

ELENICE APARECIDA CARLOS

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRIALOMETANOS E
AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO
EM FASE SÓLIDA E MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA POR
CROMATOGRÁFIA GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

ELENICE APARECIDA CARLOS

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRIALOMETANOS E
AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO
EM FASE SÓLIDA E MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA POR
CROMATOGRAPHIA GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 05 de abril de 2011

Prof^a.: Susanne Rath

Prof.: Juraci Alves de Oliveira

Prof.: Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Prof.: César Reis
(Coorientador)

Prof^a.: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

***Ao meu esposo, Sérgio Roney da Silva
Com amor, dedico.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável maior por esta conquista.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste curso.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, por sua orientação, amizade, apoio e incentivo fundamentais para superação dos momentos difíceis.

Ao professor Antônio Augusto Neves, por sua orientação, amizade e valiosas contribuições.

Ao professor César Reis, pela prontidão em orientar-me, pelas sugestões e ensinamentos.

Ao professor Cláudio Ferreira Lima, pelo apoio técnico.

Aos professores Maurício Xavier Coutrim e Robson José de Cássia Franco Afonso, do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, pelos padrões analíticos e pelas análises realizadas no CG-EM.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao mestrando Júlio César Cardoso da Silva, do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, pelo apoio técnico para realização das análises por CG-EM.

Ao técnico Ricardo e colegas do LAQUA, pela cooperação e convivência. Em especial a Cláudia, Livia, Luís Manoel e Simone Goulart, pelos gestos de carinho.

Aos amigos do COLUNI, pela agradável convivência.

Às amigas Anna Isabel, Fernanda, Flaviane, Renata e Rose, pela amizade, generosidade e precioso apoio.

Ao amigo Luciano Virtuoso, pelo incentivo.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam nesta caminhada, pelo carinho e orações.

A minha mãe e minha irmã Jaqueline, pelo amor, incentivo e orações.

Ao Sérgio, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio em todos os momentos.

BIOGRAFIA

Elenice Aparecida Carlos, filha de Sebastião Carlos e Maria de Lurdes Carlos, nasceu em João Monlevade, Minas Gerais, em 02 de outubro de 1974.

Em março de 1996, iniciou o curso de Graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharela e licenciada em outubro de 2000. Em agosto deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em setembro de 2002. Em março de 2007 iniciou as atividades de doutorado no mesmo programa de pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
APRESENTAÇÃO.....	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
CAPÍTULO 1 – Determinação simultânea de trialomitanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa.....	7
1.1 INTRODUÇÃO.....	7
1.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	9
1.2.1 Reagentes e soluções.....	9
1.2.2 Amostras.....	10
1.2.3 MEFS-HS.....	11
1.2.4 Análises Cromatográficas.....	12
1.2.5 Validação.....	13
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
1.3.1 Análise Cromatográfica.....	13
1.3.2 Otimização da MEFS-HS.....	15
1.3.2.1 Temperatura de extração.....	16
1.3.2.2 Adição de sal.....	16
1.3.2.3 Tempo de extração.....	17
1.3.3 Validação.....	19
1.3.3.1 Seletividade.....	19
1.3.3.2 Limites de detecção e quantificação do método.....	21
1.3.3.3 Linearidade do método.....	21
1.3.3.4 Precisão intermediária.....	22
1.3.3.5 Curvas analíticas.....	23

1.3.3.6 Exatidão.....	24
1.3.4 Análise de amostras de água do município de Viçosa, MG.....	26
1.4 CONCLUSÃO.....	28
 CAPÍTULO 2 – Determinação simultânea de agrotóxicos em água	29
empregando microextração em gota única e cromatografia gasosa.....	
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	30
2.2.1 Reagentes e soluções.....	30
2.2.2 Microextração em gota única (MEGU).....	31
2.2.3 Análises cromatográficas.....	32
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
2.3.1 Análise cromatográfica.....	33
2.3.2 Otimização da microextração em gota única.....	34
2.3.2.1 Solvente extrator.....	35
2.3.2.2 Tempo de contato.....	37
2.3.2.3 Velocidade de agitação.....	39
2.3.2.4 Volume da microgota.....	41
2.3.2.5 Efeito da adição de sal.....	44
2.3.2.6 Volume de amostra.....	45
2.3.3 Desempenho analítico do método.....	47
2.3.3.1 Seletividade.....	47
2.3.3.2 Limites de detecção e quantificação do método.....	48
2.3.3.3 Linearidade do método.....	49
2.3.3.4 Precisão intermediária.....	49
2.3.3.5 Exatidão.....	50
2.3.4 Análise de amostras de água.....	52
2.4. CONCLUSÃO.....	52
 CAPÍTULO 3 – Comparação entre as técnicas de MEFS-HS e MEGU-	53
ID para extração de agrotóxicos em água.....	
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	54
3.2.1 Reagentes e soluções.....	54

3.2.2 Microextração em fase sólida.....	55
3.2.3 Microextração em gota única.....	56
3.2.4 Análises Cromatográficas.....	56
3.2.5 Otimização e Validação.....	57
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.4 CONCLUSÃO.....	63
 CONSIDERAÇÃO FINAL.....	 64
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 65

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Desenho esquemático da MEFS-HS.	11
Figura 2. Cromatograma obtido da análise de água ultra pura fortificada com trialometanos, organoclorados e piretroides em concentrações iguais a 60, 2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, onde: (1) $t_R = 2,8$ min: clorofórmio; (2) $t_R = 3,6$ min: bromodiclorometano; (3) $t_R = 4,7$ min: dibromoclorometano; (4) $t_R = 5,7$ min: bromofórmio; (5) $t_R = 12,7$ min: hexaclorobenzeno; (6) $t_R = 13,2$ min: lindano; (7) $t_R = 13,6$ min: pentaclorofenol; (8) $t_R = 14,8$ min: heptacloro; (9) $t_R = 15,7$ min: aldrin; (10) $t_R = 17,9$ min: endossulfam; (11) $t_R = 18,7$ min: dieldrin; (12) $t_R = 19,5$ min: endrin; (13) $t_R = 21,3$ min: DDT; (14) $t_R = 24,9$ min e (15) $t_R = 25,3$ min: λ -cialotrina; (16) $t_R = 27,0$ min e (17) $t_R = 27,3$ min: permetrina; (18) $t_R = 29,1$ min, (19) $t_R = 29,3$ min e (20) $t_R = 29,5$ min: cipermetrina; (21) $t_R = 32,4$ min e (22) $t_R = 32,9$ min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 40 $^{\circ}\text{C}/2$ min (20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 200 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 290 $^{\circ}\text{C}/2\text{min}$; temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$ ("split"=1:5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}\text{C}$.	14
Figura 3. Aumento da resposta cromatográfica da λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, em função do tempo de extração.	18
Figura 4. Cromatograma obtido após extração de uma matriz de água superficial (A), seguido do cromatograma obtido a partir da extração da amostra fortificada (B) com trialometanos, agrotóxicos organoclorados e piretroides a 60, 2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; onde: (1) clorofórmio; (2) bromodiclorometano; (3) dibromoclorometano; (4) bromofórmio; (5) hexaclorobenzeno; (6) lindano; (7) pentaclorofenol; (8) heptacloro; (9) aldrin; (10) endossulfam; (11) dieldrin; (12) endrin; (13) DDT; (14) e (15) λ -cialotrina; (16) e (17) permetrina; (18), (19) e (20) cipermetrina; (21) e (22) deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 40 $^{\circ}\text{C}/2$ min (20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 200 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 290 $^{\circ}\text{C}/2\text{min}$; temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$ ("split":5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}\text{C}$.	20

Figura 5. Cromatograma obtido da análise, por CG-DCE, de amostra de água tratada do município de Viçosa, MG, onde: (1) $t_R = 2,8$ min: clorofórmio; (2) $t_R = 3,6$ min: bromodiclorometano; (3) $t_R = 4,7$ min: dibromoclorometano. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 40 °C/2 min (20 °C min⁻¹) 200 °C (4 °C min⁻¹) 290 °C/2min; temperatura do injetor 250 °C (“*split*” de 1:5) e temperatura do detector 300 °C.

Figura 6. Espectros de massa obtidos da análise, por CG-EM, de amostra de água tratada do município de Viçosa, MG, onde: (A) clorofórmio, (B) bromodi-clorometano e (C) dibromoclorometano. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 40 °C/2 min (20 °C min⁻¹) 200 °C (4 °C min⁻¹) 290 °C/2min; temperatura do injetor 250 °C (“*split*” de 1:5) e temperatura do detector 300 °C.

Figura 7. Desenho esquemático da microextração em gota única, modo direto.

Figura 8. Cromatograma obtido da análise de água potável fortificada com organoclorados e piretroides, onde: (1) $t_R = 5,6$ min: hexacloro-benzeno; (2) $t_R = 6,0$ min: lindano; (3) $t_R = 7,5$ min: heptacloro; (4) $t_R = 8,4$ min: aldrin; (5) $t_R = 9,6$ min: heptacloro epóxido; (6) $t_R = 10,7$ min: endossulfam; (7) $t_R = 11,7$ min: dieldrin; (8) $t_R = 12,5$ min: endrin; (9) $t_R = 14,6$ min: DDT; (10) $t_R = 17,0$ min: metoxicloro (11) $t_R = 18,1$ e 18,3 min: λ -cialotrina; (12) $t_R = 19,1$ e 19,3 min: permetrina; (13) $t_R = 20,4$; 20,5 e 20,7 min: cipermetrina; (14) $t_R = 22,8$ e 23,2 min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 150 °C/1 min (30 °C min⁻¹) 200 °C (3 °C min⁻¹) 240 °C (20 °C min⁻¹) 290 °C/6 min; temperatura do injetor 280 °C (“*split*” de 1:5) e temperatura do detector 300 °C.

Figura 9. Efeito do solvente orgânico (n-hexano e tolueno) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: concentrações de fortificação de 1 e 40 μ g L⁻¹ para organoclorados e piretroides, respectivamente; tempo de contato: 10 min; velocidade de agitação: 155 rpm; volume de microgota: 2,0 μ L; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL.

- Figura 10.** Efeito do tempo de contato na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: concentrações de fortificação de 1 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para organoclorados e piretroides, respectivamente; solvente orgânico: n-hexano; velocidade de agitação: 155 rpm; volume de microgota: 2,0 μL ; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL. 38
- Figura 11.** Efeito da velocidade de agitação da amostra (100 a 870 rpm) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; volume de microgota: 2,0 μL ; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL. 40
- Figura 12.** Efeito do volume da microgota (1,6 a 2,2 μL) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL. 43
- Figura 13.** Efeito da adição de NaCl (0 a 6% m/v) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; volume de microgota: 1,6 μL ; volume de amostra: 10 mL. 44
- Figura 14.** Efeitos do volume (10 e 35 mL) e da diluição da amostra na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; volume de microgota: 1,6 μL ; adição de sal: não. 46
- Figura 15.** Cromatograma obtido após extração de uma matriz de água potável, acima; seguido do cromatograma obtido a partir da extração da matriz fortificada com organoclorados e piretroides, onde: (1) $t_R = 5,6$ min: hexacloro-benzeno; (2) $t_R = 6,0$ min: lindano; (3) $t_R = 7,5$ min: heptacloro; (4) $t_R = 8,4$ min: aldrin; (5) $t_R = 9,6$ min: heptacloro epóxido; (6) $t_R = 10,7$ min: endossulfam; (7) $t_R = 11,7$ min: dieldrin; (8) $t_R = 12,5$ min: endrin; (9) $t_R = 14,6$ min: DDT; (10) $t_R = 17,0$ min: metoxicloro (11) $t_R = 18,1$ e 18,3 min: λ -cialotrina; (12) $t_R = 19,1$ e 19,3 min: permetrina; (13) $t_R = 20,4$; 20,5 e 20,7 min: cipermetrina; (14) $t_R = 22,8$ e 23,2 min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 150 $^{\circ}\text{C}$ /1 min 48

(30 °C min⁻¹) 200 °C (3 °C min⁻¹) 240 °C (20 °C min⁻¹) 290 °C/6 min;
temperatura do injetor 280 °C (“*split*” de 1:5) e temperatura do detector
300 °C.

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Estruturas químicas e valores máximos permitidos (VMP) para trialometanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides	3
Tabela 2. Precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	23
Tabela 3. Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos trialometanos, agrotóxicos organoclorados e piretroides estudados	24
Tabela 4. Recuperações relativas obtidas pela análise de água superficial fortificada	25
Tabela 5. Planejamento unifatorial para otimização das condições de extração de agrotóxicos em amostras de água	35
Tabela 6. Volumes de microgota recuperado após cada tempo de contato com a fase aquosa	39
Tabela 7. Volumes de microgota recuperado após 15 min de contato com a fase aquosa sob diferentes velocidades de agitação	41
Tabela 8. Teste de Tukey para os valores médios das áreas dos picos cromatográficos dos analitos obtidas para cada volume de microgota	42
Tabela 9. Precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	50
Tabela 10. Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos organoclorados e piretroides estudados	51
Tabela 11. Recuperações relativas obtidas pela análise de água potável fortificada	51
Tabela 12. Condições de extração otimizadas para as técnicas de MEFS-HS e MEGU-ID	58
Tabela 13. Precisão intermediária, linearidade, recuperação relativa e limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos desenvolvidos associando a cromatografia gasosa às técnicas de microextração em fase sólida e microextração em gota única	60
Tabela 14. Parâmetros de validação para os trialometanos do método analítico desenvolvido associando a cromatografia gasosa à técnica de microextração em fase sólida	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas
CV	Coeficiente de Variação
DCE	Detector por Captura de Elétrons
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EPA	Environmental Protection Agency
ETA	Estação de Tratamento de Água
FDA	Food and Drug Administration
HS	Headspace
ICH	Conferência Internacional em Harmonização
ID	Imersão Direta
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MEGU	Microextração em Gota Única
PDMS	Polidimetilsiloxano
THM	Trihalometanos
t_R	Tempo de Retenção
VMP	Valor Máximo Permitido
WHO	World Health Organization

RESUMO

CARLOS, Elenice Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Determinação simultânea de triálometanos e agrotóxicos em água empregando microextração em fase sólida e microextração em gota única por cromatografia gasosa.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e César Reis.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos para determinação simultânea de triálometanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides em água. Para proporcionar protocolos experimentais ambientalmente seguros, a cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons foi associada a técnicas de preparo de amostra que não emprega solvente orgânico, ou que o volume deste é significativamente reduzido, como é o caso das técnicas de microextração em fase sólida e microextração em gota única, respectivamente. A microextração em fase sólida foi empregada no modo indireto (MEFS-HS), sendo avaliados os fatores adição de sal (Na_2HPO_4), temperatura e tempo de extração na sua otimização. A microextração em gota única foi empregada por imersão direta (MEGU-ID), sendo as variáveis experimentais solvente extrator, volume da microgota, tempo de contato da microgota com a solução aquosa, velocidade de agitação, adição de sal (NaCl) e volume de amostra avaliados a fim de maximizar o desempenho da técnica. Após a otimização das técnicas, a seletividade, linearidade, precisão intermediária, exatidão e limites de detecção e quantificação dos métodos foram determinados. Os dois métodos permitiram a análise simultânea de agrotóxicos organoclorados e piretroides em água, sendo que a MEFS-HS possibilitou também a análise de triálometanos (THM). Foram obtidos coeficientes de variação (CV) entre 3 e 21% e recuperações relativas entre 70 e 125%. Os protocolos desenvolvidos também apresentaram seletividade e linearidade adequadas, com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,95. Os limites de detecção dos analitos de interesse encontram-se entre 0,003 e $3 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo todos inferiores aos respectivos valores máximos permitidos (VMP) pela legislação nacional (Ministério da Saúde) e internacional (Organização Mundial da Saúde) para água potável. Amostras de água potável foram analisadas empregando os métodos propostos, não sendo detectado

nenhum dos agrotóxicos. A partir da MEFS-HS foram detectados nas amostras analisadas os trialometanos clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano em concentrações iguais a 4,4; 3,8 e 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A soma da concentração de trialometanos foi menor do que 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ em todas as amostras analisadas, valor menor do que o VMP estabelecido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004, que é de 100 g L^{-1} para a soma dos quatro principais trialometanos.

ABSTRACT

CARLOS, Elenice Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011. **Simultaneous determination of trihalomethanes and pesticides in water using solid phase microextraction and single drop microextraction by gas chromatography.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Antônio Augusto Neves e César Reis.

This study aimed to develop methods for simultaneous determination of organochlorine pesticides, trihalomethanes and pyrethroids in water. In order to provide environmentally friendly experimental protocols, gas chromatography with electron capture detector was associated with sample preparation techniques, that uses no organic solvent, or that this volume is significantly reduced, as in solid phase microextraction and single drop microextraction, respectively. The solid phase microextraction was carried out in the headspace (HS-SPME), and factors such as, addition of salt (Na_2HPO_4), temperature and extraction time for optimization were evaluated. Single drop microextraction was used in direct immersion mode (MEGU-DI), and experimental variables such as organic solvent, volume of the microdrop, contact time of the microdrop with the aqueous solution, stirring rate, addition of salt (NaCl) and sample volume were evaluated to maximize the performance of the technique. After optimization the methods were validated through the following parameters: linearity, intermediate precision, accuracy and limits of detection and quantification. Both methods allow the simultaneous analysis of organochlorine pesticides and pyrethroids in water, and the HS-SPME also allowed the analysis of trihalomethanes (THM). Coefficients of variation (CV) between 3 and 21% and relative recoveries between 70 and 125% were obtained. The protocols developed also showed selectivity and linearity adequate, with correlation coefficients (r) greater than 0.95. The detection limits of all pesticides under study are between $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ and $3 \mu\text{g L}^{-1}$, being all below their respective maximum contaminant level (MCL) allowed by national (Ministério da Saúde) and international (World Health Organization) legislation for drinking water. Drinking water samples were analyzed using the proposed methods and any of the pesticides were detected. Using HS-SPME, the trihalomethanes chloroform, bromodichloromethane and dibromochloromethane at concentrations of 4.4, 3.8 and $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, were detected in water samples. The sum of the

concentration of trihalomethanes was less than $9 \mu\text{g L}^{-1}$ in all samples, a value lower than the MCL established by Brazilian legislation (Portaria 518 of the Ministério da Saúde, March 25, 2004), which is $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for the sum of the four main trihalomethanes.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho intitulado “Determinação Simultânea de Trialometanos e Agrotóxicos em Água Empregando Microextração em Fase Sólida e Microextração em Gota Única por Cromatografia Gasosa” está organizado em Introdução Geral; Capítulos 1, 2 e 3; Consideração Final e Referências Bibliográficas. Com relação às referências bibliográficas, estas foram organizadas em uma lista única no final do trabalho para facilitar a consulta.

No Capítulo 1 foi descrito o desenvolvimento e avaliação do desempenho analítico de um método para determinação simultânea de trialometanos e agrotóxicos em água empregando microextração em fase sólida e cromatografia gasosa. Este trabalho foi publicado na revista Química Nova (Elenice A.Carlos, Antônio A. Neves, César Reis, Maria Eliana L. R. de Queiroz; Quim. Nova 2011, 34, 272) com o título “Determinação simultânea de trialometanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa”.

No Capítulo 2 foi apresentado um método para determinação simultânea de agrotóxicos em água empregando microextração em gota única e cromatografia gasosa. Este trabalho foi submetido (Elenice A.Carlos, Antônio A. Neves, Maria Eliana L. R. de Queiroz) a uma revista indexada com o título “Simultaneous determination of pesticides in water by single drop microextraction and gas chromatography”.

Uma comparação entre os dois métodos propostos foi apresentada no Capítulo 3.

INTRODUÇÃO GERAL

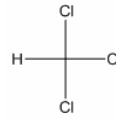
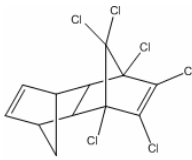
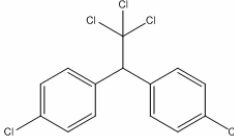
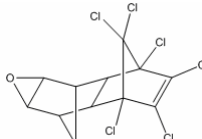
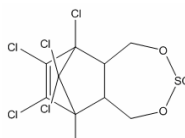
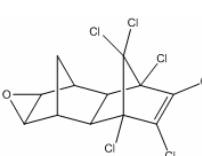
A presença de contaminantes tóxicos em águas superficiais pode causar depreciação da qualidade de águas destinadas ao consumo humano se tais substâncias não forem removidas durante o processo de tratamento de água. Dentre as diversas fontes de contaminação da água destaca-se a atividade agrícola, responsável pela introdução de agrotóxicos no ambiente aquático. A exposição do homem a estas substâncias, de forma direta ou indireta, pode causar intoxicações agudas e crônicas e aumentar a incidência de doenças graves, como o câncer [1, 2].

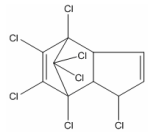
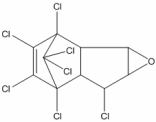
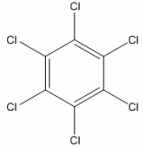
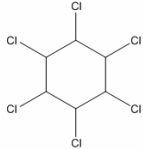
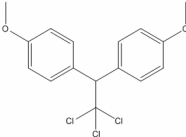
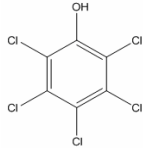
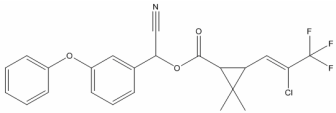
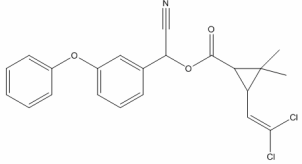
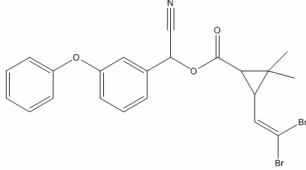
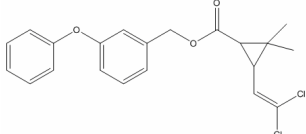
Para evitar riscos à saúde da população, a qualidade de águas destinadas ao consumo humano deve ser constantemente avaliada. A fim de nortear tal avaliação, órgãos como Organização Mundial da Saúde (WHO) e Ministério da Saúde, em âmbito nacional, estabelecem valores guia para uma série de substâncias químicas que representam risco à saúde, dentre elas os agrotóxicos [1, 3]. No Brasil, estes valores guia foram fixados pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004. A maioria dos agrotóxicos contemplados nesta Portaria são organoclorados, os demais são compostos pertencentes a diferentes classes, como organofosforados e piretroides [3].

Outra classe de compostos monitorados pela Portaria 518 é a dos trihalometanos. Estas substâncias são denominadas produtos secundários da desinfecção, sendo formadas na etapa de cloração da água. Os principais trihalometanos são o clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio. A presença desses compostos em águas destinadas ao consumo humano pode representar risco à saúde, pois são considerados possivelmente cancerígenos [1, 4].

Na Tabela 1 estão apresentados as estruturas químicas e os valores máximos permitidos (VMP) em águas destinadas ao consumo humano estabelecidos pela legislação nacional e internacional para os trihalometanos, organoclorados e piretroides considerados neste trabalho.

Tabela 1. Estruturas químicas e valores máximos permitidos (VMP) para trialometanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides

Compostos	Estrutura química	VMP (µg L ⁻¹)	
		Brasil ^a	WHO ^b
Trialometanos			
Bromodiclorometano		100*	60
Bromofórmio		100*	100
Clorofórmio		100*	300
Dibromoclorometano		100*	100
Organoclorados			
Aldrin		0,03	0,03
DDT		2	1
Dieldrin		0,03	0,03
Endossulfam		20	---
Endrin		0,6	0,6

Heptacloro		0,03	---
Heptacloro Epóxido		0,03	---
Hexaclorobenzeno		1	---
Lindano		2	2
Metoxicloro		20	20
Pentaclorofenol		9	9
Piretroides			
λ-Cialotrina		---	---
Cipermetrina		---	---
Deltametrina		---	---
Permetrina		20	300

VMP = Valor máximo permitido, ^aPortaria 518 do Ministério da Saúde (2004), ^bWorld Health Organization (2008), *Valor referente à soma das concentrações dos quatro trialometanos.

Os valores adotados pela legislação brasileira são iguais à maioria daqueles adotados por WHO, sendo que para os agrotóxicos em comum nessas duas listas, apenas os valores estabelecidos para DDT e permetrina são diferentes. O valor adotado para DDT é menos restritivo na legislação brasileira ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) do que em WHO ($1 \mu\text{g L}^{-1}$). Já para a permetrina a legislação brasileira é mais restritiva, adotando o valor de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto o valor adotado por WHO é de $300 \mu\text{g L}^{-1}$.

Conforme apresentado na Tabela 1, os VMP estabelecidos pela Portaria 518 são muito baixos, chegando, por exemplo, a $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para o aldrin, dieldrin, heptacloro e heptacloro epóxido.

A exigência de baixos níveis de concentração para uma diversidade de substâncias que devem ser monitoradas em águas destinadas ao consumo humano tem requerido o estabelecimento de métodos que permitam a análise multirresíduo de agrotóxicos, com elevada detectabilidade.

A cromatografia gasosa vem sendo amplamente empregada para este fim, permitindo a separação, identificação e quantificação simultânea de agrotóxicos pertencentes a uma ou mais classes [5-7], em níveis inferiores àqueles estabelecidos pela legislação nacional e internacional [1, 3]. Esta técnica é também empregada com sucesso para determinação de trialometas [8, 9]. Uma desvantagem do emprego da cromatografia gasosa é a necessidade de etapas prévias de preparo de amostra que podem tornar o método demorado e envolver a geração de resíduos tóxicos, sendo fonte significativa de poluição [10]. Exemplos disto são as tradicionais técnicas de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS), que exigem várias etapas de manipulação e empregam solventes orgânicos potencialmente tóxicos e normalmente caros, devido ao elevado grau de pureza exigido [11].

Para resolver esta questão, novas técnicas foram desenvolvidas a partir da miniaturização da ELL e EFS, dentre elas destacam-se a microextração em fase sólida (MEFS) e a microextração em gota única (MEGU). Estas técnicas, além de serem ambientalmente amigáveis [10], por não empregarem solventes orgânicos (MEFS) ou reduzirem significativamente o consumo de tais substâncias (MEGU), também tornaram a etapa de preparo de amostra mais simples, rápida e de menor custo.

A microextração em fase sólida foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1990 [12] e vem sendo empregada extensivamente na extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais [6, 13] e de alimentos [14, 15], além da extração de triolometanos em amostras de água [8, 9]. A MEFS consiste em duas etapas básicas: a partição dos analitos entre a amostra e uma fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico, e a dessorção térmica dos analitos no injetor do cromatógrafo a gás [16]. A MEFS é uma técnica de equilíbrio, portanto não extrai exaustivamente os analitos, mas oferece elevada detectabilidade por concentrar os analitos em um volume muito pequeno de fase extratora.

Introduzida por Jeannot e Cantwell, em 1996 [17] e aprimorada pelos mesmos pesquisadores no ano seguinte [18], a microextração em gota única é também uma técnica empregada com sucesso na extração de agrotóxicos [19, 20] e triolometanos [21]. Assim como a MEFS, a MEGU é uma técnica de equilíbrio e a fase extratora neste caso é uma microgota de solvente orgânico suspensa na ponta da agulha de uma microseringa. Durante a extração, ocorre a partição dos analitos entre a amostra e a fase orgânica, e, após um determinado período de tempo, a microgota é recolhida para dentro da microseringa e introduzida diretamente no sistema cromatográfico para análise. Tanto a MEGU quanto a MEFS podem ser empregadas pelo modo direto (MEGU-ID, MEFS-ID), mantendo a fase extratora em contato direto com a amostra; ou pelo modo indireto (MEGU-HS, MEFS-HS), mantendo a fase extratora em contato com o espaço vazio (*headspace*) acima da amostra.

Métodos analíticos têm sido propostos para análise multirresíduo de agrotóxicos e de triolometanos em protocolos distintos para cada um desses grupos de compostos. Neste trabalho foi desenvolvido método de análise simultânea de triolometanos e agrotóxicos em água empregando a MEFS acoplada à cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE). Além de unir estes grupos de compostos em um único protocolo experimental, neste trabalho foi empregada a MEFS-HS para determinação tanto de compostos voláteis quanto para compostos pouco voláteis, como é o caso dos piretroides. Outro método foi desenvolvido para análise dos agrotóxicos empregando a MEGU-ID acoplada à CG-DCE. Os dois métodos tiveram seus desempenhos analíticos avaliados sendo realizada uma comparação entre os mesmos.

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TRIALOMETANOS E AGROTÓXICOS EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

1.1 INTRODUÇÃO

A depreciação da qualidade de águas superficiais e consequente escassez de água adequada para o consumo humano é atualmente uma preocupação de órgãos públicos ambientais e de saúde. Essa depreciação pode ser causada pela presença de substâncias potencialmente tóxicas como metais pesados, compostos nitrogenados, fenóis, trialometanos, BTX (benzeno, tolueno e xileno), agrotóxicos, dentre outras [3, 22].

Os agrotóxicos organoclorados destacam-se entre os principais agentes contaminantes por apresentarem elevada persistência ambiental. Esses compostos foram intensamente empregados no combate a insetos transmissores de doenças fatais como malária e febre amarela, e também no controle de pragas que afetavam a produção agrícola [23]. Devido ao potencial tóxico e por serem bioacumulativos e persistentes no meio ambiente, os organoclorados tiveram seu uso restrito ou suprimido em muitos países [24]. No Brasil, a comercialização, o uso e a distribuição de alguns agrotóxicos organoclorados destinados à agropecuária foram proibidos em 1985 pela portaria 329 do Ministério da Agricultura [25]. Esta medida não eliminou completamente o emprego desses compostos no Brasil, uma vez que permitia a utilização de alguns organoclorados em iscas formicidas (aldrin e dodecacloro), em campanhas de saúde pública e na agricultura em caráter emergencial [25]. A partir de 14 de maio de 2009 uma medida mais rigorosa foi adotada para o DDT pela sanção da Lei Nº 11.936 que proíbe a fabricação, importação, exportação, manutenção em estoque, comercialização e o uso do DDT em todo o território nacional [26].

Para substituir os compostos organoclorados foram introduzidos novos produtos no mercado. Dentre esses se destacam os piretroides, que vêm

sendo amplamente empregados em atividades agropecuárias, em formulações de uso doméstico e em campanhas de saúde pública, para o controle de vetores de doenças [27]. Esses compostos apresentam a vantagem de serem praticamente atóxicos para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas, além do baixo efeito residual [28].

A intensa utilização dos agrotóxicos, o seu potencial tóxico, a persistência no ambiente e acumulação nas cadeias alimentares mostram a necessidade do monitoramento de resíduos em alimentos e em matrizes ambientais. Atenção especial deve ser dada à água potável, pois o consumo diário de água contaminada com resíduos de agrotóxicos pode causar efeitos tóxicos, como câncer e danos no sistema nervoso central, dependendo do tipo de composto e da quantidade ingerida [1].

Tendo em vista a possibilidade de consumo, pela população, de água contaminada, órgãos como WHO (*World Health Organization*), EPA (*Environmental Protection Agency, USA*) e Ministério da Saúde, no Brasil, estabeleceram valores máximos permitidos (VMP) para agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano.

No Brasil, o padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos à saúde humana é estabelecido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004. Nessa portaria a maioria dos agrotóxicos listados pertence à classe dos organoclorados. Os VMP, para esse grupo de agrotóxicos, variam entre $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ (aldrin, dieldrin, heptacloro e heptacloro epóxido) e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (alaclor, endossulfam e metoxicloro). Outro agrotóxico presente nesta lista com um VMP de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ é a permetrina, pertencente ao grupo dos piretroides. Atualmente este é o único piretroide presente nesta lista, apesar do amplo espectro de atuação dessa classe de compostos [3].

Além dos agrotóxicos, os trialometanos também são monitorados pelos órgãos nacionais e internacionais que estabelecem os padrões de potabilidade. Trialometanos (THM) são subprodutos de desinfecção formados na etapa de cloração da água. Esses compostos podem representar risco à saúde humana, pois são considerados possivelmente cancerígenos [1, 4]. O VMP adotado pela Portaria 518 para THM total é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde à soma das concentrações dos quatro principais THM: clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio [3].

A avaliação da qualidade de águas para consumo humano relativa à presença de agrotóxicos, trialometanos e outros compostos orgânicos pode ser feita empregando técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia gasosa [8, 29, 30]. Por esta técnica as substâncias são separadas, identificadas e quantificadas, sendo necessária, entretanto, etapa prévia de extração e concentração.

A microextração em fase sólida (MEFS) é uma das técnicas de extração mais empregada atualmente, principalmente quando se trata de extração multirresíduo de compostos orgânicos em amostras de água. Estudos reportados na literatura têm mostrado a eficiência desta técnica para extração de trialometanos [8], piretroides [29, 30], organoclorados [13], além de propostas de extração simultânea de agrotóxicos pertencentes a diferentes classes [6, 31]. Os métodos de análise multirresíduo apresentados na literatura associam diferentes classes de agrotóxicos, porém, não sugerem a associação de agrotóxicos e trialometanos em um único método. Além disso, os métodos propostos para extração de piretroides sugerem que a MEFS seja realizada por imersão da fibra na amostra (modo direto) [6, 29-32].

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para análise simultânea dos trialometanos, clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio; dos agrotóxicos organoclorados, aldrin, DDT, dieldrin, endossulfam, endrin, lindano, heptacloro, hexaclorobenzeno e pentaclorofenol; e dos piretroides, λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina em águas. As técnicas de MEFS, por *Headspace* (HS), e cromatografia gasosa (CG), com um detector por captura de elétrons (DCE), foram empregadas para extração e quantificação dos analitos de interesse.

1.2 PARTE EXPERIMENTAL

1.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. As soluções estoque de piretroides foram preparadas a partir de padrões de λ -cialotrina (pureza = 86,5%) e permetrina (pureza = 92,2%) obtidos da Syngenta, Ltd.

(Bracknell, Berkshire, UK), de cipermetrina (pureza = 92,4%) obtido da Chem Service, Inc. (West Chester, PA, USA) e de deltametrina (pureza = 98%) obtido da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha), em acetonitrila (Tedia/HPLC-Spectro). As soluções estoque de organoclorados foram preparadas em metanol (Merck/PA) a partir de padrões de aldrin (pureza = 98,5%), DDT (pureza = 98,8%), heptacloro (pureza = 99,5%) e pentaclorofenol (pureza = 99,6%) obtidos da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, USA) e padrões de dieldrin (pureza = 97,9%), endossulfam (pureza = 91,5%), endrin (pureza = 99,3%), lindano (pureza = 99,8%) e hexaclorobenzeno (pureza = 99,8%) obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha). A partir das soluções estoque individuais, foram preparadas duas soluções estoque: uma contendo os quatro piretroides em acetonitrila e a outra contendo os nove organoclorados em metanol. Uma solução estoque de trialomitanos, em metanol (Merck/PA), foi preparada a partir de uma mistura padrão obtida da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, USA), em metanol, contendo clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram estocadas a -18°C . A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações adequadas.

1.2.2 Amostras

Nas etapas de otimização e validação do método foi utilizada água ultra pura.

O método otimizado foi aplicado em amostras de água tratada, que foram coletadas em quatro pontos da rede de distribuição e no reservatório da estação de tratamento de água (ETA) que abastece o município de Viçosa, MG. Foram também coletadas amostras em dois pontos do Ribeirão São Bartolomeu, no local de captação de água da ETA e à jusante do município de Viçosa, MG. As amostras foram coletadas em frascos de vidro de 44 mL equipados com tampa de teflon e septo de silicone, contendo 3 mg de sulfito de sódio. Os frascos foram totalmente preenchidos com as amostras evitando a formação de bolhas e mantidos sob refrigeração, a 4°C . A extração e análise cromatográfica foram realizadas no mesmo dia da coleta.

1.2.3 MEFS-HS

Os ensaios de otimização da técnica para determinação simultânea de trialométanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides por MEFS-HS, foram realizados empregado um suporte (*Holder*) manual para MEFS (Supelco, Bellefort, USA) equipado com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de espessura (Supelco, Bellefort, USA).

Amostras de 25,0 mL de água fortificadas com os 17 analitos de interesse a uma concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram colocadas em frascos de vidro de 44 mL de capacidade e 2,5 cm de diâmetro, equipados com tampa de teflon e septo de silicone. Os frascos contendo as amostras foram transferidos para um sistema com temperatura controlada, previamente ajustada. A fibra foi colocada em contato com a parte gasosa da amostra (*headspace*) durante o período de aquecimento. Um desenho esquemático está apresentado na Figura 1. Após extração, a fibra foi retirada do frasco e introduzida no injetor do cromatógrafo a gás. Os analitos foram termicamente dessorvidos da fibra, durante 10 minutos, sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica.

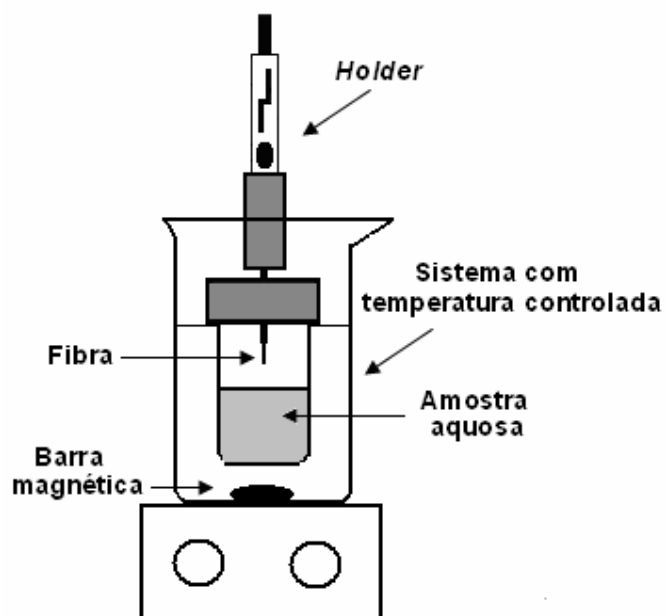


Figura 1. Desenho esquemático da MEFS-HS.

Fonte: adaptado de ULRICH, 2000 [33].

Para estabelecer as melhores condições de extração dos analitos em água, foram avaliados a adição de sal (0 e 2% m/v de Na_2HPO_4), a temperatura do sistema (40 e 60 °C) e o tempo de aquecimento (30 e 50 min). As melhores condições de extração foram avaliadas comparando os valores de áreas dos picos referentes aos analitos de interesse em cada ensaio.

1.2.4 Análises Cromatográficas

Para determinação simultânea dos trihalometanos e dos agrotóxicos organoclorados e piretroides foi empregado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 2014, com detector por captura de elétrons. As separações foram realizadas em uma coluna capilar Rtx-5MS, Restek (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme). As condições cromatográficas de análise foram: temperatura do injetor 250 °C, temperatura do forno da coluna 40 °C (2 min), com rampa de aquecimento de 20 °C/min até 200 °C, seguida de rampa de 4 °C/min até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 2 min e temperatura do detector de 300 °C. Vazão do gás de arraste (N_2) de 1,2 mL min⁻¹ e divisão de fluxo (*split*) de 1:5. A fibra ficou exposta no injetor por 10 minutos.

Para as análises por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) utilizou-se um equipamento da Shimadzu, modelo GC-2010, com uma coluna Rtx-5MS, Restek (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme). O injetor foi mantido a 250 °C, com a razão de divisão de fluxo (*split*) de 1:5. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 °C por 2 min, seguida de rampas de aquecimento de 20 °C/min até 200 °C e de 4 °C/min até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 2 min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste empregando uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. A fibra ficou exposta ao injetor durante 10 minutos.

Para a detecção por espectrometria de massas utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI-70eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado no modo varredura linear (*SCAN*) 40-500 *m/z* para identificação dos compostos. A interface foi mantida a 310 °C e a fonte de íons a 200 °C.

1.2.5 Validação

O método foi validado baseando-se nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [34], Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [35], Agência Reguladora dos Estados Unidos (FDA) [36] e Conferência Internacional em Harmonização (ICH) [37], que estabelecem critérios de validação de métodos analíticos. Os parâmetros analíticos avaliados foram: precisão, linearidade, exatidão, seletividade e limites de detecção e de quantificação.

O método validado foi empregado para a determinação dos 17 compostos em amostras de água destinada ao consumo humano e água superficial do município de Viçosa, MG.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Análise Cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos 17 compostos permitiu a completa separação de todos os analitos com um tempo de análise de 35 minutos. Na Figura 2 está representado um cromatograma obtido após análise de água ultra pura fortificada com os trihalometanos, organoclorados e piretroides em concentrações iguais a 60, 2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

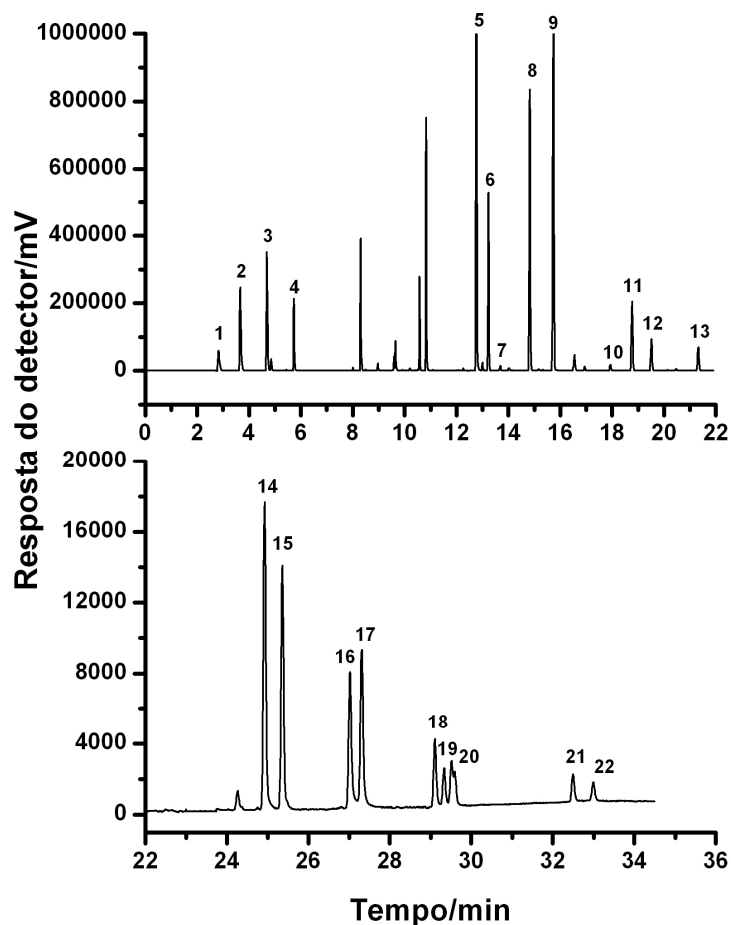


Figura 2. Cromatograma obtido da análise de água ultra pura fortificada com trialometas, organoclorados e piretroides em concentrações iguais a 60, 2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, onde: (1) $t_R = 2,8$ min: clorofórmio; (2) $t_R = 3,6$ min: bromodiclorometano; (3) $t_R = 4,7$ min: dibromoclorometano; (4) $t_R = 5,7$ min: bromofórmio; (5) $t_R = 12,7$ min: hexaclorobenzeno; (6) $t_R = 13,2$ min: lindano; (7) $t_R = 13,6$ min: pentaclorofenol; (8) $t_R = 14,8$ min: heptacloro; (9) $t_R = 15,7$ min: aldrin; (10) $t_R = 17,9$ min: endossulfam; (11) $t_R = 18,7$ min: dieldrin; (12) $t_R = 19,5$ min: endrin; (13) $t_R = 21,3$ min: DDT; (14) $t_R = 24,9$ min e (15) $t_R = 25,3$ min: λ -cialotrina; (16) $t_R = 27,0$ min e (17) $t_R = 27,3$ min: permetrina; (18) $t_R = 29,1$ min, (19) $t_R = 29,3$ min e (20) $t_R = 29,5$ min: cipermetrina; (21) $t_R = 32,4$ min e (22) $t_R = 32,9$ min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 40 $^{\circ}\text{C}/2$ min (20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 200 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 290 $^{\circ}\text{C}/2$ min; temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$ (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}\text{C}$.

1.3.2 Otimização da MEFS-HS

A extração de trialometanos e agrotóxicos em amostras de água pode ser feita empregando a microextração em fase sólida pelo modo indireto [8, 38], mantendo a fibra em contato com o espaço vazio acima da matriz (*headspace*) ou pelo modo direto [6, 29], mantendo a mesma em contato com a matriz. Esse modo é mais utilizado para a extração de compostos de baixa volatilidade, como os piretroides. Esse modo direto, entretanto, apresenta a desvantagem de expor a fibra aos constituintes da matriz que poderiam ficar fortemente adsorvidos em sua superfície danificando-a ou exigindo etapa adicional de limpeza da fibra [39]. Para aumentar a vida útil da fibra e diminuir o número de etapas operacionais optou-se neste trabalho em empregar o modo indireto (MEFS-HS).

O método MEFS-HS consiste em aquecer a amostra aquosa, contida em um frasco com tampa equipada com septo de silicone, para provocar a volatilização dos compostos e concentração dos mesmos no espaço vazio do frasco. A fibra é exposta ao *headspace* e os analitos se distribuem entre a amostra, o *headspace* e a fibra. Este método é geralmente empregado para extração de compostos voláteis, mas também pode ser aplicado a compostos pouco voláteis desde que sejam adotados procedimentos que favoreçam a transferência dos mesmos para a fase gasosa. Os procedimentos adotados para este fim são o ajuste do pH e da força iônica da solução aquosa, aumento do tempo e da temperatura de extração, ajuste do volume de amostra e do *headspace*, além do aumento da velocidade de agitação da amostra [39].

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da temperatura, tempo de extração e adição de Na_2HPO_4 . Em cada ensaio os valores de área para os picos referentes a cada um dos analitos foram registrados e as porcentagens de aumento de resposta foram calculadas. Os piretroides apresentaram picos duplos, devido à conversão em isômeros durante a injeção no cromatógrafo [40]. O valor da área atribuído a esses analitos foi considerado como sendo o somatório das áreas dos picos dos respectivos isômeros.

1.3.2.1 Temperatura de extração

A mudança da temperatura de extração tem efeitos importantes quando emprega-se a MEFS-HS. No que se refere à extração dos analitos, o aumento da temperatura provoca aumento na constante de Henry, favorecendo a transferência dos analitos da fase aquosa para o *headspace*, e consequentemente, a transferência para a fibra. Outro efeito causado pelo aumento da temperatura de extração é a diminuição do tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio, devido ao aumento do coeficiente de difusão [41].

Neste trabalho, as temperaturas a que foram submetidas as amostras foram 40 e 60 °C. Observou-se que na extração à temperatura de 40 °C durante 30 min de aquecimento e sem adição de sal, nenhum dos quatro piretroides foi extraído em quantidade suficiente para ser detectado. Quando a extração foi realizada nas mesmas condições, aumentando apenas a temperatura para 60 °C, houve aumento nas respostas de todos os analitos e foi possível detectar os quatro piretroides em estudo. A influência da temperatura na taxa de extração de compostos foi observada também em outros trabalhos que utilizaram a técnica de MEFS-HS para extração de uma ou mais classes de compostos em amostras de água [8, 42]. Para compostos pouco voláteis, como organoclorados e piretroides, o aumento da temperatura favoreceu a extração dos analitos, sendo adotadas temperaturas próximas a 60 °C [5, 38].

Temperaturas superiores a 60 °C foram estudadas previamente neste trabalho, mas apresentaram o inconveniente da formação de vapor d'água no *headspace*, sendo observado condensação de água na ponta da agulha do *holder*. Para os ensaios posteriores foi adotada a temperatura de 60 °C.

1.3.2.2 Adição de sal

Para avaliar a influência da adição de Na_2HPO_4 na extração dos analitos foram empregados tempo e temperatura de extração iguais a 30 min e 60 °C, respectivamente. As concentrações avaliadas foram de 0 e 2% (m/v) de Na_2HPO_4 . Com a adição de sal não foram observadas alterações significativas,

em nível de 95% de confiança pelo teste t de “*Student*”, nas respostas cromatográficas da maioria dos trialometanos e organoclorados. Foram observadas reduções nas respostas do bromofórmio e do hexaclorobenzeno de 6 e 21%, respectivamente, e aumentos nas áreas dos picos da λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina de 81, 102, 12 e 29%, respectivamente. Aumentos na taxa de extração de piretroides em função do aumento da força iônica da solução aquosa foram observados também por outros pesquisadores [43, 44]. Considerando a maior facilidade de transferência dos trialometanos e organoclorados para a fase gasosa, devido à maior volatilidade desses em relação aos piretroides, e considerando o aumento expressivo nas respostas da λ -cialotrina e permetrina pela adição do sal, foi adotada a adição de 2% (m/v) de Na_2HPO_4 no procedimento de extração simultânea dos analitos.

1.3.2.3 Tempo de extração

A MEFS-HS é uma técnica de equilíbrio, sendo, portanto, muito importante a determinação do tempo necessário para o sistema alcançar tal condição [42]. Analitos com elevada massa molecular necessitam de um tempo maior para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido [39]. Isto poderia ser um inconveniente para a aplicação desta técnica para algumas classes de compostos, como piretroides, por exemplo. No entanto, é possível trabalhar fora das condições de equilíbrio, desde que este parâmetro seja rigorosamente controlado, pois neste caso a contribuição cinética passa a ser fundamental [39]. Desde que seja alcançada a detectabilidade desejada, a opção por trabalhar em condição de não equilíbrio é importante para evitar um elevado tempo de extração, superiores a 60 min, por exemplo, o que não seria razoável para um protocolo experimental [6].

O efeito do tempo de exposição da fibra foi avaliado a 30 e 50 min, empregando 2% (m/v) de Na_2HPO_4 e temperatura de extração de 60 °C. Observou-se aumento nas respostas de todos os analitos, quando o tempo de extração foi aumentado de 30 para 50 min, principalmente para os piretroides. Para esses compostos foi observado um aumento de 65, 83, 95 e 112% nas respostas da λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. Tempos de extração superiores a 50 min proporcionaram

aumento nas respostas dos analitos, principalmente dos piretroides, indicando que o sistema ainda não havia alcançado o equilíbrio. Em estudos prévios foi constatado que o tempo necessário para o sistema atingir tal condição é superior a 120 min. A Figura 3 apresenta as áreas dos picos dos piretroides obtidas quando empregados tempos de extração de 50 e 120 min.

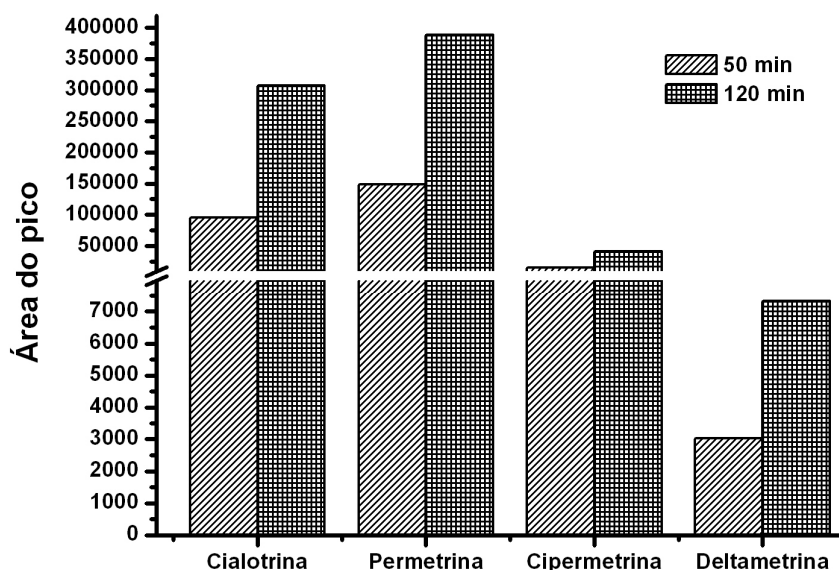


Figura 3. Aumento da resposta cromatográfica da λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, em função do tempo de extração.

Para sincronizar o tempo de extração com o tempo necessário para análise e condicionamento do cromatógrafo a gás entre as injeções foi adotado o tempo de 50 min, ou seja, optou-se por trabalhar fora do equilíbrio mantendo todas as condições de experimentais constantes durante as extrações de padrões e amostras, para evitar a interferência da componente cinética nos resultados. A escolha deste tempo permitiu aumentar a frequência analítica e viabilizar a aplicação do método em análises de rotina.

1.3.3 Validação

Após otimização da MEFS-HS, o método proposto para determinação simultânea de trihalometanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides em água foi validado. Tal método consiste em transferir 25,0 mL de amostra de água para um frasco de vidro de 44 mL de capacidade e 2,5 cm de diâmetro, equipado com tampa de teflon e septo de silicone, contendo 0,500 g de Na_2HPO_4 . O sistema é aquecido a uma temperatura constante de 60 °C por 50 minutos. A fibra PDMS de 100 μm fica exposta no espaço vazio do frasco (*headspace*) durante todo o período de aquecimento. Após extração, a fibra é retirada e introduzida no injetor do cromatógrafo à gás, sendo exposta durante 10 min. Os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica.

Para determinação do tempo de desorção foi feito um estudo prévio verificando que 10 min de exposição da fibra no injetor foram suficientes para desorção completa dos analitos. Trabalhos reportados na literatura empregaram tempos de desorção semelhantes a este para compostos da classe dos organoclorados [45] e piretroides [29].

1.3.3.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade o método otimizado foi aplicado em amostras de água superficial coletadas no local de captação de água da ETA do município de Viçosa, MG. Posteriormente essas amostras foram fortificadas com os 17 princípios ativos estudados e submetidas novamente ao método de extração e análise. Os cromatogramas referentes a essas amostras estão apresentados na Figura 4.

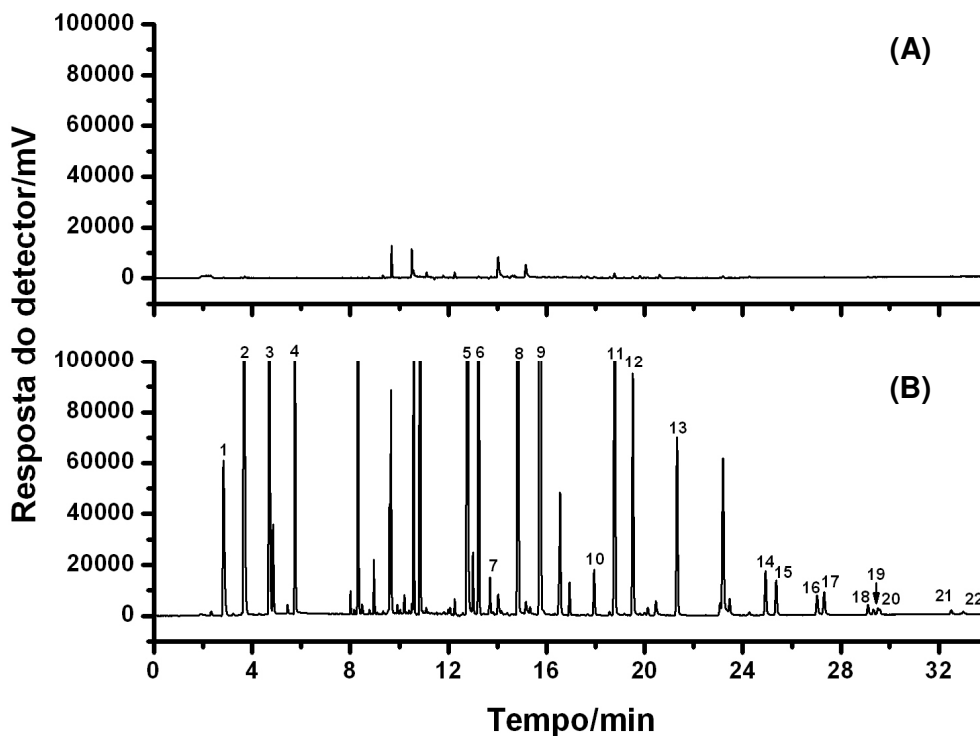


Figura 4. Cromatograma obtido após extração de uma matriz de água superficial (A), seguido do cromatograma obtido a partir da extração da amostra fortificada (B) com trialomitanos, agrotóxicos organoclorados e piretroides a 60, 2 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; onde: (1) clorofórmio; (2) bromodiclorometano; (3) dibromoclorometano; (4) bromofórmio; (5) hexaclo-robenzeno; (6) lindano; (7) pentaclorofenol; (8) heptacloro; (9) aldrin; (10) endossulfam; (11) dieldrin; (12) endrin; (13) DDT; (14) e (15) λ -cialotrina; (16) e (17) permetrina; (18), (19) e (20) cipermetrina; (21) e (22) deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a 40 $^{\circ}\text{C}/2$ min (20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 200 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) 290 $^{\circ}\text{C}/2\text{min}$; temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$ (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}\text{C}$.

Comparando os dois cromatogramas observa-se que não há picos coincidentes entre a matriz original e a matriz fortificada, desta forma as respostas dos analitos de interesse não sofrem interferência de outros componentes da matriz. Tal resultado comprova a boa seletividade do método proposto.

1.3.3.2 Limites de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção (LD) e de quantificação do método (LQ) foram determinados pela razão sinal/ruído. Amostras de água fortificadas com os analitos de interesse, em concentrações decrescentes, foram submetidas ao procedimento de extração e quantificação. Foram empregadas concentrações entre 1,0 e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os triálometanos, entre 1,0 e 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os organoclorados e entre 30 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os piretroides. Foi considerado como LD e LQ aquela concentração que produziu um sinal 3 e 10 vezes, respectivamente, superior ao ruído da linha de base. Os dados de LD e LQ são apresentados na Tabela 2.

Os valores de LD do método proposto são superiores àqueles obtidos por métodos empregados para análise de compostos pertencentes a uma única classe [5, 42]. No entanto, para todos os analitos estudados, os limites de quantificação do método proposto são menores do que os respectivos VMP estabelecidos pela legislação brasileira [3]. Vale ressaltar que para os piretroides tomou-se como referência o VMP estabelecido para a permetrina, uma vez que para os demais piretroides os valores guia ainda não foram estabelecidos. Estes resultados indicam que o método proposto apresenta detectabilidade adequada para aplicação do mesmo como protocolo experimental para o monitoramento dos analitos de interesse em águas destinadas ao consumo humano. Além disso, o método proposto permite a análise simultânea de vários analitos pertencentes a diferentes classes (trialometanos, organoclorados e piretroides).

1.3.3.3 Linearidade do método

Para avaliar a linearidade do método, curvas analíticas para os quatro triálometanos estudados foram construídas no intervalo entre 0,1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para os agrotóxicos organoclorados aldrin, dieldrin, heptacloro, hexacloro-benzeno e lindano foram construídas curvas analíticas no intervalo de 0,01 a 4 $\mu\text{g L}^{-1}$. O intervalo de concentração empregado para o DDT, endrin, endossulfam e pentaclorofenol foi de 0,05 a 4 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas referentes aos piretroides λ -cialotrina, permetrina e cipermetrina foram

construídas no intervalo de 1 a 140 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a deltametrina foi empregado o intervalo de concentração de 10 a 140 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram empregados sete níveis de concentração, sendo o LQ de cada composto o limite inferior da respectiva curva analítica. Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram maiores que 0,95 para todos os analitos estudados, conforme apresentado na Tabela 2. Tais resultados indicam que o método proposto apresenta linearidade adequada [34] nos intervalos de concentração estudados.

1.3.3.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pelo valor do coeficiente de variação (CV), obtido após análises executadas em três dias diferentes, sendo os ensaios realizados a cada 10 dias. Em cada ensaio sete amostras idênticas foram analisadas por um mesmo analista, no mesmo laboratório, sob as mesmas condições de trabalho. Para tal foram empregadas amostras fortificadas com triometanos e piretroides a 1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; e organoclorados a 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, exceto para o DDT, endossulfam e pentaclorofenol, cuja concentração empregada foi de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de CV obtidos para a maioria dos compostos foram menores que 15%. Os organoclorados pentaclorofenol e endossulfam apresentaram CV iguais a 19% (Tabela 2). Para esses compostos a concentração de fortificação das amostras submetidas aos ensaios de precisão intermediária foi igual aos limites de quantificação dos mesmos (0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$). Estes resultados estão de acordo com os critérios adotados pela Agência dos Estados Unidos que regula sobre alimentos e drogas (Food and Drug Administration), que recomenda que os resultados de CV não devem exceder a 15%, exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% [36].

Tabela 2. Precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Analito	Precisão*	Linearidade		LD	LQ
	(CV, %) ^a	Equações	r	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Trialometas					
Bromodiclorometano	5	$y = 13388x + 42763$	0,9933	0,03	0,1
Bromofórmio	3	$y = 6646,9x + 42710$	0,9806	0,03	0,1
Clorofórmio	9	$y = 4351,5x + 12901$	0,9961	0,15	0,5
Dibromoclorometano	3	$y = 13971x + 68477$	0,9863	0,03	0,1
Organoclorados					
Aldrin	10	$y = 2000000x + 216142$	0,9959	0,003	0,01
DDT	14	$y = 115808x + 31766$	0,9917	0,03	0,1
Dieldrin	9	$y = 257584x + 96094$	0,9624	0,003	0,01
Endossulfam	19	$y = 20253x + 15872$	0,9764	0,03	0,1
Endrin	6	$y = 111405x + 68547$	0,9541	0,015	0,05
Heptacloro	10	$y = 1000000x + 124886$	0,9968	0,003	0,01
Hexaclorobenzeno	12	$y = 2000000x + 411329$	0,9872	0,009	0,03
Lindano	3	$y = 445937x + 163003$	0,9607	0,009	0,03
Pentaclorofenol	19	$y = 18193x + 2741,2$	0,9905	0,03	0,1
Piretroides					
λ -Cialotrina	13	$y = 1837,5x - 1448,3$	0,9937	0,3	1
Cipermetrina	13	$y = 381,09x + 17192$	0,9832	0,3	1
Deltametrina	14	$y = 81,941x + 5531,9$	0,9660	3	10
Permetrina	15	$y = 676,22x + 21980$	0,9768	0,3	1

*Precisão intermediária, ^aCoeficiente de variação (n = 7), LD = Limite de detecção, LQ = Limite de quantificação.

1.3.3.5 Curvas analíticas

Para a determinação da recuperação relativa do método proposto e determinação dos analitos de interesse em águas superficiais e tratadas foram construídas curvas analíticas para cada um dos 17 analitos, empregando faixas de trabalho com intervalos de concentração mais restritos. Para tal, foram empregados seis níveis de concentração, dentro da faixa que melhor atendesse aos objetivos do trabalho, sendo o LQ de cada composto o limite inferior da curva analítica. Na Tabela 3 estão apresentados os intervalos de concentração empregados para cada analito. Os valores de coeficientes de correlação (r) obtidos para os analitos de interesse foram maiores que 0,99, exceto para o endrin, cujo valor de r foi igual a 0,97.

Tabela 3. Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos trialometanos, agrotóxicos organoclorados e piretroides estudados

	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	r
Trialometanos			
Bromodiclorometano	0,1 - 40	$y = 17322x + 2221,1$	0,9995
Bromofórmio	0,1 - 40	$y = 9800,2x + 9277,8$	0,9969
Clorofórmio	0,5 - 60	$y = 4698,9x + 9897,4$	0,9933
Dibromoclorometano	0,1 - 40	$y = 19514x + 9703,7$	0,9986
Organoclorados			
Aldrin	0,01 - 1	$y = 2000000x + 84803$	0,9978
DDT	0,1 - 4	$y = 112567x + 41122$	0,9916
Dieldrin	0,01 - 1	$y = 540004x + 15712$	0,9956
Endossulfam	0,1 - 4	$y = 19386x + 17510$	0,9914
Endrin	0,05 - 3	$y = 135171x + 57395$	0,9699
Heptacloro	0,01 - 1	$y = 2000000x + 24355$	0,9997
Hexaclorobenzeno	0,03 - 4	$y = 2000000x + 476578$	0,9910
Lindano	0,03 - 1	$y = 889580x + 35949$	0,9898
Pentaclorofenol	0,1 - 4	$y = 18593x + 802,23$	0,9959
Piretroides			
λ -Cialotrina	1 - 80	$y = 1507,5x + 7492,6$	0,9952
Cipermetrina	1 - 80	$y = 428,16x + 15282$	0,9956
Deltametrina	10 - 80	$y = 98,807x + 4880,4$	0,9858
Permetrina	1 - 80	$y = 919,2x + 13379$	0,9943

1.3.3.6 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada pela recuperação relativa. Amostras de água superficial foram fortificadas com os analitos de interesse em concentrações próximas aos LQ obtidos para cada composto. As amostras foram submetidas ao procedimento desenvolvido e as concentrações de cada analito foram calculadas através das equações obtidas por regressão linear das respectivas curvas analíticas. A Tabela 4 apresenta os valores das concentrações de fortificação de cada composto e as respectivas recuperações relativas.

Tabela 4. Recuperações relativas obtidas pela análise de água superficial fortificada

	Concentração de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Relativa* (%)
Trialometas		
Bromodiclorometano	1,0	70
Bromofórmio	1,0	90
Clorofórmio	1,0	120
Dibromoclorometano	1,0	110
Organoclorados		
Aldrin	0,03	100
DDT	0,1	90
Dieldrin	0,03	100
Endossulfam	0,1	120
Endrin	0,1	120
Heptacloro	0,03	100
Hexaclorobenzeno	0,03	100
Lindano	0,03	100
Pentaclorofenol	0,1	120
Piretroides		
λ -Cialotrina	20	125
Cipermetrina	20	95
Deltametrina	20	95
Permetrina	20	115

* n = 3

Os resultados de recuperação relativa obtidos para os compostos estudados estão dentro da faixa aceitável, 70 a 130% [46], indicando que o método proposto apresenta exatidão adequada para a determinação destes compostos em amostras de água.

1.3.4 Análise de amostras de água do município de Viçosa, MG

O método validado foi empregado para a determinação dos trialometanos clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio; dos organoclorados aldrin, DDT, dieldrin, endossulfam, endrin, lindano, heptacloro, hexaclorobenzeno e pentaclorofenol; e dos piretroides λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina; em amostras de água destinada ao consumo humano e água superficial do município de Viçosa, MG.

As amostras de água superficial não apresentaram nenhum dos 17 compostos estudados, dentro do limite de detecção do método. Já as amostras de água tratada apresentaram contaminação pelos trialometanos clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano. A identificação desses compostos foi realizada por CG-EM e a quantificação por CG-DCE. Nas Figuras 5 e 6 estão apresentados, respectivamente, o cromatograma obtido após análise de uma amostra de água tratada por CG-DCE e os espectros de massa obtidos por CG-EM.

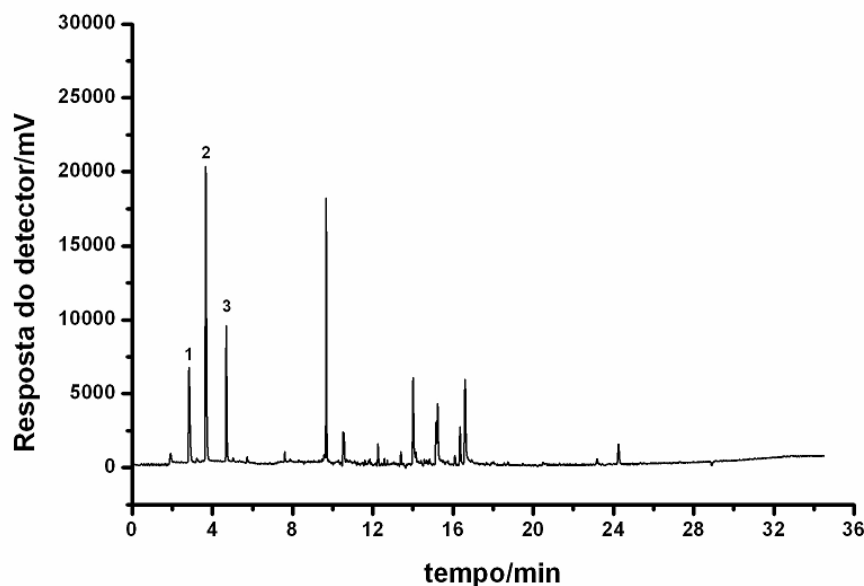


Figura 5. Cromatograma obtido da análise, por CG-DCE, de amostra de água tratada do município de Viçosa, MG, onde: (1) $t_R = 2,8$ min: clorofórmio; (2) $t_R = 3,6$ min: bromodiclorometano; (3) $t_R = 4,7$ min: dibromoclorometano. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 40 °C/2 min (20 °C min⁻¹) 200 °C (4 °C min⁻¹) 290 °C/2min; temperatura do injetor 250 °C (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300 °C.

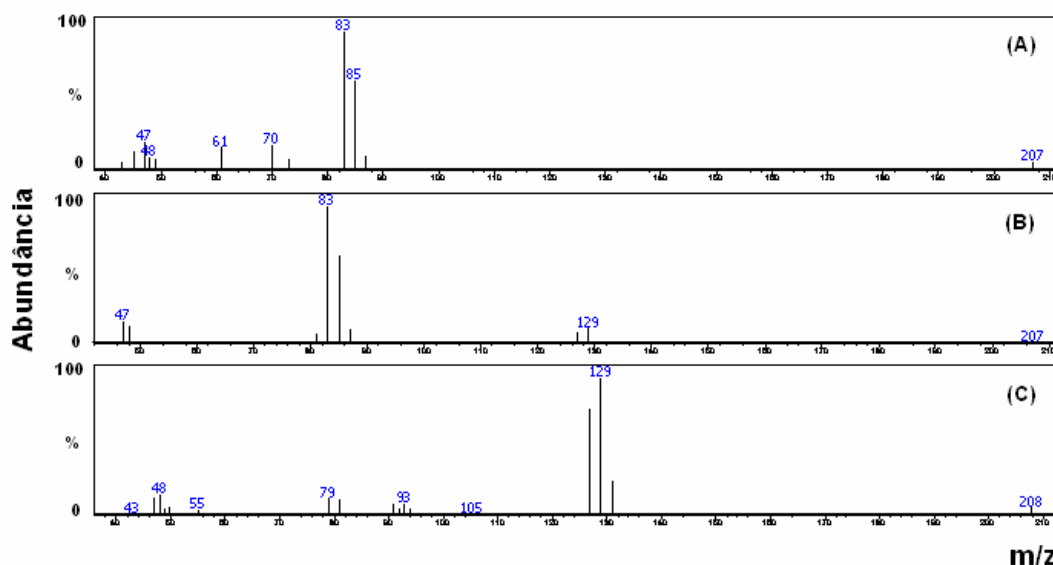


Figura 6. Espectros de massa obtidos da análise, por CG-EM, de amostra de água tratada do município de Viçosa, MG, onde: (A) clorofórmio, (B) bromodichlorometano e (C) dibromoclorometano. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 40 $^{\circ}$ C/2 min (20 $^{\circ}$ C min^{-1}) 200 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C min^{-1}) 290 $^{\circ}$ C/2min; temperatura do injetor 250 $^{\circ}$ C (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}$ C.

Os picos 1, 2 e 3 indicados na Figura 5 referem-se ao clorofórmio, bromodichlorometano e dibromoclorometano, respectivamente. Entre as amostras analisadas, os valores máximos de concentração encontrados foram de 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorofórmio, 3,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o bromodichlorometano e 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o dibromoclorometano. A soma da concentração dos trihalometanos foi menor do que 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ em todas as amostras analisadas. Esse valor é menor do que o VMP estabelecido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, que é de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para THM total [3]. Os outros picos observados no cromatograma não apresentam tempos de retenção correspondentes aos demais analitos de interesse. Como esses compostos não foram detectados pelo método proposto e considerando que os LQ são menores que os VMP estabelecidos pela Portaria 518, conclui-se que as amostras analisadas atendem aos padrões de potabilidade, não oferecendo risco à saúde humana, no que diz respeito às concentrações dos 17 analitos estudados.

1.4 CONCLUSÃO

O método proposto apresentou desempenho analítico satisfatório em relação aos parâmetros seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Além disso, os limites de detecção e quantificação para os 17 analitos de interesse foram menores do que os respectivos VMP estabelecidos pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, indicando detectabilidade adequada para aplicação do mesmo na determinação destes compostos em amostras de água destinada ao consumo humano.

A grande vantagem do método proposto, é que ele permite analisar compostos de diferentes classes químicas, como trihalometanos, agrotóxicos organoclorados e piretroides em um único protocolo experimental. Além disso, apresenta vantagens operacionais como não emprego de solvente orgânico, número reduzido de etapas de manipulação e simplicidade de operação, o que o torna uma ferramenta fundamental para o monitoramento da qualidade de água potável com relação a substâncias químicas que representam riscos à saúde humana.

A análise de amostras de água tratada coletadas na rede de distribuição do município de Viçosa, MG, apresentou apenas três compostos: clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano. A soma da concentração dos trihalometanos foi cerca de dez vezes menor que o VMP para THM total. Dessa forma pode-se afirmar que em relação aos analitos de interesse, todas as amostras analisadas atenderam ao padrão de potabilidade estabelecido pela legislação brasileira.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA E CROMATOGRAFIA GASOSA

2.1 INTRODUÇÃO

O emprego intensivo de agrotóxicos na agricultura e em atividades não agrícolas, como pecuária e campanhas de saúde pública, pode gerar resíduos de substâncias potencialmente tóxicas nos compartimentos ambientais: solo, água e ar, e também em alimentos. A exposição do homem a estas substâncias, de forma direta ou pelo consumo de água e alimentos contaminados, aumenta o risco de incidência de câncer, uma vez que muitas dessas substâncias são apontadas como potencialmente carcinogênicas [1, 2, 47].

Para evitar a ingestão de tais substâncias em níveis que possam causar riscos à saúde da população, órgãos governamentais estabeleceram limites máximos de resíduos de agrotóxicos em alimentos e água destinada ao consumo humano. Para nortear a avaliação da qualidade de água potável foram estabelecidos valores máximos permitidos (VMP) para agrotóxicos, a maioria deles organoclorados. Outra classe de compostos contemplada é a dos piretroides, sendo estabelecido VMP para a permetrina [1, 3].

A exigência de baixos níveis de concentração para uma diversidade de agrotóxicos que devem ser monitorados em água potável tem impulsionado o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a análise multirresíduo desses compostos, com elevada detectabilidade. Além disso, atualmente, existe a busca por métodos ambientalmente seguros, reduzindo ou eliminando o emprego de solventes orgânicos, que são, muitas vezes, substâncias tóxicas [10].

Esses métodos têm sido desenvolvidos associando a cromatografia gasosa e técnicas de preparo de amostras que não empregam solventes

orgânicos, como a microextração em fase sólida [5, 6, 31, 43], ou que empregam uma quantidade reduzida de solvente, como a microextração em gota única [7, 48, 49].

A microextração em gota única (MEGU) é uma técnica de preparo de amostra para análise cromatográfica que vem ganhando destaque atualmente por reduzir drasticamente o consumo de solvente orgânico e proporcionar elevado fator de concentração, além de integrar extração e injeção. Esta técnica consiste em manter uma microgota de um solvente imiscível em água suspensa na ponta da agulha de uma microseringa imersa em uma amostra aquosa sob agitação. Os analitos são transferidos da solução aquosa para a fase orgânica, e, após um determinado período de tempo, a microgota é recolhida para dentro da microseringa e introduzida diretamente no sistema cromatográfico para análise [17, 18].

Trabalhos reportados na literatura têm demonstrado a eficiência da MEGU para extração de agrotóxicos em amostras de água [50] e alimentos [20]. Os protocolos experimentais apresentam desempenho analítico satisfatório com relação à detectabilidade, linearidade e precisão [50], demonstrando que essa técnica pode ser uma boa alternativa para o preparo de amostras de água para análise multirresíduo de agrotóxicos por cromatografia gasosa.

No presente trabalho variáveis experimentais que controlam o desempenho da técnica MEGU foram avaliadas e otimizadas e, em associação com a cromatografia gasosa, com detector por captura de elétrons, foi desenvolvido um método de análise simultânea de 14 agrotóxicos (organoclorados e piretroides) em água.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 Reagentes e soluções

Foram empregados neste trabalho dez padrões de agrotóxicos organoclorados e quatro de piretroides: cipermetrina (pureza = 92,4%) obtido

da Chem Service, Inc. (West Chester, PA, USA); λ -cialotrina (pureza = 86,5%) e permetrina (pureza = 92,2%) obtidos da Syngenta, Ltd. (Bracknell, Berkshire, UK); aldrin (pureza = 98,5%), DDT (pureza = 98,8%), heptacloro (pureza = 99,5%) e heptacloro epóxido (pureza = 99,5%) obtidos da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, USA) e padrões de deltametrina (pureza = 98%), dieldrin (pureza = 97,9%), endossulfam (pureza = 91,5%), endrin (pureza = 99,3%), lindano (pureza = 99,8%), metoxicloro (pureza = 98,7%) e hexaclorobenzeno (pureza = 99,8%) obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha). Soluções estoque foram preparadas em acetonitrila (Tedia/HPLC-Spectro) e armazenadas a -18°C . Soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em água ultra pura, isenta dos analitos de interesse, e armazenadas a 4°C . Os solventes n-hexano e tolueno foram de grau resíduo. Água ultra pura foi utilizada nas etapas de otimização e validação.

2.2.2 Microextração em gota única (MEGU)

Amostras de 10 mL de água fortificada com os analitos em concentrações adequadas foram transferidas para frascos de vidro de 15 mL de capacidade e 1,9 cm de diâmetro, equipados com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10 μL com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzida no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa à meia altura da coluna de líquido e o êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução. Uma microgota de 1,6 μL foi mantida em contato com a amostra sob agitação de 380 rpm (PC-420, Corning), durante 15 minutos a 20°C . Após a extração, 1,0 μL foi recolhido na microseringa e injetado diretamente no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com o solvente extrator para garantir a limpeza completa e eliminação de bolhas de ar. Um desenho esquemático é apresentado na Figura 7.

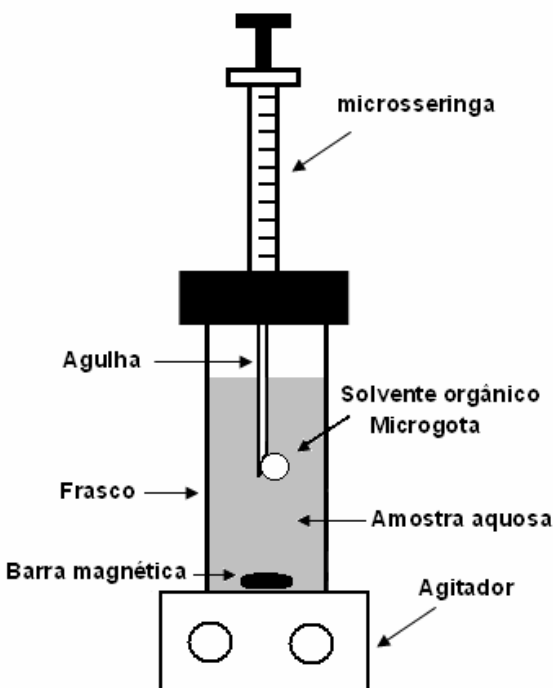


Figura 7. Desenho esquemático da microextração em gota única, modo direto.

Fonte: adaptado de Psillakis e Kalogerakis, 2002 [51].

2.2.3 Análises cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 2014, equipado com detector por captura de elétrons. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar Rtx-5MS, Restek (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de espessura de filme). A programação de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 150 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), rampa de aquecimento de 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$, seguida de rampa de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$, e finalmente rampa de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$, sendo esta temperatura mantida por 6 min. O nitrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} , as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 280 $^{\circ}\text{C}$ e 300 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Todas as injeções foram feitas no modo split com divisão de fluxo de 1:5.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas para análise simultânea dos 14 agrotóxicos após extração por MEGU, permitiu a completa separação de todos os analitos com um tempo de análise de 25 minutos. Na Figura 8 está representado um cromatograma obtido por análise de água potável fortificada com os organoclorados aldrin, dieldrin, endossulfam, endrin, heptacloro e heptacloro epóxido a $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$; hexaclorobenzeno, lindano, DDT e metoxicloro a $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$; e os piretroides λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina a $8 \mu\text{g L}^{-1}$.

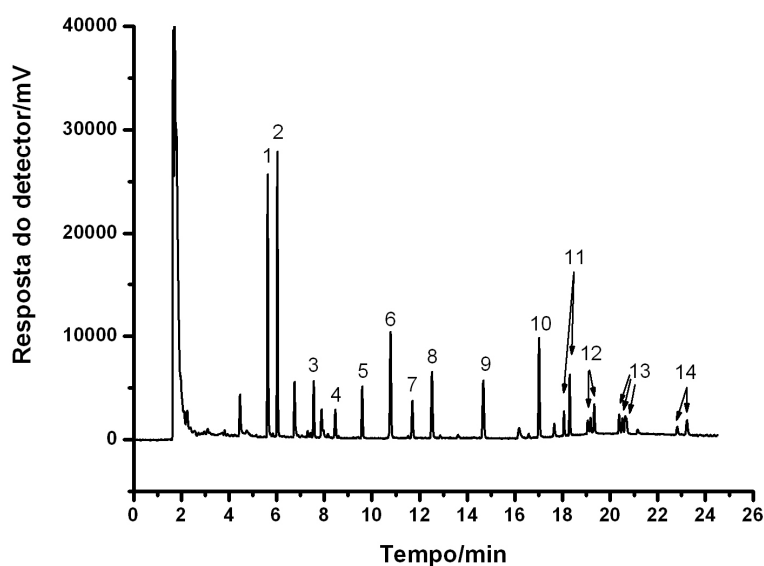


Figura 8. Cromatograma obtido da análise de água potável fortificada com organoclorados e piretroides, onde: (1) $t_R = 5,6$ min: hexaclorobenzeno; (2) $t_R = 6,0$ min: lindano; (3) $t_R = 7,5$ min: heptacloro; (4) $t_R = 8,4$ min: aldrin; (5) $t_R = 9,6$ min: heptacloro epóxido; (6) $t_R = 10,7$ min: endossulfam; (7) $t_R = 11,7$ min: dieldrin; (8) $t_R = 12,5$ min: endrin; (9) $t_R = 14,6$ min: DDT; (10) $t_R = 17,0$ min: metoxicloro (11) $t_R = 18,1$ e $18,3$ min: λ -cialotrina; (12) $t_R = 19,1$ e $19,3$ min: permetrina; (13) $t_R = 20,4$; $20,5$ e $20,7$ min: cipermetrina; (14) $t_R = 22,8$ e $23,2$ min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) operando a $150^\circ\text{C}/1$ min ($30^\circ\text{C min}^{-1}$) 200°C (3°C min^{-1}) 240°C ($20^\circ\text{C min}^{-1}$) $290^\circ\text{C}/6$ min; temperatura do injetor 280°C (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300°C .

2.3.2 Otimização da microextração em gota única

No processo de otimização do método de análise simultânea de agrotóxicos organoclorados e piretroides em água, algumas variáveis da técnica de microextração em gota única, MEGU, foram avaliadas univariadamente. Para este estudo foram empregadas amostras de água ultra pura fortificadas com os organoclorados: aldrin, DDT, dieldrin, endrin, endossulfam, heptacloro, metoxicloro, e os piretroides: λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina. As concentrações de fortificação foram de 1 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, para organoclorados e piretroides, respectivamente. As variáveis da técnica que tiveram seu desempenho nas respostas cromatográficas avaliadas foram: solvente extrator, volume da microgota, tempo de contato da microgota com a amostra, volume e velocidade de agitação da amostra, além da adição de sal (NaCl). Na Tabela 5 estão relacionadas a ordem em que os experimentos foram executados, as variáveis e suas combinações na otimização da MEGU. Para cada combinação foram realizados ensaios em triplicata. Os melhores desempenhos de cada variável foram considerados pelas respostas cromatográficas obtidas e pela sua influência na estabilidade da microgota.

Tabela 5. Planejamento unifatorial para otimização das condições de extração de agrotóxicos em amostras de água

Ordem de execução	Fator estudado	Condições de extração					
		SE	TC (min)	VA (rpm)	V _{FO} (μL)	AS (% m/v)	V _{FA} (mL)
1º	SE Tolueno n-Hexano	<i>FE</i>	10	155	2,0	0	10
2º	TC (min) 5 a 35	Hexano	<i>FE</i>	155	2,0	0	10
3º	VA (rpm) 100 a 870	Hexano	15	<i>FE</i>	2,0	0	10
4º	V _{FO} (μL) 1,6 a 2,2	Hexano	15	380	<i>FE</i>	0	10
5º	AS (% m/v) 0 a 6	Hexano	15	380	1,6	<i>FE</i>	10
6º	V _{FA} (mL) 10 e 35	Hexano	15	380	1,6	0	<i>FE</i>

SE = solvente extrator, TC = tempo de contato, VA = velocidade de agitação, V_{FO} = volume da microgota, AS = Adição de sal, V_{FA} = volume de amostra, FE = fator estudado.

2.3.2.1 Solvente extrator

A escolha do solvente extrator é uma etapa fundamental para a garantia do bom desempenho da MEGU, sendo esta a primeira dentre as etapas realizadas em trabalhos que visam a otimização desta técnica. O solvente escolhido deve, ao mesmo tempo, garantir a eficiência da transferência de massa dos analitos para a fase orgânica e preservar a integridade da microgota durante a extração. Para a extração por imersão da microgota em uma solução aquosa o principal requisito é a imiscibilidade do solvente em meio aquoso. Outra propriedade que deve ser levada em consideração para a escolha do solvente orgânico é a viscosidade, que deve ser adequada para formação e permanência, durante a extração, da microgota na ponta da agulha da microseringa. Considerando estas características e também a compatibilidade com a cromatografia gasosa, tolueno e n-hexano foram os solventes

empregados neste estudo. Estes solventes também foram escolhidos baseando-se nos resultados apresentados em trabalhos que associam técnicas de microextração em fase líquida, como a MEGU, à cromatografia gasosa [7, 49, 52, 53]. O tolueno foi empregado com sucesso na extração de diferentes classes de agrotóxicos em água [7, 49]. Já o n-hexano foi empregado para extração de organoclorados nesta matriz, apresentando bons resultados [52, 53].

Os ensaios foram realizados empregando as condições de extração indicadas na Tabela 5. Para cada solvente empregado foram calculadas as áreas médias ($n = 3$) dos picos de cada analito, bem como o desvio padrão entre as medidas. A eficiência do n-hexano e do tolueno na extração dos analitos é apresentada na Figura 9.

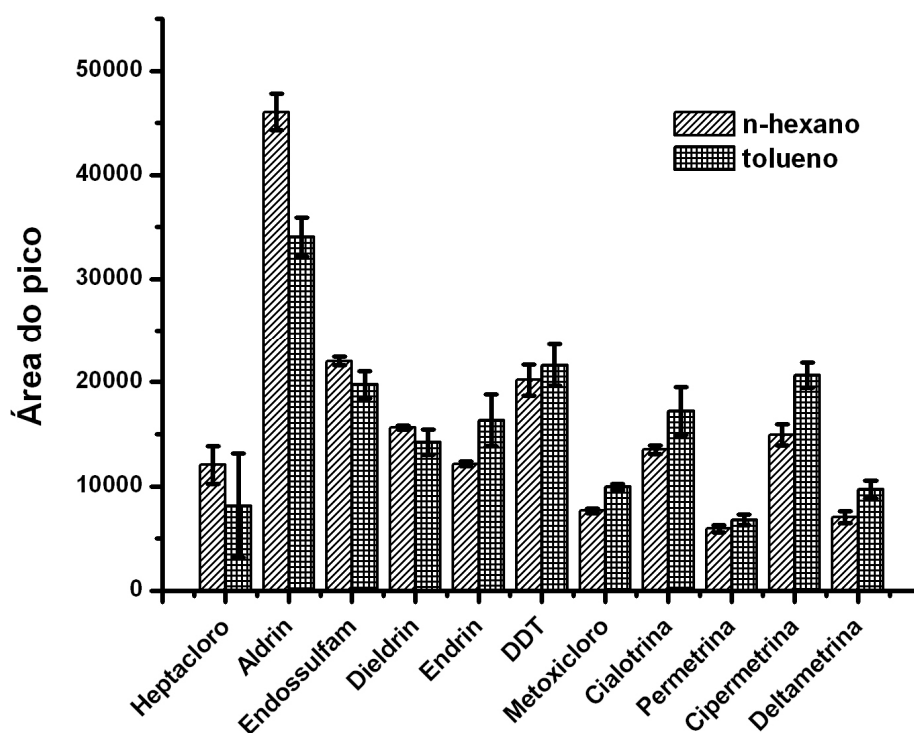


Figura 9. Efeito do solvente orgânico (n-hexano e tolueno) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: concentrações de fortificação de 1 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para organoclorados e piretroides, respectivamente; tempo de contato: 10 min; velocidade de agitação: 155 rpm; volume de microgota: 2,0 μL ; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL.

As respostas cromatográficas obtidas para a maioria dos analitos de interesse quando empregados n-hexano ou tolueno como solventes extratores são estatisticamente semelhantes. Apenas o aldrin, metoxicloro e cipermetrina apresentaram variações de respostas significativamente diferentes em função do solvente extrator empregado. O aumento relativo de resposta observado para o aldrin foi de 35% quando empregado o n-hexano, já para o metoxicloro e a cipermetrina este aumento foi de 29 e 38%, respectivamente, quando o solvente extrator empregado foi o tolueno. Observa-se que a mudança do solvente promoveu a extração destes analitos em proporções semelhantes; no entanto, o n-hexano apresentou melhor resposta do analito que apresenta o VMP mais restritivo, dentre os limites estabelecidos para agrotóxicos em água potável, que é de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para aldrin. Este é também o VMP estabelecido para dieldrin, heptacloro e heptacloro epóxido. Os VMP para metoxicloro e cipermetrina são bem maiores, sendo iguais a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ [3]. Considerando a necessidade de um método com detectabilidade suficiente para atender às exigências para o aldrin, o n-hexano é mais indicado do que o tolueno. Além disso, o n-hexano proporcionou menores desvios entre as medidas, sendo este o solvente empregado nos ensaios posteriores.

2.3.2.2 Tempo de contato

A MEGU é uma técnica de equilíbrio, sendo esperado, portanto, que o aumento do tempo de extração proporcione aumento na massa de analito transferida da fase aquosa para a fase orgânica, atingindo seu máximo no momento em que o sistema alcançar o equilíbrio. Neste trabalho, o efeito positivo do aumento do tempo de contato na eficiência de extração dos analitos foi observado pelo sinal analítico registrado para cada tempo empregado, num intervalo de 5 a 35 minutos. Na Figura 10 estão representadas as variações das respostas cromatográficas para cada analito em função do tempo de contato da microgota com a amostra. Foram observados acréscimos nas respostas em função do aumento do tempo de contato, indicando que em 35 minutos o sistema ainda não havia alcançado o equilíbrio.

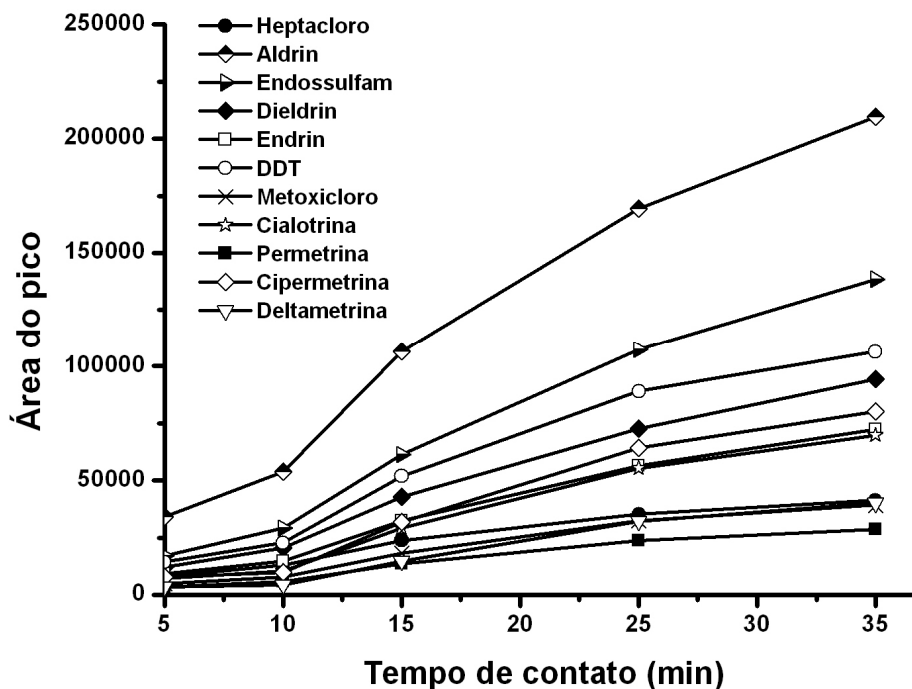


Figura 10. Efeito do tempo de contato na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: concentrações de fortificação de 1 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para organoclorados e piretroides, respectivamente; solvente orgânico: n-hexano; velocidade de agitação: 155 rpm; volume de microgota: 2,0 μL ; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL.

Para obter a detectabilidade máxima seria necessário igualar o tempo de extração ao tempo de equilíbrio. No entanto, o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio geralmente é alto, podendo provocar perda de solvente por dissolução da gota [47, 54].

A estabilidade da microgota durante a extração é um fator que deve ser avaliado para a escolha do tempo de extração. Para esta avaliação foram realizados experimentos mantendo a microgota em contato com a fase aquosa nos diferentes tempos estudados, empregando as mesmas condições experimentais, exceto no que diz respeito ao recolhimento da fase orgânica. Neste caso, após o tempo de extração, foi recolhido todo o volume de microgota para dentro da microsseringa, sendo realizada a medida do mesmo. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Volumes de microgota recuperado após cada tempo de contato com a fase aquosa

Tempo de contato (min)	Volume da microgota (μL)	
	Inicial	Recuperado
5	2,0	1,9
10	2,0	1,9
15	2,0	1,9
25	2,0	1,4
35	2,0	1,1

Conforme constatado, empregando velocidade de agitação de 155 rpm, a microgota manteve-se estável até 15 minutos de contato com a fase aquosa, ocorrendo dissolução de apenas 5% do volume total. Esta dissolução está de acordo com a solubilidade do n-hexano em água, que é de $0,0095 \text{ g L}^{-1}$ (a 20°C). A partir deste intervalo de tempo ocorreram perdas elevadas de solvente, sendo registrado um decréscimo de 45% no volume inicial da microgota quando empregado um tempo de extração de 35 minutos. Para evitar variações no volume da microgota durante a extração optou-se por empregar um tempo de contato de 15 minutos.

Esta prática de trabalhar em condição de não equilíbrio pode ser adotada desde que a medição de tempo seja precisa [55]. Outros pesquisadores também optaram por trabalhar fora do equilíbrio, relatando bons resultados no que diz respeito ao desempenho do método [20, 47, 50].

2.3.2.3 Velocidade de agitação

O aumento da velocidade de agitação aumenta a extração dos analitos e reduz o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio [47, 51, 56]. No entanto, assim como o tempo de contato, a velocidade de agitação é um fator que deve ser avaliado considerando não somente a eficiência na transferência de massa dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica, mas também a integridade da microgota. Velocidade de agitação elevada aumenta a ocorrência de queda ou deslocamento da microgota, a diminuição de volume

por dissolução do solvente na fase aquosa, além da formação de bolhas de ar [10]. Para evitar estes incidentes e garantir uma maior precisão, velocidades de agitação inferiores a 800 rpm são geralmente selecionadas em trabalhos reportados na literatura [20, 47, 48, 56, 57]. O efeito da velocidade de agitação na extração dos analitos foi avaliado empregando taxas entre 100 e 870 rpm. Velocidades superiores não foram consideradas neste trabalho em razão da formação de bolhas de ar e da freqüência elevada de desprendimento da microgota registradas em ensaios preliminares, quando empregadas as condições de extração apresentadas na Tabela 5. A relação entre o sinal analítico e a velocidade de agitação está apresentada na Figura 11.

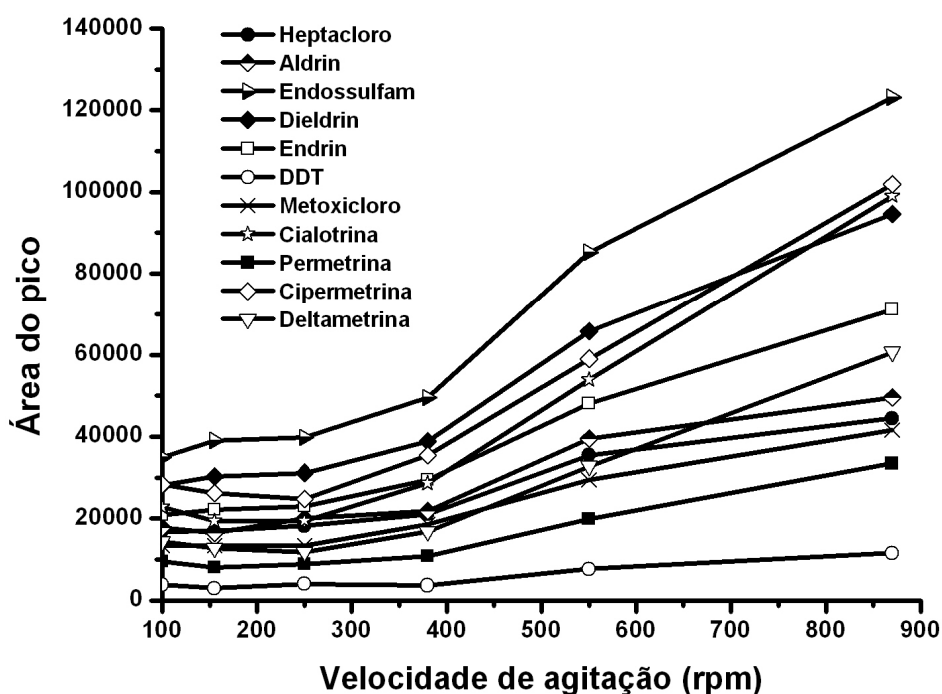


Figura 11. Efeito da velocidade de agitação da amostra (100 a 870 rpm) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; volume de microgota: 2,0 μ L; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL.

Aumentos nas áreas dos picos em função do aumento da velocidade de agitação são observados para todos os analitos. A Figura 11 mostra, ainda, que a transferência máxima de massa dos analitos não foi alcançada quando empregada velocidade de agitação de 870 rpm, no entanto, velocidades superiores poderiam comprometer a integridade da microgota [19]. Para escolha deste parâmetro foi realizado um estudo de estabilidade da microgota mediante o aumento da velocidade de agitação. Empregando velocidades de até 870 rpm não foram observados formação de bolhas de ar ou desprendimento da microgota, no entanto, velocidades superiores a 380 rpm provocaram diminuições de volume da microgota por dissolução do solvente (Tabela 7), comprometendo a estabilidade da microgota e, conseqüentemente, a precisão dos resultados.

Tabela 7. Volumes de microgota recuperado após 15 min de contato com a fase aquosa sob diferentes velocidades de agitação

Velocidade de agitação (rpm)	Volume da microgota (μL)	
	Inicial	Recuperado
100	2,0	1,9
155	2,0	1,9
250	2,0	1,9
380	2,0	1,9
550	2,0	1,7
870	2,0	1,4

Para favorecer a extração dos analitos sem prejudicar a precisão do método foi adotada a velocidade de 380 rpm.

2.3.2.4 Volume da microgota

O efeito do volume da microgota na extração dos analitos foi avaliado mantendo constante o volume de fase orgânica coletada no final da extração, sendo este igual a 1,0 μL . Em todos os experimentos realizados neste trabalho foi adotado este procedimento para controlar o volume injetado, uma vez que o mesmo poderia variar se fosse coletado o volume total da microgota devido à

dissolução do solvente durante a extração. No caso específico da avaliação do volume da microgota, o volume injetado seria tão maior quanto maior fosse o volume de microgota empregado e este seria um fator que, certamente, contribuiria para alteração das respostas analíticas. Recolher um volume de fase orgânica inferior ao volume da microgota também apresenta a vantagem de evitar a contaminação com a matriz aquosa, o que causaria, além de alterações nas respostas analíticas, prejuízos para o sistema cromatográfico. O recolhimento de parte do volume total da microgota provoca perda de detectabilidade e essa perda é proporcional ao tamanho da microgota. De maneira geral isso foi observado neste estudo, pois, estatisticamente, os resultados com microgota de 1,6 a 2,2 μL foram semelhantes. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de comparação das médias pelo Teste de Tukey, a 95% de confiança.

Tabela 8. Teste de Tukey para os valores médios das áreas dos picos cromatográficos dos analitos obtidas para cada volume de microgota

Analito	Volume da microgota (μL)			
	1,6	1,8	2,0	2,2
Aldrin	29368,7 $\pm$ 207,2 a	33886,1 $\pm$ 2024,3 a	24990,4 $\pm$ 1278,2 a	26089,9 $\pm$ 2391,9 a
DDT	6282,4 $\pm$ 295,4 a	7701,1 $\pm$ 569,9 a	5298,1 $\pm$ 644,9 a	5590,2 $\pm$ 640,7 a
Dieldrin	40576,3 $\pm$ 2456,1 ab	52114,1 $\pm$ 3084,0 a	37228,1 $\pm$ 2024,7 b	39233,3 $\pm$ 870,8 b
Endossulfam	52097,6 $\pm$ 3831,7 a	65976,7 $\pm$ 4650,2 a	47613,9 $\pm$ 1979,8 a	50672,2 $\pm$ 1786,2 a
Endrin	28896,5 $\pm$ 1984,2 a	37971,1 $\pm$ 1915,4 b	26682,0 $\pm$ 1848,7 a	29861,7 $\pm$ 483,7 ab
Heptacloro	24282,2 $\pm$ 950,5 a	29098,2 $\pm$ 941,8 a	21929,6 $\pm$ 1127,8 a	22713,7 $\pm$ 1660,5 a
Metoxicloro	18123,7 $\pm$ 287,7 a	23162,0 $\pm$ 1625,6 b	16042,5 $\pm$ 857,4 a	17568,5 $\pm$ 205,7 a
λ -Cialotrina	32609,5 $\pm$ 1286,8 a	36208,2 $\pm$ 4708,0 a	29225,8 $\pm$ 8096,0 a	24055,3 $\pm$ 1630,1 a
Cipermetrina	32612,9 $\pm$ 535,8 a	37092,4 $\pm$ 3622,7 a	27524,9 $\pm$ 5826,3 a	25925,9 $\pm$ 1344,3 a
Deltametrina	18736,4 $\pm$ 458,3 a	20745,8 $\pm$ 2707,4 a	16347,3 $\pm$ 4276,1 a	14121,9 $\pm$ 806,4 a
Permetrina	12726,9 $\pm$ 22,15 a	15143,9 $\pm$ 2109,1 a	11635,8 $\pm$ 2057,3 a	9613,5 $\pm$ 966,9 a

*Valores médios (n=3) seguidos de pelo menos uma mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

Em estudos prévios foram testados volumes de microgota maiores que 1,0 μL , sendo determinado como volume mínimo 1,6 μL , uma vez que volumes inferiores ofereceram risco de coleta da matriz juntamente com a fase orgânica e um volume máximo de 2,2 μL , uma vez que volumes superiores acarretam instabilidade da microgota e dificuldades de manipulação [10, 20, 47]. Outra

desvantagem de empregar um volume maior de microgota é o aumento do tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio, devido à transferência de massa no interior da microgota ser apenas por difusão [58]. Na Figura 12 estão apresentadas as áreas dos picos dos analitos obtidas para cada volume de microgota empregado: 1,6, 1,8, 2,0 e 2,2 μL .

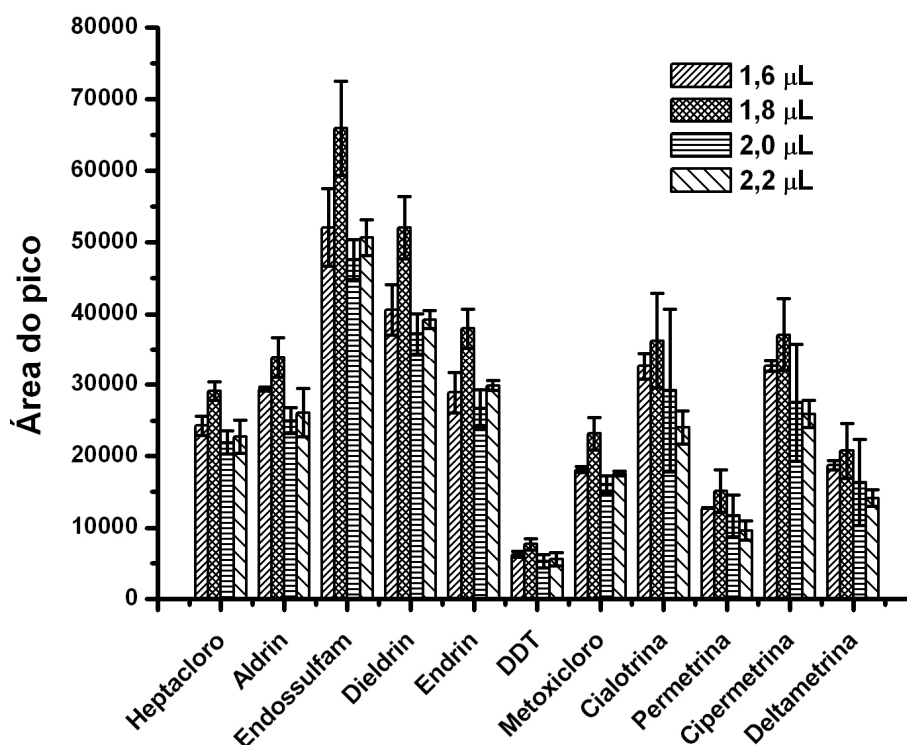


Figura 12. Efeito do volume da microgota (1,6 a 2,2 μL) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; adição de sal: não; volume de amostra: 10 mL.

Pode-se observar que menores desvios entre as medidas ($n = 3$) foram obtidos quando empregado um volume de microgota igual a 1,6 μL . Observa-se, ainda, uma tendência de aumento nas respostas quando empregado volume igual a 1,8 μL , no entanto, empregando o teste de Tukey observou-se que as respostas para a maioria dos analitos não são significativamente diferentes em nível de 95% de confiança. Um volume maior de microgota deve favorecer a transferência de massa dos analitos da fase aquosa para a fase

orgânica, mas, por outro lado prolonga o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio [58]. Estes dois efeitos parecem ter sido compensados uma vez que os experimentos foram conduzidos em condição de não-equilíbrio. Para aumentar a precisão do método e facilitar a manipulação da microgota, foi adotado o volume de 1,6 μL nos experimentos posteriores.

2.3.2.5 Efeito da adição de sal

Este experimento foi realizado submetendo à extração amostras isentas de sal e amostras contendo NaCl em concentrações iguais a 3 e 6% (m/v) nas condições indicadas na Tabela 5. As variações das respostas cromatográficas em função da concentração de NaCl na solução estão representadas na Figura 13.

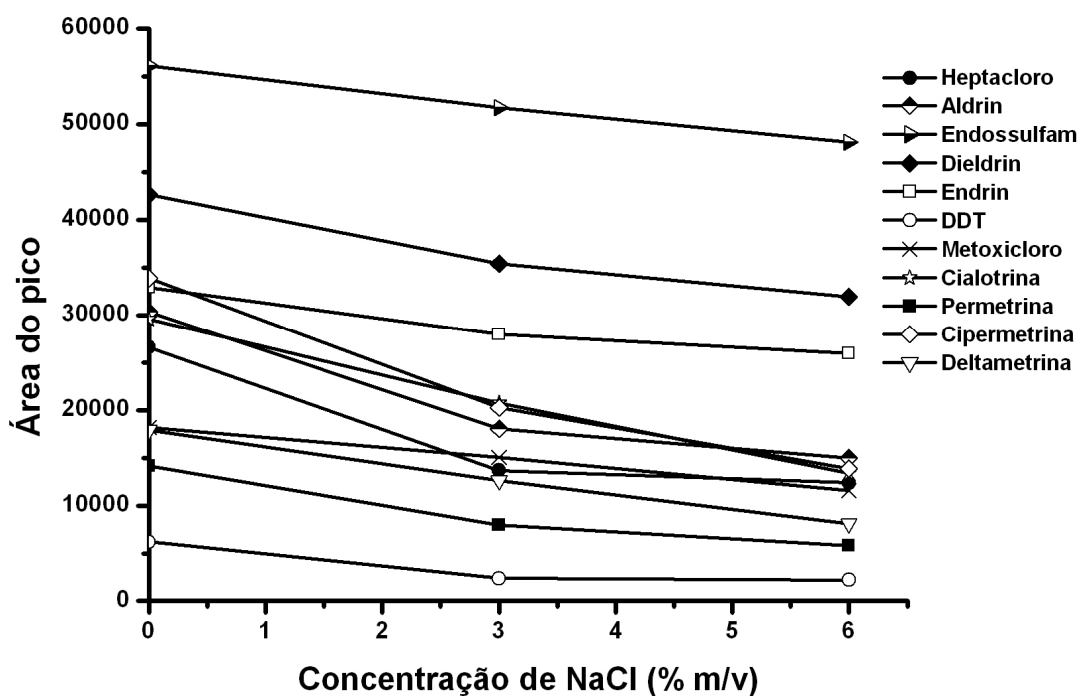


Figura 13. Efeito da adição de NaCl (0 a 6% m/v) na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; volume de microgota: 1,6 μL ; volume de amostra: 10 mL.

O decréscimo das áreas dos picos dos analitos em função do aumento da concentração de NaCl na solução, indica o efeito negativo da adição de sal sobre a transferência de massa dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica. A adição de sal à amostra geralmente favorece a extração de compostos pouco polares, devido ao aumento da força iônica da solução [51]. No entanto, efeitos contrários têm sido observados para MEGU [19, 20, 47, 59]. Supõe-se que, além do efeito “*salting-out*”, a presença de sal provoca alterações das propriedades físicas do filme de extração, reduzindo as taxas de difusão dos analitos para fase orgânica [60].

2.3.2.6 Volume de amostra

Para avaliação do efeito do volume de amostra na taxa de transferência de massa dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica, foram empregadas as condições de extração indicadas na Tabela 5. O aumento do volume de amostra de 10 para 35 mL foi avaliado fixando fatores diferentes em cada etapa de experimentos. Numa primeira etapa foram mantidas constantes as concentrações dos analitos, já na segunda etapa as concentrações foram alteradas de forma a manter constantes a massa total de cada analito. Para esta segunda condição, os ensaios empregando 35 mL de amostra foram realizados com amostras diluídas a um fator de 3,5 vezes. As respostas analíticas obtidas estão apresentadas na Figura 14.

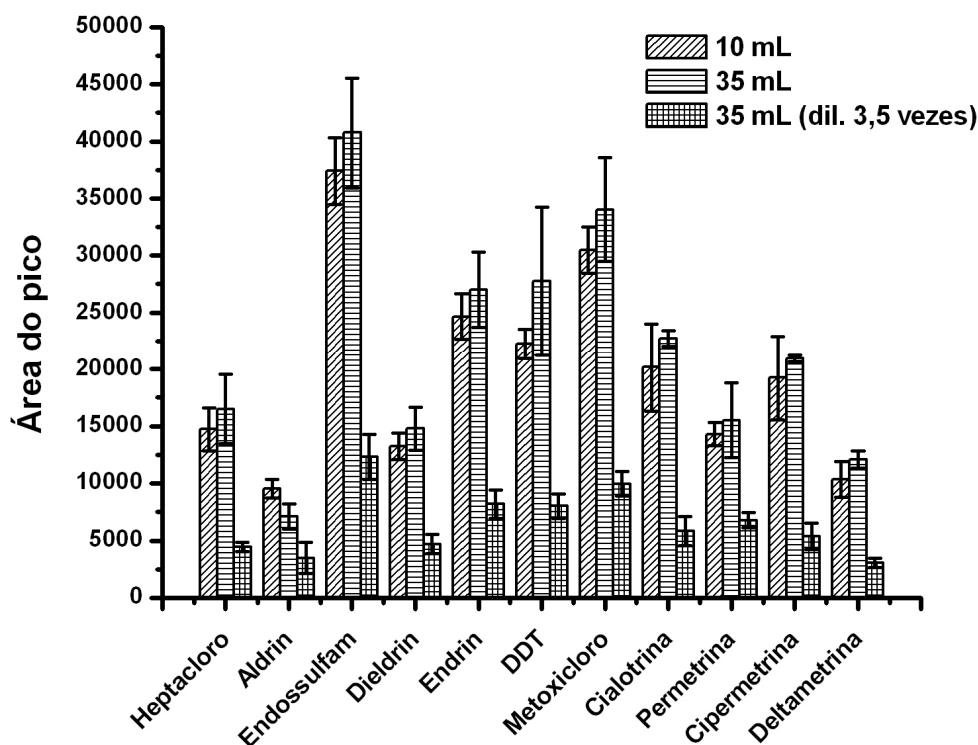


Figura 14. Efeitos do volume (10 e 35 mL) e da diluição da amostra na extração dos analitos por MEGU-ID. Condições experimentais: solvente extrator: n-hexano; tempo de contato: 15 min; velocidade de agitação: 380 rpm; volume de microgota: 1,6 μ L; adição de sal: não.

Embora os ensaios não tenham sido realizados em condições de equilíbrio, as variáveis cinéticas, assim como as demais, foram rigorosamente controladas, sendo mantidas constantes em todos os experimentos. A extração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (microgota) obedece à uma constante de equilíbrio. A alteração do volume da amostra de 10 para 35 mL não causou modificações significativas, uma vez que as respostas cromatográficas foram estatisticamente semelhantes. Foi observado que quando a concentração do analito é constante, o volume da amostra não afeta significativamente a extração. Quando se faz a comparação com um volume de 35 mL em que se dilui a amostra 3,5 vezes, a redução da resposta é proporcional ao fator de diluição. Esses resultados indicaram que a MEGU depende da concentração dos analitos na amostra e não do volume da mesma, permitindo, conseqüentemente, o emprego de pequenos volumes de amostra.

O volume de amostra foi fixado em 10 mL nos ensaios de validação do método.

2.3.3 Desempenho analítico do método

O desempenho do método otimizado foi avaliado para análise simultânea dos organoclorados: aldrin, DDT, dieldrin, endrin, endossulfam, heptacloro, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, metoxicloro, e dos piretroides: λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina, em amostras de água.

Nessa avaliação foram utilizados os parâmetros seletividade, linearidade, precisão intermediária, exatidão e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, seguindo as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [34], Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [35], Agência Reguladora dos Estados Unidos (FDA) [36] e Conferência Internacional em Harmonização (ICH) [37].

2.3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada submetendo amostras de água potável, com e sem adição dos analitos de interesse, ao método desenvolvido. Comparando os cromatogramas da matriz original e fortificada apresentados na Figura 15, observa-se que nenhum pico cromatográfico foi registrado no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse, indicando a ausência de compostos que pudessem interferir no sinal analítico dos organoclorados e piretroides de interesse.

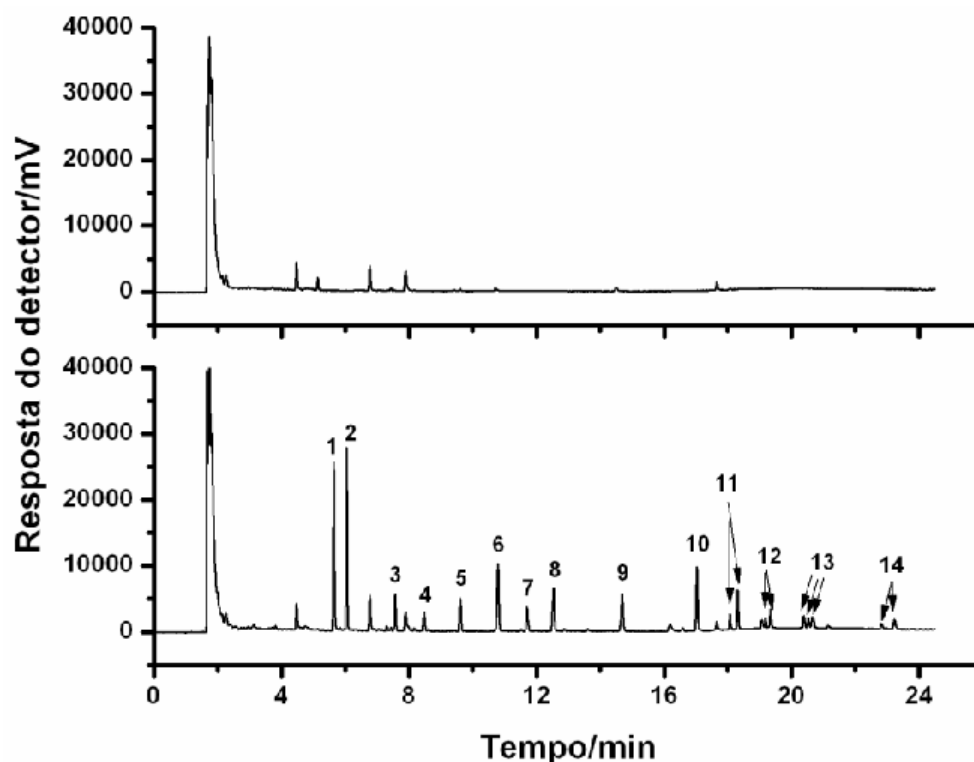


Figura 15. Cromatograma obtido após extração de uma matriz de água potável, acima; seguido do cromatograma obtido a partir da extração da matriz fortificada com organoclorados e piretroides, onde: (1) $t_R = 5,6$ min: hexacloro-benzeno; (2) $t_R = 6,0$ min: lindano; (3) $t_R = 7,5$ min: heptacloro; (4) $t_R = 8,4$ min: aldrin; (5) $t_R = 9,6$ min: heptacloro epóxido; (6) $t_R = 10,7$ min: endossulfam; (7) $t_R = 11,7$ min: dieldrin; (8) $t_R = 12,5$ min: endrin; (9) $t_R = 14,6$ min: DDT; (10) $t_R = 17,0$ min: metoxicloro (11) $t_R = 18,1$ e $18,3$ min: λ -cialotrina; (12) $t_R = 19,1$ e $19,3$ min: permetrina; (13) $t_R = 20,4$; $20,5$ e $20,7$ min: cipermetrina; (14) $t_R = 22,8$ e $23,2$ min: deltametrina. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) operando a 150 $^{\circ}$ C/1 min (30 $^{\circ}$ C min $^{-1}$) 200 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C min $^{-1}$) 240 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C min $^{-1}$) 290 $^{\circ}$ C/6 min; temperatura do injetor 280 $^{\circ}$ C (“split” de 1:5) e temperatura do detector 300 $^{\circ}$ C.

2.3.3.2 Limites de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram determinados pela razão sinal/ruído. Foram empregadas amostras de água ultra pura fortificadas com organoclorados e piretroides em intervalos de concentração de 1,0 a 0,001 μ g L $^{-1}$ e 10 a 0,1 μ g L $^{-1}$, respectivamente. As

concentrações de fortificação que produziram sinal superior ao ruído da linha de base em 3 e 10 vezes, foram tomadas como LD e LQ, respectivamente (Tabela 9). Os limites de detecção (LD) de todos os analitos foram inferiores aos respectivos valores máximos permitidos (VMP) em água potável, estabelecidos pela legislação brasileira [3] e pela WHO (World Health Organization) [1]. Os compostos com os VMP mais restritivos ($0,03 \mu\text{g L}^{-1}$) são o aldrin, dieldrin, heptacloro e heptacloro epóxido. Para estes compostos foram obtidos LQ três vezes menores do que o VMP, exceto para o aldrin, cujo LQ é igual ao VMP. Para os demais analitos de interesse os LQ obtidos foram pelo menos dez vezes menores do que o VMP. Estes resultados indicam que o método apresenta detectabilidade adequada para o monitoramento da qualidade da água potável com relação aos agrotóxicos avaliados neste estudo.

2.3.3.3 Linearidade do método

A linearidade do método foi determinada pela análise de amostras de água ultra pura fortificadas com os analitos de interesse em seis diferentes concentrações, incluindo o respectivo LQ. Curvas analíticas foram construídas nos intervalos de concentração apresentados na Tabela 9. O método apresentou linearidade de resposta adequada [34, 35], nos intervalos de concentração avaliados, apresentando coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99 para todos os analitos.

2.3.3.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada em quatro diferentes concentrações, sendo elas iguais a uma, duas, cinco e dez vezes o respectivo LQ de cada analito. Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias não consecutivos. Para a cipermetrina foi obtido um coeficiente de variação (CV) igual a 21% (Tabela 9), para todos os outros analitos os CV foram inferiores a 20%, limite aceitável pela USEPA [46].

Tabela 9. Precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Analito	Precisão* (CV, %) ^a	Linearidade		LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)
		Faixa (µg L ⁻¹)	r		
Organoclorados					
Aldrin	19	0,03 – 1,8	0,9980	0,009	0,03
DDT	19	0,1 – 2	0,9981	0,03	0,1
Dieldrin	14	0,01 – 0,6	0,9984	0,003	0,01
Endossulfam	10	0,05 – 20	0,9988	0,015	0,05
Endrin	15	0,05 – 1	0,9979	0,015	0,05
Heptacloro	16	0,01 – 0,6	0,9959	0,003	0,01
Heptacloro epóxido	17	0,01 – 0,6	0,9986	0,003	0,01
Hexaclorobenzeno	14	0,03 – 2	0,9988	0,009	0,03
Lindano	9	0,03 – 4	0,9998	0,009	0,03
Metoxicloro	17	0,1 – 20	0,9996	0,03	0,1
λ-Cialotrina	15	0,3 – 16	0,9958	0,09	0,3
Cipermetrina	21	1 – 16	0,9972	0,3	1
Deltametrina	17	2 – 16	0,9929	0,6	2
Permetrina	17	1 – 16	0,9964	0,3	1

*Precisão intermediária, ^aCoeficiente de variação (n = 12), LD = Limite de detecção, LQ = Limite de quantificação.

2.3.3.5 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método foram determinadas as recuperações relativas dos analitos de interesse. Os ensaios foram realizados empregando amostras de água potável fortificadas com os piretroides em concentrações iguais a $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e organoclorados em concentrações entre 0,2 e $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. As amostras foram submetidas ao método desenvolvido e as concentrações de cada analito foram calculadas pelas equações obtidas por regressão linear das respectivas curvas analíticas (Tabela 10). As recuperações relativas foram determinadas comparando as concentrações encontradas com as concentrações de fortificação. Os valores obtidos variaram entre 71 e 107% (Tabela 11), estando, portanto, dentro da faixa aceitável, 70 – 130% [46].

Tabela 10. Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos organoclorados e piretroides estudados

	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	r
Organoclorados			
Aldrin	0,03 – 1,8	$y = 17867x + 9671,4$	0,9980
DDT	1,0 – 1,0	$y = 28935x + 371,71$	0,9906
Dieldrin	0,01 – 0,3	$y = 63360x + 47,024$	0,9962
Endossulfam	0,05 – 0,5	$y = 115645x - 2764,5$	0,9949
Endrin	0,05 – 0,5	$y = 76666x - 1260,1$	0,9948
Heptacloro	0,01 – 0,3	$y = 70506x - 695,39$	0,9930
Heptacloro epóxido	0,01 – 0,5	$y = 66096x + 679,05$	0,9943
Hexaclorobenzeno	0,03 – 1,0	$y = 104037x + 352$	0,9975
Lindano	0,03 – 2,0	$y = 73457x - 2592,6$	0,9979
Metoxicloro	0,1 – 1,0	$y = 53335x - 1255,4$	0,9964
Piretroides			
λ -Cialotrina	0,3 – 16	$y = 2239,1x - 278,42$	0,9958
Cipermetrina	1,0 - 16	$y = 1808,5x + 1628,7$	0,9872
Deltametrina	2,0 - 16	$y = 1190,2x + 764,55$	0,9929
Permetrina	1,0 – 16	$y = 1891,4x + 26,796$	0,9870

Tabela 11. Recuperações relativas obtidas pela análise de água potável fortificada

	Concentração de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Relativa* (%)
Organoclorados		
Aldrin	0,2	71
DDT	0,8	91
Dieldrin	0,2	91
Endossulfam	0,4	90
Endrin	0,4	88
Heptacloro	0,2	97
Heptacloro epóxido	0,2	102
Hexaclorobenzeno	0,8	86
Lindano	0,8	105
Metoxicloro	0,8	77
Piretroides		
λ -Cialotrina	8	102
Cipermetrina	8	107
Deltametrina	8	91
Permetrina	8	91

* n = 3

Os parâmetros avaliados indicam o bom desempenho analítico do método proposto para análise de piretroides e organoclorados em água.

2.3.4 Análise de amostras de água

Amostras de água potável coletadas em três pontos da rede de distribuição da Estação de Tratamento de Água da Universidade Federal de Viçosa (ETA-UFV) foram analisadas não sendo detectado nenhum dos analitos de interesse neste estudo.

2.4 CONCLUSÃO

A microextração em gota única associada à cromatografia gasosa permitiu o desenvolvimento de um método para análise multirresíduo de agrotóxicos em água com desempenho analítico adequado para adoção do mesmo como protocolo experimental.

Considerando o baixo custo, a elevada frequência analítica e a redução drástica do volume de solvente e do número de etapas de manipulação empregados, este protocolo pode ser uma ferramenta útil para a verificação rotineira da presença de agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano.

Amostras de água tratada coletadas na rede de distribuição do município de Viçosa, MG, foram submetidas ao método proposto não sendo detectado nenhum dos 14 analitos de interesse. Como o LD para cada composto é menor do que o respectivo VMP estabelecido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, pode-se concluir que as amostras analisadas atenderam ao padrão de potabilidade com relação aos compostos considerados neste estudo.

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE MEFS-HS E MEGU-ID PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

3.1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação ambiental tem incentivado os químicos a desenvolverem métodos de preparo de amostra que possibilitem a redução ou a eliminação completa do emprego de solventes orgânicos. A partir da miniaturização das tradicionais técnicas de preparo de amostra [10], como a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS), foram criadas novas técnicas: a microextração em fase sólida (MEFS) e a microextração em fase líquida (MEFL). Para esta última, o modo operacional mais simples proposto é chamado de microextração em gota única (MEGU) [20].

A microextração em fase sólida eliminou completamente o emprego de solventes orgânicos substituindo-os por uma fibra de sílica fundida recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente [12]. Já a microextração em gota única faz uso de solventes, porém, em quantidade insignificante quando comparado às técnicas tradicionais. Na MEGU o volume de solvente orgânico comumente empregado varia entre 1,0 e 2,0 μL .

A MEFS e a MEGU são técnicas de equilíbrio onde os processos de extração/concentração ocorrem pela distribuição dos analitos entre duas ou três fases. Pelo modo direto (MEFS-ID, MEGU-ID), com imersão da fase extratora na solução-amostra, o analito se distribui entre a fase extratora, sendo esta uma microgota de solvente orgânico (MEGU) ou uma fibra (MEFS), e a matriz. O modo indireto (MEFS-HS, MEGU-HS), consiste em manter a fase extratora em contato com o espaço vazio acima da amostra (*headspace*), sendo o analito distribuído entre três fases: matriz, *headspace* e fase extratora [61].

A imersão direta é geralmente empregada para extração de compostos pouco voláteis ou compostos voláteis quando a matriz não é muito complexa

[61]. O modo indireto é normalmente empregado para extração de compostos de elevada volatilidade, mas também pode ser empregada para extração de analitos pouco voláteis pelo ajuste de condições que favoreçam a passagem dos mesmos para a fase gasosa, como aquecimento, ajuste de pH e da força iônica da solução aquosa [39].

Tanto a MEFS quanto a MEGU são técnicas que dispensam etapas adicionais de *clean-up* e integram extração e injeção, reduzindo o número de etapas de manipulação. Além disso, estas técnicas oferecem elevado fator de enriquecimento, por empregar volumes de fase aceptora, fibra ou microgota, muito inferior ao volume da fase doadora (amostra) [61]. Estas características tornam as duas técnicas atraentes, pois simplificam a operação, reduzem o tempo e custo de análise e aumentam a detectabilidade do método.

Com tantos atrativos estas técnicas têm sido vastamente empregadas, sendo a extração de agrotóxicos em diferentes matrizes uma de suas aplicações. Acopladas à cromatografia gasosa, a MEFS e a MEGU têm proporcionado o desenvolvimento de métodos que permitem a análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras ambientais [5, 7, 13, 44, 48-50, 62] e de alimentos [14, 47, 63-65].

Neste trabalho foram comparados os desempenhos de dois métodos para análise multirresíduo de agrotóxicos em água empregando cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE). As técnicas de preparo de amostra empregadas foram a MEFS-HS e a MEGU-ID.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. As soluções estoque de piretroides foram preparadas a partir de padrões de λ -cialotrina (pureza = 86,5%) e permetrina (pureza = 92,2%) obtidos da Syngenta, Ltd. (Bracknell, Berkshire, UK), de cipermetrina (pureza = 92,4%) obtido da Chem

Service, Inc. (West Chester, PA, USA) e de deltametrina (pureza = 98%) obtido da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha), em acetonitrila (Tedia/HPLC-Spectro). As soluções estoque de organoclorados foram preparadas em metanol (Merck/PA) a partir de padrões de aldrin (pureza = 98,5%), DDT (pureza = 98,8%), heptacloro (pureza = 99,5%), heptacloro epóxido (pureza = 99,5%) e pentaclorofenol (pureza = 99,6%) obtidos da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, USA) e padrões de dieldrin (pureza = 97,9%), endossulfam (pureza = 91,5%), endrin (pureza = 99,3%), lindano (pureza = 99,8%), metoxicloro (pureza = 98,7%) e hexaclorobenzeno (pureza = 99,8%) obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha). A partir das soluções estoque individuais, foram preparadas uma solução estoque contendo os quatro piretroides em acetonitrila e duas soluções estoque contendo combinações diferentes de organoclorados, uma em acetonitrila e outra em metanol. Uma solução estoque de trialometanos, em metanol (Merck/PA), foi preparada a partir de uma mistura padrão obtida da Supelco, Inc. (Bellefort, PA, USA), em metanol, contendo clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram estocadas a -18°C . A partir das soluções estoque foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações adequadas. Água ultra pura foi utilizada na otimização e validação dos métodos.

3.2.2 Microextração em fase sólida

Amostras de 25,0 mL de água fortificada com trialometanos e agrotóxicos organoclorados e piretroides foram transferidas para um frasco de vidro de 44 mL de capacidade e 2,5 cm de diâmetro, equipado com tampa de teflon e septo de silicone, contendo 0,500 g de Na_2HPO_4 . O sistema foi aquecido a uma temperatura constante de 60°C por 50 minutos. Empregado um suporte (*Holder*) manual para MEFS (Supelco, Bellefort, USA) a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de espessura (Supelco, Bellefort, USA) foi introduzida no frasco de amostragem sendo exposta ao espaço vazio do frasco (*headspace*) durante todo o período de aquecimento. Após extração, a fibra foi retirada e introduzida no injetor do cromatógrafo a gás, sendo exposta durante 10 min. Os analitos foram termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica.

3.2.3 Microextração em gota única

Amostras de 10 mL de água fortificada com os agrotóxicos organoclorados e piretroides em concentrações adequadas foram transferidas para frascos de vidro de 15 mL de capacidade e 1,9 cm de diâmetro, equipados com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10 μ L com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzida no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa à meia altura da coluna de líquido e o êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução. Uma microgota de 1,6 μ L foi mantida em contato com a amostra sob agitação de 380 rpm (PC-420, Corning), durante 15 minutos a 20 °C. Após a extração, 1,0 μ L foi recolhido na microseringa e injetado diretamente no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com o solvente extrator para garantir a limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

3.2.4 Análises Cromatográficas

Os dois métodos avaliados associam técnicas de preparo de amostra, MEFS-HS e MEGU-ID, à cromatografia gasosa. Para determinação dos analitos de interesse foi empregado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 2014, com detector por captura de elétrons. A temperatura do detector foi mantida em 300 °C, o nitrogênio foi empregado como gás de arraste e as injeções foram feitas com divisão de fluxo (*split*) de 1:5. As separações foram realizadas em uma coluna capilar Rtx-5MS, Restek (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 μ m de espessura de filme). Para determinação simultânea dos trialometas e dos agrotóxicos organoclorados e piretroides após extração por MEFS-HS foi empregada a seguinte programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 40 °C (2 min), com rampa de aquecimento de 20 °C/min até 200 °C, seguida de rampa de 4 °C/min até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 2 min. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e vazão do gás de arraste empregada foi de 1,2 mL min⁻¹. A fibra ficou exposta no injetor por 10 minutos. Para análise dos agrotóxicos organoclorados e piretroides após extração por MEGU-ID foi empregada vazão do gás de arraste de 1,0 mL min⁻¹ e a temperatura do injetor foi mantida em 280 °C. A

programação de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 150 °C (1 min), rampa de aquecimento de 30 °C/min até 200 °C, seguida de rampa de 3 °C/min até 240 °C, e finalmente rampa de 20 °C/min até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 6 min.

3.2.5 Otimização e Validação

Para estabelecer as melhores condições de extração dos analitos por MEFS-HS foram avaliados a adição de sal (0 e 2% m/v de Na_2HPO_4), a temperatura do sistema (40 e 60 °C) e o tempo de aquecimento (30 e 50 min). As variáveis da técnica de MEGU-ID que tiveram seu desempenho nas respostas cromatográficas avaliadas foram: solvente extrator, volume da microgota, tempo de contato da microgota com a amostra, volume e velocidade de agitação da amostra, além da adição de sal (NaCl).

Os métodos otimizados foram validados baseando-se nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [34], Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [35], Agência Reguladora dos Estados Unidos (FDA) [36] e Conferência Internacional em Harmonização (ICH) [37], que estabelecem critérios de validação de métodos analíticos. Os parâmetros analíticos avaliados foram: precisão intermediária, exatidão, linearidade, seletividade e limites de detecção e de quantificação.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fatores que afetam o desempenho das técnicas MEFS e MEGU foram otimizados. Na Tabela 12 está apresentado um resumo das condições de extração estabelecidas para cada uma das técnicas de preparo de amostra.

Tabela 12. Condições de extração otimizadas para as técnicas de MEFS-HS e MEGU-ID

Parâmetro	Técnica de preparo de amostra	
	MEFS-HS	MEGU-ID
Fase aceptora	Fibra (PDMS, 100 μm)	1,6 μL de n-hexano
Volume de amostra	25 mL	10 mL
Temperatura de extração	60 $^{\circ}\text{C}$	ambiente (20 $^{\circ}\text{C}$)
Tempo de extração	50 min	15 min
Agitação da amostra	não	380 rpm
Adição de sal à amostra	Na_2HPO_4	não

Para ambas as técnicas o tempo de extração otimizado é menor do que o tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio, mas suficiente para proporcionar a extração dos analitos com a detectabilidade desejada. Os tempos de extração adotados para a MEGU-ID e MEFS-HS foram de 15 e 50 min, respectivamente. A MEGU-ID apresenta, portanto, a vantagem de proporcionar uma frequência analítica cerca de três vezes maior do que aquela oferecida pela MEFS-HS, fator importante principalmente para emprego dos métodos analíticos em análises de rotina.

Adicionalmente, a técnica MEGU-ID apresenta outras vantagens como a não adição de sal e operação em temperatura ambiente. Para a MEFS-HS foi necessário aumentar a temperatura e a força iônica da solução-amostra para favorecer a passagem dos analitos de interesse da fase aquosa para a fase gasosa.

Empregando as condições de extração otimizadas foram avaliados os desempenhos analíticos dos métodos desenvolvidos, CG/MEFS-HS e CG/MEGU-ID. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, precisão intermediária, linearidade, exatidão e limites de detecção e quantificação do

método. A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa dos analitos. Na Tabela 13 estão apresentados os parâmetros de validação de cada método para os analitos em comum.

As duas técnicas possibilitaram a extração de agrotóxicos organoclorados e piretroides em água apresentando seletividade para as matrizes de interesse. Tanto a MEFS-HS quanto a MEGU-ID proporcionaram protocolos experimentais com desempenhos analíticos satisfatórios [34-37], além de limites de detecção inferiores aos valores máximos permitidos para cada agrotóxico em água destinada ao consumo humano [3]. Algumas diferenças na performance das técnicas podem ser observadas pela Tabela 13. Exceto para o endossulfam, a MEFS-HS apresentou coeficientes de variação inferiores aos apresentados pela MEGU-ID. Este fato pode estar relacionado com a operacionalidade de cada técnica. Ambas necessitam de um controle rigoroso das variáveis cinéticas quando se trabalha em condições de não equilíbrio, como foi o caso do presente estudo. A diferença está na manipulação da fase aceptora, pois enquanto para a MEFS já existe um dispositivo pronto para exposição da fibra (*holder*), na MEGU é necessário que o analista consiga reproduzir o exato volume de microgota exposta e recolhida em cada ensaio. As duas técnicas apresentaram exatidão adequada, com porcentagens de recuperação relativa dentro da faixa recomendada, que é de 70 a 130% [46]. Valores inferiores a 100% foram observados para a maioria dos analitos quando empregada a MEGU-ID, já na MEFS-HS para a maioria dos analitos a porcentagem de recuperação relativa foi igual ou maior do que 100%, podendo estar relacionado com o efeito de memória da fibra. Em relação à linearidade observa-se melhores valores de coeficientes de correlação (r) para a MEGU-ID ($> 0,99$), mas em intervalos de concentração mais estreitos do que aqueles apresentados pela MEFS-HS, principalmente no que se refere aos piretroides. Para ambas as técnicas, os limites de quantificação são menores do que o VMP para cada analito [1, 3]. As duas técnicas proporcionaram limites de quantificação semelhantes, sendo observado maior diferença apenas para a deltametrina, cujos LQ foram de 2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, quando empregado MEGU-ID e MEFS-HS, respectivamente. A menor detectabilidade da MEFS-HS pode estar relacionada com a baixa volatilidade da deltametrina.

Tabela 13. Precisão intermediária, linearidade, recuperação relativa e limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos desenvolvidos associando a cromatografia gasosa às técnicas de microextração em fase sólida e microextração em gota única

Analito	Microextração em fase sólida (MEFS-HS)						Microextração em gota única (MEGU-ID)					
	Precisão ^a	Linearidade		LD	LQ	Recup. ^b	Precisão ^a	Linearidade		LD	LQ	Recup. ^b
	(CV, %) ^c	Faixa (µg L ⁻¹)	r	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(%)	(CV, %) ^d	Faixa (µg L ⁻¹)	r	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(%)
Organoclorados												
Aldrin	10	0,01 - 4	0,9959	0,003	0,01	100	19	0,03 – 1,8	0,9980	0,009	0,03	71
DDT	14	0,05 - 4	0,9917	0,03	0,1	90	19	0,1 – 2	0,9981	0,03	0,1	91
Dieldrin	9	0,01 - 4	0,9624	0,003	0,01	100	14	0,01 – 0,6	0,9984	0,003	0,01	91
Endossulfam	19	0,05 - 4	0,9764	0,03	0,1	120	10	0,05 – 20	0,9988	0,015	0,05	90
Endrin	6	0,05 - 4	0,9541	0,015	0,05	120	15	0,05 – 1	0,9979	0,015	0,05	88
Heptacloro	10	0,01 - 4	0,9968	0,003	0,01	100	16	0,01 – 0,6	0,9959	0,003	0,01	97
Hexaclorobenzeno	12	0,01 - 4	0,9872	0,009	0,03	100	14	0,03 – 2	0,9988	0,009	0,03	86
Lindano	3	0,01 - 4	0,9607	0,009	0,03	100	9	0,03 – 4	0,9998	0,009	0,03	105
Piretroides												
λ-Cialotrina	13	1 - 140	0,9937	0,3	1	125	15	0,3 – 16	0,9958	0,09	0,3	102
Cipermetrina	13	1 - 140	0,9832	0,3	1	95	21	1 – 16	0,9972	0,3	1	107
Deltametrina	14	10 - 140	0,9660	3	10	95	17	2 – 16	0,9929	0,6	2	91
Permetrina	15	1 - 140	0,9768	0,3	1	115	17	1 – 16	0,9964	0,3	1	91

^aPrecisão intermediária; ^bRecuperação relativa; ^cCoeficiente de variação (n=7); ^dCoeficiente de variação (n=12); LD=Limite de detecção; LQ=Limite de quantificação.

A MEFS-HS e a MEGU-ID proporcionaram protocolos experimentais adequados para a análise de agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano. Uma vantagem da MEFS-HS é que esta técnica permitiu também a determinação de trialometanos (THM), além dos agrotóxicos. Testes preliminares foram realizados para avaliar a viabilidade do emprego da MEGU-ID para análise simultânea de agrotóxicos e THM, no entanto, a coluna cromatográfica empregada neste trabalho não permitiu a separação do metanol (solvente no qual é preparada a mistura padrão de THM comercializada) e do clorofórmio (principal THM), ocorrendo, portanto, a sobreposição dos picos referentes a estes dois compostos. Empregando a MEFS-HS não houve interferência do metanol na resposta cromatográfica do clorofórmio, uma vez que o metanol não foi extraído pela fibra empregada (PDMS) devido à sua baixa afinidade pelo material de recobrimento da mesma. Portanto, o método que associa a MEFS-HS à CG-DCE foi o único que proporcionou a análise simultânea de THM e agrotóxicos em amostras de água. Na Tabela 14 estão apresentados os parâmetros de validação do referido método para os trialometanos.

Tabela 14. Parâmetros de validação para os trialometanos do método analítico desenvolvido associando a cromatografia gasosa à técnica de microextração em fase sólida

Analito	Precisão ^a	Linearidade		LD	LQ	Recup. ^b
	(CV, %) ^c	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(%)
Trialometanos						
Bromodichlorometano	5	0,1 - 100	0,9933	0,03	0,1	70
Bromofórmio	3	0,1 - 100	0,9806	0,03	0,1	90
Clorofórmio	9	0,1 - 100	0,9961	0,15	0,5	120
Dibromodichlorometano	3	0,1 - 100	0,9863	0,03	0,1	110

^aPrecisão intermediária; ^bRecuperação relativa; ^cCoefficiente de variação (n=7);

^dCoefficiente de variação (n=12); LD=Límite de detecção; LQ=Límite de quantificação.

Os parâmetros de validação do método que associa a MEFS-HS à CG-DCE obtidos para os quatro trialometanos estão dentro dos padrões recomendados [34, 35], além disso, os limites de quantificação obtidos para estes compostos são menores do que os valores máximos permitidos para água destinada ao consumo humano [3].

Para análise de agrotóxicos organoclorados e piretroides em água, a escolha da MEFS-HS ou da MEGU-ID pode ser feita considerando as características de operação. Observando as condições de extração apresentadas na Tabela 12 verifica-se que a MEGU-ID apresenta vantagens como menor tempo de extração e operação em temperatura ambiente, além de dispensar a adição de sal à amostra. Características gerais das técnicas também devem ser levadas em consideração nesta escolha, como a facilidade de manipulação, disponibilidade e custo da fase aceptora. A MEFS apresenta a vantagem de minimizar erros operacionais por apresentar dispositivo de simples manipulação. No entanto, apresenta maior custo e a necessidade de reutilização da fibra em análises posteriores, o que pode causar erros relacionados ao efeito de memória da fibra. O custo do solvente para a MEGU é insignificante quando comparado ao custo das fibras disponíveis comercialmente para a MEFS [11]. Além disso, as microgotas são renovadas a cada extração, eliminando o efeito de memória observado na MEFS [66].

A disponibilidade de fase aceptora está relacionada com o modo de operação escolhido. Para emprego das técnicas pelo modo direto, a MEGU apresenta a vantagem de contar com uma infinidade de solventes orgânicos que podem ser empregados, bastando apenas que os mesmos sejam imiscíveis em fase aquosa. Solventes pouco polares como tolueno e n-hexano [52] tem sido empregados para extração de analitos com baixa afinidade pela fase aquosa e para extração de analitos polares, fases aceptoras compostas de líquidos iônicos [67] vêm sendo empregadas com sucesso. Já a MEFS fica limitada à disponibilidade comercial das fibras [10], sendo o polidimetilsiloxano (PDMS), o poliacrilato (PA) e o divinilbenzeno (DVB) os materiais de recobrimento empregados nas principais fibras comercializadas. Outra desvantagem da MEFS-ID é o contato da fibra com componentes da matriz, que diminui a vida útil da fibra, aumentando o custo da análise, além de impossibilitar, muitas vezes, o ajuste do pH da amostra, uma vez que este procedimento pode acarretar danos à fase adsorvente da fibra.

Quando se trata do emprego do modo indireto de extração (*headspace*) a limitação de disponibilidade de fase aceptora passa a ser da MEGU, uma vez que devido ao aquecimento da amostra para forçar a volatilização dos analitos, pode ocorrer também perda da fase aceptora pelo mesmo processo. Para evitar, portanto, a volatilização da microgota, é necessário que o solvente

empregado tenha baixa pressão de vapor, o que culmina na incompatibilidade com a técnica de quantificação, uma vez que o emprego da cromatografia gasosa exige uma elevada volatilidade de analitos e da fase extratora [11]. Neste caso a MEFS-HS se torna mais interessante por não apresentar esta desvantagem, uma vez que as fibras suportam temperaturas elevadas.

3.4 CONCLUSÃO

As duas técnicas, MEFS-HS e MEGU-ID, apresentaram desempenho analítico satisfatório possibilitando o desenvolvimento de protocolos experimentais adequados para a análise de agrotóxicos organoclorados e piretroides em amostras de água destinada ao consumo humano. A performance dos métodos foi semelhante, ficando a escolha da técnica de extração vinculada a fatores operacionais.

A não geração de resíduos tóxicos e a integração entre extração e injeção são vantagens em comum dessas técnicas. As diferenças operacionais mais significativas estão relacionadas com o modo de operação e tempo de extração, além do custo e disponibilidade da fase aceptora.

A frequência analítica proporcionada pela MEGU-ID é maior do que aquela proporcionada pela MEFS-HS, pois o tempo de extração da primeira é cerca de três vezes menor do que o da segunda técnica. No que se refere à fase aceptora, a MEGU-ID também é mais vantajosa, uma vez que o custo dos solventes é menor e a disponibilidade de mercado maior em relação às fibras empregadas na MEFS-HS. A simplicidade de operação é a característica que faz da MEFS-HS uma técnica mais interessante do que a MEGU-ID e este pode ser um fator decisivo para a escolha da técnica MEFS-HS para análises de rotina.

CONSIDERAÇÃO FINAL

O padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004, determina valores máximos permitidos para vinte e quatro agrotóxicos, quatro trihalometanos, além de inúmeras outras substâncias potencialmente tóxicas. O número elevado de substâncias que devem ser monitoradas requer o estabelecimento de métodos que permitam a análise multirresíduo, e até mesmo multiclasse, a fim de diminuir tempo e custo de análise. Além disso, a crescente preocupação ambiental exige que os métodos analíticos sejam ambientalmente seguros. Neste sentido, é necessário reduzir ou eliminar o emprego de solventes orgânicos nas etapas de preparo de amostra.

Associando a cromatografia gasosa às técnicas MEFS e MEGU foi possível estabelecer protocolos experimentais para análise simultânea de até três classes de compostos. Além disso, os métodos desenvolvidos não geram resíduos tóxicos. Esta é uma das vantagens das duas técnicas em relação às tradicionais técnicas de preparo de amostra. O número reduzido de etapas de manipulação e a simplicidade de operação são outras características que tornam estas técnicas mais vantajosas do que a extração líquido-líquido e extração em fase sólida, por exemplo.

Vantagens operacionais e desempenho analítico satisfatório fazem dos métodos propostos neste estudo uma boa alternativa para análise de agrotóxicos e trihalometanos em amostras de água destinada ao consumo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization, W. H. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 2008, Geneva.
2. Brunton, L. I.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. **GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. 2006, Rio de Janeiro: McGraw Hill. 1821p.
3. Brasil, **Portaria nº 518**, Ministério da Saúde. 2004, Brasília.
4. Wang, G.-S.; Deng, Y.-C.; Lin, T.-F. Cancer risk assessment from trihalomethanes in drinking water. **Science of The Total Environment**, 2007. 387(1-3): p. 86-95.
5. Dong, C.; Zeng, Z.; Yang, M. Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane-coated fiber by GC-ECD. **Water Research**, 2005. 39(17): p. 4204-4210.
6. Gonçalves, C.; Alpendurada, M. F. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. **Journal of Chromatography A**, 2002. 968(1-2): p. 177-190.
7. de Souza Pinheiro, A.; de Andrade, J. B. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Talanta**, 2009. 79(5): p. 1354-1359.
8. Cho, D.-H.; Kong, S.-H.; Oh, S.-G. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. **Water Research**, 2003. 37(2): p. 402-408.
9. Bahri, M.; Driss, M. R. Development of solid-phase microextraction for the determination of trihalomethanes in drinking water from Bizerte, Tunisia. **Desalination**. 250(1): p. 414-417.

10. Wardencki, W.; Curylo, J.; Namiesnik, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2007. 70(2): p. 275-288.
11. Xu, L.; Basheer, C.; Lee, H. K. Developments in single-drop microextraction. **Journal of Chromatography A**, 2007. 1152(1-2): p. 184-192.
12. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, 1990. 62: p. 2145-2148.
13. Júnior, J. L. R.; Ré-Poppi, N. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, 2007. 72(5): p. 1833-1841.
14. Chai, M.; Tan, G.; Lal, A. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits. **Analytical Sciences**, 2008. 24: p. 273-276.
15. Menezes Filho, A.; dos Santos, F. N.; de Paula Pereira, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**. 81(1-2): p. 346-354.
16. Zhang, Z.; Yang, M. J.; Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, 1994. 66(17): p. 844A-853A.
17. Jeannot, M. A.; Cantwell, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**, 1996. 68(13): p. 2236-2240.
18. Jeannot, M. A.; Cantwell, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. **Analytical Chemistry**, 1997. 69(2): p. 235-239.
19. Cortada, C., et al. Determination of organochlorine pesticides in complex matrices by single-drop microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2009. 638(1): p. 29-35.

20. Amvrazi, E. G.; Tsiropoulos, N. G. Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, 2009. 1216(14): p. 2789-2797.
21. Aguilera-Herrador, E., et al. Determination of trihalomethanes in waters by ionic liquid-based single drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2008. 1209(1-2): p. 76-82.
22. Brasil, **Resolução nº 357**, Ministério do Meio Ambiente, 2005, Brasília.
23. Hassal, K. A. **The biochemistry & uses of pesticides**. 1990, Hong Kong: Macmillan Press Ltd.
24. Baird, C. **Química Ambiental**. 2002, Porto Alegre: Bookman.
25. Brasil, **Portaria Nº 329**, Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1985, Brasília.
26. Brasil, **Lei Nº 11936**, Legislação, 2009, Brasília.
27. Santos, R. L. C., et al. Avaliação do efeito residual de piretroides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**. 2007. p. 276-283.
28. Hirata, R. Piretroides: estrutura química - atividade biológica. **Química Nova**, 1995. 18: p. 368-374.
29. Barrionuevo, W. R.; Lanças, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretroides em água, in **Química Nova**. 2001. p. 172-175.
30. Casas, V., et al. Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, 2006. 1124(1-2): p. 148-156.
31. Beceiro-González, E., et al. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2007. 1141(2): p. 165-173.

32. Menezes Filho, A.; dos Santos, F. N.; de Paula Pereira, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, 2010. 81(1-2): p. 346-354.
33. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, 2000. 902: p. 167-197.
34. INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**. Instituto Nacional de Metrologia, 2010, DOQ-CGCRE-08.
35. ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. RE Nº 899.
36. US-FDA. **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**. Center for Veterinary Medicine, 2001.
37. ICH. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B**. 1996.
38. Mmualefe, L. C., et al. Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 2009. 91(2): p. 239-244.
39. Pawliszyn, J. **Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice**. 1997, New York: Willey-VHC.
40. Mastovská, K.; Lehotay, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, 2004. 1040(2): p. 259-272.
41. Lord, H.; Pawliszyn, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, 2000. 902: p. 17-63.
42. Bahri, M.; Driss, M. R. Development of solid-phase microextraction for the determination of trihalomethanes in drinking water from Bizerte, Tunisia. **Desalination**, 2010. 250(1): p. 414-417.
43. Komatsu, E.; Vaz, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**. 2004. p. 720-724.

44. Sakamoto, M.; Tsutsumi, T. Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. **Journal of Chromatography A**, 2004. 1028(1): p. 63-74.
45. Qiu, C.; Cai, M. Ultra trace analysis of 17 organochlorine pesticides in water samples from the Arctic based on the combination of solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-electron-capture detector. **Journal of Chromatography A**, 2010. 1217(8): p. 1191-1202.
46. Tolosa, I.; Readman, J. W.; Mee, L. D. Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. **Journal of Chromatography A**, 1996. 725(1): p. 93-106.
47. Zhang, M., et al. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, 2008. 74(4): p. 599-604.
48. Lambropoulou, D. A., et al. Single-drop microextraction for the analysis of organophosphorous insecticides in water. **Analytica Chimica Acta**, 2004. 516(1-2): p. 205-211.
49. Xiao, Q., et al. Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. **Talanta**, 2006. 69(4): p. 848-855.
50. Ahmadi, F., et al. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A**, 2006. 1101(1-2): p. 307-312.
51. Psillakis, E.; Kalogerakis, N. Developments in single-drop microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2002. 21(1): p. 54-64.
52. de Jager, L. S.; Andrews, A. R. J. Development of a rapid screening technique for organochlorine pesticides using solvent microextraction (SME) and fast gas chromatography (GC). **Analyst**, 2000. 125(11): p. 1943-1948.

53. Zhao, L.; Lee, H. K. Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, 2001. 919(2): p. 381-388.
54. Psillakis, E.; Kalogerakis, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2003. 22(9): p. 565-574.
55. He, Y.; Lee, H. K. Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe. **Analytical Chemistry**, 1997. 69(22): p. 4634-4640.
56. López-Blanco, M. C., et al. Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of [alpha]- and [beta]-endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, 2003. 984(2): p. 245-252.
57. Tor, A.; Aydin, M. E. Application of liquid-phase microextraction to the analysis of trihalomethanes in water. **Analytica Chimica Acta**, 2006. 575(1): p. 138-143.
58. Theis, A. L., et al. Headspace Solvent Microextraction. **Analytical Chemistry**, 2001. 73(23): p. 5651-5654.
59. Amvrazi, E. G.; Tsiropoulos, N. G. Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2009. 1216(45): p. 7630-7638.
60. Psillakis, E.; Kalogerakis, N. Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. **Journal of Chromatography A**, 2001. 907(1-2): p. 211-219.
61. Oliveira, A. R. M., et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**. 2008. p. 637-644.

62. Saraji, M.; Esteki, N. Analysis of carbamate pesticides in water samples using single-drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 2008. 391(3): p. 1091-100.
63. Zhao, E., et al. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. **Journal of Chromatography A**, 2006. 1114(2): p. 269-273.
64. Chai, M. K.; Tan, G. H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 2009(117): p. 561-567.
65. Zambonin, C. G., et al. Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. **Food Chemistry**, 2004(86): p. 269-274.
66. Lambropoulou, D. A.; Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **Journal of Chromatography A**, 2007. 1152: p. 70-96.
67. Aguilera-Herrador, E., et al. Ionic liquid-based single-drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers in waters. **Journal of Chromatography A**, 2008. 1201(1): p. 106-111.