrimento das demais composições de fase móvel, metanol:água 0,1% ácido fórmico (9 agrotóxicos), acetonitrila:água 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (11 agrotóxicos) e acetonitrila:água 0,1% ácido fórmico (9 agrotóxicos).

Também foi realizado um detalhamento acerca da quantidade e quais agrotóxicos foram detectados nos testes da análise exploratória utilizando a APCI como fonte de ionização, tais dados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9 – Resumo da quantidade dos agrotóxicos que foram detectados com uso da APCI como fonte de ionização.

INTERFACE: IONIZAÇÃO QUÍMICA A PRESSÃO ATMOSFÉRICA		
Condições da fase móvel	Nº agrotóxicos detectados	Agrotóxicos detectados
MeOH:H ₂ O + 5mM NH ₄ HCO ₃	12	Atrazina; Alacloro; Ametrina; Carbofurano; Carbaril; Deltametrina; Endosulfam; Sulfato de Endosulfam; Pirimicarbe; Piraclostrobin; Permetrina; 2,4-D
MeOH:H ₂ O + 0,1%CH ₂ O ₂	9	Atrazina; Alacloro; Ametrina; Carbofurano; Carbaril; Sulfato de Endosulfam; Pirimicarbe; Piraclostrobin; 2,4-D
ACN:H ₂ O + 5mM NH ₄ HCO ₃	11	Atrazina; Ametrina; Carbofurano; Carbaril; Deltametrina; Sulfato de Endosulfam; Lindano; Pirimicarbe; Piraclostrobin; Permetrina; 2,4-D
ACN:H ₂ O + 0,1%CH ₂ O ₂	9	Atrazina; Aldrin; Ametrina; β-Ciflutrina; Carbofurano; Carbaril; Sulfato de Endosulfam; Pirimicarbe; 2,4-D

Assim, em vista das melhores condições em ambas as interfaces terem sido obtidas com fase móvel composta de metanol:água 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio, optou-se por ponderar sobre as áreas dos sinais conseguidos em cada fonte, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Áreas dos sinais obtidas pela análise exploratória de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas fontes ESI e APCI.

Agrotóxicos	Área do sinal na ESI	Área do sinal na APCI
Atrazina	5.843.945	5.412.884
Alacloro	2.747.705	1.015.287
Ametrina	23.907.296	5.943.750
Carbofurano	5.920.134	2.612.768
Carbaril	986.102	331.466
Deltametrina	n.d.	162.256
Diuron	5.811.035	n.d.
Endosulfam	n.d.	124.868
Sulfato de Endosulfam	405.674	157.398
Pirimicarbe	23.608.403	4.594.505
Piraclostrobina	13.900.001	3.473.221
Permetrina	n.d.	47.312
2,4 D	135.137	106.314

n.d.= não detectado

Um maior número de agrotóxicos foram detectados na APCI do que na ESI. Em contrapartida, foi verificado uma discrepância entre as áreas dos sinais dos analitos, tendo na ESI maiores valores de área. Tal diferença de magnitude entre os sinais já foi relatada em estudos anteriores [57] e pode ser justificada por a ESI ser descrita como uma fonte de ionização mais suave, enquanto a APCI é considerada mais agressiva e pode causar degradação dos agrotóxicos e com isso ocorrer um decaimento na área do sinal [60].

Posto estas considerações, optou-se por utilizar a fonte ESI e desenvolver um gradiente de eluição composto por metanol:água com adição de 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio para os 10 agrotóxicos que nela foram detectados (ver Tabela 10). Para auxiliar no processo de composição do gradiente foi calculada

a porcentagem de metanol necessária para cada um dos 10 agrotóxicos serem eluídos da coluna cromatográfica (Tabela 11).

Tabela 11 – Tempos de retenção, porcentagem de metanol e relação *m/z* dos agrotóxicos, obtidos pela análise exploratória de soluções padrão de agrotóxicos em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Eletrospray				
Agrotóxicos	Ionização	<i>m/z</i>	T _R (min)	%Metanol
2,4-D	-	219,0	11,41	59,20
Carbofurano	+	222,0	12,57	64,71
Carbaril	+	202,0	13,09	67,17
Pirimicarbe	+	239,0	13,90	71,02
Atrazina	+	216,0	14,15	72,21
Ametrina	+	228,0	15,54	78,81
Alacloro	+	238,0	16,87	85,13
Sulfato de Endosulfam	-	421,0	17,83	89,69
Piraclostrobina	+	388,0	17,85	89,78
Diuron	+	233,0	19,85	99,38

T_R=Tempo de retenção; %Metanol= Porcentagem de metanol.

Outra consideração advinda da análise exploratória foi a opção por desenvolver um método no modo de monitoramento do íon selecionado (SIM), pois nele focaliza-se apenas os íons de interesse ao invés de um determinado intervalo de *m/z*. Isso aumenta a sensibilidade na detecção dos compostos escolhidos [58].

4.2 Desenvolvimento do método por LC-MS em modo SIM

Para elaboração da programação de eluição, foram feitas as seguintes considerações:

Como verificado na análise exploratória, o primeiro analito, 2,4-D, precisou de aproximadamente 59% de metanol para ser eluído, e o último, diuron de aproximadamente 99%. Foram então elaborados e testados dois gradientes de eluição (Tabela 12), tendo o Gradiente 2 maior taxa de variação em relação ao Gradiente 1, porém ambos possuindo 1 min para retorno as condições iniciais de análise e permanência de 2 min para estabilização do sistema cromatográfico.

Por se tratar de desenvolvimento de um método em modo de monitoramento dos íons selecionados, foram monitoradas apenas a relação massa/carga dos 10 agrotóxicos que responderam na análise exploratória. Os valores de *m/z* dos analitos podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 12 – Gradiente de eluição elaborados para sistema LC-MS modo SIM.

Gradiente 1			Gradiente 2		
Tempo (min)	% MeOH	% Água	Tempo (min)	% MeOH	% Água
0,01	50	50	0,01	50	50
13	100	0	8	100	0
15	100	0	10	100	0
16	50	50	11	50	50
18	50	50	13	50	50

A Figura 4 apresenta o perfil cromatográfico adquirido a partir da análise de uma solução padrão dos agrotóxicos em concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nos Gradientes de eluição 1 e 2 (Tabela 12). A Figura 5 foi apresentada para comparar os dois gradientes testados, uma vez que, não se pode visualizar os picos referentes a cada analito nestes cromatogramas em função da normalização entre os sinais realizada automaticamente pelo software do equipamento, por isso foram apresentados também os cromatogramas individuais, obtidos nos Gradientes 1 e 2 (Figuras 6 e 7).

Figura 5 – Cromatogramas da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, Gradientes 1 (Figura 5A) e 2 (Figura 5B). Identificação do picos cromatográficos: 1-pirimicarbe; 2-ametrina; 3-carbofurano; 4-carbaril; 5-atrazina; 6-alacloro; 7-piraclostrofina; 8-diuron; 9-2,4-D; 10-sulfato de endosulfam. Para condições instrumentais de análise ver item 3.6.

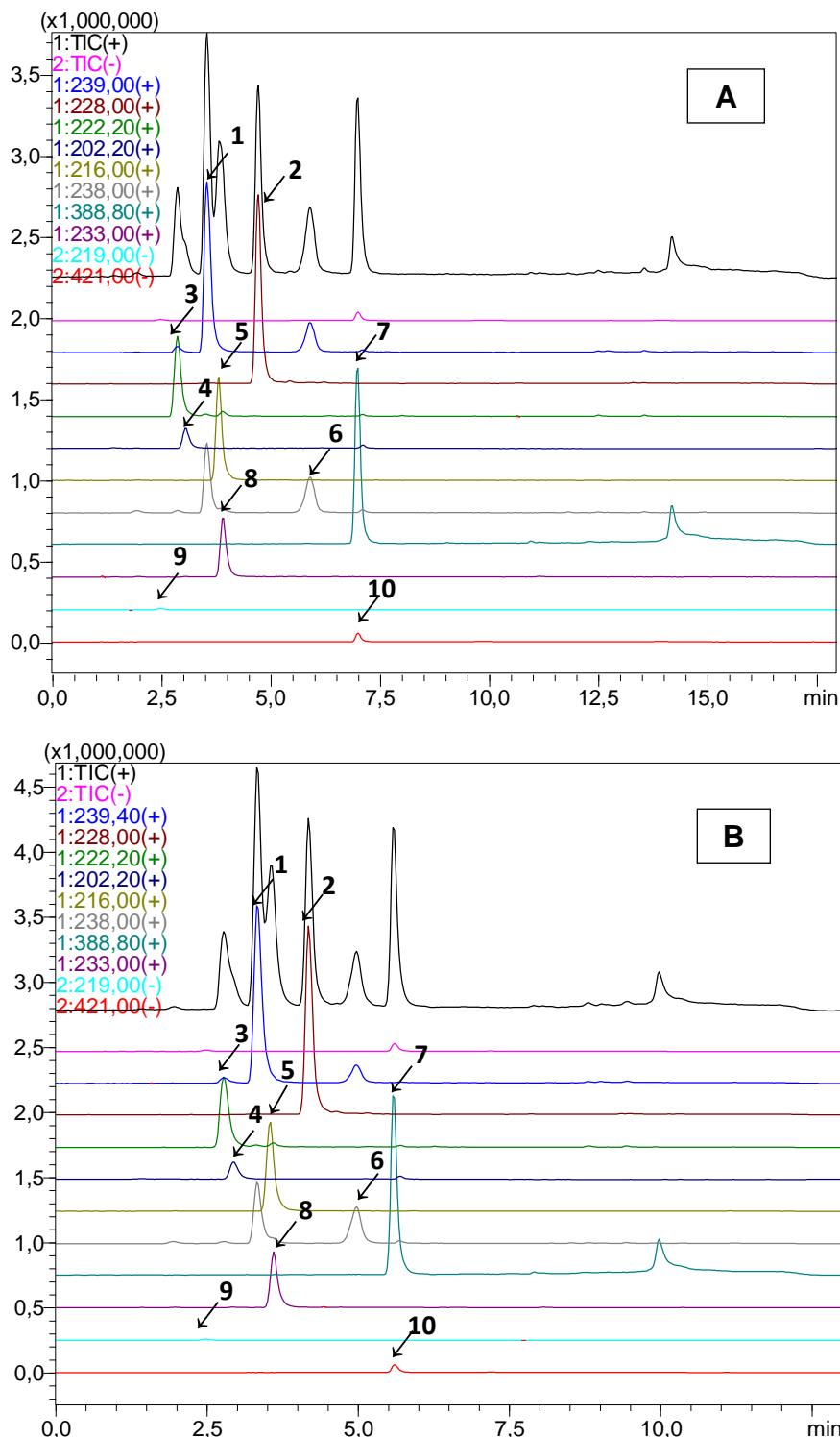


Figura 6 – Cromatogramas e espectros de massas individuais obtidos em análise da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, gradiente 1.

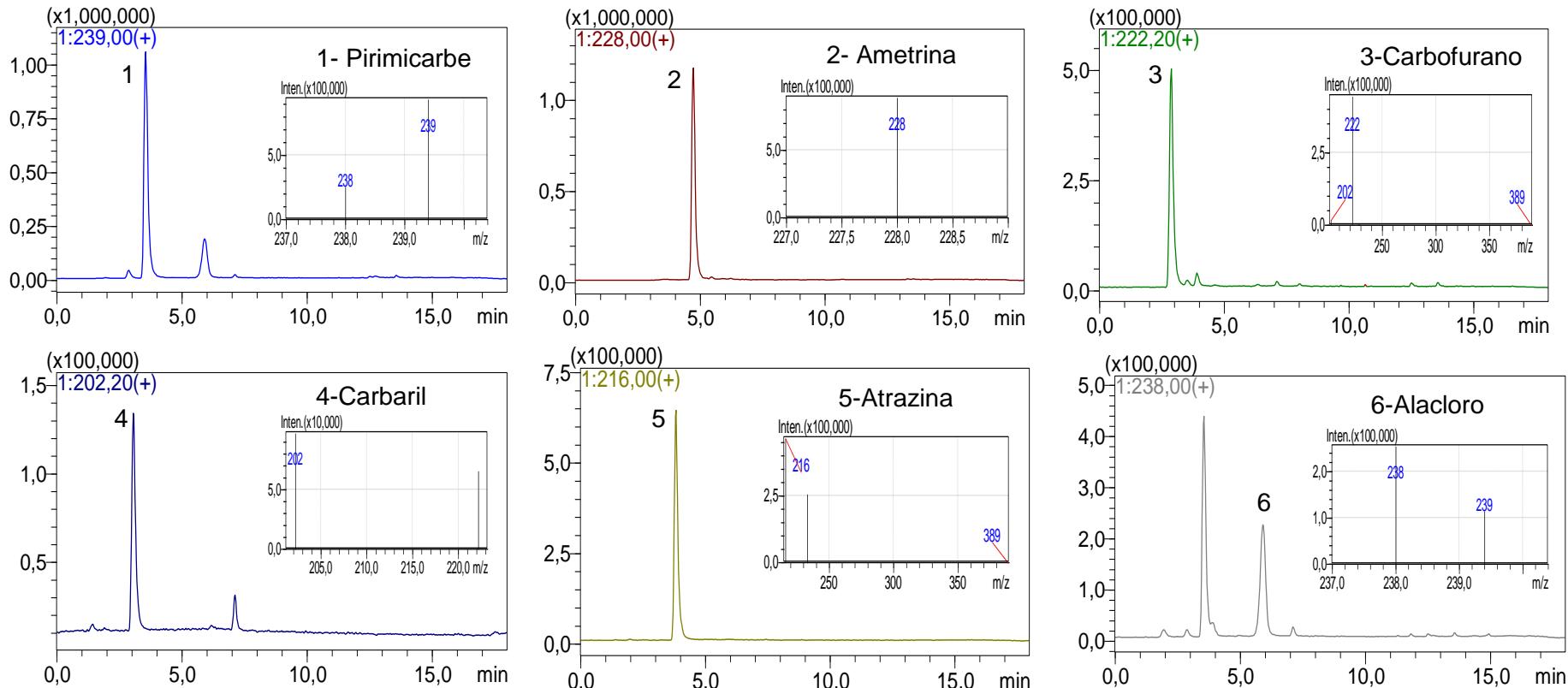


Figura 6 – Continuação.

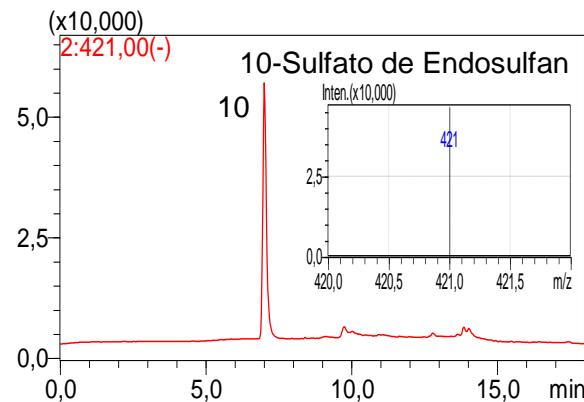
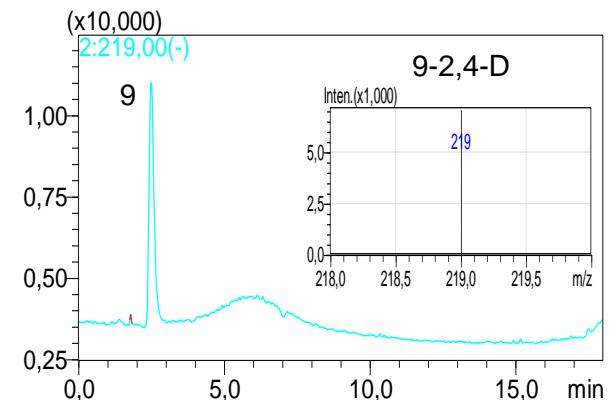
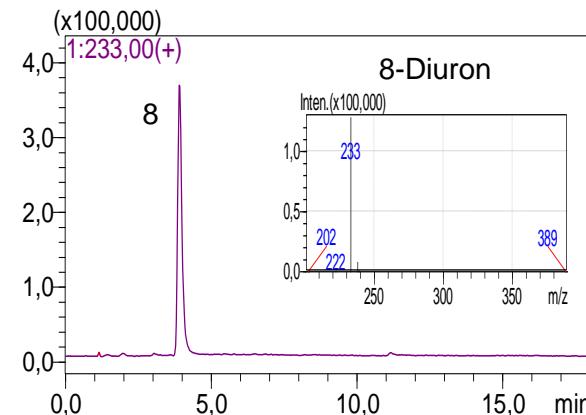
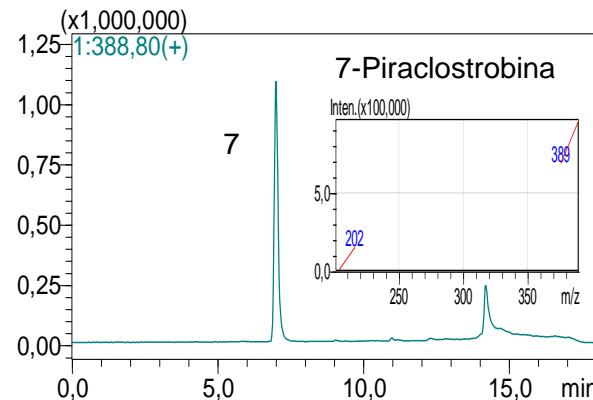


Figura 7 – Cromatogramas e espectros de massa individuais obtidos em análise da solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), modo SIM, gradiente 2.

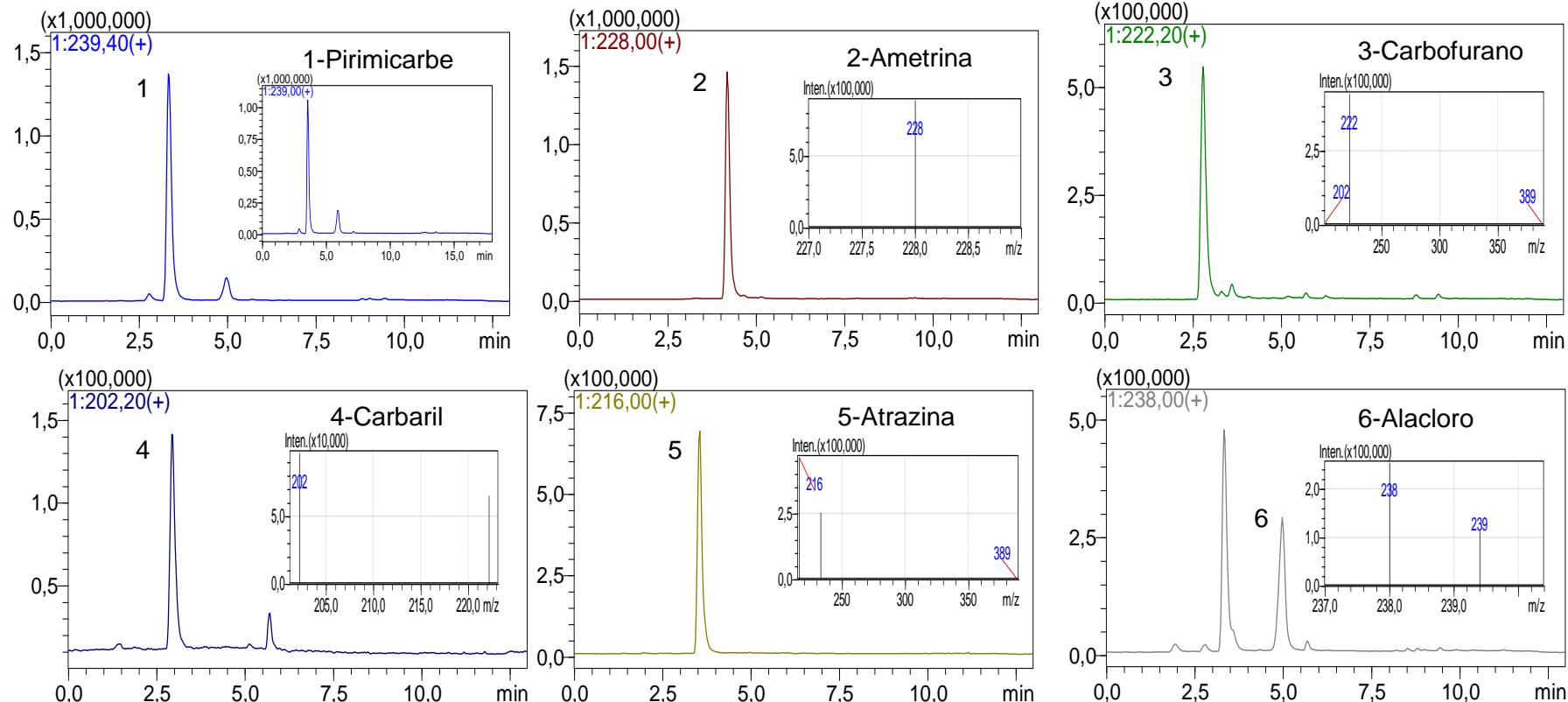
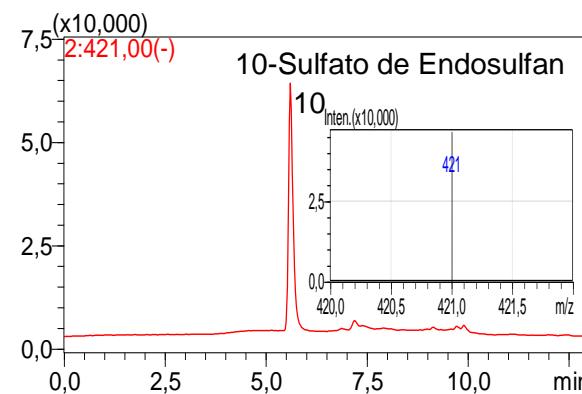
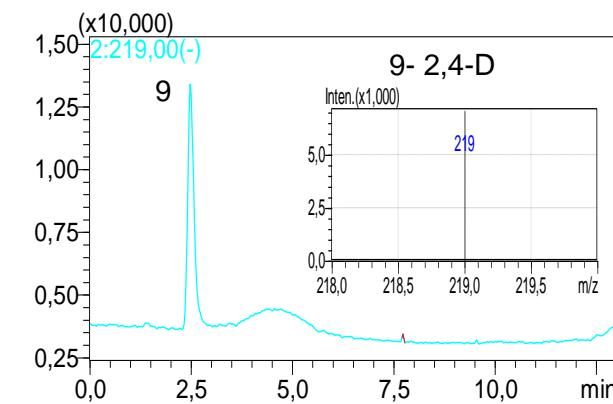
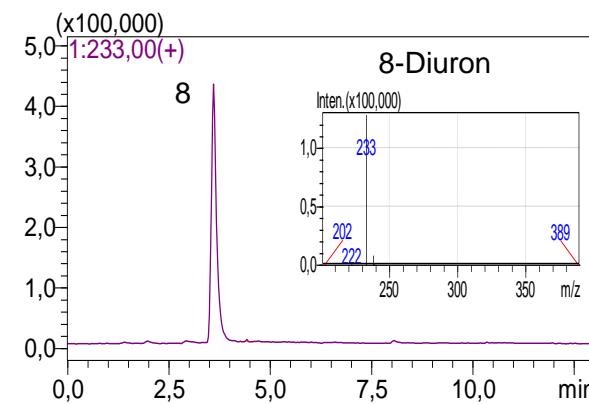
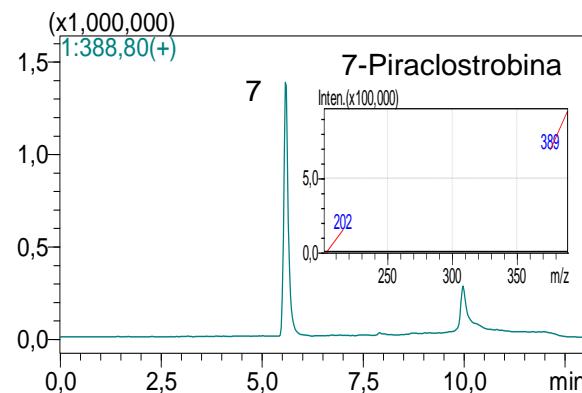


Figura 7 – Continuação.



Com a observação dos cromatogramas (Figuras 5, 6 e 7) pode-se construir a Tabela 13. Nesta tabela estão dispostos os tempos de retenção dos analitos para os Gradientes 1 e 2. Por meio da sua observação foi possível inferir que, de maneira similar, os agrotóxicos tiveram tempos de retenção menores no Gradiente 2, isto ocorreu devido a diferença na taxa de variação do solvente entre eles.

Tabela 13 – Tempos de retenção dos agrotóxicos ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) nos Gradientes 1 e 2.

Agrotóxico	<i>m/z</i>	T_R Gradiente 1 (min)	T_R Gradiente 2 (min)
2,4-D	219,0	2,58	2,40
Carbofurano	222,0	2,87	2,83
Carbaril	202,2	3,06	2,98
Pirimicarbe	239,0	3,54	3,37
Atrazina	216,0	3,82	3,58
Diuron	233,0	3,91	3,65
Ametrina	228,0	4,72	4,23
Alacloro	238,0	5,91	5,02
Sulfato de Endosulfam	421,0	6,99	5,16
Piraclostrobina	388,8	7,00	5,64

m/z= relação massa/carga.

O gradiente de eluição 2 possui taxa de variação maior, ou seja, a porcentagem de metanol varia mais rapidamente em um menor intervalo de tempo. Essa variação maior na proporção de solvente orgânico propiciou um aumento na força cromatográfica da fase móvel, visto que o metanol possui maior força do que a água. Como a retenção de um componente é controlada pela força do solvente em que solventes mais fortes diminuem a retenção e solventes mais fracos aumentam a retenção [85], isso explica o fato de todos os analitos apresentarem uma eluição mais rápida.

Em consequência disso, o tempo total de corrida foi menor, fator positivo em uma análise cromatográfica. Outro aspecto importante notado ao se analisar os Gradientes 1 e 2 foi a intensidade e a simetria dos sinais

cromatográficos dos analitos, que demonstraram serem melhores no Gradiente 2.

Apesar disso, houveram mais sobreposições de picos no Gradiente 2 quando comparado ao Gradiente 1, porém este fato não é impeditivo para a determinação dos agrotóxicos em solução quando se utiliza um espectrômetro de massas, visto que o sinal analítico referente ao agrotóxico pode ser diferenciado por meio da sua relação m/z específica, evitando o trabalho adicional de separação de compostos [88].

Por todos estes fatores relatados na comparação entre os Gradientes 1 e 2, o escolhido para composição do método foi o Gradiente de eluição 2. Por apresentar um tempo total de corrida cromatográfica menor e uma melhor intensidade e simetria dos picos cromatográficos. Após a obtenção das condições de análise no sistema de cromatografia líquida/espectrometria de massas, o procedimento de extração por SPE foi otimizado.

4.3 Otimização do procedimento de extração por SPE

De acordo com Andrade-Eiroa *et al.*, (2016) [64] a SPE tem sido aceita a mais de 20 anos como um método de preparação de amostra alternativa à extração líquido-líquido (LLE), e como método principal para análise de compostos orgânicos particularmente em água potável e águas residuárias, pois permite a pré-concentração dos analitos. Por esses motivos a SPE foi escolhida para este estudo.

Para o desenvolvimento do método de extração por SPE a escolha das condições experimentais envolve seleção de formato, modo de extração, seleção da fase sólida, do solvente da amostra, do solvente de eluição, dentre outras [36]. O formato selecionado foi em cartucho, no modo de concentração de amostra *off-line*, a seleção da fase sólida e solvente de eluição foram feitos experimentalmente e estão descritos no subitem 4.3.1.

4.3.1 Seleção do adsorvente e solvente de eluição

Para etapa de pré-concentração dos agrotóxicos foram testados 4 adsorventes: Florisil®, alumina neutra, C18 e sílica. Para os testes de otimização, foi utilizado o nível de fortificação dos analitos de 50 ng mL^{-1} em água mineral, com volume de amostra de água mineral de 500 mL. Tal volume de amostra foi escolhido por permitir verificar a capacidade de pré-concentração dos analitos sem a saturação do adsorvente presente no cartucho.

Os solventes de eluição testados foram metanol e acetonitrila em volume de 10 mL. Tais solventes foram escolhidos em virtude da compatibilidade com o instrumento utilizado (LC) e por terem sido os solventes também testados na composição da fase móvel. Os resultados estão mostrados nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

Figura 8 – Eficiência na recuperação (%) ($n=3$) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de Florisil, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.

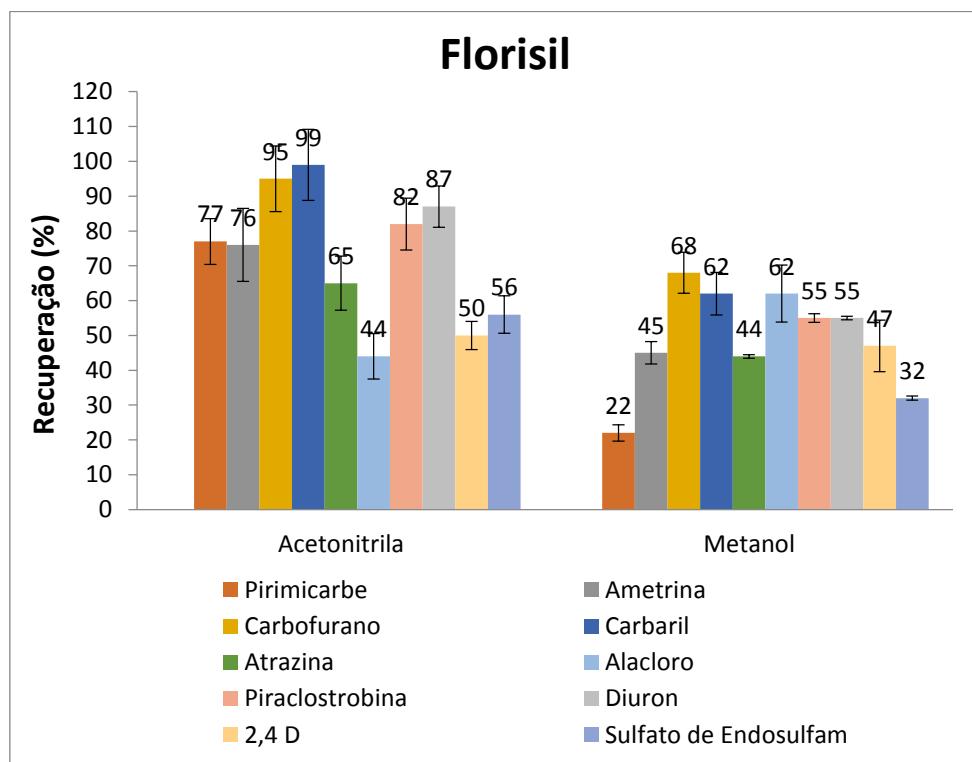


Figura 9 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de alumina neutra, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.
*n.d.= não detectado.

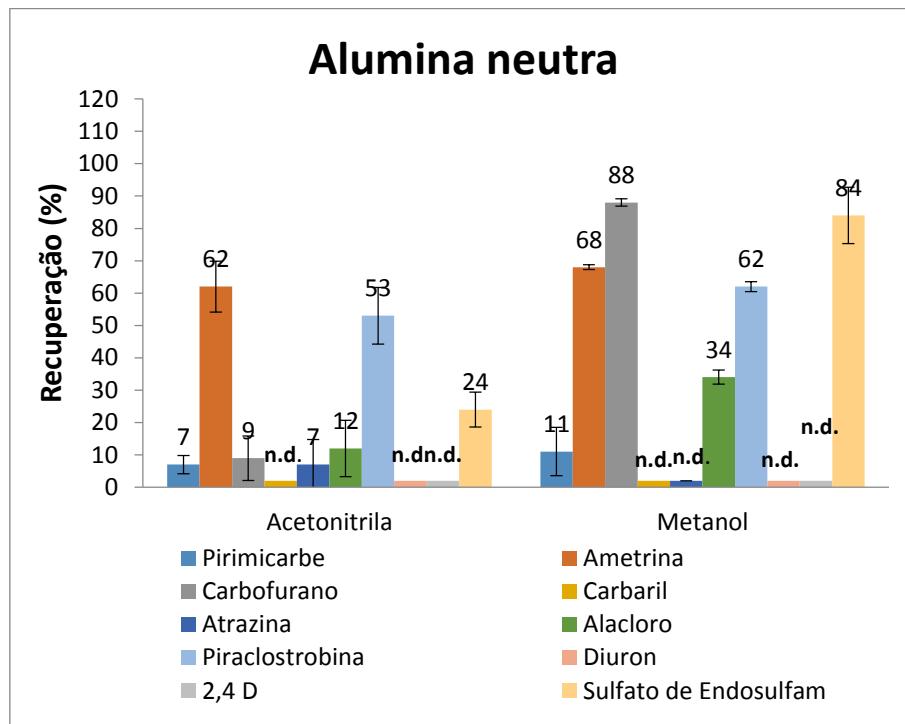


Figura 10 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição.

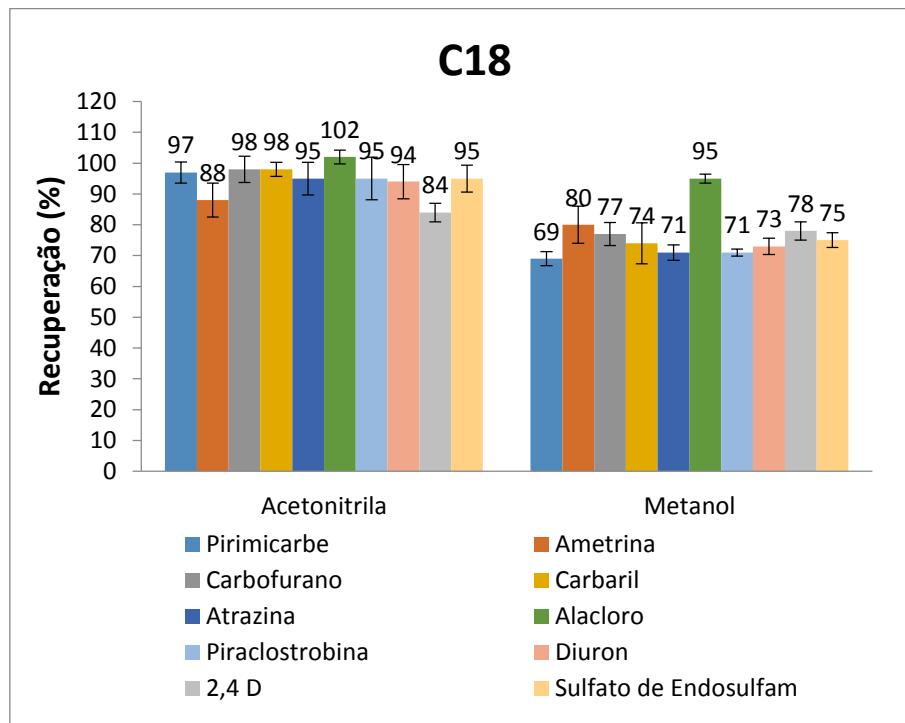
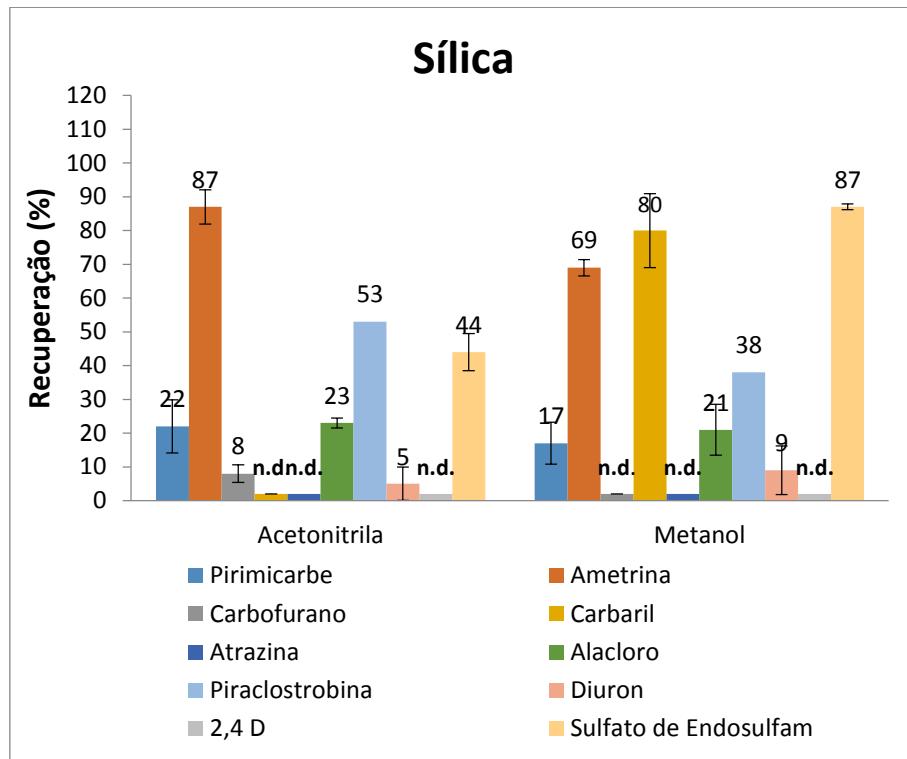


Figura 11 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 500 mg de sílica, 500 mL de amostra e 10 mL de diferentes solventes de eluição. *n.d.= não detectado.



Dentre os adsorventes testados, três deles – sílica, alumina neutra e Florisil® – empregam o mecanismo de adsorção como forma de separação. A sílica é o adsorvente mais utilizado na SPE, enquanto a Florisil® é bastante popular na análise de agrotóxicos e também foi aquele que obteve melhor faixa de recuperação (acetonitrila: 44-99%; metanol: 22-68%) entre os três [35].

As baixas recuperações obtidas com a sílica (acetonitrila: 5-87%; metanol: 9-88%) podem ter sido ocasionadas pelo fato do adsorvente facilmente adsorver água, levando a formação de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis. Dessa forma, como a amostra em questão é água mineral, possivelmente a superfície da sílica foi recoberta por moléculas de água e os sítios que sofreram esse fenômeno não estariam disponíveis para adsorção [35].

No caso da alumina neutra (acetonitrila: 7-62%; metanol: 11-88%), que possui superfície mais adequada a retenção de compostos básicos, os valores

de recuperação também não foram satisfatórios para grande parte dos agrotóxicos.

Além dos fatores já apresentados, é cabível destacar que os três adsorventes (Florisil®, alumina neutra e sílica) são polares e em análises de compostos polares e de polaridade intermediária podem provocar adsorção irreversível em suas superfícies e o analito de interesse pode não ser removido com os eluentes comumente empregados nessa técnica.

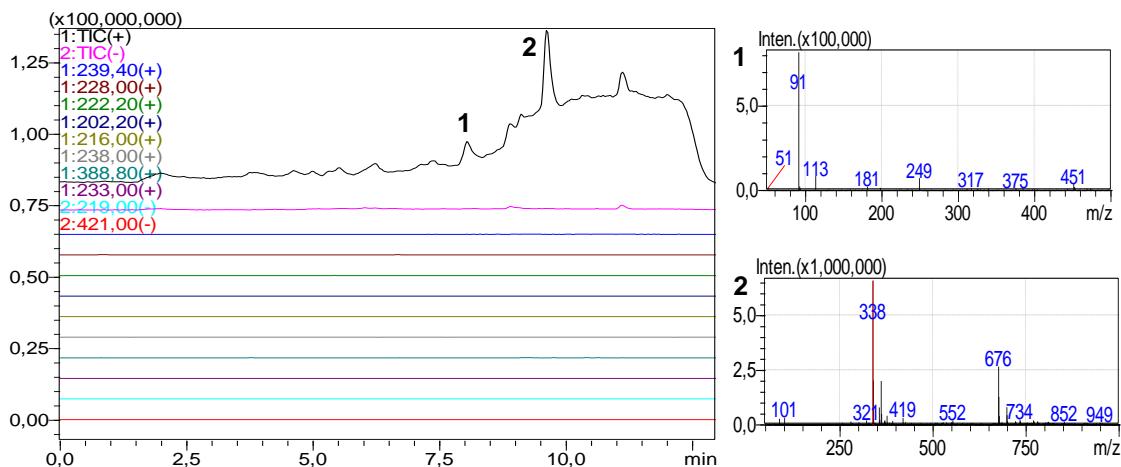
O C18 foi o adsorvente que apresentou os melhores valores de recuperação para os agrotóxicos, tanto em metanol (69-95%) como em acetonitrila (84-102%). Este material é composto pelo grupo octadecilsilano quimicamente ligado a sílica e seu mecanismo de retenção acontece por partição devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H dos analitos. Como os analitos em estudo apresentam grupos favoráveis a este tipo de interação foi confirmado o melhor desempenho deste adsorvente na recuperação dos 10 agrotóxicos.

Isto foi constatado neste estudo, visto que os valores de recuperação e considerando o intervalo de recuperação aceito pela ANVISA (70-120%), foram conseguidas utilizando cartuchos de C18 e solvente de eluição acetonitrila. Pela essa razão exposta foram estes os parâmetros escolhidos para dar prosseguimento às demais otimizações do método de extração.

No entanto, como a eficiência do procedimento de extração não está vinculado apenas aos ensaios de recuperação, é importante observar também a qualidade do extrato obtido, em razão de que compostos provenientes da matriz poderão atuar como interferentes durante a determinação dos analitos.

Para evidenciar a qualidade do extrato e avaliar se haverá possíveis componentes interferentes, foram realizadas extrações com o branco da amostra e analisadas por LC-MS em modo de varredura. O cromatograma obtido com a melhor condição de extração pode ser visto na Figura 12.

Figura 12 – Cromatograma e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e 10 mL de acetonitrila.



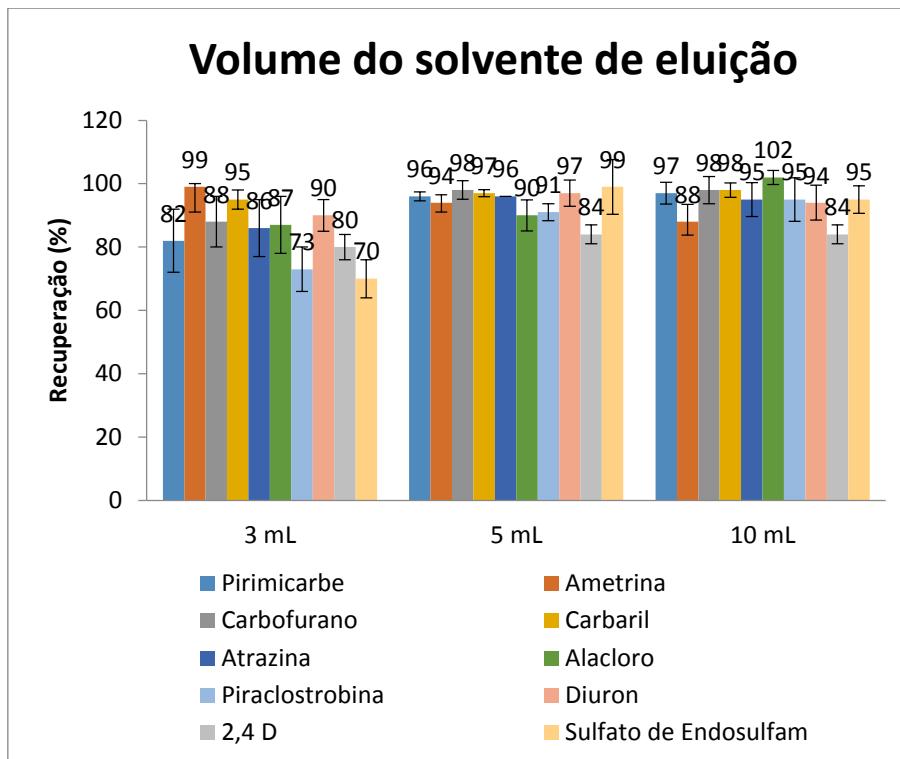
A análise do cromatograma não indicou a presença de compostos da matriz com massa/carga igual ou próxima aos agrotóxicos estudados, não havendo, portanto, necessidade de adição de uma etapa de limpeza no procedimento de extração. Além disso, os picos mais intensos observados no cromatograma podem ser advindos da matriz, como também de resíduos de análises anteriores realizadas por outros operadores.

A partir da verificação que não há interferentes para análise dos agrotóxicos na amostra, prosseguiu-se com a otimização do método de extração, utilizando cartuchos de C18 e solvente de eluição acetonitrila.

4.3.2 Seleção do volume do solvente de eluição

Um dos parâmetros importantes no desenvolvimento do método de extração por SPE é o volume do solvente de eluição [35]. Sabendo-se disso, foram testados dois volumes do solvente de eluição (acetonitrila). A Figura 13 demonstra os valores de recuperação dos agrotóxicos com a variação do volume do solvente de eluição.

Figura 13 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 µg L⁻¹, utilizando 500 mg de C18, 500 mL de amostra e diferentes volumes de acetonitrila.



Analizando os resultados encontrados com a variação dos volumes do solvente de eluição, 3, 5 e 10 mL, foi possível observar na Figura 13 que os valores de recuperação obtidos com o maior volume de eluição 10 mL (84-102%) foram muito próximos aos valores encontrados utilizando o valor intermediário de 5 mL (84-99%). O volume de 3 mL teve o intervalo de recuperação mais baixo (70-99%), porém ainda com bons valores e dentro do intervalo recomendado.

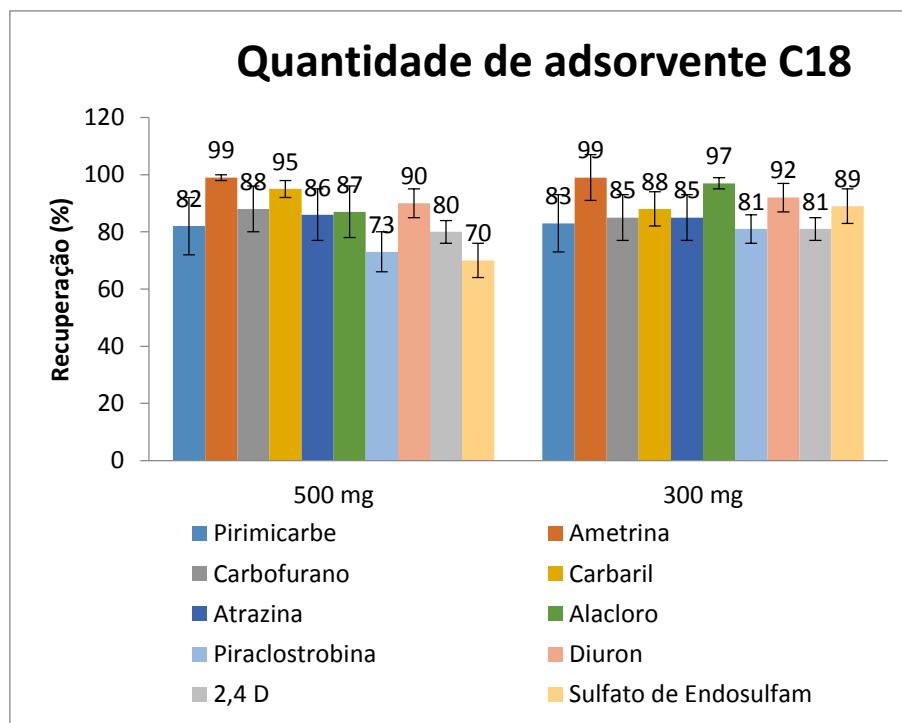
Em vista dos valores de recuperação obtidos utilizando 3 mL terem se apresentados tão bons quanto os conseguidos com 10 mL, foi escolhido o volume de 3 mL por promover uma boa recuperação com menor uso de solvente orgânico.

Com os parâmetros de tipo de adsorvente, solvente eluição (C18; acetonitrila) e volume do solvente de eluição otimizados (3 mL), foi avaliado a quantidade do adsorvente.

4.3.3 Seleção da quantidade do adsorvente C18

A escolha da quantidade da fase adsorvente depende de vários fatores, entre os quais o volume de amostra a ser extraída, o grau de interferentes e a complexidade da matriz [35]. A primeira sugestão para quantidade de adsorvente é seguir a recomendação dos fabricantes, entre as quantidades mais comuns está a de 500 mg, sendo a inicialmente escolhida para os estudos. Por isso, optou-se por testar uma massa inferior do adsorvente. A Figura 14 demonstra os valores de recuperação dos agrotóxicos com a variação da massa de adsorvente (C18).

Figura 14 – Eficiência na recuperação (%) ($n=3$) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 3 mL de acetonitrila, 500 mL de amostra e diferentes massas de C18.



A partir da observação dos dados apresentados na Figura 13 pode ser feita a comparação entre os valores de recuperação com 500 e 300 mg de adsorvente. Foi verificado com a redução de 200 mg de massa de adsorvente C18 as recuperações apresentaram ainda bons valores (81-99%) e permaneceram dentro da faixa recomendável, portanto a redução da massa não comprometeu a eficiência da extração.

Assim, as melhores condições encontradas para o processo de extração utilizando adsorvente comercial foram: 300 mg de adsorvente C18, 500 mL de amostra de água mineral, 3 mL de acetonitrila como solvente de eluição.

4.4 Avaliação do adsorvente alternativo óxido de grafeno parcialmente oxidado (GOp)

A utilização de adsorventes alternativos baseados em nanomateriais como nanotubos de carbono, óxido de grafeno e grafeno tem se mostrado bastante promissora no desenvolvimento de métodos de extração por SPE para determinação de contaminantes orgânicos em amostras ambientais [90, 91].

Por isso, foi realizada parceria com a Dra. Kaline Amaral Wanderley do Instituto de Química, da Universidade de Brasília (UnB), para o fornecimento de nanomateriais, entre eles: óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno parcialmente oxidado (GOp) e óxido de grafeno reduzido (GOr), este ultimo também descrito apenas como grafeno (G).

Estudos recentes refletem a importância de se examinar as características de adsorção do GO com diferentes níveis de oxidação, uma vez que isto tem impacto significativo nas propriedades físicas e químicas do material [92,93]. O GOp, por exemplo, demonstrou propriedades intermediárias entre óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido.

Dessa maneira, foram realizados testes com o óxido de grafeno parcialmente oxidado (GOp) como adsorvente para avaliar a sua capacidade de extração dos agrotóxicos atrazina, alacloro, ametrina, carbofurano, carbaril, diuron, pirimicarbe, piraclostrobina, 2,4 D e sulfato de endosulfam.

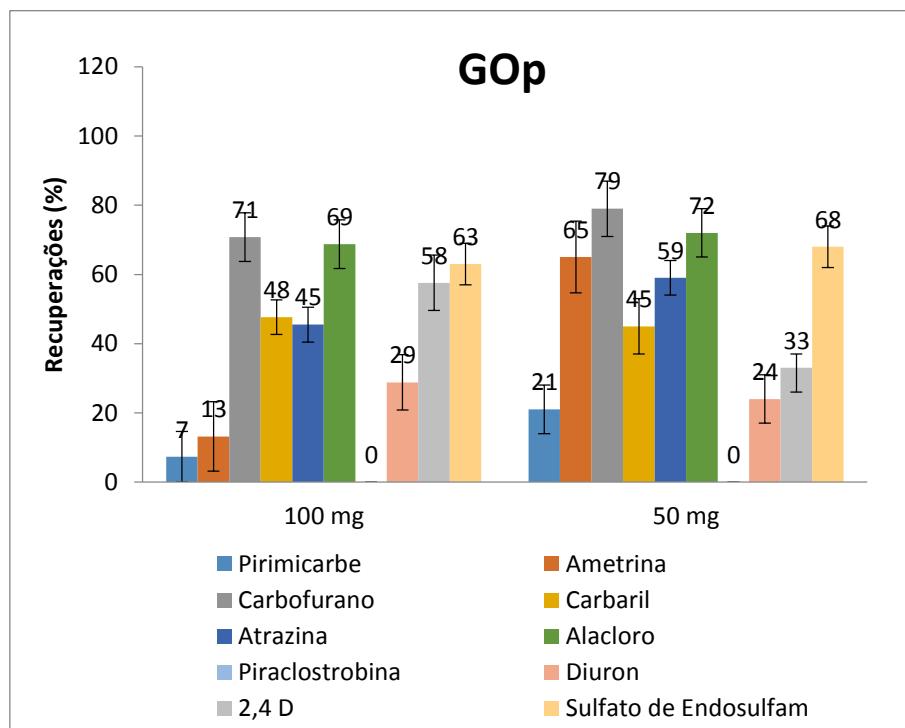
Na análise da adsorção dos agrotóxicos ao GOp foi aplicado o método que foi otimizado com o adsorvente C18, mudando apenas a etapa de condicionamento do material. Entretanto, algumas dificuldades práticas foram observadas durante sua aplicação. A primeira delas foi a elevada compactação do material pressão no cartucho de SPE, que ocasionou diminuição no fluxo de percolação da amostra e perda de partículas do adsorvente por arraste.

Tais contratemplos também foram relatadas por Sitko *et al.*, (2013) [45] e são justificadas considerando as propriedades do adsorvente o qual possui partículas extremamente pequenas [94]. Em razão disso, foi preciso diminuir o volume de amostra e otimizar as condições do método de extração para melhor desempenho do adsorvente.

4.4.1 Seleção da quantidade do adsorvente alternativo

O primeiro parâmetro avaliado foi a quantidade do adsorvente, em virtude das excelentes propriedades de adsorção este tipo de material pode ser utilizado em quantidades muito pequenas [95]. Por isso, as quantidades de 100 e 50 mg foram testadas conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 15 – Eficiência na recuperação (%) ($n=3$) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes massas de óxido de grafeno parcialmente oxidado, 100 mL de amostra e 3 mL de solvente eluição acetonitrila.



Constata-se na Figura 15 que a utilização de menor massa do adsorvente (50 mg) ocasionou um aumento nos valores de recuperação do maior número dos agrotóxicos, comparando com a quantidade de 100 mg. Para entender tal

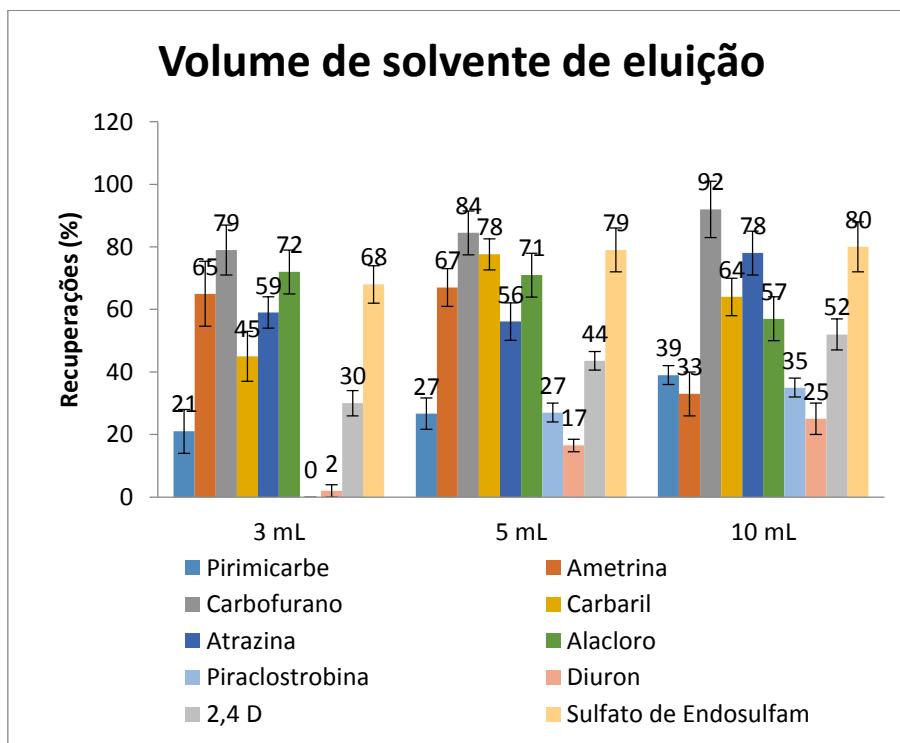
comportamento, se faz necessário considerar que há uma forte afinidade de GOp com os agrotóxicos em estudo e, desta maneira, quanto maior a quantidade, maior serão as interações entre o adsorvente e as moléculas dos analitos o que pode ocasionar aprisionamento dos analitos quando se utiliza altas massas de adsorvente.

Além disso, a eluição incompleta dos analitos pode ser ocasionada pelo forte empilhamento π - π com os analitos, e para garantir boas recuperações o volume e tipo de solvente para eluição dos analitos devem ser cuidadosamente escolhidos [45]. Em razão disso, os próximos parâmetros otimizados foram o volume e tipo de solvente de eluição.

4.4.2 Seleção do volume do solvente de eluição

A fim de investigar a influência do volume do solvente de eluição na recuperação dos analitos, foram testados três volumes do solvente de eluição acetonitrila (Figura 16).

Figura 16 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes volumes de acetonitrila, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.



Ao se realizar um comparativo entre as recuperações obtidas com os dois menores volumes de eluição (3 e 5 mL), foi possível verificar que para determinados agrotóxicos como pirimicarbe, carbofurano, carbaril, piraclostrobina, 2,4-D e sulfato de endosulfam houve um proporcional aumento na recuperação com o aumento do volume. Confirmando a suposição de eluição incompleta de alguns analitos ao se utilizar baixos volumes de solvente de eluição [45].

Por sua vez, ao se avaliar os resultados entre os volumes de 5 e 10 mL também foi verificado um incremento nas recuperações com o aumento do volume. No entanto, trata-se do dobro de solvente orgânico utilizado o que não elevou as recuperações ao intervalo de trabalho aceitável pela ANVISA. Por isto, o volume de 5 mL foi o selecionado para os demais testes de otimização do método de extração.

4.4.3 Seleção do tipo de solvente de eluição

Como a otimização da quantidade do adsorvente e do volume do solvente de eluição não possibilitou atingir faixa de recuperação aceitável (70-120%) para os 10 agrotóxicos em estudo, optou-se por avaliar também o tipo de solvente de eluição. Foram testados três solventes com características mais polares - metanol, acetonitrila e acetona - bem como a mistura em proporções iguais (50:50) de metanol e acetonitrila (Figuras 17, 18).

Também foram avaliados dois solventes de polaridades intermediárias, diclorometano e acetato de etila (Figura 18). Tais solventes foram escolhidos na tentativa de abranger uma ampla faixa de polaridade que proporcionasse diferentes interações com os analitos em estudo.

Figura 17 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes de eluição, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.

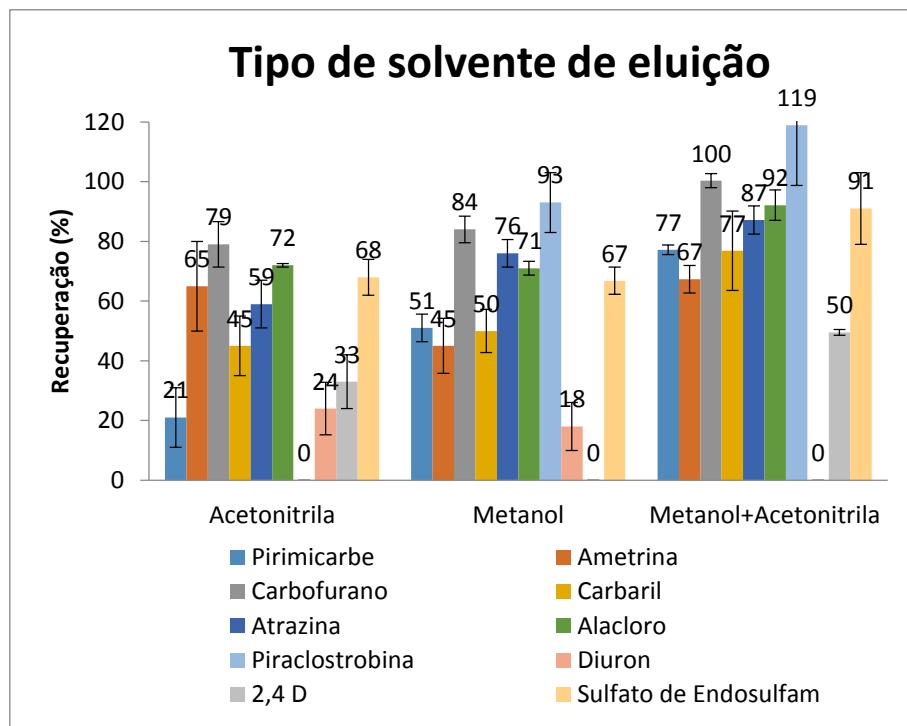
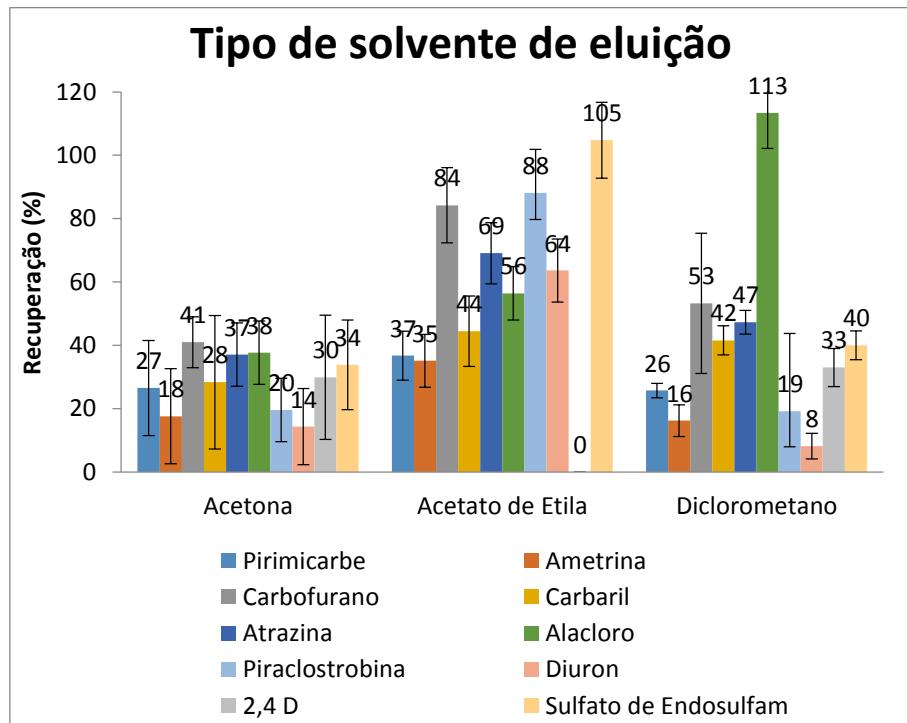


Figura 18 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes de eluição, 100 mL de amostra e 50 mg de GOp.



Para explicar o comportamento dos agrotóxicos frente às interações entre o GOp e os solventes de eluição, é importante lembrar que este material caracterizou-se como um sorvente de modo misto, ou seja, contém em sua estrutura tanto cadeias alquílicas (fase reversa) como grupos funcionais ricos em oxigênio [36]. Portanto, a adsorção pode ocorrer por inúmeras vias, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, empilhamento π - π , efeito hidrofóbico, forças de dispersão, entre outras [45,47].

Entre os analitos que apresentaram baixos valores de recuperação nas condições testadas, estão: carbaril, diuron, 2,4-D e piraclostrobina. As estruturas moleculares do 2,4-D, diuron e piraclostrobina (Figura 1) são compostas de diferentes grupos como aminas, ácido carboxílico, halos de arila e heteroátomos de oxigênio que facilmente podem formar ligações de hidrogênio com o GOp, tais ligações notadamente conhecidas por sua alta força de ligação podem ter provocado a sorção irreversível destes compostos.

Com relação ao carbaril, um estudo anterior realizado por Shi *et al.* (2016), [49] relatou a dificuldade na recuperação deste analito que provavelmente é causada devido a presença de um grupo naftil em sua estrutura, o qual possui forte interação com os elétrons π deslocalizados do adsorvente.

No geral, os solventes de eluição acetona, acetato de etila e diclorometano não foram favoráveis a recuperação dos analitos em estudo, uma vez que não reduziram a afinidade dos analitos por GOp para que fossem eluídos quantitativamente (Figura 18). Outra possibilidade é o fato destes solventes não serem compatíveis com cromatografia em fase reversa (utilizada neste estudo), e, consequentemente necessitam serem evaporados e redissolvidos em solvente compatível para análise. A adição de mais uma etapa no procedimento de extração pode ocasionar perda de frações dos analitos, levando a baixas recuperações.

O melhor resultado conseguido, dentro da faixa de recuperação recomendada, foi obtido na condição de eluição com a mistura de metanol com acetonitrila (50:50), para um total de 6 agrotóxicos: alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam. Estes agrotóxicos, com

exceção do carbaril, possuem em suas moléculas somente uma estrutura de anel baseada em carbono, que são contrabalanceadas pela presença de átomos de nitrogênio e/ou cloro que diminuem a afinidade causada pelos elétrons π do GOp facilitando a eluição.

Pode-se presumir também que tomando como base a força do solvente medida por meio da sua polaridade, individualmente metanol e acetonitrila apresentam os valores de 5,1 e 5,8, respectivamente [78]. Quando calculado o índice de polaridade para mistura destes solventes na proporção 50:50, encontra-se um valor de 5,4 sendo, portanto, um valor intermediário entre os dois solventes, que pode ter levado a uma condição ótima entre os agrotóxicos que melhor foram recuperados com metanol ou acetonitrila.

Comparando os resultados no obtidos no procedimento de extração entre o GOp (Figura 17) e os adsorventes comerciais testados (Figuras 8, 9, 10 e 11), pode-se elencar algumas considerações a respeito das suas vantagens e desvantagens.

Foi visto que, apesar do GOp apresentar recuperação aceitável para menos agrotóxicos (6 agrotóxicos) frente ao C18 (10 agrotóxicos) ele permite utilizar quantidade de adsorvente quase 3 vezes inferior, com volume de eluição próximo ao utilizado no C18.

Além disso, o GOp pode ser facilmente obtido em laboratórios, por métodos químicos simples, sem equipamentos especiais, a partir de uma série de materiais comuns e baixo custo, isto é, o grafite [36]. Ademais, ainda é incipiente o número de publicações utilizando materiais a base de grafeno para extração de agrotóxicos multiclasse, o que eleva a importância de um estudo envolvendo o adsorvente.

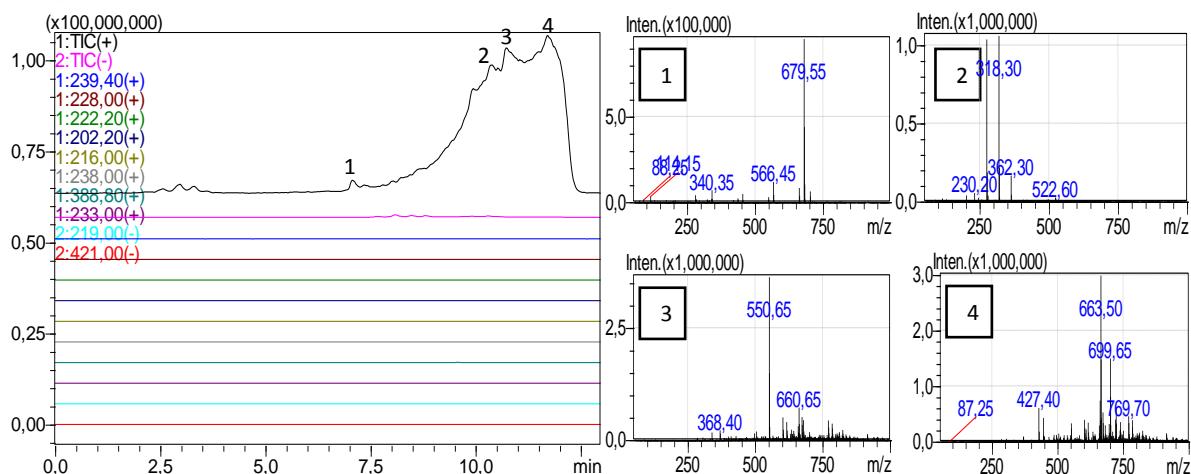
Por estas razões, o GOp foi escolhido para validação do método analítico com seis agrotóxicos (alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam) sob as condições de: 50 mg de GOp, 100 mL de amostra, 5 mL de mistura de solventes metanol e acetonitrila (50:50) para eluição.

4.4.4 Qualidade do extrato obtido empregando adsorvente alternativo

Como realizado durante as otimizações do adsorvente comercial C18, foi feito o estudo da qualidade do extrato obtido ao se utilizar o adsorvente alternativo GOp, a fim de verificar se outros compostos não estavam interferindo na determinação dos analitos.

Para isso, foram realizadas extrações com o branco da amostra e analisadas no LC-MS em modo de varredura de íons. O cromatograma obtido com a melhor condição de extração para o adsorvente alternativo pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 – Cromatograma e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 50 mg de GOp, 100 mL de amostra e 5 mL de metanol e acetonitrila (50:50).



O cromatograma indica não apresentou compostos com massa/carga igual ou próxima aos agrotóxicos estudados, e assim como relatado com o C18 não há necessidade de uma etapa de limpeza adicional no procedimento de extração. Foram observados mais sinais no extrato do branco utilizando o GOp, por isso foi realizada uma corrida cromatográfica com os solventes que compõem a fase móvel. Os sinais observados no cromatograma do extrato branco também foram encontrados no solvente, indicando que não são provenientes do adsorvente.

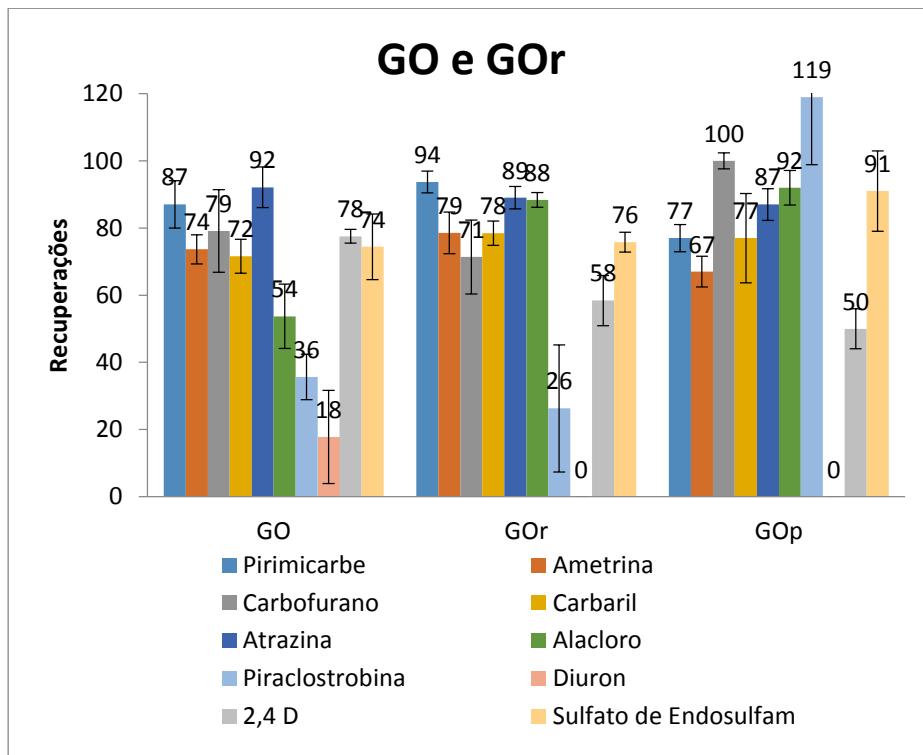
4.5 Avaliação dos adsorventes alternativos óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (GOr)

Conforme mencionado anteriormente, estudos refletem a importância de se examinar as características de adsorção do GO com diferentes níveis de oxidação [92,93]. Por isso, além do óxido de grafeno parcialmente oxidado (GOp) também foram analisadas as capacidades de extração para os dez (10) agrotóxicos alacloro, ametrina, atrazina, carbaril, carbofurano, diuron, piraclostrobina, pirimicarbe, sulfato de endosulfam e 2,4-D com os adsorventes óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (GOr).

A capacidade de extração dos adsorventes foi analisada utilizando as condições ótimas conseguidas anteriormente no procedimento de extração com o GOp. Dessa maneira, foi utilizado 50 mg de adsorvente, 100 mL de amostra, 5 mL de mistura de solventes metanol e acetonitrila (50:50) para eluição.

Os resultados de recuperação encontrados para os agrotóxicos com a utilização do óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (GOr) como adsorventes são demonstrados na Figura 20, nela também estão dispostos os valores de recuperação encontrados para o GOp.

Figura 20 – Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos agrotóxicos em água mineral por SPE com nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando 50 mg de GO, GOr e GOp, 100 mL de amostra e 5 mL da mistura metanol acetonitrila (50:50).



Com relação ao comportamento dos agrotóxicos frente ao óxido de grafeno reduzido (GOr), esperava-se uma capacidade adsorptiva maior do que o observado com o óxido de grafeno parcialmente oxidado (GOp). Isso, porque os analitos possuem uma polaridade relativamente baixa o que favorece sua extração por esse adsorvente, uma vez que é o mais indicado para extração em fase reversa [40,47].

Os agrotóxicos que apresentaram baixos valores de recuperação para o GOr foram: diuron, piraclostrobina e 2,4-D. O menor valor de recuperação foi o do diuron, pois não foi conseguido a recuperação de qualquer fração deste composto, seguido da piraclostrobina (20%) e 2,4-D (58%). Possivelmente, a molécula do diuron ficou aprisionada no óxido de grafeno reduzido via interação π - π com o adsorvente [43].

No caso da piraclostrobina, a sua estrutura molecular possui dois centros aromáticos que também facilitam a adsorção por meio das interações π , contudo a molécula apresenta heteroátomos (nitrogênio e oxigênio) distribuídos em sua estrutura que auxiliam, sua eluição. Um comportamento semelhante ocorre no caso do 2,4-D.

Por sua vez, a eficiência da extração dos agrotóxicos com o óxido de grafeno (GO), foi satisfatória para sete agrotóxicos. Os agrotóxicos piraclostrobina e diuron também apresentaram baixos valores de recuperação recuperações, revelando um comportamento similar ao GOr.

Ao comparar os valores de recuperação dos agrotóxicos em água utilizando adsorventes a base de óxido de grafeno (Figuras 17 e 20, Tabela 14), é possível verificar que os adsorventes óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido apresentaram uma melhor eficiência em relação ao óxido de grafeno parcialmente oxidado, tanto em termos de número de agrotóxicos, quanto em valores de recuperação, que no geral se mantiveram próximos a 80%.

Tabela 14 – Comparação entre os três adsorventes a base de grafeno em relação aos agrotóxicos recuperados.

Adsorvente	Nº de agrotóxicos recuperados	Agrotóxicos recuperados
GO _p	5	Alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam
GO	7	Ametrina, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe, 2,4-D e sulfato de endosulfam
GOr	7	Ametrina, alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe, sulfato de endosulfam

GO_p= óxido de grafeno parcialmente oxidado; GO= óxido de grafeno; GOr= óxido de grafeno reduzido; Nº=número.

Diante deste resultado, o óxido de grafeno foi selecionado como material adsorvente para determinação dos agrotóxicos em água mineral engarrafada, pois apresentou valores de recuperação para dez agrotóxicos, sendo sete dentro dos valores aceitáveis pela legislação.

4.6 Validação do método analítico

Após a otimização das condições cromatográficas de análise e do método de extração em fase sólida, torna-se necessário a validação, a fim de garantir a confiabilidade do método. Para este trabalho foram adotados os parâmetros de linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e a influência do efeito matriz na exatidão do método.

4.6.1 Linearidade e sensibilidade

O primeiro parâmetro avaliado foi a linearidade do método, uma vez que, para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado [95].

De acordo com a ANVISA, a linearidade pode ser determinada a partir da curva analítica a qual representa a relação entre resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, é geralmente obtida por uma equação de reta ($y = ax + b$), que expressa os coeficientes linear, angular e permite calcular os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), estes são parâmetros utilizados como critério de avaliação da qualidade da curva analítica [63].

Para obtenção das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em metanol, a uma concentração de $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$, a partir dela foram preparadas soluções trabalho para compor a curva, nas concentrações: 1; 2,5; 5; 10,0; 25; 50; 100; 250; 500; $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. As análises foram feitas em triplicata ($n=3$), após a aquisição dos dados as curvas foram construídas a partir da relação entre concentração e área de cada agrotóxico (Figura 21). A Tabela 15 demonstra as equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2) obtidos a partir das curvas analíticas de cada agrotóxico estudado por LC-MS.

Figura 21 – Curvas analíticas preparadas em metanol obtidas das análises dos agrotóxicos em LC-MS no intervalo de concentração de 0,001 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

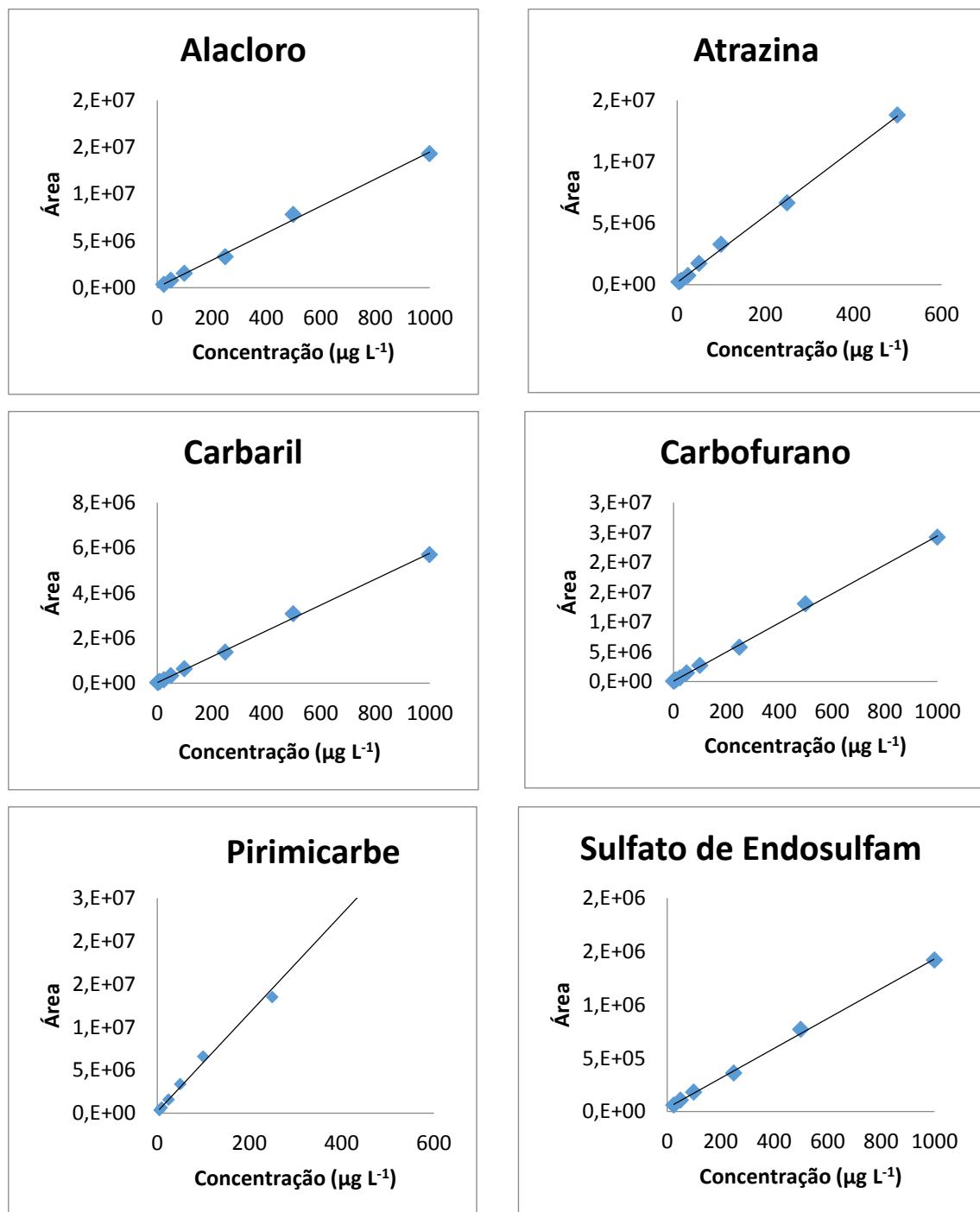


Tabela 15 — Equações da reta e coeficiente de determinação (r^2) dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxicos	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da Reta	Coeficiente de Determinação (r^2)
Atrazina	5-500	$y = 2,71238 \cdot 10^7 x + 170679$	0,9976
Alacloro	25-1000	$y = 1,44398 \cdot 10^7 x + 43138,4$	0,9967
Carbaril	2,5-1000	$y = 5,73861 \cdot 10^7 x + 22584,2$	0,9984
Carbofurano	1-1000	$y = 2,43941 \cdot 10^7 x + 62001,2$	0,9985
Pirimicarbe	5-500	$y = 5,73058 \cdot 10^7 x + 183346$	0,9975
Sulfato de Endosulfam	25-1000	$y = 1,39652 \cdot 10^7 x + 32420,1$	0,9989

Pode ser constatado pelos dados expostos na Tabela 15, que os valores obtidos dos coeficientes de determinação para cada agrotóxico foram satisfatórios ($>0,99$), representando uma boa associação linear entre a concentração dos analitos e as respostas cromatográficas dentro do intervalo compreendido pela curva analítica. Estes dados estão em consonância com as recomendações propostas por órgãos de regulamentação de métodos analíticos como ANVISA e INMETRO [63,64].

Em termos de sensibilidade analítica a qual demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular, foi determinado a partir da observação das equações de reta dos analitos que o agrotóxico com maior sensibilidade de resposta é o pirimicarbe, pois apresenta maior coeficiente angular, enquanto o de menor sensibilidade é o sulfato de endosulfam.

Os intervalos de concentração obtidos para cada agrotóxico são satisfatórios, pois compreenderam os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação [10,28].

4.6.2 Seletividade não específica (efeito matriz)

Uma questão importante no desenvolvimento de métodos de análise usando LC-MS com fonte ESI ou APCI é possível a ocorrência de efeitos matriz. Na maioria dos casos, um efeito matriz é considerado como uma supressão (inesperada) ou melhoria da resposta do analito devido aos constituintes da matriz co-eluentes. Pode ser facilmente detectada comparando a resposta obtida de uma solução padrão e de uma amostra pré-tratada e enriquecida após a extração [96].

O efeito matriz foi avaliado comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira preparada no extrato da matriz e a segunda no solvente (metanol). Quando a razão entre os dois coeficientes angulares for igual a 1, significa que não há efeito matriz, portanto, o método é seletivo, quando for superior a 1 o efeito matriz ocasiona um aprimoramento de sinal, e quando for inferior a 1 ocorre uma supressão de sinal do analito [97].

A Tabela 16 demonstra os intervalos de concentração, as equações de reta na matriz e no solvente dos agrotóxicos em estudo e a razão entre os coeficientes angulares das curvas no extrato da matriz e no solvente.

Tabela 16 – Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os agrotóxicos.

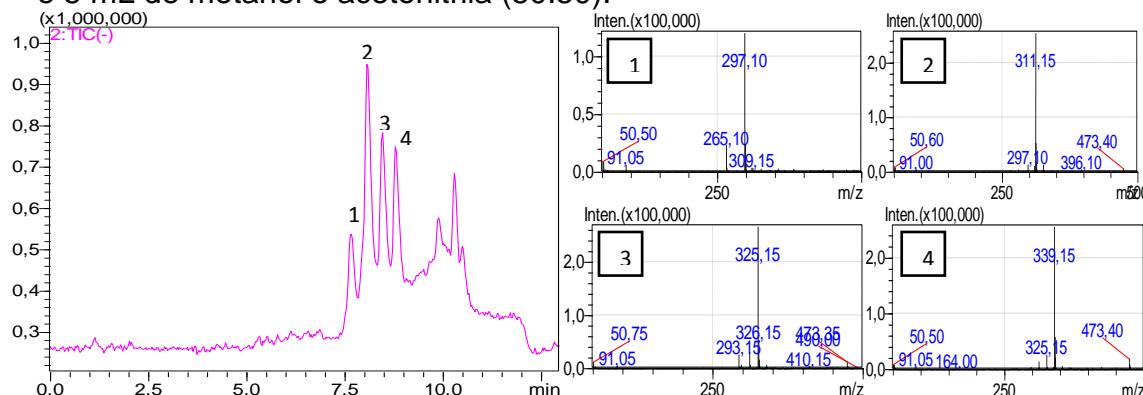
Agrotóxicos	Intervalo de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Extrato da Matriz		Extrato do Solvente		
		Equação da Reta	r^2	Equação da Reta	r^2	RCA
Atrazina	5-500	$y= 2,65121 \cdot 10^7 x - 27389,5$	0,9991	$y= 2,71238 \cdot 10^7 x + 170679$	0,9976	0,98
Alacloro	25-1000	$y= 1,43515 \cdot 10^7 x + 248297$	0,9941	$y= 1,44398 \cdot 10^7 x + 43138,4$	0,9967	0,99
Carbaril	2,5-1000	$y= 5,28217 \cdot 10^7 x + 1,06075 \cdot 10^6$	0,9931	$y= 2,43941 \cdot 10^7 x + 62001,2$	0,9967	2,00
Carbofurano	1-1000	$y= 2,33747 \cdot 10^7 x + 214680$	0,9960	$y= 2,43941 \cdot 10^7 x + 62001,2$	0,9984	0,96
Pirimicarbe	5-500	$y= 5,94367 \cdot 10^7 x - 49347$	0,9975	$y= 5,73058 \cdot 10^7 x + 183346$	0,9975	1,03
Sulfato de Endosulfam	25-1000	$y= 1,20364 \cdot 10^6 x + 52557$	0,9948	$y= 1,39652 \cdot 10^7 x + 32420,1$	0,9989	0,86

*RCA: Razão entre os coeficientes angulares no extrato da matriz e no solvente.

Os valores da razão entre os coeficientes angulares das curvas no extrato e no solvente demonstraram que para os agrotóxicos atrazina, alacloro, carbofurano e pirimicarbe o efeito matriz foi muito pouco significativo, uma vez que o RCA apresentou valores muito próximos ou iguais a 1. Este resultado já era esperada ao se observar o cromatograma do extrato branco (Figura 19), que não apresentou interferentes com os analitos em estudo.

O sulfato de endosulfam apresentou um efeito matriz negativo, ou seja, ocorreu uma supressão no sinal deste composto. A partir da verificação do cromatograma da corrente total de íons (TICC) em modo negativo (Figura 22), foi constatada a presença de sinais cromatográficos de intensidades relativamente elevadas e com razões m/z ligeiramente próximas ao analito.

Figura 22 – Cromatograma da corrente total de íons em modo negativo e espectros de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de água mineral por SPE utilizando 50 mg de GOp, 100 mL de amostra e 5 mL de metanol e acetonitrila (50:50).



Tal observação suscitou a hipótese da supressão da ionização em função da alta concentração de interferentes, pois, de acordo com King *et al.*, 2000 [98], isto pode aumentar a viscosidade e a tensão superficial das gotas produzidas na interface ESI. Este fenômeno reduz a capacidade dos analitos em atingir a fase gasosa e consequentemente diminuem a área do sinal. Além disso, vale ressaltar a dificuldade na ionização de agrotóxicos organoclorados, como sulfato de endosulfam, quando se utilizada ESI, fato que também pode corroborar o efeito matriz observado [86].

Com relação ao carbaril, foi o único agrotóxico que apresentou efeito matriz positivo. Na literatura, descreve-se de maneira muito geral as possíveis causas do aumento de sinal na ESI, uma vez que esta fonte é relatada como mais

sujeita à supressão de íons. Assim, diversos fatores podem ocasionar este comportamento, como as condições de ionização e evaporação de solvente, a etapa de pré-tratamento de amostra e condições instrumentais no método cromatográfico [65,97].

4.6.3 Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada por meio dos valores de recuperação obtidos a partir das extrações em fase sólida realizadas em três níveis de concentração e em triplicata para cada nível de concentração, utilizando o óxido de grafeno parcialmente oxidado como adsorvente.

A Tabela 17 apresenta os valores de recuperação e dos desvios padrão relativos em 3 níveis de fortificação dos agrotóxicos estudados. Para os seis agrotóxicos alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam o método foi aplicado nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 17 - Resultados de recuperação média (%) e desvios padrão relativos (DPR%) para os três níveis de fortificação testados ($n = 3$).

Agrotóxicos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
Atrazina	0,5	87	5
	1	99	3
	2,5	78	9
Alacloro	0,5	92	7
	1	91	12
	2,5	79	5
Carbofurano	0,5	100	2
	1	105	6
	2,5	91	2
Carbaril	0,5	77	2
	1	70	1
	2,5	70	9
Pirimicarbe	0,5	78	1
	1	87	5
	2,5	73	0,4
Sulfato de Endosulfam	0,5	91	7
	1	90	4
	2,5	79	3

No desenvolvimento de método para análise de resíduos de agrotóxicos, a literatura propõe que um método analítico é considerado eficiente quando a recuperação dos analitos encontra-se no intervalo aceitável entre 70 - 120%, e o coeficiente de variação (precisão) entre as amostras não deve ultrapassar 20% [63].

Analizando os resultados da Tabela 17, para o teste de exatidão, percebe-se que para os agrotóxicos (alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam) o método desenvolvido mostrou-se exato nos níveis de fortificação testados (0,5; 1,0; 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) com valores de recuperação entre 70 e 105%.

Com relação à repetibilidade ou precisão intradia do método esta foi avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) de análises realizadas no mesmo dia. Do modo semelhante foi realizado para precisão intermediária, no entanto os ensaios foram realizados com o nível de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em 3 dias diferentes e consecutivos para verificar se o método desenvolvido apresenta o mesmo desempenho quando alguma condição é alterada.

A Tabela 17 apresentou os valores encontrados para as análises de precisão intradia, e a Tabela 18 os valores obtidos com os testes de precisão intermediária.

Tabela 18 – Resultados para teste de precisão intermediária expressos por meio do desvio padrão relativo (DPR%) para o nível de 1,0 0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Agrotóxicos	DPR (%)
Alacloro	8
Atrazina	13
Carbaril	9
Carbofurano	15
Pirimicarbe	15
Sulfato de Endosulfam	7

Para os compostos determinados os valores dos desvios padrão relativos da precisão intradia e intermediária foram inferiores a 20%, conforme definido pela literatura, indicando que o método desenvolvido foi preciso [99].

4.6.4 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi aplicado o método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste método, o LD e o LQ podem ser expressos utilizando as Equações 1 e 2. Tal abordagem foi escolhida tomando como referência o estudo feito por Kruve *et al.*, (2015) [65], no qual foi realizada uma comparação entre abordagens de determinação do LD, e baseado no resultado do estudo a melhor abordagem é a que utiliza a Equação 1. Quanto a LQ os autores sugerem o disposto na Equação 2.

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{a} \quad (1) \quad LQ = 10 \cdot \frac{s}{a} \quad (2)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta e a é o coeficiente angular da curva analítica.

As estimativas do desvio padrão (s) foram calculadas empregando as respostas obtidas nas menores concentrações do ensaio de exatidão, enquanto que os coeficientes angulares utilizados foram obtidos a partir das equações da reta dos agrotóxicos preparados nos extratos da matriz no estudo da seletividade do método. Os valores dos LD e LQ obtidos estão expressos na Tabela 19.

Tabela 19 – Limites de detecção e quantificação dos agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LMR* ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Alacloro	0,008	0,025	20* **
Atrazina	0,007	0,023	2* **
Carbaril	0,0003	0,001	-

Carbofurano	0,003	0,011	7**
Pirimicarbe	0,001	0,004	-
Sulfato de Endosulfam	0,017	0,050	20* **

*LMR's estabelecidos pela RDC nº 274 para água mineral. [10] **LMR's estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 396 para água subterrânea. [28]

De acordo com os valores apresentados na Tabela 19, pode-se observar que os limites de detecção variaram entre 0,0003 e 0,017 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de quantificação 0,001 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em consulta aos materiais legais sobre águas minerais e subterrâneas [10,28] não são encontrados LMR para todos os agrotóxicos em estudo, no entanto, ao comparar os valores de LD e LQ com os LMR existentes pode-se considerar que os valores são satisfatórios.

4.7 Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em água

Para destacar a qualidade do método proposto, alguns parâmetros analíticos foram comparados a outros métodos publicados para determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas. A Tabela 20 descreve os parâmetros comparados entre os métodos.

Tabela 20 – Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas.

Método analítico	Matriz	Adsorvente	Recuperação (%)	LD (ng L ⁻¹)	DPR%	Ref.
SPE/LC-MS	Água mineral (100 mL)	GO (50 mg)	76 – 100	0,3 – 17	< 12	*
SPE/LC-MSMS	Águas ambientais (50 mL)	GOr (30 mg)	81 – 111	0,5 – 6,9	< 5,54	[49]
SPE/LC-MSMS	Águas ambientais (40 mL)	-	93 – 104	120 – 580	< 11	[74]
SPE/LC-MSMS	Água mineral (140 mL)	C18 (500 mg)	70 – 120	-	< 9	[72]
SPE/LC-MSMS	Águas ambientais (100 mL)	C18 (500 mg)	70 – 120	1,2 – 23	< 20	[73]

*Informações do método proposto; LD= limite de detecção; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem; Ref.= referência; DPR% =desvio padrão relativo.

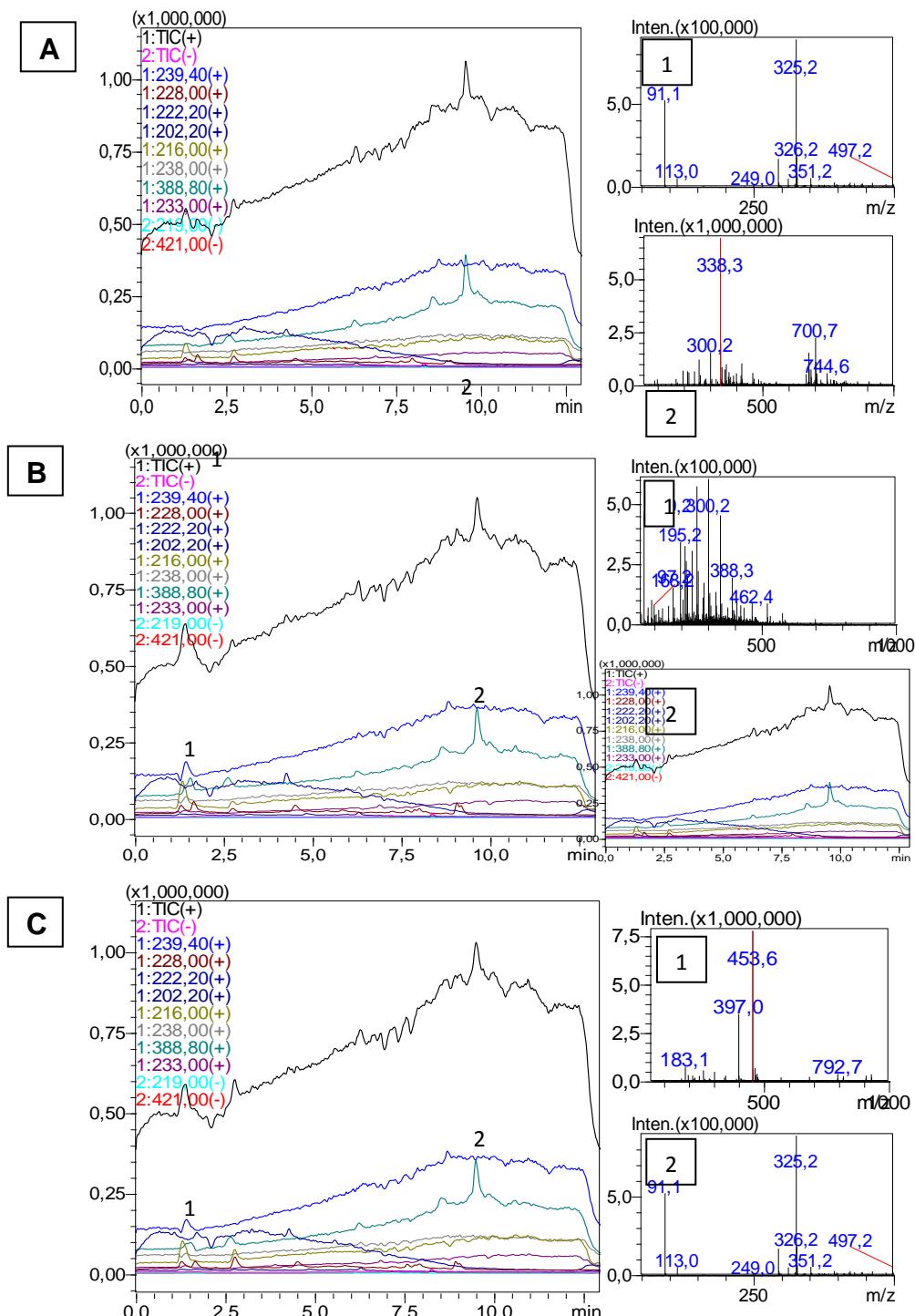
A comparação assinalada na Tabela 20 mostrou que o método proposto neste estudo dispõe de boas recuperações e que estão dentro da média comumente relatada nos outros métodos. Além disso, possui algumas vantagens como, por exemplo, a boa precisão conseguida na técnica de extração e os valores dos limites de detecção.

4.8 Aplicação do método em amostras comerciais de água mineral engarrafada produzidas em Sergipe

O método proposto para determinação de 7 agrotóxicos multiclasse (ametrina, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe, 2,4-D e sulfato de endosulfam) foi aplicado em três amostras de água mineral engarrafada produzidas em Sergipe. As amostras, adquiridas comercialmente, provêm de diferentes fontes localizadas no estado de Sergipe. Duas delas estão situadas no município de São Cristovão, nos povoados Rita Cacete e Tebaída, Figuras 4A e 4B, respectivamente. E a terceira localiza-se no município de Estância, Povoado Grotão (Figura 4C), conforme descrito mais detalhadamente na seção 3.9.

As três amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na seção 3.6 e a análise por LC/MS foi realizada em modo varredura de íons (SCAM) e no de monitoramento de íon selecionado (SIM), seção 3.7. Os cromatogramas e os espectros de massas das análises estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Cromatogramas da análise em modo *SIM* e espectros de massas da análise em modo *SCAN* das amostras de água mineral. Figura 23A: fonte de água mineral A; 23B: fonte água mineral B; 23C: fonte água mineral C.



Como pode ser observado na Figura 23, foram identificados alguns sinais cromatográficos de intensidade elevada no chromatograma analisado em modo de monitoramento do íon selecionado (*SIM*). Em vista disso, para avaliar se estes sinais poderiam ser referentes a algum dos agrotóxicos em estudo foram

comparados os tempos de retenção destes picos das amostras com soluções padrão dos agrotóxicos.

Foi verificado que os tempos de retenção assinalados não coincidiram com os dos analitos. Além disso, para confirmação dos resultados, foram observadas as massas referentes a estes sinais no cromatograma em modo varredura de íons, confirmando que as três amostras de água mineral engarrada não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados (ametrina, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe, 2,4-D e sulfato de endosulfam), considerando o intervalo de concentração identificável pelo método proposto.

5 CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas com utilização da fonte ESI se mostrou adequada na identificação de 10 agrotóxicos (atrazina, alacloro, ametrina, carbofurano, carbaril, diuron, pirimicarbe, piraclostrobina, 2,4 D e sulfato de endosulfam) dos 17 avaliados.

A elaboração de um gradiente de eluição (50-100%) composto por metanol:água (5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio) com fluxo de fase móvel 0,5 mL min⁻¹, coluna Luna C18 2,5 µm (100 x 3 mm) em modo de monitoramento do íon selecionado permitiu a identificação dos agrotóxicos sem a obrigatoriedade de completa separação entre eles, com sinais simétricos e tempo de análise de 13 min.

A técnica de extração em fase sólida com utilização de adsorvente comercial C18 se mostrou favorável para extração de dez agrotóxicos (atrazina, alacloro, ametrina, carbofurano, carbaril, diuron, pirimicarbe, piraclostrobina, sulfato de endosulfam e 2,4 D) nas condições de 300 mg de C18, 500 mL de água mineral e 3 mL de solvente de eluição acetonitrila, com boas recuperações entre 84±3,0 e 99±8%.

A aplicação de adsorventes baseados em óxido de grafeno, (GO, GO_p, GO_r) para SPE apresentou boa capacidade de pré-concentração e adsorção de agrotóxicos multiclasse (ametrina, alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe, 2,4-D e sulfato de endosulfam), com valores satisfatórios de recuperação (76±1,6–100±2,4%). Desse modo, o método proposto, que utilizou

50 mg de adsorvente GO, 100 mL de amostra de água mineral, 5 mL de mistura dos solventes metanol e acetonitrila (50:50) como solvente de eluição mostrou-se eficiente para determinação dos agrotóxicos alacloro, atrazina, carbaril, carbofurano, pirimicarbe e sulfato de endosulfam em água mineral.

Os parâmetros de validação estudados apresentaram resultados satisfatórios, permitindo boa linearidade, sensibilidade e eficiência do método desenvolvido com a técnica de extração em fase sólida (SPE) e análise por LC-MS. O método proposto foi aplicado na análise de três amostras de água mineral engarrada produzida em Sergipe, e foi não foi verificado resíduos de agrotóxicos nestas amostras.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Mediante os resultados obtidos, o presente trabalho tem as seguintes perspectivas:

- Estender a aplicação do método a outros rótulos de água mineral engarrafada produzida em Sergipe.

7 REFERÊNCIAS

- [1] BAIRD, C.; CANN, M. C. **Química Ambiental**. 4º ed. – Porto Alegre: Bookman, 2011.
- [2] VANLOON, G. W.; DUFFY, S. J. **Environmental Chemistry: a global perspective**. 2º ed. – New York: Oxford University Press, 2005.
- [3] SPADOTTO, C. **Índice de vulnerabilidade da água subterrânea à contaminação**. 1º ed. – Campinas: EMBRAPA, CNPM 2014. (EMBRAPA, Comunicado Técnico, 2).
- [4] BOLZAN, C. M.; CALDAS, S. S.; GUIMARÃES, B. S. PRIMEL, D. G. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine and triazoles in mineral water samples. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 17, p. 3410-3417, 2016.

- [5] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Consumo nacional de agrotóxicos e afins por área plantada.** Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=IU18&t=usoagrotoxico&s-1-consumo-nacional-agrotoxicos>> Acesso em: 3 de setembro de 2017.
- [6] GUARDO, A. D.; FINIZIO, A. A client-server software for TGE identification of groundwater vulnerability to pesticides at regional level. **Science of The Total Environment**, v. 530-531, p. 247-256, 2015.
- [7] ZOU, N.; GU, K.; LIU, S.; HOU, Y.; ZHANG, J.; XU, X.; LI, X.; PAN, C. Rapid analysis of pesticide residues in drinking water samples by dispersive solid-phase extraction based on multiwalled carbon nanotubes and pulse glow discharge ion source ion mobility spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1202-1212, 2016.
- [8] BOLZAN, C. M.; CALDAS, S. S.; GUIMARÃES, B. S.; PRIMEL, E. G.; Dispersive liquid-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of triazine, neonicotinoid, triazole and imidazolinone pesticides in mineral water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1902-1913, 2015.
- [9] CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; ARIAS, J. L. O.; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 149, p. 676-688, 2016.
- [10] BRASIL. **Resolução RDC ANVISA/MS nº 274**, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.
- [11] GRUJIC, S. VASILJEVIC, T.; RADISIC, M.; LAUSEVIC, M. Determination of pesticides by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: NOLLET, L. M. L.; RATHORE, H. S. **Handbook of Pesticides: methods of pesticide residues analysis**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010. 630 p.

- [12] MCCLAIN, R. Milestones in supercritical fluid chromatography: a historical view of the modernization and development of supercritical fluid chromatography. In: POOLE, C. F. **Supercritical Fluid Chromatography**, Cambridge :Elsevier, 2017. 572 p.
- [13] LANÇAS, F. M. **Fundamentos da Cromatografia Gasosa** – Campinas, SP: Editora Átomo, 2017.
- [14] JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; In: QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**, 1 ed. – Rio de Janeiro: LTC, 2015. 263 p.
- [15] BRASIL. **Lei Nº 7.841**, de 8 de agosto de 1945. Código de Águas Minerais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1945.
- [16] BRANCO, P. M. **Água Mineral e Água de Mesa**. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Agua-Mineral-e-Agua-de-Mesa-1299.html>> Acessado em: 02 de dezembro, 2017.
- [17] FRASÃO, L. **O mercado de 7 bilhões de litros**. Disponível em: <http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=71> Acesso em: 04 de setembro de 2017.
- [18] ABAR, A. C. **Indústria da água mineral movimenta mais de R\$ 10 bilhões ao ano no Brasil**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/globo-news/noticia/2016/03/industria-da-agua-movimenta-mais-de-r-10-bilhoes-ao-ano-no-brasil.html>>. Acesso em: 04 de setembro de 2017.
- [19] JONH, G.; RODMAN, Jr. Bottled Water 2016: Nº 1 & Growing. **Bottled Water Reporter**, v. 57, n. 4, p. 12-21, 2017.
- [20] Governo do Estado de Sergipe, **Vigilância Sanitária fiscaliza transporte de água mineral na BR-101**. Disponível em:<<http://www.agencia.se.gov.br/noticias/saude/vigilancia-sanitaria-fiscaliza-transporte-de-agua-mineral-na-br-101>> Acesso em: 14 de maio de 2018.

- [21] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Área Territorial Brasileira.** Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtml> Acesso em: 14 de maio de 2018.
- [22] BRASIL, **Lei Nº 7.802**, de 11 de julho de 1989. Legislação Federal de agrotóxicos e afins. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1945.
- [23] Gerência Geral de Toxicologia/Anvisa, Agrotóxico, Herbicida e Pesticida. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>, Acesso em 04 dez, 2017.
- [24] COELHO, E. R. C.; BERNARDO, L. D. Presença e remoção de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina e desetilhidroxiatrazina em instalação piloto de ozonização e filtração lenta. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 4, p. 789-796, 2017.
- [25] SRIVASTAVA, S.; GOYAL, P. SRIVASTAVA, M. M. Pesticides: Past, Present and Future. In: NOLLET, L. M. L.; RATHORE, H. S. **Handbook of Pesticides: methods of pesticide residues analysis**, Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010. 630 p.
- [26] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2015** – Culturas Temporárias e Permanentes.– Culturas Temporárias e Permanentes. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default_xls.shtml> Acesso em: 14 de maio de 2018.
- [27] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006.** Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv61914.pdf>> Acesso em: 14 de maio de 2018.
- [28] BRASIL, **Resolução CONAMA nº 396**, 3 de abril de 2008. Classificação e diretrizes ambientais para águas subterrâneas. Diário Oficial da União, DF, 2008.

- [29] IUPAC PPDB – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Pesticides Properties Data Base.** Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>> Acesso em: 30 de agosto de 2017.
- [30] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos.** Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 30 de agosto de 2017.
- [31] Pubchem. **PubChem Data Base.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 14 de setembro de 2017.
- [32] CASSAL, V. B. AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública, **Revista Eletrônica em Gestão Educação e Tecnologia Digital**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.
- [33] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais Técnicas de Preparo de Amostra para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- [34] DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.
- [35] LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)** – São Carlos: RiMa, 2004.
- [36] JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- [37] POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.

- [38] CARVALHO, J. J.; JERÓNIMO, P. C. A.; GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M. F. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 5, p. 955-968, 2008.
- [39] MAJORS, R. E. Solid-Phase Extraction. In: PAWLISZYN, J.; LORD, H. L. **Handbook of Sample Preparation**, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- [40] AUGUSTO, F.; HANTAO, L. W.; MAGOLLÓN, N. G. S.; BRAGA, A. C. G. N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n., p. 14-23, 2013.
- [41] ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 677-690, 2006.
- [42] PLOTKA-WASYLK, J.; SZCZEPANSKA, N.; GUARDIA, M.; NAMIESNIK, J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23-43, 2016.
- [43] WANG, X.; LIU, B.; LU, Q.; QU, Q. Graphene-based materials: Fabrication and application for adsorption in analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, n. 51, p. 1-15, 2014.
- [44] YE, N.; SHI, P. Applications of graphene-based materials in solid-phase extraction and solid-phase microextraction. **Separation & Purification Reviews**, v. 44, n. 1, p. 183-198, 2015.
- [45] SITKO, R.; ZAWISZA, B.; MALICKA, E. Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 33-43, 2013.
- [46] HUMMERS, W.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide, **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

- [47] LIU, Q.; SHI, J.; JIANG, G. Application of graphene in analytical sample preparation, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2012.
- [48] IBRAHIM. W. A.; NODEH, H. R.; SANAGI, M. M. Graphene-based materials as solid phase extraction sorbent for trace metal ions, organic compounds and biological sample preparation, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 4, p.267-283, 2016.
- [49] SHI, Z.; HU, J.; LI, Q.; ZHANG, S.; LIANG, Y.; ZHANG, H. Graphene based solid phase extraction combined with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for carbamate pesticides analysis in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 219-227, 2014.
- [50] HAN, Q.; WANG, Z.; XIA, J.; ZHANG, X.; WANG, H.; DING, M. Application of graphene for the SPE clean-up of organophosphorus pesticides residues from apple juices. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 99-105, 2014.
- [51] VALLS-CANTENYS, C.; SCHEURER, M.; IGLESIAS, M.; SACHER, F. BRAUCH, H. J.; SALVADÓ, V. A sensitive multi-residue method for the determination of 35 micropollutants including pharmaceuticals, iodinated contrast media and pesticides in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 22, p. 6189-6200, 2016.
- [52] MORAIS, E. H. C.; BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. D. F. Técnica de preparo de amostras empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 146-162, 2013.
- [53] LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17-44, 2008.
- [54] FERRER, I.; BARCELÓ, D. LC-MS methods for trace determination of pesticides in environmental samples, **Analusis Magazine**, v. 26, n. 6, p. 118-122, 1998.

- [55] KMELLÁR, B.; PAREJA, L.; FERRER, C.; FODOR, P.; FÉRNANDEZ-ALBA, A. R. Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 84, n. 2, p. 262-273, 2011.
- [56] LIU, L. B.; LIU, Y.; LIN, J. M. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables by using GC-MS and LC-MS. In: NOLLET, L. M. L.; RATHORE, H. S. **Handbook of Pesticides**: methods of pesticide residues analysis, Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010. 630 p.
- [57] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3º ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- [58] KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J.; Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 685-699, 2009.
- [59] WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry**: instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4º ed. – West Sussex: John Wiley & Sons, 2007.
- [60] LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- [61] CARDOSO, J. O.; OLIVEIRA, R. V. LC-MS/MS: fundamentos, vantagens e problemas no acoplamento. In: CASS, Q. CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. 1º ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- [62] LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. 2ª ed. – Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2016.
- [63] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003.

[64] INMETRO, Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC Nº 166** de 24 de julho de 2017, dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providências.

[65] KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, O.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

[66] KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II. **Analytical Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015.

[67] AOAC, AOAC Guidelines for Single-laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, **Official Methods of Analysis**, 19^a ed., AOAC, INTERNATIONAL, Gaithersburg MD, 2012.

[68] IUPAC, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analyses (IUPAC technical report), **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n.5, p. 835–855, 2002.

[69] LEITE, F. **Validação em Análise Química**, 4^º edição, Editora Átomo – Campinas: São Paulo, 2002.

[70] TAVERNIERS, I.; LOOSE, M.; BOCKSTAEL, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

[71] EVARD, H.; KRUVE, A.; LEITO, I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. **Analytical Chimica Acta**, V. 942, p. 23-39, 2016.

[72] MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 38-44, 2012.

- [73] MANN, O.; POCK, E.; WRUSS, K.; WRUSS, W.; KRSKA, R. Development and validation of a fully automated online SPE-ESI-LC-MS/MS multi-residue method for the determination of different classes of pesticides in drinking, ground and surface water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 353-372, 2016.
- [74] SUN, P.; GAO, Y. L.; XU, C.; LIAN, Y. F. Determination of six organophosphorus pesticides in water samples by three-dimensional graphene aerogel-based solid-phase extraction combined with gas chromatography mass spectrometry. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, n. 19, p. 10277-10283, 2018.
- [75] KATSUMATA, H.; KOJIMA, H.; KANEKO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K. Preconcentration of atrazine and simazine with multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction disk. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 348-351, 2010.
- [76] RADOVIĆ, T.; GRUJIĆ, S.; PETKOVIĆ, A.; DIMKIĆ, M.; LAUSEVIĆ, M. Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, p. 1-17, 2015.
- [77] CHIARELLO, M.; GRAEFF, R. N.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHNEIDER, V. E.; MOURA, S. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 158-165, 2017.
- [78] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. **High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model**. John Wiley & Sons, 2007.
- [79] KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 4, p. 685-699, 2009.

- [80] ASPERGER, A.; EFER, J.; KOAL, T.; ENGEWALD, W. On the signal response of various pesticides in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 2, p. 65-72, 2001.
- [81] Shimadzu Application News, **Analysis of pesticides in drinking water using triple quadrupole LC/MS/MS**, n.36. Disponível em: <<https://www.shimadzu.com/an/literature/lcms/jpo213066.html>> Acesso em 3 set, 2017.
- [82] Shimadzu Application News, **Simultaneous analysis of pesticides in environment water using LC-MS**, n. C34. Disponível em: <<http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/lcms/c34.pdf>> Acesso em 3 set, 2017.
- [83] Shimadzu Application News, **A high sensitivity method for quantitative determination of ten phenols in surface water on LC/MS/MS with APCI interface**, n. AD-0125. Disponível em: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/lcms/ad0125lcms_Phenols%20in%20Surface%20water.pdf> Acesso em 3 set, 2017.
- [84] COLLINS, C. H. BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1º ed. – Campinas, SP: UNICAMP, 2006.
- [85] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2º ed. – New York: John Wiley & Sons, 1997.
- [86] FAMIGLINI, G.; PALMA, P.; TERMOPOLI, V.; TRUFELLI, H.; CAPPIELLO A. Sigle-Step LC/MS method for the simultaneous determination of GC-Amenable organochlorine and LC-Amenable phenoxy acidic pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 17, p. 7373-7378, 2009.
- [87] THURMAN, E. M.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization

interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5441-5449, 2001.

[88] SPRENGER, R. F.; AQUINO, A. J. Perfil cromatográfico – desreplicando para não reisolar. In: CASS, Q. CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. 1º ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

[89] ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (Part I). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641-654, 2016.

[90] LI, N.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Magnetic grapheme solid-phase extraction for the determination of carbamate pesticides in tomatoes coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 141, p. 212-219, 2015.

[91] ERSAN, G.; APUL, O. G.; PERREAU, F.; KARANFIL, T. Adsorption of organic contaminants by grapheme nanosheets: a review. **Water Research**, v. 126, p. 385-398, 2017.

[92] LIU, R.; GONG, T.; ZHANG, K.; LEE, C. Graphene oxide papers with high water adsorption capacity for air dehumidification. **Scientific Reports**, v. 7, n. 9761, p. 1-9, 2017.

[93] MA, D.; DONG, L.; ZHOU, M.; ZHU, L. The influence of oxidation debris containing in graphene oxide on the adsorption and electrochemical properties of 1,10-phenanthroline-5,6-dione. **The Royal Society of Chemistry**, v. 9, n. 141, p. 2761-27-66, 2016.

[94] GEIM, A. K. Graphene: status and prospects. **Science**, v. 324, n. 5934, p. 1530-1534, 2009.

[95] LIU, Q.; SHI, J.; ZENG, L.; WANG, T.; CAI, Y.; JIANG, G. Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 2, p. 197-204, 2011.

- [95] PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- [96] NIJESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matriz effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 881-899, 2006.
- [97] GOSETTI, F.; MAZZUCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.
- [98] KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. **Journal American Society Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.
- [99] SANTE, Commission of the European Communities. Document n° SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides and analysis in food and feed. Uppsala, Suécia, 2017.