

RENATA DOMINGOS ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BASEADOS NA
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E PARTIÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO POR CROMATOGRAFIA 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
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A474d
2014
Alves, Renata Domingos, 1982-
Desenvolvimento de métodos baseados na
microextração líquido-líquido dispersiva e partição em
baixa temperatura para determinação multirresíduo de
agrotóxicos em água e solo por cromatografia gasosa /
Renata Domingos Alves. - Viçosa, MG, 2014.
xvi, 136f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.112-136.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Resíduos - Análise.
3. Extração (Química). 4. Cromatografia gasosa.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 363.7384

RENATA DOMINGOS ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BASEADOS NA
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E PARTIÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO POR CROMATOGRAFIA 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: 20 de agosto de 2014.

Fernando Barboza Egreja Filho

José Humberto de Queiroz

Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Carlos Roberto Bellato

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão, e avós
pelo amor incondicional, confiança e apoio
em todas as etapas de minha vida.
E ao Hideraldo, por seu companheirismo e amor.

“Eu posso ir muito além de onde estou.
Posso voar e subir sem me cansar
Ir pra frente sem me fatigar
Vou com asas, como águia,
Pois confio no Senhor!
Que me dá forças pra ser um vencedor.”

Eros Biondini

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de minha existência, pelas conquistas que Ele tem me proporcionado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI) pelo apoio financeiro.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, orientadora e amiga, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, ensinamento, confiança, orientação e amizade.

Ao professor Antônio Augusto Neves por ter aceitado a co-orientação deste trabalho. Muito obrigada pelas sugestões, críticas, ensinamentos e amizade.

Ao professor André Fernando de Oliveira, pela disponibilidade em ajudar, ensinar e pelas sugestões. Muito obrigada também pela amizade.

Aos professores Carlos Roberto Bellato e Raphael Bragança A. Fernandes, por todo o suporte técnico na realização deste projeto, colaborando de maneira indispensável com este trabalho.

Aos professores Fernando B. Egreja Filho, Raphael Bragança A. Fernandes e Carlos Roberto Bellato por aceitarem participar da banca examinadora e pelas sugestões que contribuiram para a qualidade desta tese.

Aos técnicos, Ricardo Martins (DEQ-UFV), Ricardo Natalino (DEQ-UFV), Mário Sérgio (DPS-UFV), Luis Eduardo (DAG-UFV) pela colaboração e auxílio em minhas análises.

Aos estagiários, Fernando Souza, Lívia França, Mariana Diniz e Thais Lindenberg e demais auxiliares, Roberta Condé, Vitor Libardi, Luiz Philipi, Mariana Zantelli e Ana Carolina obrigada pela ajuda constante, sem o auxílio de vocês não seria possível a realização de todas as etapas deste trabalho.

À turma de coleta de amostras: Maria Eliana, Antônio Augusto, André Fernando, Adley Bergson, Artulino Alves, Emílio Alves, Fernando Souza, Hideraldo Silva, Luiz Philip, Miraldo Santos, Rodrigo Oliveira e Taciana Silveira, obrigada pela disposição, dedicação e animação.

Aos 'motorizados' do laboratório: Maria Eliana, Antônio Augusto, André Fernando, Adley Bergson, Anna Isabel, Carlos Eduardo Soares, Carlos Eduardo

Oliveira, Elenice Carlos, Flaviane Souza, Luiz Manoel, Ricardo Martins e Simone Goulart obrigada pelas muitas vezes que vocês se dispuseram a auxiliar nos deslocamentos entre um laboratório e outro.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica – LAQUA, ou melhor, família LAQUA: Adley Bergson, Alessandra Zinato, Anna Isabel Guido, Carlos Soares, Carlos Eduardo Oliveira, Elenice Carlos, Flaviane Sousa, Fernanda Heleno, Gustavo Gonçalves, Luiz Manoel Noronha, Simone Goulart, Lívia Carvalho, Carolina Monteiro, Agatha Lopes, Cristiane Almeida, Isadora Mendes, Adriana, Bethania Mansur, Cyntia Rocha, Raquel Dardengo, Luiz Felipe Apolônio, Robson Alves, Nívia Oliveira, Marcos Rafael, Nelson Abreu, Gleissy Santos, Mariana Diniz, Thais Lindenberg, Roberta Condé, Fernando Souza, Lívia França, Mariana Zanotelli, Ana Carolina, Ana Schettini, Eduarda Resende, Vitor Libardi, Luiz Philip, Miraldo Santos, Guilherme Salvador, Bruno Carvalho, Sofia Azevedo, Paula Sevenini, Igor Forattini, Camila Ferraz e Tamires Castro, obrigada pelo auxílio, amizade e maravilhosa convivência.

Aos colegas do LABQUIM, Danilo de Castro, Fabiano Almeida, Jaderson Milagres, José Neto, Liany Miranda e Thiago Toledo obrigada pela amizade e auxílio na digestão de amostras e análise de metais.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Emílio e cunhada Gizelly, avós, tios e primos pelo apoio, carinho e torcida, em especial ao Tio Nem, que quase todas as semanas me fazia sorrir com suas ligações e carinho. À Naiara e Ana Tereza pela amizade eterna.

Ao Hideraldo, pelo companheirismo, compreensão, paciência, apoio e pela presença e participação em todos os momentos.

Às colegas de república, Giuliana e Izabel Chaves, Anna Isabel Guido e Fernanda Heleno obrigada pela amizade e pelos bons momentos de convivência.

À Aparecida Mageste, Roselaine Cunha, Taciana Silveira e Liany Miranda, obrigada pela amizade, carinho, paciência, incentivo e por não me deixarem desistir.

Às professoras Astréa Silva e Alessandra Ambrozim, obrigada pela amizade, sugestões e apoio. Ao colega Tiago Lage, obrigada pelas muitas vezes que me socorreu, principalmente às vésperas dos seminários.

Meus agradecimentos aos amigos e colegas que de uma forma ou de outra auxiliaram para a realização deste trabalho e que com pesar não mencionei nesses agradecimentos.

BIOGRAFIA

RENATA DOMINGOS ALVES, filha de Artulino Alves Sobrinho e Maria Madalena Domingos Alves, nasceu em Manhuaçu, Minas Gerais, em 10 de abril de 1982.

Em fevereiro de 2001, iniciou o Curso de Graduação em Ciências, pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina, diplomando-se como licenciada em Química em dezembro de 2004.

Em janeiro de 2005, após aprovação em concurso público, foi nomeada professora efetiva do Estado de Minas Gerais, iniciando as atividades nesse mesmo ano.

Em março de 2008, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, titulando-se em fevereiro de 2010. Iniciou em seguida o Doutorado em Agroquímica nessa mesma Universidade, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE ÁGUAS SUPERFICIAIS E RESIDUÁRIAS	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	15
2.2. INSTRUMENTAÇÃO	17
2.3. REGIÃO DE ESTUDO.....	19
2.4. COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA.....	21
2.5. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS.....	22
2.6. ANÁLISE DE METAIS POR ICP-OES	23
2.7. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	24
2.8. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS.....	29
2.9. AMOSTRAS REAIS.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS.....	33
3.2. ANÁLISE DE METAIS	36
3.3. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	42
4. CONCLUSÕES	73
CAPÍTULO 2 – HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM SOLOS AGRÍCOLAS.....	74
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	80
2.2. INSTRUMENTAÇÃO.....	81

2.3.	ÁREA DE ESTUDO.....	82
2.4.	AMOSTRAS DE SOLO	82
2.5.	EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP).....	83
2.6.	PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO.....	86
2.7.	ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO	88
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1.	OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP.....	91
3.2.	PARÂMETROS ANALÍTICOS SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP	94
3.3.	ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO	108
4.	CONCLUSÕES	110
	CONCLUSÕES GERAIS.....	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos agrotóxicos selecionados neste estudo	4
Tabela 2. Concentração de elementos na solução de trabalho usada para preparar as soluções da curva analítica para determinar metais em água por ICP-OES	16
Tabela 3. Condições de operação do ICP-OES	18
Tabela 4. Pontos de amostragem de água superficial na Bacia do Rio Manhuaçu	21
Tabela 5. Programação do forno micro-ondas	24
Tabela 6. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=5) para otimização de LLE/LTP na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água	27
Tabela 7. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3)	29
Tabela 8. Características físicas e químicas das amostras de água superficial coletadas na microbacia do rio Manhuaçu	34
Tabela 9. Características físicas e químicas das amostras de água residuária coletadas em Martins Soares, MG.....	36
Tabela 10. Parâmetros analíticos obtidos na determinação de metais em água por ICP-OES	37
Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos para a determinação de metais em amostras de água por ICP-OES	37
Tabela 12. Valores de recuperação e desvios padrão relativo na análise de metais em amostras de água superficial da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu, MG	38
Tabela 13. Determinação de metais totais em águas superficiais da microbacia do Rio Manhuaçu por ICP-OES	39
Tabela 14. Tempos de retenção dos agrotóxicos após condições cromatográficas otimizadas	43
Tabela 15. Comparação dos parâmetros das equações de regressão da linearidade das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em tolueno.....	44
Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos utilizados na otimização de DLLME/LDS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água	50
Tabela 17. Resultados do planejamento fatorial 2^3 completo para otimização DLLME/LDS.....	56
Tabela 18. Comparação dos parâmetros das equações de regressão da linearidade de dois métodos de extração multirresíduos de agrotóxicos em amostras de água.....	60
Tabela 19. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de água	61
Tabela 20. Comparação das recuperações de agrotóxicos em amostras de água fortificadas e extraídas por LLE/LTP e DLLME/LDS.....	63
Tabela 21. Desvio padrão relativo (n=6) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água com os métodos LLE/LTP e DLLME/LDS empregando GC/ECD	65
Tabela 22. Comparação da precisão intermediária (n=18) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água com o método LLE/LTP e DLLME/LDS empregando GC/ECD	66
Tabela 23. Comparação do efeito de matriz obtido após a etapa de preparo de amostras	67
Tabela 24. Fatores de enriquecimento (EF) obtidos para 15 agrotóxicos em amostras de água submetidas à técnica DLLME/LDS e GC/ECD.....	70
Tabela 25. Planejamento fatorial 2^4 em duplicata para otimização SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP na extração multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo	85
Tabela 26. Caracterização física e química das amostras de solo coletadas em área agrícola da microbacia do rio Manhuaçu, MG.....	90
Tabela 27. Resultados do planejamento fatorial 2^4 completo para otimização SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP	93

Tabela 28. Tempos de retenção dos agrotóxicos após condições cromatográficas otimizadas e parâmetros das equações de regressão da linearidade da curva analítica preparada em tolueno	96
Tabela 29. Parâmetros das equações de regressão da linearidade do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo e análise por GC/ECD	98
Tabela 30. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo e valores orientadores para agrotóxicos em solos no estado de São Paulo de acordo com CETESB (2005)	99
Tabela 31. Recuperações de agrotóxicos em amostras de solo fortificadas e extraídas por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP	101
Tabela 32. Desvios padrão relativo para avaliação da repetitividade (n=6) e precisão intermediária (n=18) dos agrotóxicos extraídos de amostras de solo pelo método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP empregando GC/ECD.....	103
Tabela 33. Efeito de matriz (ME) das amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD	104
Tabela 34. Fatores de enriquecimento (EF) obtidos para 15 agrotóxicos em amostras de solo submetidas ao método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD.....	106
Tabela 35. Comparação da recuperação e do fator de enriquecimento obtidos na análise de agrotóxicos multiclasse em amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e por SLE/LTP-DLLME/LDS.....	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da Bacia do rio Manhuaçu, MG com a indicação da região de estudo nos municípios de Luisburgo (13), Manhuaçu (14) e São João do Manhuaçu (23). 20
- Figura 2.** Gráfico dos teores de metais totais em amostras de água superficial da microbacia do rio Manhuaçu coletadas em: () mar/2012, () jun/2012, () dez/2012 e () mar/2013 comparadas ao valor máximo permitido () pelo CONAMA 357/2005. 40
- Figura 3.** Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em acetonitrila: 1) Hexaclorobenzeno ($30 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($30 \mu\text{g L}^{-1}$); (3) Disulfotom ($43 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($90 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($6 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($80 \mu\text{g L}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($750 \mu\text{g L}^{-1}$); (8) Triadimenol ($200 \mu\text{g L}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($26 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($9 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($700 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($26 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Bifentrina (padrão interno, $200 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Difenconazol ($80 \mu\text{g L}^{-1}$); (16) Azoxistrobina ($37 \mu\text{g L}^{-1}$). As condições cromatográficas foram descritas em Materiais e métodos. 43
- Figura 4.** Comparação de técnicas para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água. 46
- Figura 5.** Influência do tipo e tempo de agitação da técnica LLE/LTP na resposta cromatográfica dos analitos. Foram testados agitação em vórtex por 0,5; 1 e 2 min; mesa agitadora por 30, 60, e 120 min. 47
- Figura 6.** Influência da proporção amostra:acetonitrila na determinação multirresíduo de agrotóxicos em água. 48
- Figura 7.** Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores velocidade de agitação, adição de ácido e força iônica sobre a extração de agrotóxicos em amostras de água para otimização da LLE/LTP. 49
- Figura 8.** Efeito do solvente de extração na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3. 51
- Figura 9.** Efeito do solvente dispersor na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator 100 μL ; volume de solvente dispersor: 500 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3. 52
- Figura 10.** Efeito do volume de solventes dispersor (acetona) no volume de fase orgânica superior recuperado por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n \geq 4. 53
- Figura 11.** Efeito do volume dos solventes extrator (tolueno) e dispersor (acetona) na resposta cromatográfica dos agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3. 54
- Figura 12.** Efeito do volume dos solventes extrator (tolueno) e dispersor (acetona) no fator de enriquecimento dos agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3. 55
- Figura 13.** Áreas relativas dos agrotóxicos obtidas no planejamento fatorial 2³ para otimização de DLLME/LDS em amostras de água. 56
- Figura 14.** Gráficos de Pareto com os efeitos dos fatores adição de NaCl, pH e tempo de extração na resposta relativa dos agrotóxicos para otimização da DLLME/LDS. 57
- Figura 15.** Cromatogramas de extratos de amostra de água superficial (Ponto 1) submetidas à LLE/LTP (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (3) Disulfotom ($900 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (8) Triadimenol ($900 \mu\text{g L}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (PI) Bifentrina (PI; $200 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Difenconazol ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($320 \mu\text{g L}^{-1}$). 59

- Figura 16.** Cromatogramas de extratos de amostra de água superficial (Ponto 1) submetidas à DLLME/LDS (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (3) Disulfotom ($7,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($4 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós (19mg L^{-1}); (7) Tiametoxam (94mg L^{-1}); (8) Triadimenol (62mg L^{-1}); (9) Endosulfam I ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($1 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($4 \mu\text{g L}^{-1}$); (PI) Bifentrina (PI; $3 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Difenconazol ($7,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($25 \mu\text{g L}^{-1}$)..... **59**
- Figura 17.** Distribuição dos 15 agrotóxicos de acordo com o efeito de matriz dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS em amostras de água..... **68**
- Figura 18.** Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de água superficial coletadas em março de 2013 e submetidas ao DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min..... **72**
- Figura 19.** Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de água residuária obtidos por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min..... **72**
- Figura 20.** Influência do tipo e tempo de agitação da técnica SLE/LTP-DLLME/LDS na resposta cromatográfica dos analitos. VT= agitação em vórtex e MA= mesa agitadora..... **91**
- Figura 21.** Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores tempo de agitação, adição de NaCl, tempo de extração e tipo de partição na resposta dos agrotóxicos para otimização da SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP..... **94**
- Figura 22.** Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em tolueno: 1) Hexaclorobenzeno ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (3) Disulfotom ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (8) Triadimenol ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Difenconazol ($15000 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$). As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos..... **95**
- Figura 23.** Cromatogramas de extratos de amostra de solo submetidas à SLE-DLLME/LDS (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($937 \mu\text{g kg}^{-1}$); (2) Lindano ($12 \mu\text{g kg}^{-1}$); (3) Disulfotom ($312 \mu\text{g kg}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($125 \mu\text{g kg}^{-1}$); (5) Aldrin ($125 \mu\text{g kg}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($625 \mu\text{g kg}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($1562 \mu\text{g kg}^{-1}$); (8) Triadimenol ($937 \mu\text{g kg}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($31 \mu\text{g kg}^{-1}$); (10) Dieldrin ($16 \mu\text{g kg}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($1562 \mu\text{g kg}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($156 \mu\text{g kg}^{-1}$); (13) DDT ($62 \mu\text{g kg}^{-1}$); (14) Difenconazol ($469 \mu\text{g kg}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($78 \mu\text{g kg}^{-1}$)..... **97**
- Figura 24.** Distribuição dos 15 agrotóxicos de acordo com o efeito de matriz do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP em amostras de solo..... **105**
- Figura 25.** Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de solo coletadas na microbacia do rio Manhuaçu em março de 2013 e submetidas ao SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. Condições de extração: quantidade de amostra: 4 g; Volume de solvente extrator 1: 12 mL (acetonitrila:água, 1:2); tempo de agitação: 1 min em vórtex; tempo de partição em baixa temperatura ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$): 2 h; Evaporação a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e recuperação em água: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 1,20 mL; tempo de extração: 1 min; tempo de partição em baixa temperatura ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$): 25 min..... **109**

RESUMO

ALVES, Renata Domingos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Desenvolvimento de métodos baseados na microextração líquido-líquido dispersiva e partição em baixa temperatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água e solo por cromatografia gasosa.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e Laércio Zambolim.

A microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu é uma sub-bacia do Rio Doce, cujo principal rio é o rio Manhuaçu. Essa bacia se localiza na zona leste de Minas Gerais, que se destaca pela grande produção de café. A região ainda caracteriza-se pelo relevo acidentado, favorecendo a erosão e também, com grandes possibilidades de que os agrotóxicos e fertilizantes aplicados nas plantações de café contaminem as águas superficiais. Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar essa região com relação à presença de resíduos de agrotóxicos e metais. Para alcançar este objetivo foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de resíduos de 15 agrotóxicos de diferentes classes (aldrin, azoxistrobina, clorotalonil, clorpirifós, ciproconazol, DDT, dieldrin, difenoconazol, disulfotom, endosulfam, hexaclorobenzeno, lindano, tiametoxam e triadimenol) em amostras de água e solo. Foram determinados também os metais Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de água. A separação, identificação e quantificação dos agrotóxicos foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. As técnicas extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) e microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (DLLME/LDS) foram otimizadas e validadas para extração dos resíduos de agrotóxicos de amostras de água. Para análise das amostras de solo foi desenvolvido um novo método hifenando as técnicas extração sólido líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e microextração líquido-líquido dispersiva com partição a baixa temperatura (DLLME/LDS/LTP) e cromatografia gasosa. Nas condições otimizadas, para amostras de água foram obtidos limites de detecção (LOD) na faixa de 0,7 à 91 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LLE/LTP e de 0,007 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DLLME/LDS. Para as amostras de solo, o limite de detecção do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP variou de 0,4 a 479 $\mu\text{g kg}^{-1}$. De modo geral as recuperações para a maioria dos compostos ficaram na faixa de 70-120%, com desvio padrão relativo (RDS) abaixo de 20%, para ambas as matrizes. Para água, foi verificado um efeito de matriz mínimo para a maioria dos agrotóxicos. Entretanto, para o solo, uma

supressão média da resposta cromatográfica (-20 a -50%) para a maioria dos agrotóxicos (87%) foi verificada. O fator de enriquecimento do método DLLME/LDS, para água, variou de 37 a 110. Para solo, o fator de enriquecimento variou de 1,5 a 24,5. A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foi utilizada para a determinação de metais em amostras de águas. Os valores de LOD da técnica variaram de 3 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações para amostras de água avaliadas em três níveis de fortificação variaram de 70 a 110% com desvios padrão relativos entre 0,5 a 19%. Os métodos DLLME/LDS-GC/ECD, SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP-GC/ECD foram aplicados em análises de amostras de água e solos da região cafeeicultora em estudo. Nenhum dos agrotóxicos monitorados foi detectado nas amostras de águas superficiais e solos nos períodos avaliados. A técnica ICP-OES foi utilizada para determinação de metais em amostras de água. Foram encontrados Fe, Mn, e Pb (este último em uma amostra) em concentrações acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Verificou-se que DLLME/LDS apresenta limites de detecção e quantificação mais baixos que LLE/LTP, sendo, portanto, mais adequado na determinação de agrotóxicos em nível de traço. Destaca-se, porém, que LLE/LTP é mais simples e rápida que DLLME/LDS sendo mais adequado para análises de rotina que não exijam elevada sensibilidade. Ressalta-se, que pela primeira vez a etapa de centrifugação da técnica DLLME, utilizada para acelerar a separação de fases, foi substituída pelo abaixamento de temperatura no novo método desenvolvido, obtendo-se resultados semelhantes e uma etapa menos laboriosa. Desta maneira, ao melhor de nosso conhecimento, a combinação de SLE/LTP com DLLME/LDS/LTP foi realizada pela primeira vez para determinação de níveis traço de agrotóxicos de diferentes classes em solos agrícolas. O novo método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP-GC/ECD é linear, exato, preciso, utiliza pouca quantidade de solvente orgânico e apresenta bom fator de enriquecimento de maneira a permitir a utilização deste para análise de traço de resíduos de agrotóxicos em amostras de solos.

ABSTRACT

ALVES, Renata Domingos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Development of methods based on dispersive liquid-liquid microextraction and low temperature partitioning for multiresidue determination of pesticides in soil and water by gas chromatography.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Antônio Augusto Neves and Laércio Zambolim.

The Manhuaçu River watershed is a sub-basin of the Doce River whose the main river is the Manhuaçu River. This basin is located in eastern of Minas Gerais, whose economy is based on coffee production. The mountain region favours erosion and also there is a high probability the pesticides and fertilizers applied on coffee plantations contaminate surface water. Thereby, this work developed analytical methods for the determination of 15 pesticides residues of different classes (aldrin, azoxistrobin, chlorotalonil, chlorpyrifos, ciproconazole, DDT, dieldrin, difenoconazole, disulfoton, endosulfan, hexachlorobenzene, lindane, thiamethoxan e triadimenol) in water and soil samples. Metals such as Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn were also determined in water samples. Pesticides were analysed by gas chromatography with electron capture detection. The methods, liquid-liquid extraction with low temperature partitioning (LLE/LTP) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) were optimized and validated for the extraction of pesticide residues in water samples. For analysis of soil samples, a new method was developed combining solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE/LTP) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). Under the optimized conditions, the limits of detection (LOD) were from 0.7 to 91 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 0.007 to 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LLE/LTP and DLLME/LDS, respectively, for water samples. For soil samples, the limits of detection ranged from 0.4 to 47 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The recoveries were in the range of 70-120% for most of the compounds. Acceptable results for both methods of precision (repeatability and intermediate precision) were obtained, the relative standard deviation were below 20% for both matrices. For water, a minimum matrix effect for most of the pesticides was observed. However, for soil, average signal suppression (from -20 to -50%) for most of the pesticides (87%) was observed. The enrichment factor of DLLME/LDS method for water ranged between 37 and 110. For soil, it ranged from 1.5 to 24.5. The Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) was used for the determination of metals in water samples. The LOD of the method ranged from 3 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. The recoveries for water samples evaluated at

three fortification levels ranged from 70 to 110% with relative standard deviations from 0.5 to 19%. The DLLME/LDS-GC/ECD, SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP-GC/ECD and ICP-OES methods were applied in the analysis of water and soil samples from the coffee-growing region under study. None of the target pesticides were detected in surface water and soil samples. In the analysis of metals in surface water, Fe, Mn, and Pb (the latter in one sample) were found at concentrations above the maximum limit established by Brazilian legislation. It was found that DLLME/LDS is more sensitive method than LLE/LTP, therefore, the former is more suitable to determine the level of trace pesticides. The latter is simpler and faster than the former, so, it is more suitable for routine analyzes that do not require high sensibility. It is the first time that centrifugation step in DLLME method was replaced by low temperature partitioning to accelerate the phase separation. The obtained results were similars. Thus, to the best of our knowledge, the combination of SLE/LTP with DLLME/LDS/LTP was performed at the first time for determination of trace levels of multiresidue pesticides in agricultural soils. The new method SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP is linear, accurate, precise, with low organic solvent consumption, relatively short sample preparation time and has a good enrichment factor so as to allow for the use in trace analysis of pesticide residues in soil samples from coffee producing region.

INTRODUÇÃO GERAL

A Bacia do Rio Manhuaçu, cujo principal rio é o Rio Manhuaçu, é uma sub-bacia do Rio Doce. O Rio Manhuaçu nasce na Serra da Seritinga, divisa dos municípios de Divino e São João do Manhuaçu, e deságua no Rio Doce pela margem direita, acima da cidade de Aimorés, do qual é um dos principais afluentes. A microbacia hidrográfica do Rio Manhuaçu apresenta uma população estimada de 308.792 habitantes (Censo 2008), abrange um total de 32 municípios, possui extensão de 264 km e área de drenagem de 9.011 km², tendo como principais afluentes pela margem direita os rios José Pedro e São Manuel (IGAM, 2012). Outros tributários do Rio Manhuaçu são Córrego Bom Jesus, Ribeirão Manhuaçuquinho, Rio São Simão, Ribeirão Santo Apolinário, Rio Jacutinga, Rio Alvarenga, Ribeirão Bueno, Rio Itueto, Ribeirão São Luiz, Rio Jequitibá, Córrego da Onça, Ribeirão Japu e Rio Capim (ONG-PRÓ-RIO-MANHUAÇU, 2011).

Essa bacia se localiza na região de montanhas do leste de Minas Gerais, e possui como principal produto agrícola o café. Dentre os municípios que a compõe, Manhuaçu, Luisburgo e São João do Manhuaçu são destaques no cenário agrícola regional em virtude da elevada produtividade (FARIA *et al.*, 2010). A região das Matas de Minas, formada pelos polos cafeeiros de Manhuaçu, Muriaé e Viçosa, produziram em 2013 aproximadamente seis milhões de sacas. Dessas, 3,3 milhões foram da região de Manhuaçu. Esse volume somado ao das regiões do rio Doce e Central, representaram cerca de 24% da produção mineira e 12% da do país. A área plantada de café na região de Manhuaçu foi de 145.742 hectares, sendo 129.595 hectares com produção estimada em 3.282.440 sacas beneficiadas de 60 quilos e produtividade de 25,3 sacas por hectare (EMATER, 2014). Além do café, verifica-se também a presença de pastagens, que juntos perfazem, em alguns casos, mais de 80% de todo o uso do solo (FARIA *et al.*, 2010).

A maior parte de suas montanhas está coberta por essa cultura em plantio em curvas de nível. A região caracteriza-se pelo relevo acidentado, o que favorece a erosão e também, há possibilidade de que agrotóxicos e fertilizantes aplicados nas plantações de café sejam carregados para as águas superficiais, contaminando-as (SOARES *et al.*, 2012).

A preocupação em relação aos impactos das atividades agrícolas ao meio ambiente (PRIMEL *et al.*, 2005; RISSATO *et al.*, 2006; PERUZZO *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2013a; SCHMITZ *et al.*, 2014a; SCHMITZ *et al.*, 2014b; YOHANNES *et al.*, 2014) tem sido crescente nos últimos anos, de modo que é necessário identificar os contaminantes

e/ou caracterizar as principais fontes de contaminação. A poluição das águas superficiais com produtos químicos tóxicos e excesso de nutrientes tem sido uma questão de preocupação ambiental em todo o mundo (RISSATO *et al.*, 2004; VEGA *et al.*, 2005; MALOSCHIK *et al.*, 2007; HILDEBRANDT *et al.*, 2008; HOAI *et al.*, 2011; VARCA, 2012; APARICIO *et al.*, 2013), dada a importância da qualidade da água potável para a saúde pública e da qualidade da água bruta para a vida aquática. As alterações na qualidade das águas superficiais podem ter causas naturais, contudo modificações podem ser agravadas pelas atividades antrópicas decorrentes do uso e ocupação do solo, podendo-se citar mudança do regime hídrico, desmatamento, mineração, práticas agrícolas, urbanização, entre outros (EZAKI *et al.*, 2011).

A qualidade das águas superficiais e solos nos municípios de Manhuaçu, São João do Manhuaçu e Luisburgo merece atenção especial visto que estes municípios se encontram localizados em uma região de nascentes para a bacia hidrográfica do Rio Manhuaçu e também por se constituírem importantes mananciais de captação de água para abastecimento público. Destaca-se também que o rio Manhuaçu apresenta contaminação por efluentes domésticos não tratados adequadamente. Contaminação esta que têm aumentado ao longo dos anos, acompanhando o desenvolvimento da região. Assim, destaca-se a necessidade de se avaliar a qualidade das águas superficiais e solos na microbacia do Rio Manhuaçu no que tange aos parâmetros físicos e químicos.

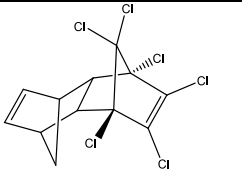
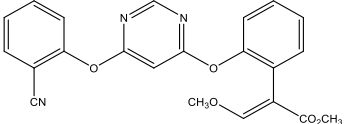
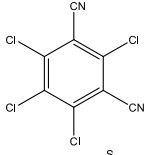
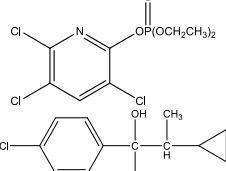
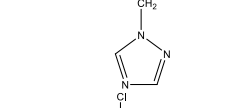
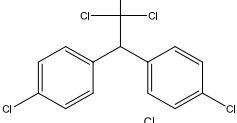
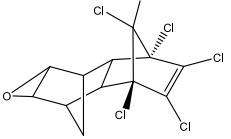
No comércio de Manhuaçu podem ser encontrados dezenas de produtos agrícolas permitidos e utilizados na cultura de café. Para seleção dos agrotóxicos a serem analisados e também da região de estudo, foram realizadas reuniões com o representante regional da Emater-MG em Manhuaçu, MG. Quinze princípios ativos utilizados atualmente ou no passado, foram selecionados para este estudo, visando elucidar o destino dos mesmos no ambiente e avaliar a possível contaminação na região. Dentre os agrotóxicos selecionados estão: aldrin, azoxistrobina, ciproconazol, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, difenoconazol, disulfotom, endosulfam I, endosulfam II, hexaclorobenzeno, lindano, tiametoxam e triadimenol. A estrutura e massa molar, bem como algumas propriedades físico-químicas de cada agrotóxico são apresentadas na Tabela 1.

Para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água superficial, foram otimizadas, validadas e comparadas duas técnicas de extração: a primeira emprega a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) adaptado de Goulart *et al.*, (2010) e a segunda a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME/LDS)

(FARAJZADEH *et al.*, 2009; MOINFAR; HOSSEINI, 2009). A análise dos extratos foi realizada por cromatografia gasosa, empregando-se o detector por captura de elétrons (GC/ECD).

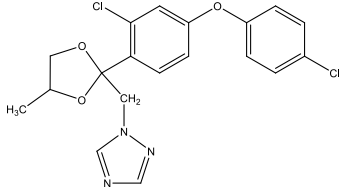
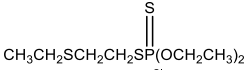
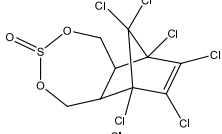
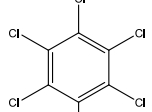
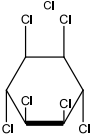
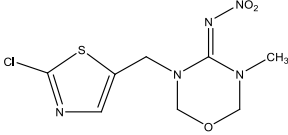
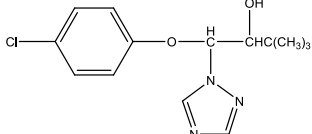
Amostras de solo de áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu também foram avaliadas quanto à presença de agrotóxicos. Para determinação dos 15 analitos em estudo, foi desenvolvido um novo método, que consiste na hifenação de duas técnicas, a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME/LDS). A combinação destas duas técnicas possibilita a determinação de resíduos de agrotóxicos em uma amostra complexa e une as vantagens de ambas as técnicas: extração e *clean up* da amostra na primeira etapa (SLE/LTP) e pré-concentração dos analitos (DLLME/LDS) na segunda etapa. Destaca-se ainda, que pela primeira vez está sendo proposta uma modificação da técnica DLLME/LDS ainda não relatada na literatura. Esta modificação visa eliminar a etapa de centrifugação utilizada na técnica convencional proposta inicialmente por Rezaee *et al.*, (2006) e modificada por Moinfar *et al.* (2009) e Farajzadeh *et al.* (2009). Como vantagem destaca-se que a partição a frio em freezer é menos laboriosa que a etapa de centrifugação.

Tabela 1. Propriedades dos agrotóxicos selecionados neste estudo

Composto	Fórmula	Grupo químico	Classe	Massa molar / (g mol ⁻¹)	S / (mg L ⁻¹)	K _{ow}	PE / °C
Aldrin		Ciclodieno	Inseticida	364,91	0,027	6,5	145
Azoxistrobina		Estrobilurina	Fungicida	403,40	6,7	2,5	360
Chlorotalonil		Cloronitrila	Fungicida	265,91	0,81	2,9	350
Clorpirifós		Organofosforado	Inseticida	350,89	1,0	4,7	-
Ciproconazol		Triazol	Fungicida	291,78	93	3,1	-
DDT		Organoclorado	Inseticida	354,49	0,006	6,9	185
Dieldrin		Organoclorado	Inseticida	380,91	0,14	3,7	385

(continuação na próxima página)

Tabela 1. (Continuação)

Composto	Fórmula	Grupo químico	Classe	Massa molar / (g mol ⁻¹)	S / (mg L ⁻¹)	K _{ow}	PE / °C
Difenoconzole		Triazol	Fungicida	406,26	15	4,4	101
Disulfotom		Organofosforado	Inseticida, acaricida	274,4	25	3,9	-
Endosulfam		Organoclorado (mistura de isômeros alfa e beta)	Inseticida, acaricida	406,93	0,32	4,7	-
Hexaclorobenzeno		Hidrocarboneto aromático clorado	Fungicida	284,8	0,0047	3,9	325
Lindano		Organoclorado	Inseticida, acaricida	290,82	8,5	3,5	323
Thiametoxam		Neonicotinoide	Inseticida	291,71	4100	-0,13	-
Triadimenol		Triazol (mistura de isômeros)	Fungicida	295,76	72	3,2	-

S = solubilidade em água a 20 °C; k_{ow} = Log do coeficiente de partição octanol-água (pH 7,0 e 20 °C); PE = ponto de ebulição.
Fonte: (ANVISA, 2012; CHEMSPIDER, 2012; IUPAC, 2012).

Os metais também podem contaminar os cursos d'água por causas naturais. Entretanto, a contaminação também pode ter origem em fontes antropogênicas como escoamento de águas residuais sem tratamento, vazamentos acidentais e despejos de resíduos direto no solo (TURGUT, 2003). A presença desses poluentes nas águas superficiais pode ter um impacto negativo na qualidade da água, e afetar a população em geral, uma vez que as águas de rios muitas vezes são utilizadas para abastecimento público, irrigação de campos agrícolas circundantes e para alimentação de animais, favorecendo o seu potencial de bioacumulação na cadeia alimentar. Assim, a mobilização de vários metais tóxicos no meio ambiente pode causar exposições excessivas às quais podem ser perigosas à saúde humana. Devido à toxicidade de muitos metais e não metais, a sua concentração no meio ambiente, assim como a de agrotóxicos, devem ser monitorados. Logo, foi avaliada, nesse estudo, a presença de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em águas superficiais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

Entretanto, apesar da existência de indicadores referentes à contaminação da microbacia do rio Manhuaçu (SOARES *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013), onde há predominância da agricultura com uso de agrotóxicos, não existem, até o momento, informações se as práticas agrícolas nestes municípios contribuem, ou não, com a contaminação dessas águas. Vale destacar também, que além da pesquisa supracitada, não foi encontrado, na literatura, outro trabalho que avaliasse a contaminação ambiental nessa região, motivando ainda mais o trabalho aqui proposto. Estudos para determinação e quantificação de poluentes e sua toxicologia devem ser desenvolvidos de modo a nortear as decisões e ações para combate e prevenção à poluição.

OBJETIVOS**OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos que permitissem diagnosticar a qualidade de águas e solos em relação à contaminação por resíduos de agrotóxicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecimento das condições para análise multirresíduo por cromatográfica gasosa dos agrotóxicos: aldrin, azoxistrobina, ciproconazol, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, difenoconazol, disulfotom, endosulfam I, endosulfam II, hexaclorobenzeno, lindano, tiametoxam e triadimenol.
- Otimização e validação do método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água superficial por GC/ECD.
- Otimização e validação do método de microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (DLLME/LDS) para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água superficial por GC/ECD.
- Emprego do método mais adequado para quantificar resíduos de agrotóxicos multiclasses em amostras de águas superficiais e residuária da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu coletadas em áreas com influência da cultura de café.
- Otimização e validação de um novo método de extração baseado em extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade e partição por abaixamento de temperatura (DLLME/LDS/LTP) para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo por cromatografia gasosa.

- Análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo coletadas em áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD.
- Determinação das concentrações de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn por ICP-OES em amostras de água superficial da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu.
- Fazer um diagnóstico ambiental da região produtora de café da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu, Minas Gerais em relação à presença dos resíduos de agrotóxicos e metais estudados nesse trabalho.

CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE ÁGUAS SUPERFICIAIS E RESIDUÁRIAS

1. INTRODUÇÃO

Sistemas agrícolas de produção intensiva necessitam utilizar, mais frequentemente, fertilizantes químicos e agrotóxicos para suprir as deficiências do solo e para o controle das pragas que atacam as lavouras e prejudicam as colheitas. Desta maneira, uma gama variada de agrotóxicos e fertilizantes químicos tem sido utilizada em grande quantidade ao longo dos anos em regiões agrícolas para assegurar a alta produtividade (ANDRADE *et al.*, 2011). Dados recentes da literatura mostram que as águas e solos de áreas agrícolas (PRIMEL *et al.*, 2005; VEGA *et al.*, 2005; CORBI *et al.*, 2006; RISSATO *et al.*, 2006; MALOSCHIK *et al.*, 2007; BAKOURI *et al.*, 2008; HILDEBRANDT *et al.*, 2008; PERUZZO *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2012; VARCA, 2012; YANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; APARICIO *et al.*, 2013; SEQUINATTO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2013; GERÓNIMO *et al.*, 2014) estão contaminados com resíduos de agrotóxicos e poluentes orgânicos persistentes. Portanto, a utilização não criteriosa destes produtos pode comprometer a qualidade das águas superficiais e subterrâneas e, conseqüentemente, gerar sérios problemas para a flora, fauna e saúde humana (CRUZ *et al.*, 2003; CID *et al.*, 2007; HUI *et al.*, 2008; ZACHARIA *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a; FREIRE *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2014b; FREIRE *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2014a; SCHMITZ *et al.*, 2014b; ZHOU *et al.*, 2014).

O uso eficaz de agrotóxicos deve ser visto num contexto mais amplo do que simplesmente o controle eficiente de pragas. Deve-se levar em conta também os efeitos da acumulação de agrotóxicos no meio ambiente, especialmente no solo, na água e nos alimentos produzidos, depois de sucessivas aplicações dos mesmos (KAMMERBAUER; MONCADA, 1998). Assim, verifica-se a importância do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em águas e solos próximos a áreas agrícolas em todo o mundo.

Dentro deste contexto, a etapa de preparo de amostras em matrizes ambientais desempenha um papel importante. As técnicas de rotina para a determinação de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente e em amostras de

alimentos normalmente envolvem várias etapas como extração, *clean up* e concentração antes da análise instrumental. Tradicionalmente, a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SFE) são técnicas amplamente utilizadas para o preparo de amostras (KOOTSTRA *et al.*, 1995; TRAN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009; MOMPLAISIR *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2014a). Mas estas técnicas exigem maior volume de solventes orgânicos tóxicos, além disso, a operação é demorada e tediosa. Para contornar essas dificuldades, a microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990; PAWLISZYN, 1995). Esta técnica baseia-se num equilíbrio dos analitos entre a amostra e a fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária e inclui a extração e pré-concentração simultânea dos analitos de amostras aquosas ou no espaço superior das amostras (headspace). SPME não utiliza solvente de extração, entretanto, a fibra de extração é cara, frágil e com tempo de vida limitado, além da possibilidade de efeito de memória (PROSEN; ZUPANČIČ-KRALJ, 1999; ALPENDURADA, 2000).

A demanda por baixas concentrações de uma variedade de agrotóxicos a serem monitorados em amostras de águas superficiais tem estimulado o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade para análises multirresíduos destes compostos. Neste contexto, a técnica de microextração em fase líquida (LPME) para o preparo de amostra emergiu em meados dos anos 90. Muitas variantes desta técnica têm sido desenvolvidas desde então, e as técnicas de LPME são geralmente divididos em três principais grupos: microextração em gota única (SDME) (JEANNOT; CANTWELL, 1996), microextração em fase líquida por membrana (M-LPME) (SHEN; LEE, 2002) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (REZAEI *et al.*, 2006). Todas estas técnicas utilizam pouco solvente orgânico e têm boa sensibilidade, no entanto, para as duas primeiras algumas desvantagens são relatadas. Para SDME o tempo de extração é longo, e na maioria dos casos o equilíbrio não é atingido mesmo após longo tempo, agitação rápida tende a deslocar a gota de solvente orgânico e há possibilidade de formação de bolhas de ar (SHEN; LEE, 2002; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; AHMADI *et al.*, 2006; PAVÓN *et al.*, 2008). Para as técnicas que utilizam membranas, alguns inconvenientes podem ocorrer como efeitos de memória, por serem utilizadas em várias extrações (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e baixa precisão em virtude de operações manuais da membrana (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003), o

que inclui o preparo, impregnação e acomodação da fibra no sistema (OLIVEIRA *et al.*, 2008) podem ser citados.

Em 2006, foi introduzida a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (BERIJANI *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2006), uma nova e recente variação da microextração em fase líquida. Nesta técnica, uma mistura adequada de solventes extrator e dispersor é rapidamente injetada na solução aquosa para formar uma solução nuvem (solução turva). O equilíbrio é alcançado rapidamente devido à maior superfície de contato entre as gotículas do solvente extrator e a amostra aquosa. Em seguida, o solvente de extração pode ser separado por centrifugação. O procedimento é extremamente simples, rápido, de baixo custo, eficiente, com baixo consumo de solvente extrator e alto fator de enriquecimento (BIRJANDI *et al.*, 2008; XIONG; HU, 2008). Nos últimos anos, várias publicações têm demonstrado a aplicabilidade de DLLME na análise de clorofenóis (LI *et al.*, 2013a; WANG *et al.*, 2014b), fenilureias (WANG *et al.*, 2011c), triazóis (WANG *et al.*, 2011a; WANG *et al.*, 2011b; FARAJZADEH; KHOSHAMARAM, 2013), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (XU *et al.*, 2009; LEONG *et al.*, 2010; GUO; LEE, 2011; TSENG *et al.*, 2014), antidepressivos tricíclicos (GE; LEE, 2013), antibióticos (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2013), hormônios (CHANG; HUANG, 2010), ésteres ftalatos (GUO; LEE, 2013; ZHANG; LEE, 2013), agrotóxicos organofosforados (XIONG; HU, 2008; FARAJZADEH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2012; SEEBUNRUENG *et al.*, 2014), agrotóxicos piretroides (WANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2012; FARAJZADEH; KHOSHAMARAM, 2014), agrotóxicos organoclorados (LEONG; HUANG, 2009; LI *et al.*, 2013b), carbamatos (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011) e agrotóxicos multiclassas (JUYBARI *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014).

Apesar das vantagens inerentes sobre outras técnicas clássicas, a técnica convencional requer o uso de solventes de extração halogenados tóxicos (TSENG *et al.*, 2014). Assim, para superar esses inconvenientes têm-se utilizado solventes com densidade inferior à da água (DLLME/LDS) (FARAJZADEH *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2010; ALBASEER *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2012; BIPARVA *et al.*, 2012; MORENO-GONZALEZ *et al.*, 2012), que são ambientalmente mais amigáveis. Os solventes de baixa densidade, mais amplamente utilizados são tolueno, n-hexano e 1-octanol.

Outra técnica de preparo de amostras ambientalmente segura, simples, rápida e eficiente em análises de rotina em função do reduzido número de etapas no procedimento tem sido a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) (LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001a; LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001b; VIEIRA *et al.*, 2007). A principal vantagem da técnica é permitir, em uma única etapa, a extração dos agrotóxicos e *clean up* da amostra (PINHO *et al.*, 2010b; MAGALHAES *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014). A técnica é baseada na partição dos analitos entre a matriz aquosa e o solvente orgânico miscível em água à temperatura ambiente. Com o abaixamento da temperatura (-20 °C), a fase aquosa (congelada ou apenas resfriada) separa-se da fase orgânica superior. Assim, solvente orgânico e analitos são isolados e posteriormente analisados (GOULART *et al.*, 2012) por cromatografia gasosa ou líquida. Aplicações da técnica também podem ser encontradas para matrizes aquosas (GOULART *et al.*, 2010; GOULART *et al.*, 2012; SILVÉRIO *et al.*, 2012), gordurosas (LI *et al.*, 2007a; LI *et al.*, 2007b; LI *et al.*, 2007c; GOULART *et al.*, 2008; RÜBENSAM *et al.*, 2011; GOULART *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014), viscosas (PINHO *et al.*, 2010a), biológicas (MAGALHÃES *et al.*, 2012), além de amostras sólidas (VIVIAN *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010; MARTHE *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2010b; DARDENGO *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2013; MAGALHAES *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2014; HELENO *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014). Em relação às técnicas convencionais, apresenta ainda vantagens como, baixo consumo de solventes orgânicos, baixo custo, além de ser confiável, seletiva e facilmente aplicável à análise de rotina (GOULART *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2011; GOULART *et al.*, 2012). A principal desvantagem da técnica é o baixo fator de enriquecimento, porém, baixos limites de detecção têm sido obtidos para análise de vários contaminantes orgânicos nas diversas matrizes acima citadas.

A análise de metais em águas superficiais é uma etapa importante para garantir a saúde humana e ambiental (ALVES *et al.*, 2014c; LIU *et al.*, 2014). A presença de metais e outras substâncias inorgânicas tóxicas em águas, são atribuídas ao intemperismo das rochas, carreamento de solos e também, aos resíduos das atividades antropogênicas. A contaminação por metais pode ocorrer por fontes difusas, como deposição sólida e lixiviação do solo de áreas agrícolas, e por fontes pontuais caracterizadas principalmente pelas emissões de efluente

industriais, esgotos domésticos, depósitos de lixo, despejos de mineração e também pelo uso de fertilizantes e agrotóxicos (CAMPOS *et al.*, 2002; TURGUT, 2003). Estudos visando a detecção dos possíveis impactos da agricultura têm demonstrado que, principalmente em áreas abertas, sem mata ciliar, produtos tóxicos (fertilizantes e agrotóxicos) utilizados nas culturas agrícolas têm contaminado águas superficiais (TURGUT, 2003; GOWD; GOVIL, 2008; KAR *et al.*, 2008; FRIESE *et al.*, 2010) e sedimentos (MUCHA *et al.*, 2003; CORBI *et al.*, 2006; CORBI *et al.*, 2008; CHAND; PRASAD, 2013) com metais em virtude do escoamento dos mesmos (CORBI *et al.*, 2006) e causado bioacumulação em diferentes níveis tróficos (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008; CORBI *et al.*, 2008; CHIBA *et al.*, 2011; CORBI *et al.*, 2011; MISHRA; SHARMA, 2011; HARGUINTEGUY *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; MONROY *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidos para análise das concentrações de metais em água, muitas delas baseados em espectrometria de emissão ou absorção atômica. Entre estes, a espectrometria de absorção atômica (AAS) (NARIN *et al.*, 2000; TURGUT, 2003; XIA *et al.*, 2004; JAHROMI *et al.*, 2007; FARAJZADEH *et al.*, 2008; VAREJÃO *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013b), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (MALLAH *et al.*, 2008; ESCUDERO *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2011; SERESHTI *et al.*, 2011; SERESHTI *et al.*, 2012) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (RAHMI *et al.*, 2007; TRUJILLO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014a) têm sido amplamente relatadas com diversas variações. A espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) tem sido amplamente utilizada para determinação de metais traço por ser relativamente simples e utilizar o equipamento mais barato. Entretanto, determinações diretas de metais em nível traço por FAAS é limitada não apenas devido à baixa sensibilidade, mas também pelas interferências da matriz (MA *et al.*, 2009). A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) são adequadas para análise de amostras de água para detecção em nível de traço. Para aplicações onde é necessária elevada sensibilidade, ICP-MS é a técnica de escolha. Entretanto, ICP-OES é mais robusta e mais facilmente aplicável em amostras com alto teor de sólidos totais dissolvidos. Além disso, a utilização de ICP-OES no modo de vista axial tem ajudado a superar a desvantagem de baixa sensibilidade, aumentando a faixa de

concentração medida em níveis de ppt para muitos elementos (SAROJAM, 2012). ICP-OES é um método muito atraente para a determinação de elementos inorgânicos em amostras ambientais e biológicas, em virtude da capacidade de análise multi-elementar e alta taxa de transferência analítica (SILVA *et al.*, 2009; SAROJAM, 2010).

A microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu pertencente à bacia hidrográfica do rio Doce, é composta de trinta e dois municípios situados na zona leste de Minas Gerais cuja economia é baseada principalmente no cultivo do café (FARIA *et al.*, 2010). O relevo acidentado da região favorece a erosão e também, há possibilidade de que agrotóxicos e fertilizantes aplicados nas plantações de café sejam carreados para as águas superficiais, contaminando-as. Ao melhor de nosso conhecimento, há apenas um estudo que avalia a presença de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais em uma sub-bacia ao norte dessa região (SOARES *et al.*, 2013). Vinte e quatro agrotóxicos diferentes foram detectados por Soares *et al.*, (2013) e dentre estes, DDT foi detectado em 5 amostras de água em concentração entre 0,01 a 0,05 mol L⁻¹. Em 67% das amostras de águas coletadas em período chuvoso e em 21% das amostras coletadas em período de seca foi detectado pelo menos um agrotóxico. Desta maneira, a qualidade das águas nos municípios de Manhuaçu, Luisburgo e São João do Manhuaçu merece atenção especial, visto que estes municípios se encontram localizados em uma região de nascentes e suas águas superficiais são utilizadas como mananciais de captação para abastecimento público.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a contaminação ambiental (metais e agrotóxicos) em águas superficiais e residuárias da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu. Os compostos foram selecionados em função do uso agrícola dos mesmos. Os níveis de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram determinados por ICP-OES. Resíduos de agrotóxicos, aldrin, azoxistrobina, ciproconazol, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, difenoconazol, dissulfotom, endossulfam I, endossulfam II, hexaclorobenzeno, lindano, tiametoxam e triadimenol foram determinados por GC/ECD. Duas diferentes técnicas de preparo de amostras para análise de resíduos de agrotóxicos foram otimizadas e comparadas quanto aos principais parâmetros analíticos. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) foi escolhida por ser uma técnica simples, rápida, passível de ser empregada em análises de rotina dada a alta frequência analítica da mesma e a realização de

extração e *clean up* da amostra em uma única etapa. Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (DLLME/LDS) foi selecionada por ser uma técnica que favorece a concentração dos analitos, logo, ideal para análise multirresíduo de agrotóxicos em nível de traço em amostras ambientais de água. Ao melhor de nosso conhecimento, LLE/LTP e DLLME/LDS tem sido aplicada pela primeira vez para análise deste grupo de compostos em amostras de água por GC/ECD. Também, pela primeira vez, essa região da microbacia do rio Manhuaçu tem sido avaliada quanto à presença de resíduos de agrotóxicos e metais em amostras de águas superficiais e residuárias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados reagentes químicos de grau analítico e água ultrapura ($18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, Estados Unidos da América). Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. Gás argônio foi utilizado nas análises em ICP-OES tripla pureza de 99,999% (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil). Nitrogênio foi utilizado nas análises cromatográficas com 99,999% de pureza (Air Products, São Paulo, Brasil).

Os reagentes hidróxido de sódio (99% m/m), ácido nítrico (65% m/m) e ácido clorídrico (37% m/m) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (99,0% m/m) e ácido acético (99,7% v/v) adquiridos da Isofar (Duque de Caxias, Brasil). Acetato de etila (99,5% v/v), 1-octanol (99% v/v) e acetona (99% v/v) também foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Metanol (99,9% v/v) e n-hexano (99,0% v/v) foram adquiridos da Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, França). Neste experimento também foram empregados tolueno (99,9% v/v) da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos da América) e acetonitrila (99,9% v/v) da Merck (Darmstadt, Alemanha). Foram utilizados também papel de filtro qualitativo ($14 \mu\text{m}$, J. Prolab, Paraná, Brasil), papel de filtro quantitativo ($7,5 \mu\text{m}$ Nalgon, São Paulo, Brasil) e membranas de nitrato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha).

Para os estudos em ICP-OES foram preparadas soluções estoque de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn na concentração de 100 mg L^{-1} pela dissolução de quantidades

apropriadas de $K_2Cr_2O_7$ (Impex, São Paulo, Brasil), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (Nuclear, São Paulo, Brasil), $MnSO_4 \cdot xH_2O$ (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), $Pb(NO_3)_2$ (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e Zn bastão (Riedel-de Häen, Seelze, Alemanha) em solução ácida diluídas, respectivamente, modificado do método 3111B (APHA, 2005). Soluções estoque comerciais de Co e Ni foram obtidas da Merck (Darmstadt, Alemanha) a 1000 mg L^{-1} . Estas duas soluções foram diluídas à 100 mg L^{-1} . A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho multielementares em concentrações equivalente a 20 e 250 vezes o valor máximo permitido (VMP) pela resolução CONAMA nº 357 (2005) (código STM1 e STM2, respectivamente). A concentração dos elementos nestas soluções de trabalho é apresentada na Tabela 2. Foi adicionado HNO_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ no preparo das soluções de trabalho e as mesmas foram posteriormente utilizadas no preparo das soluções para construção das curvas analíticas. Para os estudos de recuperação, foi preparada uma solução de trabalho (STM3) contendo todos analitos a 25 mg L^{-1} a partir de diluições das soluções estoque (100 mg L^{-1}). Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até a análise.

Tabela 2. Concentração de elementos na solução de trabalho usada para preparar as soluções da curva analítica para determinar metais em água por ICP-OES

Elemento	Concentração de metais / (mg L^{-1})	
	STM1 (20 VMP)	STM2 (250 VMP)
Co	1	12
Cr	1	12
Cu	0,2	2
Fe	6	75
Mn	2	25
Ni	0,5	6
Pb	0,2	2
Zn	4	45

STM=Solução de Trabalho de metais; VMP=valor máximo permitido.

Os agrotóxicos utilizados nesse estudo foram azoxistrobina (99,9% m/m), ciproconazol (99,8% m/m), clorotalonil (99,3% m/m), dieldrin (97,9% m/m), difenoconazol (97,0% m/m), endosulfam (73,2% e 26,6% m/m para endosulfam I e endosulfam II, respectivamente), hexaclorobenzeno (99,8% m/m), lindano (99,8% m/m) e tiametoxam (99,7% m/m) adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim,

Alemanha); aldrin (98,5% m/m) e DDT (98,8% m/m) adquiridos da Supelco (Bellefonte, Estados Unidos da América); clorpirifós (99,0 % m/m) da Chem Service (West Chester, Estados Unidos da América), disulfotom (97,0% m/m) e triadimenol (99,0% m/m) da Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Bifentrina (92,2% m/m), adquirida da FMC (São Paulo, Brasil) foi utilizada como padrão interno.

Soluções padrão estoque de cada princípio ativo individual (1000 mg L^{-1}) foram preparadas em acetonitrila pura e estocadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Soluções padrão estoque intermediárias individuais (100 mg L^{-1}) foram preparadas por diluição das anteriores em acetonitrila.

As soluções de trabalho de todos os agrotóxicos para otimização LLE/LTP, foram preparadas pela diluição das soluções padrão estoque com acetonitrila. Uma solução de trabalho I (ST1) contendo 10 mg L^{-1} de aldrin, clorotalonil, clorpirifós, endosulfam e hexaclorobenzeno; 20 mg L^{-1} de azoxistrobina e 50 mg L^{-1} de ciproconazol, difenoconazol e tiametoxam. A solução de trabalho II (ST2) foi preparada com DDT, dieldrin e lindano a 10 mg L^{-1} e disulfotom e triadimenol a 30 mg L^{-1} . A solução de trabalho de bifentrina (padrão interno) foi preparada em acetonitrila a 10 mg L^{-1} . Para os estudos de recuperação e linearidade do método LLE/LTP-GC/ECD, foram preparadas soluções de trabalho contendo os agrotóxicos em concentrações equivalentes a 30, 100 e 1000 vezes o LOQ do método.

Para otimização de DLLME/LDS foi preparada a solução de trabalho III (ST3) em acetonitrila contendo $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno e lindano e $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de azoxistrobina, difenoconazol, ciproconazol, disulfotom, endosulfam, tiametoxam e triadimenol. Para estudos de recuperação e linearidade do método DLLME/LDS-GC/ECD foram preparadas soluções de trabalho em acetonitrila contendo os agrotóxicos em concentrações equivalentes a 100, 500 e 1500 vezes o LOQ do método.

2.2. INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de água superficial para análise de metais foram digeridas em forno de micro-ondas, modelo Ethos1 (Milestone, Connecticut, Estados Unidos da América). A determinação dos elementos inorgânicos em amostras de água foi feita em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) modelo Optima 8300 (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos da

América). A tocha foi colocada com vista axial, além disso, foi utilizado o detector de estado sólido CCD (charge-coupled device), sistema óptico Echelle e software WinLab32 para ICP versão 5.2 para medida simultânea de todos comprimentos de onda dos analitos de interesse. Um amostrador automático S10 foi acoplado. Os parâmetros instrumentais utilizados para as análises são apresentados na Tabela 3 e seguiram as recomendações do fabricante. Os comprimentos de onda (nm) escolhidos foram os seguintes: Co (228,6), Cr (267,7), Cu (327,4), Fe (238,2), Mn (257,6), Ni (231,6), Pb (220,3) e Zn (213,8).

Tabela 3. Condições de operação do ICP-OES

Parâmetro	
Nebulizador	Mira Mist
Câmara de Spray	Câmara ciclônica
Tocha	Quartzo
Injetor	Alumina
Potência (W)	1300
Vazão do plasma (L min ⁻¹)	12
Vazão do auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Vazão do nebulizador (L min ⁻¹)	1,0
Fluxo da bomba peristáltica (mL min ⁻¹)	1,5
Tempo de estabilização (s)	15
Tempo de lavagem da agulha (s)	15
Tempo de integração (s)	1-5

Um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kioto, Japão), modelo 2014, equipado com detector por captura de elétrons ⁶³Ni (GC/ECD), auto injetor AOC-20i e coluna capilar ZB-5, Zebron (Phenomenex, Estados Unidos da América) (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,10 µm) recheada com 5% de fenil e 95% de dimetilsiloxano foi utilizada para análise de resíduos de agrotóxicos em extratos de amostras de água superficial. As condições cromatográficas de análise foram: temperatura do injetor e do detector 280 e 300 °C, respectivamente. A programação de aquecimento do forno da coluna foi 150 °C (1 min), rampa de 15 °C min⁻¹ até 200 °C (4 min), seguida de rampa de 5 °C min⁻¹ até 210 °C e rampa de 60 °C min⁻¹ até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 4 min. O nitrogênio foi empregado como gás de arraste a um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. As injeções foram feitas com divisão de fluxo (*split*) de 1:5. O volume

injetado foi de 1,0 µL e o tempo total de análise foi de 18,6 minutos. As corridas foram gerenciadas pelo software Shimadzu GCsolution. A identificação dos picos foi baseada em comparação dos tempos de retenção dos compostos em soluções padrão.

Foram utilizados também, balança analítica BP 221S (Sartorius, Göttingen, Alemanha) de resolução $1,0 \times 10^{-4}$ g, bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, São Paulo, Brasil), sistema de filtração a vácuo (Supelco, Pennsylvania, Estados Unidos da América), evaporador rotativo a vácuo modelo 802 (Fisatom, São Paulo, Brasil), banho termostaticado TE-184 (Tecnal, São Paulo, Brasil) com controle de temperatura, potenciômetro com eletrodo combinado de vidro modelo DM21 (Digimed, São Paulo, Brasil), mesa agitadora TE-420 (Tecnal, São Paulo, Brasil), agitador Vortex Certomat MV (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha), centrífuga Q222-T28 (Quimis, São Paulo, Brasil), freezer 280 L (Consul, Minas Gerais, Brasil), GPS eTrex Vista H (Garmin, Kansas, Estados Unidos da América), micropipetas automáticas monocanal de volume variável da HTL (Labmate Pro LMP100, LMP1000 E LMP10000, Varsóvia, Polônia).

Para as análises *in situ* foram utilizados kit medidor de pH 330i portátil, à prova d'água (WTW, Weilheim in Oberbayern, Alemanha) e medidor de condutividade portátil LF 613T (Schott Instruments, Mainz, Alemanha).

2.3. REGIÃO DE ESTUDO

Na região de montanhas do Leste de Minas foram selecionados os municípios de Manhuaçu, Luisburgo e São João do Manhuaçu para avaliação do potencial contaminação por agrotóxicos e metais. Esses municípios destacam-se pela elevada produção cafeeira com uso intensivo de agrotóxicos e insumos agrícolas.

Foram coletadas amostras de águas superficiais em oito pontos ao longo do rio Manhuaçu, próximo a propriedades cafeeiras. Foram selecionados pontos à montante e à jusante dos três municípios para verificar a contribuição antrópica na contaminação das águas superficiais. A região de estudo da microbacia do rio Manhuaçu encontra-se indicada na Figura 1.

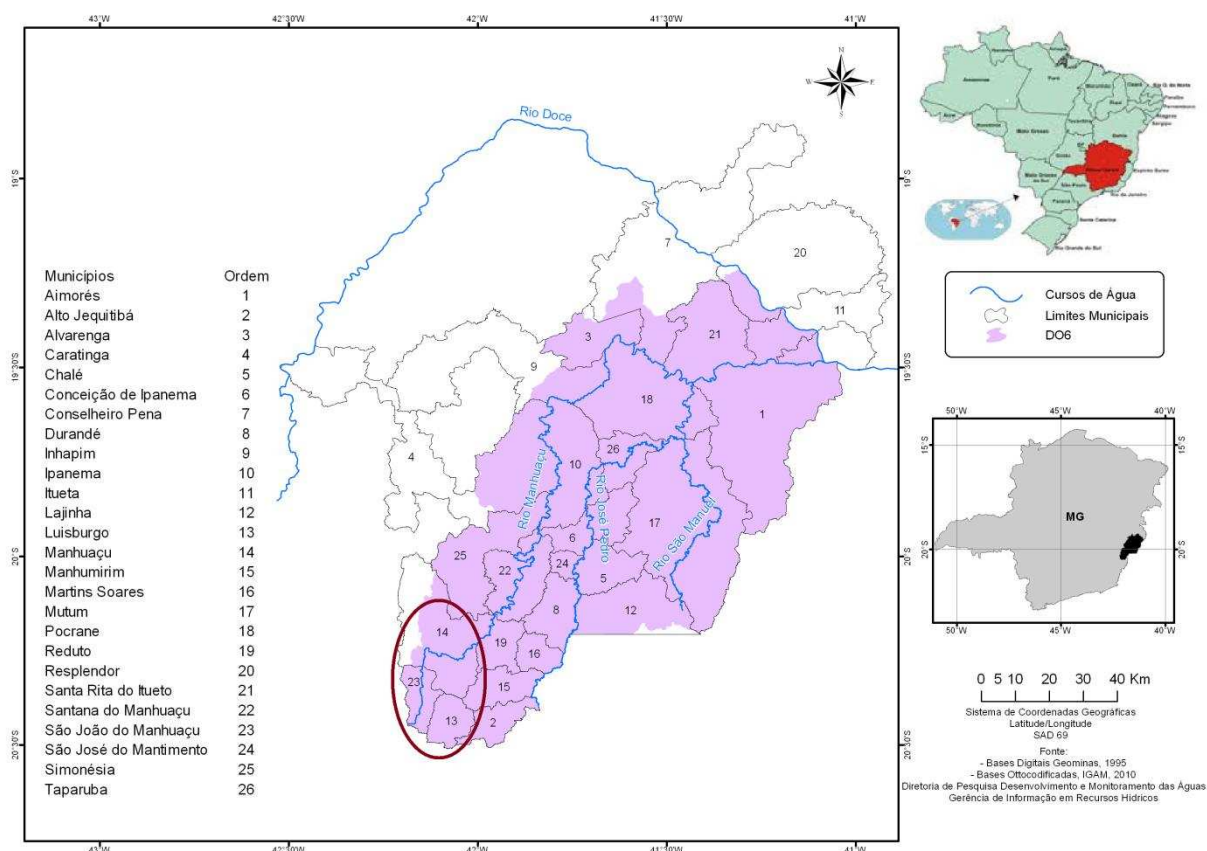


Figura 1. Mapa da Bacia do rio Manhuaçu, MG com a indicação da região de estudo nos municípios de Luisburgo (13), Manhuaçu (14) e São João do Manhuaçu (23). Adaptado de: <<http://comites.igam.mg.gov.br/comites-estaduais/bacia-do-rio-doce/do6-cbh-aguas-do-rio-manhuacu>>

Foram selecionados cinco pontos no rio Manhuaçu (dois em São João de Manhuaçu, dois em Manhuaçu, e um na principal nascente do Rio Manhuaçu, localizada entre os municípios de São João do Manhuaçu e Divino). Dois pontos foram selecionados em um afluente desse rio, ou seja, no rio São Luiz, no município de Luisburgo, próximo à propriedades cafeeiras. Também foi selecionado um ponto no Córrego Manhuaçuinho, abaixo de uma das maiores propriedades cafeeiras do município de Manhuaçu e acima do principal manancial de abastecimento público desse município.

Os oito pontos de amostragem foram georreferenciados e as coordenadas geográficas dos pontos amostrados na microbacia do Rio Manhuaçu são apresentadas na Tabela 4, bem como as principais características dos locais de coleta.

Tabela 4. Pontos de amostragem de água superficial na Bacia do Rio Manhuaçu

Ponto	Coordenadas (UTM 23K SAD 69)	Descrição
P1	6794098 / 7736638	Nascente do Rio Manhuaçu.
P2	6796951 / 7739806	Ponte de acesso a propriedades cafeeiras à montante do município de São João do Manhuaçu, Rio Manhuaçu.
P3	6797322 / 7746237	Ponte de acesso a propriedades cafeeiras, após um posto de gasolina e a Jusante do município de São João do Manhuaçu, Rio Manhuaçu.
P4	6807886 / 7755438	Ponte de acesso ao Parque de Exposição no município de Manhuaçu, após encontro do Rio São Luiz com o Rio Manhuaçu.
P5	6812024 / 7759055	Leito do Rio Manhuaçu à jusante do município de Manhuaçu.
P6	6801858 / 7736710	Ponte de acesso a propriedades cafeeiras à montante de Luisburgo, Rio São Luiz.
P7	6805163 / 7738355	Ponte de acesso a propriedades cafeeiras à jusante de Luisburgo, Rio São Luiz.
P8	6800689 / 7763068	Represa abaixo de uma grande propriedade cafeeira e acima do manancial de abastecimento público de Manhuaçu, Córrego Manhuaçuzinho.

Amostras de água residuária (n=4) do processamento de pós-colheita do café foram coletadas em novembro de 2013 em uma grande fazenda cafeeira localizada em Martins Soares, MG. Nesta fazenda, há 3 anos havia sido implantado três tanques com lona impermeabilizante para tratamento da água residuária antes que a mesma fosse descartada em uma lagoa de água superficial. Foram coletadas uma amostra (1 L) em cada tanque e uma na lagoa para avaliação da presença de resíduos de agrotóxico nas mesmas.

2.4. COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram realizadas quatro campanhas de amostragem de água superficial nas épocas de chuva e seca em: março de 2012, junho de 2012, dezembro de 2012 e março de 2013. As amostras de água foram coletadas manualmente em frasco de polietileno de boca larga (12 L), previamente descontaminado. As coletas foram

realizadas à meia profundidade (30 a 60 cm), no centro do rio e contra a correnteza, sendo a maioria realizada sob pontes. Essas amostras foram posteriormente transferidas para frascos menores de acordo com a análise a ser realizada, conforme descrito a seguir.

Para análise de resíduos de agrotóxicos, cerca de 1 L de amostra de água foi transferido para um frasco de vidro âmbar. Para metais totais, foram transferidos cerca de 2 L de amostra de água para frascos de polietileno.

Todos os frascos, contendo as amostras de água superficial, foram imediatamente colocados em sacos de polietileno, armazenados e transportados para o laboratório de Química Analítica (LAQUA) em caixa de isopor com gelo (4 °C) para a realização dos procedimentos analíticos.

As amostras de água para análise de agrotóxicos foram filtradas primeiramente em papel qualitativo (14 µm) e depois em membrana de nitrato de celulose (0,45 µm) com auxílio de bomba a vácuo. As amostras destinadas à análise de metais totais foram acidificadas com HNO₃ concentrado para obter um pH inferior a 2, como recomendado pelo método 3010B (APHA, 2005). Todas as amostras foram armazenadas em geladeira (≤ 4 °C) até o início das análises.

A coleta, transporte e armazenamento das amostras de água residuária seguiram os mesmos procedimentos das amostras de água superficial.

2.5. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

No momento da coleta de amostras de águas superficiais foram determinados pH, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido.

Em campo foram realizadas as medidas de pH através da leitura direta em potenciômetro utilizando eletrodo combinado de vidro e eletrodo Ag/AgCl como referência, com compensação de temperatura. A calibração foi realizada previamente com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0.

A condutividade elétrica e temperatura das amostras foram medidas com medidor portátil de condutividade. As medidas foram diretas após calibração do eletrodo com solução padrão de KCl 0,01 mol L⁻¹, cuja condutividade padrão é de 1,4 mS cm⁻¹.

No laboratório da estação de tratamento de água da Universidade Federal de Viçosa (ETA-UFV), foram realizadas as análises de cor e turbidez. As análises foram realizadas em menos de 24 h após a coleta das mesmas. A determinação de cor foi

realizada por comparação visual direta, em tubos de Nessler, utilizando soluções padrão de cloroplatinato de potássio como referência ($1 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}_2\text{PtCl}_6$ corresponde a uma unidade de cor, definição de Hazen). A turbidez das amostras de água foi determinada pelo método nefelométrico, Standard Methods 2130-B (APHA, 2005), utilizando um turbidímetro digital Hach, modelo 2100P.

A alcalinidade das amostras de água superficial foi determinada pelo método potenciométrico (USEPA, 1978). O método consiste na titulação potenciométrica das amostras de água com solução de HCl ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) padronizado. Cloreto também foi determinado nas amostras pelo método argentimétrico, Standard Methods 4500Cl-B, utilizando solução de nitrato de prata (AgNO_3) como titulante e cromato de potássio (K_2CrO_4) como indicador (APHA, 2005).

As amostras de água residuária foram coletadas e levadas imediatamente para o laboratório de análises químicas e microbiológicas, Laboratório Água Limpa, em Manhuaçu, MG, para caracterização das mesmas quanto aos parâmetros: DQO (Standard Method 5220-D), DBO (Standard Method 5210-B), condutividade elétrica (Standard Method 2510-B), pH (Standard Method 4500H⁺-B), sólidos totais (Standard Method 2540-B), sólidos fixos (Standard Method 2540-E), sólidos voláteis (Standard Method 2540-E) e sólidos sedimentáveis (Standard Method 2540-F). Todas as análises utilizaram métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

2.6. ANÁLISE DE METAIS POR ICP-OES

As amostras foram digeridas em forno micro-ondas utilizando frascos de politetrafluoretileno (PTFE) (100 mL de capacidade) devidamente vedados e com controle interno de temperatura. Previamente à etapa de abertura de amostras, os frascos de PTFE do micro-ondas foram submetidos a um criterioso procedimento de descontaminação. A digestão de amostras para análise de metais totais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) seguiu o método 3030K (APHA, 2005). Foram adicionados 45 mL da amostra de água superficial e 5 mL de HNO_3 concentrado no tubo de PTFE, seguido por digestão da amostra em forno de micro-ondas de acordo com a programação descrita na Tabela 5, modificada do método 3030K (APHA, 2005).

Tabela 5. Programação do forno micro-ondas

Etapas	Tempo / min	Temperatura (°C)	Potência / W
1	10	Ambiente-160	1000
2	10	160-165	1000

Em seguida as amostras foram filtradas com papel de filtro quantitativo (7,5 µm) em balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água Milli-Q. As amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno sob refrigeração (4 °C) até o momento da análise. O método 3120B (APHA, 2005) foi utilizado para determinação metais totais Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn por ICP-OES.

2.7. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

A primeira etapa do preparo de amostras para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água consistiu na otimização de duas técnicas: LLE/LTP e DLLME/LDS. Essas duas técnicas são simples, rápidas, ambientalmente seguras, pois utilizam pequeno volume de solvente orgânico, e de baixo custo, podendo ser aplicadas à análise de rotina de amostras de água ambientais.

Em seguida foram avaliados e comparados os principais parâmetros analíticos de ambas as técnicas e a mais adequada foi aplicada à análise de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais coletadas em rios e lagoas de estabilização de áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu.

2.7.1. Otimização da técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)

Para o preparo de amostras fortificadas, volumes apropriados das soluções de trabalho ST1(32 ou 64 µL) e ST2 (60 ou 120 µL) foram adicionados em 2 ou 4 mL de amostra de água para produzir amostras equivalentes contendo aldrin, clorotalonil, clorpirifós, endosulfam e hexaclorobenzeno a 160 µg L⁻¹; azoxistrobina a 320 µg L⁻¹; ciproconazol, difenoconazol e tiametoxam a 800 µg L⁻¹; DDT, dieldrin e lindano a 300 µg L⁻¹ e disulfotom e triadimenol a 900 µg L⁻¹. Após a fortificação, as amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 1 h, antes de serem submetidas à LLE/LTP e análise por GC/ECD.

A técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) consiste em acrescentar à amostra aquosa uma solução extratora que pode ser acetonitrila ou uma mistura acetonitrila/acetato de etila em diferentes proporções. A mistura é agitada e levada ao freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a separação das fases aquosa/orgânica ou o congelamento da fase aquosa. A fase orgânica sobrenadante contendo os analitos de interesse é retirada e analisada. Foram adicionados $36\text{ }\mu\text{L}$ de bifentrina 10 mg L^{-1} para obter uma concentração final de padrão interno equivalente a $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

A primeira etapa da otimização foi testar as técnicas LLE/LTP descritas na literatura para determinação de diferentes classes de compostos em águas superficiais (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010).

A técnica 1, adaptada de Vieira et al. (2007), consistiu em adicionar 8 mL da mistura acetonitrila:acetato de etila (6,5:1,5) a 4 mL de água mineral fortificadas contendo $0,02\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Após agitação (mesa agitadora) por 15 min a 175 opm e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a mistura em fase única foi levada ao freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 6 h para a separação de fases e congelamento da fase aquosa. Em seguida, a fase orgânica foi filtrada em sulfato de sódio anidro, acrescida de 0,2 mL de bifentrina (10 mg L^{-1}), completando-se o volume para 10 mL com acetonitrila. Esses extratos foram analisados por GC-ECD.

A técnica 2, modificada de Vieira et al. (2007) consistiu na redução das quantidades dos reagentes da técnica 1. Assim, foram adicionados 4 mL da mistura acetonitrila:acetato de etila (6,5:1,5) em 2 mL de água mineral ($0,02\text{ mol L}^{-1}$ NaCl) fortificada. Essa mistura em fase única foi agitada em mesa agitadora por 15 min a 175 opm e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e levada ao freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 6 h para a separação de fases e congelamento da fase aquosa. Os extratos (fase orgânica) foram secos ao passar em uma camada adsorvente de Na_2SO_4 anidro em papel filtro. O volume final foi completado para 5 mL com acetonitrila após ter sido adicionado 0,1 mL de bifentrina (10 mg L^{-1}). Os extratos foram armazenados em freezer até o momento da análise cromatográfica.

A técnica 3, modificada de Goulart et al. (2010) consistiu em adicionar 4 mL de acetonitrila a 2 mL de água mineral fortificada. A mistura em fase única foi agitada em mesa agitadora por 15 min a 175 opm e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e levada ao freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 2 h para a separação de fases aquosa e orgânica. Em seguida, 1,8 mL de

fase orgânica foram transferidos para vial com 36 μL de bifentrina ($10,00 \text{ mg L}^{-1}$) e analisados por GC-ECD.

A etapa seguinte no processo de otimização foi selecionar o tempo e o tipo de agitação que forneceriam melhores extrações dos analitos em estudo. Para isso foram testadas mesa agitadora e agitação em vórtex por 5, 10, 15, 20 e 1, 2, e 3 min, respectivamente. Esse estudo foi realizado seguindo os procedimentos da técnica 3.

A etapa seguinte da otimização da LLE/LTP consistiu em avaliar a proporção amostra:solvente extrator na extração de agrotóxicos em água, visando evitar a diluição das amostras durante o preparo das mesmas. Foram testadas as proporções amostra:acetoneitrila 1:1 e 1:2 (v/v). Para isso, 2 ou 4 mL de água mineral foram fortificadas com as soluções de trabalho ST1 e ST2, descritos anteriormente. Após adição de 4 mL de acetoneitrila às amostras, as misturas em fase única foram levadas à mesa agitadora por 10 min (175 opm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$) e em seguida ao freezer para a partição em baixa temperatura por 2 h. A fase orgânica de cada mistura foi transferida para vial contendo $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de bifentrina e armazenada em freezer até a análise cromatográfica.

A última etapa da otimização foi realizada por uma otimização multivariada. Um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central ($n=5$) foi aplicado e os fatores considerados foram: (1) velocidade de agitação (opm), (2) acidificação do solvente extrator (% CH_3COOH m/v) e (3) força iônica (mol L^{-1} NaCl) da técnica LLE/LTP. Foram executados 13 ensaios no total. O tratamento de dados foi realizado utilizando o software Statistica 7.0. A variável dependente foi a área relativa dos picos de cada analito em cada experimento. Os efeitos significativos estatisticamente das variáveis foram estudados, e as interações entre elas foram avaliadas pela aplicação da análise de variância (ANOVA). Todos os experimentos foram realizados numa sequência aleatória.

A influência da velocidade de agitação foi avaliada em 150 e 200 opm. A influência da acidificação do meio foi avaliada adicionando ácido acético ao solvente extrator (acetoneitrila) e a influência da força iônica foi verificada utilizando uma solução de cloreto de sódio. Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=5) para otimização de LLE/LTP na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água

Fatores	Níveis de amostragem		
	-1	Ponto Central	1
(F1) Velocidade de agitação / opm	150	175	200
(F2) Adição de CH ₃ COOH / %	0	0,5	1
(F3) Força iônica / mol L ⁻¹	0	0,25	0,5

Ensaio	Fatores codificados		
	F1	F2	F3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9C	0	0	0
10C	0	0	0
11C	0	0	0
12C	0	0	0
13C	0	0	0

C= Ponto central.

2.7.2. Otimização da técnica microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME/LDS)

Para o preparo de amostras fortificadas, 25 µL de ST3 foram adicionados em 5 mL de amostra de água de maneira a obter amostras com aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno e lindano a 1 µg L⁻¹; azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, disulfotom, endosulfam, tiamethoxam e triadimenol a 5 µg L⁻¹. Após a fortificação, as amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 1 h, antes de serem submetidas à DLLME/LDS e análise por GC/ECD.

A técnica DLLME/LDS consiste em adicionar uma alíquota de 5 mL de amostra de água em tubo de ensaio (9 mL) de vidro com tampa rosqueável. Seiscentos microlitros da mistura de solventes orgânicos (solventes extrator e dispersor) são injetados rapidamente na solução amostra com auxílio de uma micropipeta automática (LM1000). Uma solução nuvem constituída de finas microgotas do solvente extrator dispersa na amostra aquosa é formada. A mistura é agitada em vórtex e centrifugada por 5 min a 3500 rpm. Como o solvente de extração utilizado é menos denso que a água, após a centrifugação, a fase orgânica sobrenadante no topo do frasco volumétrico é retirada com auxílio de uma

micropipeta automática (LM100). A fase orgânica foi transferida para inserts (microvials de 150 μL) com 2 μL de bifentrina 3 mg L^{-1} . Posteriormente, uma alíquota de 1 μL é injetada no GC/ECD. O volume de fase orgânica superior foi determinado usando uma microseringa de vidro para HPLC de 100 μL .

A primeira etapa da otimização da técnica consistiu na seleção do solvente extrator adequado. n-Hexano, 1-octanol e tolueno foram selecionados como solventes extratores e testados para a extração multirresíduo de agrotóxicos em água. Para escolha do solvente extrator, foram realizados ensaios utilizando 5 mL de água Milli-Q fortificada com os agrotóxicos em estudo (25 μL ST3). A mistura de solventes (600 μL), contendo acetonitrila e os solventes extratores avaliados, foi injetada rapidamente na amostra. Foram utilizadas diferentes proporções de acetonitrila e solvente extrator para obter igual volume de fase orgânica superior recuperada (85 μL) após a extração. As proporções utilizadas foram: 5:2 v/v de acetonitrila:n-hexano, e 5:1 v/v para acetonitrila:1-octanol e acetonitrila:tolueno.

O segundo parâmetro a ser otimizado foi o solvente dispersor. Um importante ponto a ser observado é a miscibilidade do solvente dispersor na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra). Tendo em vista os solventes que apresentam estas características, foram selecionados acetona, acetonitrila e metanol, solventes mais frequentemente utilizados (AHMADI *et al.*, 2006; BERIJANI *et al.*, 2006; FATTAHI *et al.*, 2007a; ITO *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2012; MORENO-GONZALEZ *et al.*, 2012; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2013). Quantidades iguais de cada solvente dispersor (500 μL) avaliados contendo 100 μL de tolueno foram adicionadas em soluções de amostras fortificadas (5 mL) para obter 85 μL de fase orgânica sobrenadante.

Em DLLME, os volumes dos solventes extrator e dispersor são fatores essenciais os quais podem influenciar a ocorrência do estado de emulsão e determinar o desempenho da extração. Foram otimizados simultaneamente os volumes dos solventes dispersor e extrator combinando alguns diferentes volumes de ambos. Para este experimento, foram injetados 600 μL da mistura de solventes extrator e dispersor, correspondentes aos volumes V1, V2, V3, V4 e V5, em 5 mL de amostras de água fortificadas com os agrotóxicos e submetidos à técnica DLLME. Os volumes testados foram: V1= 120 μL de tolueno + 480 μL de acetona; V2= 100 μL de tolueno + 500 μL de acetona; V3= 86 μL de tolueno + 514 μL de acetona; V4= 67 μL de tolueno + 533 μL de acetona e V5= 54 μL de tolueno + 546 μL de acetona.

O melhor resultado foi escolhido em função dos fatores de enriquecimento dos agrotóxicos, visando maior sensibilidade.

Em seguida foram avaliados os efeitos da força iônica, do pH e do tempo de extração. Tais variáveis foram otimizadas por uma abordagem multivariada para levar em conta as possíveis interações entre as mesmas. Um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central ($n=3$) envolvendo 11 ensaios foi realizado. A área relativa total foi utilizada como resposta analítica. Todos os experimentos foram realizados numa sequência aleatória. As faixas das variáveis estudadas e os dados do planejamento são apresentadas na Tabela 7. A influência da adição de NaCl foi verificada utilizando uma solução de cloreto de sódio. O pH da fase aquosa foi ajustado com HCl ou NaOH. Foram utilizados 5 mL de amostra aquosa (com ou sem adição de NaCl e com ou sem ajuste de pH) fortificada com 25 μ L da mistura de agrotóxicos ST3. Em seguida foram injetados 600 μ L de acetona:tolueno (8:1). A mistura agitada ou não em vórtex foi centrifugada por 5 min a 3500 rpm. A fase orgânica superior foi recolhida e analisada por GC/ECD.

Tabela 7. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central ($n=3$)

Fatores	Níveis de amostragem		
	-1	Ponto Central	1
(X1) Adição de NaCl / %NaCl (m/v)	0	1	2
(X2) pH	4,2	6,4	8,7
(X3) Tempo de extração / s	0	15	30

Ensaio	Fatores codificados		
	X1	X2	X3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9C	0	0	0
10C	0	0	0
11C	0	0	0

C= Ponto central.

2.8. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

2.8.1. Parâmetros analíticos validados na determinação de metais

Na etapa de validação do método de digestão em micro-ondas e análise de metais por ICP-OES, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade de resposta do método, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (ensaios de recuperação) e precisão (repetitividade). Os procedimentos realizados para a validação do método proposto foram baseados nos guias de validação nacionais e internacionais (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

A linearidade foi avaliada pela curva analítica obtida pela análise das amostras digeridas fortificadas com metais em 10 concentrações distintas dos metais Co (0,02 a 5 mg L⁻¹), Cr (0,05 a 5 mg L⁻¹), Cu (0,009 a 3 mg L⁻¹), Fe (0,1 a 3 mg L⁻¹), Mn (0,05 a 10 mg L⁻¹), Ni (0,02 a 2 mg L⁻¹), Pb (0,01 a 2 mg L⁻¹) e Zn (0,09 a 18 mg L⁻¹) submetidas à digestão em micro-ondas e análise em ICP-OES. No preparo das curvas analíticas quantidades adequadas das soluções de trabalho (ST1 e ST2) foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida 0,5 mL HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ foi adicionado e o volume completado com água Milli-Q. A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa pela equação da curva analítica e o seu coeficiente de correlação (r).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC (ICH, 2005). O LOD e LOQ do método para metais foram calculados pela razão entre o desvio padrão da medida da concentração do branco (n=20) e a sensibilidade analítica obtida a partir da curva analítica para cada metal. O valor resultante foi multiplicado por 3,3 para obter o LOD e por 10 para obter o LOQ. O branco foi submetido aos mesmos procedimentos de digestão e análise das amostras de águas superficiais.

A exatidão foi avaliada neste trabalho através de estudos de recuperação. As amostras de água superficial foram misturadas e fortificadas com solução de trabalho (ST3, 25 mg L⁻¹) dos analitos em três níveis diferentes de concentração, dentro da faixa linear para cada elemento. Os níveis foram: 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹. Estas amostras foram preparadas com 0,2 mL de HNO₃ 1,4 mol L⁻¹. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (Equação 4) associado às respostas relativas dos metais em cada ensaio. A repetitividade foi determinada em um mesmo

dia e consistiu na análise de seis replicatas de cada um dos níveis de concentração (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) para cada metal.

2.8.2. Parâmetros analíticos validados na determinação de resíduos de agrotóxicos

Os parâmetros utilizados para validar os métodos foram seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito de matriz, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Todas as análises foram conduzidas utilizando amostras de água livres de agrotóxicos. Os procedimentos realizados para a validação do método foram baseados em orientações encontradas na literatura (ICH, 2005; INMETRO, 2010; MAPA, 2011).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de água superficial isenta dos agrotóxicos estudados com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada. Ambas amostras foram submetidas ao procedimento de extração otimizado.

A linearidade do método foi estabelecida plotando a área relativa do pico de cada agrotóxico (A/A_{PI}) versus a concentração do agrotóxico adicionado às amostras. Para a construção das curvas analíticas foi utilizado extratos obtidos pelo método otimizado (LLE/LTP ou DLLME/LDS) a partir de matriz branca fortificada. A faixa de aplicação foi preparada com no mínimo cinco níveis de concentração, sendo o primeiro nível equivalente ao LOQ e todos os outros níveis, múltiplos dele. Todas as soluções desse ensaio foram preparadas em triplicata e duas injeções foram feitas em cada um dos níveis de concentração. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido pela regressão linear.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram estabelecidos pela análise de amostras de água isentas dos agrotóxicos, fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos e extraídas por LLE/LTP ou DLLME/LDS. O LOD foi estabelecido como o menor nível detectável sendo essa concentração igual a três vezes a relação sinal-ruído, enquanto que o LOQ foi considerado como a concentração igual a dez vezes a relação sinal-ruído.

A exatidão, em termos de recuperação, foi determinada através da porcentagem de agrotóxicos recuperada em 3 níveis de fortificação (1, 2 e 10 LOQ para LLE/LTP e 1, 2 e 3 LOQ para DLLME/LDS). Para cada nível de fortificação

foram preparadas seis replicatas. A porcentagem de agrotóxicos recuperada (R), calculada através da Equação 1.1, é definida como a porcentagem da quantidade total de analito (n_{ad}) que é transferida para a fase extratora (n_{Ext}).

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, e, expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) (Equação 1.2) associado às respostas relativas dos agrotóxicos em cada ensaio. A repetitividade foi determinada em um mesmo dia e consistiu na análise de seis replicatas de cada um dos níveis de concentração (1, 2 e 10 LOQ para LLE/LTP e 1, 2 e 3 LOQ para DLLME/LDS). A precisão intermediária foi calculada com seis replicatas nas três concentrações em que foi avaliada a repetitividade e em três dias diferentes (dia 1, dia 3 e dia 5). Foi avaliada pelo mesmo analista e utilizando o mesmo instrumento. A extração dos analitos das amostras fortificadas foi realizada em conjunto com brancos das amostras para certificação da integridade dos dados obtidos.

$$R(\%) = \frac{n_{FExt}}{n_{ad}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.1})$$

$$RSD (\%) = \frac{DP}{C_f} \times 100 \quad (\text{Equação 1.2})$$

em que n_{FExt} é a quantidade de analito transferida para a fase extratora, n_{ad} é a quantidade de analito adicionada à amostra, DP é o desvio padrão das concentrações obtidas para cada analito em cada nível de concentração, C_f é a concentração determinada na amostra fortificada

Para avaliação do efeito de matriz (ME), foram preparadas duas curvas analíticas para cada método a ser validado, uma contendo os 15 analitos em solvente (acetonitrila para LLE/LTP ou tolueno para DLLME/LDS) (curva no solvente), e outra, pela fortificação do extrato da matriz branca (curva no extrato da matriz) com os 15 analitos na mesma faixa de concentração que a curva no solvente. Os extratos da matriz branca foram obtidos de amostra de água isenta dos agrotóxicos avaliados e submetidos à técnica LLE/LTP ou DLLME/LDS. Todas as soluções deste ensaio foram preparadas em triplicatas e com no mínimo cinco níveis de concentração. A Equação 1.3 foi utilizada para cálculo do ME e a porcentagem de enriquecimento ou supressão na resposta cromatográfica foi comparada para ambos os métodos como verificado em trabalhos na literatura (CUNHA; FERNANDES, 2011; MELO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013).

O fator de enriquecimento (EF), parâmetro que avalia a partição dos analitos entre as fases, foi avaliado em DLLME/LDS. Após otimização e validação do método DLLME/LDS e GC/ECD, o mesmo foi empregado na extração e análise de 18 amostras de água destilada contendo os 15 princípios ativos. Essas amostras foram fortificadas com 125 µL da solução padrão de trabalho para validação (STV, concentração dos agrotóxicos equivalente a 100 LOQ) obtendo-se a concentração dos agrotóxicos em amostras de água em concentrações equivalentes a 2 vezes LOQ. Para a quantificação foi utilizada a curva analítica em tolueno (curva no solvente) com padronização interna e o fator de enriquecimento (EF) foi calculado a partir da Equação 1.4.

$$ME (\%) = \left(\frac{a_{CE}}{a_{CS}} \times 100 \right) - 100 \quad (\text{Equação 1.3})$$

$$EF = \frac{C_{FExt}}{C_{ad}} \quad (\text{Equação 1.4})$$

em que a_{CE} é a inclinação da curva no extrato, a_{CS} é a inclinação da curva no solvente, C_{FExt} é a concentração determinada na fase extratora e C_{ad} é concentração do analito puro adicionado à amostra.

2.9. AMOSTRAS REAIS

O método otimizado DLLME/LDS e GC/ECD foi empregado para determinação de resíduos de agrotóxicos em 32 amostras de água superficial coletadas na microbacia do rio Manhuaçu e em 4 amostras de água residuária do processamento pós-colheita do café.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

As amostras de águas superficiais coletadas foram caracterizadas quanto aos principais parâmetros físicos e químicos. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Características físicas e químicas das amostras de água superficial coletadas na microbacia do rio Manhuaçu

Coleta	Amostras	T / °C	pH	CE / $\mu\text{S cm}^{-1}$	TB / UNT	Cor / uH	ALC / mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	Cl / mg L^{-1}
Março de 2012	P1	22,3	6,42	23,6	3,5	30	16,2	1,6
	P2	22,3	6,54	45,1	11,6	56	34,3	2,3
	P3	22,8	6,72	59,0	14,5	120	38,2	3,3
	P4	24,0	6,26	33,6	10,2	54	17,9	1,7
	P5	24,5	5,47	49,0	11,2	55	29,2	6,4
	P6	24,8	6,76	38,4	10,2	56	20,2	3,3
	P7	23,8	5,73	35,5	11,3	52	21,5	3,1
	P8	21,0	7,18	24,3	6,4	48	25,9	0,9
Junho de 2012	P1	19,7	6,55	16,6	3,5	25	8,8	1,99
	P2	19,6	6,71	25,6	10,1	65	11,8	2,23
	P3	18,6	6,55	33,0	11,6	98	31,5	2,94
	P4	18,6	7,02	20,0	20,5	84	15,1	2,94
	P5	19,3	6,62	40,2	22,5	82	20,6	3,90
	P6	17,6	7,16	21,4	6,1	38	20,6	2,23
	P7	18,2	6,55	21,2	6,7	41	16,2	2,71
	P8	18,4	6,83	14,3	8,6	59	10,4	2,47
Dezembro de 2012	P1	23,3	7,90	47,1	4,9	53	6,6	nd
	P2	24,7	6,40	68,5	14,9	108	18,2	nd
	P3	25,0	6,90	70,5	15,8	112	21,9	nd
	P4	26,3	6,50	40,0	9,5	78	8,2	nd
	P5	26,8	7,21	60,2	8,1	45	6,1	nd
	P6	24,6	6,72	80,2	8,4	40	11,8	nd
	P7	24,3	7,20	71,5	7,3	39	13,4	nd
	P8	23,4	5,00	25,1	10,9	112	8,9	nd
Março de 2013	P1	25,2	7,02	49,3	18,5	105	27,8	0,2
	P2	23,6	6,70	52,1	18,0	110	32,7	0,5
	P3	22,9	6,64	31,9	3,2	60	16,0	nd
	P4	26,0	6,82	57,5	11,2	55	20,6	nd
	P5	26,2	6,53	40,3	15,0	97	16,3	nd
	P6	25,6	6,88	52,5	10,5	54	23,8	nd
	P7	25,6	6,41	61,3	19,0	97	Nd	0,9
	P8	23,3	6,94	22,6	9,6	65	12,4	nd

T= Temperatura; pH= Potencial hidrogeniônico; CE= Condutividade elétrica; Tb= Turbidez (Unidade Nefelométrica de Turbidez); ALC= Alcalinidade; Cl= Cloreto; nd= não detectado.

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se perceber que a temperatura da água variou de 17 a 27 °C. Variações de temperatura são parte do regime climático normal, e corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas, bem como estratificação vertical. A temperatura superficial é influenciada

por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade (CETESB, 2013).

Os valores de pH das amostras de água superficial variaram de 5,5 a 7,9. Em 9% das amostras foram verificados valores de pH abaixo do limite estabelecido pela legislação (CONAMA, 2005), cuja faixa aceitável é 6,0 a 9,0.

A condutividade é uma expressão numérica da capacidade de uma água conduzir a corrente elétrica. Depende das concentrações iônicas e da temperatura e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água, e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. A condutividade também fornece uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece nenhuma indicação das quantidades relativas dos vários componentes. Em geral, níveis acima de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ indicam ambientes impactados (CETESB, 2013). As análises de água superficial forneceram resultados entre 14 e $80 \mu\text{S cm}^{-1}$.

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la (alteração na penetração da luz) devido à presença de sólidos em suspensão. Esta redução de intensidade ocorre por absorção e espalhamento, uma vez que as partículas que provocam turbidez na água são maiores que o comprimento de onda da luz branca. Alta turbidez reduz a fotossíntese de vegetação enraizada submersa e algas e assim, pode influenciar nas comunidades biológicas aquáticas. Além disso, afeta adversamente os usos doméstico, industrial e recreacional da água (CETESB, 2013). As amostras analisadas apresentaram valores de turbidez (3,2- 22,5 UNT) dentro do limite estabelecido pela resolução CONAMA 357/05, que para classe 2 prevê valores inferiores a 40 UNT.

A cor de uma amostra está associada ao grau de redução de intensidade que a luz sofre ao atravessá-la devido à presença de sólidos dissolvidos como ácidos húmicos e fúlvicos, etc. Assim, está associada à presença de materiais dissolvidos ou em suspensão. Outros compostos são os óxidos de ferro e manganês abundantes em diversos solos. O problema maior de cor na água, em geral, é estético, já que causa um efeito repulsivo aos consumidores. Neste trabalho, a cor das amostras de água variou de 25 a 120 uH.

A alcalinidade variou de 6 a $38 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ nas amostras de água superficial. Já cloreto variou de não detectado (ND) a $6,5 \text{ mg L}^{-1}$.

A Tabela 9 apresenta os resultados das análises física e química realizadas nas amostras de água residuária coletadas em Martins Soares, MG e os padrões de lançamento de efluentes segundo a Resolução nº430 do Conama (CONAMA, 2011).

Tabela 9. Características físicas e químicas das amostras de água residuária coletadas em Martins Soares, MG

Parâmetros	CONAMA 430/2011	ARC1	ARC2	ARC3	ARC4
pH	5-9	4,6	4,7	4,8	6,8
CE / $\mu\text{S cm}^{-1}$	-	2009	1976	1822	54,0
DBO / $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$	-	2490	2007	1872	94,0
DQO / $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$	-	9405	8030	6555	395
ST / mg L^{-1}	-	3484	3850	3458	86,0
SF / mg L^{-1}	-	1478	1564	1424	18,0
SV / mg L^{-1}	-	2006	2286	2034	68,0
SS / mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	<0,1	0,3	<0,1	<0,1

ARC= Água residuária de café; pH= Potencial hidrogeniônico; CE= Condutividade elétrica; DBO= Demanda bioquímica de oxigênio; DQO= Demanda química de oxigênio; ST= sólidos totais; SF= sólidos fixos; SV= sólidos voláteis; SS= Sólidos sedimentáveis.

Pode-se perceber que o valor de pH das amostras de água residuária variou de 4,6 a 6,8. Do tanque 1 ao 3 (ARC1-3) verifica-se um ligeiro aumento do valor de pH e na lagoa (ARC4) o valor de pH encontra-se dentro do valor estabelecido pela resolução Conama 430/2011 para lançamento deste em corpos d'água. Os demais parâmetros avaliados sofreram diminuições significativas do tanque 1 (ARC1) até a lagoa (ARC4). Os valores de condutividade elétrica reduziram de 2009 a 54, DBO de 2490 a 94, DQO de 9405 a 395. Os teores de sólidos totais, fixos e voláteis aumentaram do tanque 1 (ARC1) para o tanque 2 (ARC2), e diminuíram significativamente até atingir valores de 86; 18 e 68, respectivamente.

3.2. ANÁLISE DE METAIS

Os teores de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram determinados em amostras de águas superficiais coletadas em 8 pontos da região cafeeira da zona leste de Minas Gerais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Para avaliação da contaminação por metais em águas superficiais, primeiramente, foram avaliados os seguintes parâmetros

analíticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão (ensaios de recuperação) e precisão.

A linearidade do método foi avaliada para cada elemento a partir da equação da curva analítica obtida por meio de regressão linear no intervalo apresentado na Tabela 10. Para cada elemento foram empregados dez níveis de concentração. Os parâmetros da curva analítica e os coeficientes de correlação (r) obtidos são apresentados na Tabela 10. Pode-se perceber que os valores de r obtidos foram superiores a 0,99 para todos os metais analisados, com valores entre 0,995 e 0,999. Tais resultados indicam a boa linearidade de resposta do método para análise de metais em amostras de água superficial nas faixas de concentrações avaliadas.

Tabela 10. Parâmetros analíticos obtidos na determinação de metais em água por ICP-OES

Metais	Faixa linear / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	a	b	r
Co	25 - 5000	1489	-16,77	0,996
Cr	50 - 5000	4433	-28,86	0,996
Cu	9 - 2700	57693	-188,49	0,999
Fe	150 - 3000	5426	188,77	0,996
Mn	50 - 10000	40947	-698,91	0,996
Ni	25 - 2500	3004	-25,52	0,996
Pb	10 - 2000	721	10,25	0,996
Zn	90 - 18000	4161	2052,49	0,995

a= inclinação; b= intercepto; r=coeficiente de correlação.

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados para todos os analitos baseados nos parâmetros da curva analítica e na resposta do branco. Os valores de LOD e LOQ obtidos para os elementos estudados, bem como os valores máximos permitidos para cada metal em água estabelecidos pela legislação específica são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) obtidos para a determinação de metais em amostras de água por ICP-OES

Metais	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VMP / ($\mu\text{g L}^{-1}$) CONAMA 357, 2005	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$) WHO, 2011
Co	8	25	50	-
Cr	17	50	50	50
Cu	3	9	9	2000
Fe	50	150	300	-

(continuação na próxima página)

Tabela 11. (Continuação)

Metais	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	VMP / ($\mu\text{g L}^{-1}$) CONAMA 357, 2005	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$) WHO, 2011
Mn	17	50	100	-
Ni	8	25	25	70
Pb	3	10	10	10
Zn	30	90	180	-

LOD= limite de detecção; LOQ= limite de quantificação; VMP= valor máximo permitido.

Conforme pode-se observar, os valores de LOQ do método adotado são suficientes quando comparados aos valores máximos permitidos pela legislação. Alguns elementos apresentaram LOQ igual ou 2 vezes menor ao limite máximo permitido pela resolução CONAMA 357 (2005), resolução esta que classifica os corpos de água e fornece as diretrizes ambientais para os seu enquadramento. Quando comparado aos valores-guia para qualidade de água para consumo humano (WHO, 2011), o LOQ de alguns elementos foi bem inferior ao valor máximo permitido (VMP).

Os ensaios para avaliação da exatidão do método foram feitos por estudo de recuperação para cada metal em três níveis de contaminação. A repetitividade do método também foi avaliada nessas mesmas concentrações. A Tabela 12 apresenta os valores de recuperação e o desvios padrão relativo (RSD) obtidos.

Tabela 12. Valores de recuperação e desvios padrão relativo na análise de metais em amostras de água superficial da microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu, MG

Metais	Concentração adicionada / ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	500,00		1000,00		2000,00	
	R / %	RSD / %	R / %	RSD / %	R / %	RSD / %
Co	88	6	88	7	82	0,5
Cr	110	5	110	7	103	0,6
Cu	100	5	98	5	93	1
Fe	110	16	110	19	99	3
Mn	98	3	93	5	85	2
Ni	84	7	84	7	79	1
Pb	71	9	75	7	70	1
Zn	72	18	71	15	77	5

R= Recuperação (n=6); RSD= desvio padrão relativo (n=6).

As recuperações obtidas variaram de 70 a 110%. Para análise de resíduos de contaminantes, o procedimento analítico deve ser capaz de recuperar, em cada nível

de fortificação, de 70 a 120%. Uma vez que os valores obtidos estão dentro deste intervalo, pode-se concluir que os resultados de recuperação dos metais analisados são satisfatórios.

A repetitividade foi avaliada em três níveis de concentração, 500; 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os desvios padrão relativo dos elementos estudados variaram de 3 a 18%; de 5 a 19% e de 0,5 a 5%, respectivamente. Os resultados de RSD foram considerados satisfatórios, uma vez que, os valores encontrados ficaram abaixo de 20%.

O método validado foi aplicado nas 32 amostras de água superficial coletadas nos períodos de março de 2012 à março de 2013. Os teores de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram determinados por ICP-OES. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13. A Figura 2 mostra os teores de metais presentes nas amostras de água superficial da microbacia do rio Manhuaçu.

Tabela 13. Determinação de metais totais em águas superficiais da microbacia do Rio Manhuaçu por ICP-OES

Coleta	Pontos	Concentração de metais /($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
VMP CONAMA 357/2005 /($\mu\text{g L}^{-1}$)		50	50	9	300	100	25	10	180
Março de 2012	P1	<8	<17	<3	274	<50	<8	<3	<30
	P2	<8	<17	<3	339	214	<8	<3	<30
	P3	<8	<17	<3	282	67	<8	<3	<30
	P4	<8	<17	<3	196	20	<8	<3	<30
	P5	<8	<17	<3	148	<50	<8	<3	<30
	P6	<8	<17	<3	164	79	<8	<3	<30
	P7	<8	<17	<3	<150	62	<8	<3	<30
	P8	<8	<17	<3	281	152	<8	<3	<30
Junhode 2012	P1	<8	<17	<3	<150	<17	<8	<3	<30
	P2	<8	<17	<3	164	79	<8	<3	<30
	P3	<8	<17	<3	274	61	<8	<3	<30
	P4	<8	<17	<3	289	<50	<8	<3	<30
	P5	<8	<17	<3	<150	<50	<8	<3	<30
	P6	<8	<17	<3	188	116	<8	<3	<30
	P7	<8	<17	<3	227	72	<8	<3	<30
	P8	<8	<17	<3	<150	<17	<8	<3	<30

(Continuação na próxima página)

Tabela 13. (Continuação)

Coleta	Pontos	Concentração de metais /($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Dezembro de 2012	P1	<8	<17	<3	228	<17	<8	<3	<30
	P2	<8	<17	<3	508	346	<8	<3	<30
	P3	<8	<17	<3	602	412	<8	<3	<30
	P4	<8	<17	<3	236	<17	<8	<3	<30
	P5	<8	<17	<3	285	56	<8	<3	<30
	P6	<8	<17	<3	242	84	<8	<3	<30
	P7	<8	<17	<3	270	85	<8	<3	<30
	P8	<8	<17	<3	464	41	<8	<3	<30
Março de 2013	P1	<8	<17	<9	405	540	<8	<3	<30
	P2	<8	<17	<3	423	124	<8	<3	<30
	P3	<8	<17	<3	470	81	<8	<3	<30
	P4	<8	<17	<3	305	<50	<8	<3	<30
	P5	<8	<17	<3	273	47	<8	<3	<30
	P6	<8	<17	<3	187	54	<8	<3	<30
	P7	<8	<17	<9	212	50	<8	44	<30
	P8	<8	<17	<3	211	<50	<8	<3	<30

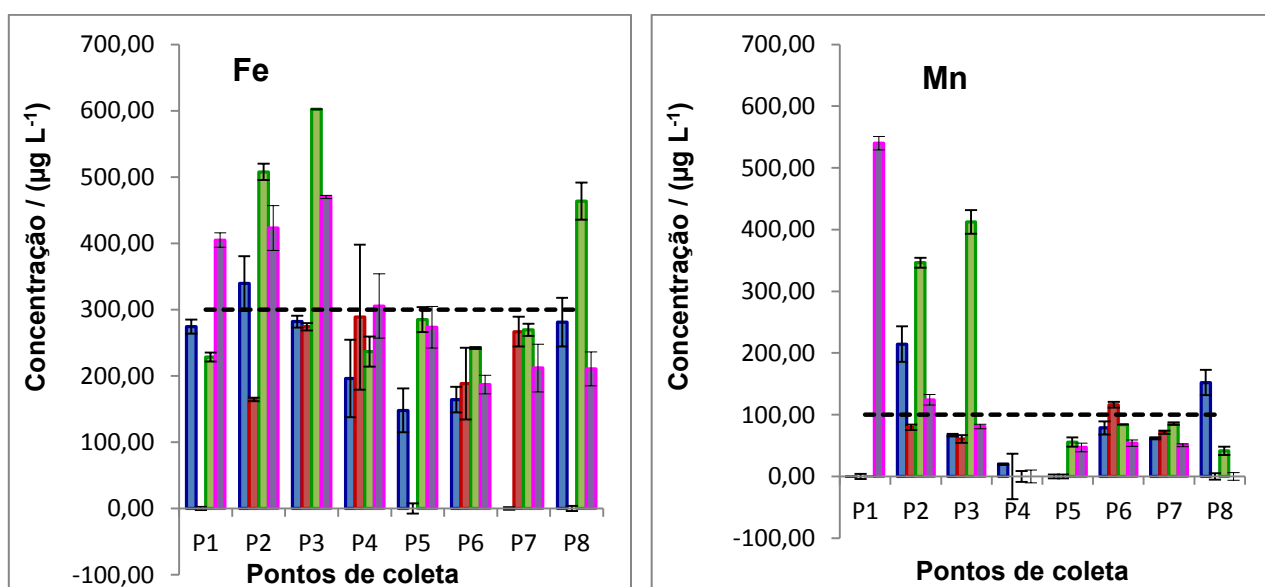


Figura 2. Gráfico dos teores de metais totais em amostras de água superficial da microbacia do rio Manhuaçu coletadas em: (___) mar/2012, (___) jun/2012, (___) dez/2012 e (___) mar/2013 comparadas ao valor máximo permitido (___) pelo CONAMA 357/2005.

Para avaliação da contaminação por metais nas amostras de água analisadas, foi utilizada a Resolução 357/05 (CONAMA, 2005), que prevê os

padrões de qualidade para cada parâmetro de acordo com a classe em o corpo d'água é classificado.

Os metais cobalto, cromo, níquel e zinco não foram detectados nas amostras de água superficial da microbacia do Rio Manhuaçu no período monitorado. O cobre foi detectado em duas amostras em concentrações inferiores ao limite de quantificação. (LOQ).

As concentrações de ferro variaram de <150 (abaixo do limite de quantificação) a $602 \mu\text{g L}^{-1}$ (média de $292 \mu\text{g L}^{-1}$). Ficaram acima do VMP pela legislação brasileira, 25% das amostras analisadas. Os teores de ferro encontrados em junho de 2012 foram os menores quando comparado aos outros períodos. As maiores concentrações de ferro foram encontradas no período de dezembro de 2012. Maiores concentrações de ferro foram encontradas no período chuvoso por outros pesquisadores (RIETZLER *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2012). Os resultados obtidos nesse trabalho estão abaixo aos obtidos por Rietzler *et al.* (2001), cujos valores variaram de não detectado a $15,2 \text{ mg L}^{-1}$ na estação seca e de 3,15 a 125 mg L^{-1} na estação chuvosa em amostras de água da microbacia da Pampulha em Belo Horizonte, MG. Segundo CETESB (2013) os valores elevados de ferro, que é um dos constituintes essenciais do solo está associado aos fenômenos de erosão e lixiviação. Os solos da microbacia do rio Manhuaçu são altamente intemperizados, e possuem naturalmente alta concentração de ferro principalmente na forma de óxidos de ferro (hematita e goethita). O ferro não apresenta efeitos tóxicos, porém causa diversos problemas para o abastecimento público de água. Confere cor e sabor à água, provoca manchas em roupas e utensílios sanitários (CETESB, 2013).

Os teores mínimos e máximos observados para manganês variaram de abaixo do limite de detecção a $540 \mu\text{g L}^{-1}$ (média de $129 \mu\text{g L}^{-1}$). Do total de amostras analisadas, 22% ficaram acima do VMP pela legislação brasileira. Os menores teores de manganês foram encontrados nas amostras coletadas em junho de 2012. Os maiores teores foram encontrados no rio Manhuaçu durante os meses de dezembro de 2012 e março de 2013. A maior concentração de Mn foi verificada na nascente (P1) em março de 2013, $540 \mu\text{g L}^{-1}$, valor superior ao estabelecido pelo CONAMA ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). O manganês faz parte de diversos minerais, ligado principalmente ao oxigênio e silício (óxidos e sulfetos de manganês, formas comuns no solo), podendo o mesmo ter sido carregado para as águas superficiais.

O chumbo foi detectado em uma amostra (n=3) coletada no rio São Luiz, à jusante de Luisburgo, numa concentração 4 vezes superior ao valor máximo permitido ($44 \pm 4 \mu\text{g L}^{-1}$). Esta foi a única amostra que apresentou valores elevados de Pb, indicando um caso sugestivo de contaminação antrópica que pode colocar em risco a saúde dessa população. Esse elemento é muito tóxico mesmo em baixas concentrações. É um elemento tóxico cumulativo concentrando-se principalmente nos ossos. Teores acima de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ provocam uma intoxicação variável no ser humano em função da quantidade acumulada no organismo, e podem causar danos cerebrais irreversíveis.

Durante todo o percurso amostrado da rede hidrográfica houve a presença sistemática dos metais Fe e Mn provenientes provavelmente do solo. De maneira geral, em junho, mês de menor pluviosidade, foram encontradas as menores concentrações de metais característicos do solo, devido ao menor carreamento de partículas para o sistema aquático. Maiores concentrações verificadas em períodos de maior pluviosidade podem estar relacionadas à ocupação irregular ao longo das margens dos rios. Muito solo tem sido removido e mantido exposto, sem cobertura vegetal. Conclui-se desta maneira que a microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu tem sofrido interferência da urbanização e das práticas agrícolas e, programas de conscientização podem ser estabelecidos, principalmente nos municípios avaliados.

Vale a pena destacar que os metais podem se acumular em lagos e rios por meio dos sedimentos. Mudanças nas condições ambientais como temperatura e regime hídrico podem alterar a biodisponibilidade e também favorecer o carreamento de partículas do solo e sua deposição em corpos d'água, alterando assim, o teor dos metais nas águas superficiais e subterrâneas. Dessa maneira, ressalta a necessidade de monitorar também os sedimentos e solos próximos aos locais de coleta em trabalhos futuros, para o melhor entendimento das fontes poluidoras.

3.3. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

O cromatograma dos 15 agrotóxicos analisados mais o padrão interno é apresentado na Figura 3. Todos os agrotóxicos foram eluídos cromatograficamente em tempo menor que 18,6 minutos, um tempo bem razoável, e apresentaram picos resolvidos nas condições otimizadas do GC/ECD. Os tempo de retenção (t_R) de cada analito são apresentados na Tabela 14.

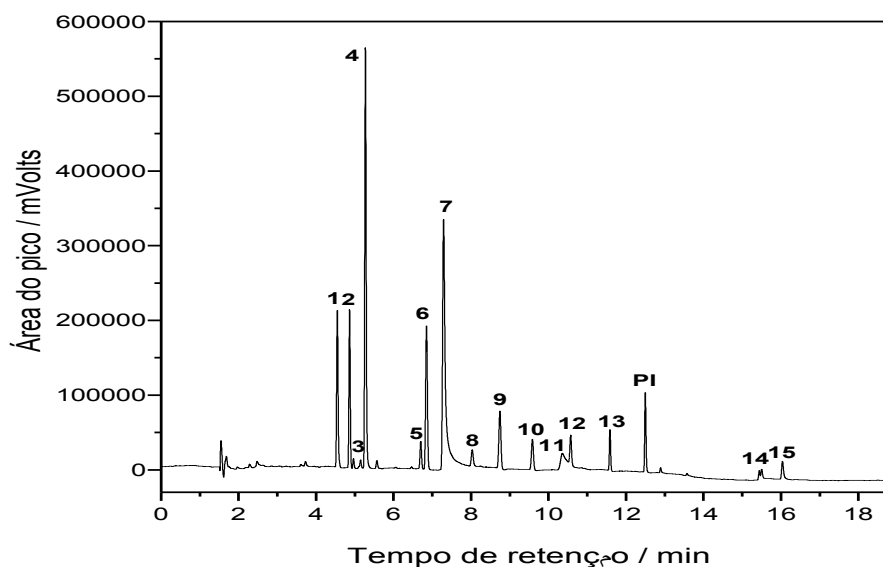


Figura 3. Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em acetonitrila: 1) Hexaclorobenzeno ($30 \mu\text{g L}^{-1}$); 2) Lindano ($30 \mu\text{g L}^{-1}$); 3) Disulfotom ($43 \mu\text{g L}^{-1}$); 4) Clorotalonil ($90 \mu\text{g L}^{-1}$); 5) Aldrin ($6 \mu\text{g L}^{-1}$); 6) Clorpirifós ($80 \mu\text{g L}^{-1}$); 7) Tiametoxam ($750 \mu\text{g L}^{-1}$); 8) Triadimenol ($200 \mu\text{g L}^{-1}$); 9) Endosulfam I ($26 \mu\text{g L}^{-1}$); 10) Dieldrin ($9 \mu\text{g L}^{-1}$); 11) Ciproconazol ($700 \mu\text{g L}^{-1}$); 12) Endosulfam II ($26 \mu\text{g L}^{-1}$); 13) DDT ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); 14) Bifentrina (padrão interno, $200 \mu\text{g L}^{-1}$); 15) Difenconazol ($80 \mu\text{g L}^{-1}$); 16) Azoxistrobina ($37 \mu\text{g L}^{-1}$). As condições cromatográficas foram descritas em Materiais e métodos.

Tabela 14. Tempos de retenção dos agrotóxicos após condições cromatográficas otimizadas

Pico	Agrotóxico	Tempo de retenção / min
1	Hexaclorobenzeno	4,5
2	Lindano	4,8
3	Disulfotom	5,1
4	Clorotalonil	5,3
5	Aldrin	6,7
6	Clorpirifós	6,9
7	Tiametoxam	7,3
8	Triadimenol	8,0
9	Endosulfam-I	8,8
10	Dieldrin	9,6
11	Ciproconazol	10,4
12	Endosulfam-II	10,6
13	DDT	11,6
(PI)	Bifentrina	12,3
14	Difenconazol	15,5
15	Azoxistrobina	16,0

Curvas analíticas em acetonitrila e em tolueno foram preparadas para os cálculos de recuperação, efeito de matriz e fator de enriquecimento dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS, respectivamente.

A curva analítica em acetonitrila foi preparada por diluição das soluções de trabalho para validação de LLE/LTP (concentrações dos agrotóxicos equivalentes a 30 e 100 LOQ) para obter hexaclorobenzeno e lindano (12 a $240 \mu\text{g L}^{-1}$), disulfotom (17 a $348 \mu\text{g L}^{-1}$), clorotalonil e dieldrin (3 a $72 \mu\text{g L}^{-1}$), aldrin ($2,3$ a $45 \mu\text{g L}^{-1}$), clorpirifós e difenoconazol (32 a $640 \mu\text{g L}^{-1}$), tiametoxam (300 a $900 \mu\text{g L}^{-1}$), triadimenol (80 a $800 \mu\text{g L}^{-1}$), endosulfam I e II (10 a $210 \mu\text{g L}^{-1}$), ciproconazol (280 a $840 \mu\text{g L}^{-1}$), DDT (4 a $84 \mu\text{g L}^{-1}$), e azoxistrobina (15 a $300 \mu\text{g L}^{-1}$). Para DLLME/LDS, uma curva analítica foi preparada por diluição das soluções padrão em tolueno nas seguintes faixas de concentração de: 1 - $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para hexaclorobenzeno; $0,7$ - $33 \mu\text{g L}^{-1}$ para lindano; 27 - $1353 \mu\text{g L}^{-1}$ para disulfotom; $0,6$ - $14 \mu\text{g L}^{-1}$ para clorotalonil; 3 - $78 \mu\text{g L}^{-1}$ para aldrin; 8 - $507 \mu\text{g L}^{-1}$ para clorpirifós; 193 - $1451 \mu\text{g L}^{-1}$ para tiametoxam; 86 - $1712 \mu\text{g L}^{-1}$ para triadimenol; 1 - $35 \mu\text{g L}^{-1}$ para endosulfam I; 7 - $183 \mu\text{g L}^{-1}$ de dieldrin; 280 - $1403 \mu\text{g L}^{-1}$ para ciproconazol; $0,7$ - $35 \mu\text{g L}^{-1}$ para endosulfam II; 3 - $134 \mu\text{g L}^{-1}$ para DDT; 168 - $1401 \mu\text{g L}^{-1}$ para difenoconazol e 125 - $1252 \mu\text{g L}^{-1}$ para azoxistrobina. As curvas analíticas foram preparadas em triplicata. Pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação de regressão linear. Os parâmetros das curvas analíticas (inclinação, intercepto e coeficiente de correlação) obtidos para cada curva são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Comparação dos parâmetros das equações de regressão da linearidade das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e em tolueno

Agrotóxicos	Parâmetros da curva analítica em acetonitrila (LLE/LTP)			Parâmetros da curva analítica em tolueno (DLLME/LDS)		
	a	b	r	a	b	r
Hexaclorobenzeno	44	0,9	0,997	154	0,267	0,996
Lindano	42	0,7	0,997	151	0,121	0,997
Disulfotom	2,0	0,03	0,999	4,3	0,053	0,997
Clorotalonil	376	2,5	0,996	302	-0,093	0,993
Aldrin	53	0,1	0,998	125	0,558	0,997
Clorpirifós	15	1,2	0,997	8,6	7,31	0,990
Tiametoxam	9,1	-0,07	0,999	10	1,15	0,990
Triadimenol	1,1	0,08	0,996	1,2	0,189	0,992
Endosulfam I	27,5	0,4	0,998	437	1,26	0,991
Dieldrin	52	0,1	0,999	119	1,67	0,990
Ciproconazol	0,77	-0,007	0,997	1,1	1,80	0,991
Endosulfam II	14	0,09	0,997	218	0,521	0,994
DDT	35	0,1	0,998	73	0,093	0,992
Difenoconazol	3,2	0,08	0,999	4,2	0,174	0,994
Azoxistrobina	5,4	0,1	0,996	0,38	0,0056	0,990

a= Inclinação; b= Intercepto; r= Coeficiente de correlação.

Tendo em vista a boa linearidade obtida, coeficientes de correlação maiores que 0,99 para todos os agrotóxicos, as duas curvas analíticas podem ser aplicadas na quantificação de resíduos de agrotóxicos das respectivas técnicas de preparo de amostras.

O preparo de amostras é uma das mais importantes etapas na análise de agrotóxicos em nível de traço, com uma influência direta e importante em ambos limites de detecção e quantificação obtidos. A eficiência de extração depende fortemente do solvente orgânico utilizado, da natureza da amostra e das propriedades químicas dos agrotóxicos (CUNHA; FERNANDES, 2011). Neste estudo, dois tipos de procedimentos de extração são avaliados: LLE/LTP (VIEIRA *et al.*, 2007; SILVERIO *et al.*, 2012) e DLLME (ALVES *et al.*, 2012). Pela primeira vez estes métodos foram avaliados para análise multirresíduo de agrotóxicos utilizados na cafeicultura (recentemente ou no passado) em amostras de água superficial e residuária.

3.3.1. Otimização da técnica extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)

A primeira etapa no processo de otimização da técnica LLE/LTP para determinação de 15 resíduos de agrotóxicos em amostras de água, consistiu em comparar técnicas de LLE/LTP descritas na literatura (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010) e verificar se as mesmas atingiam uma boa eficiência na extração multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes. As técnicas 1 e 2 diferem da técnica 3 principalmente em relação à partição a frio. Nas técnicas 1 e 2, a amostra permanece no freezer até o congelamento da fase aquosa. Já na técnica 3, a partição ocorre apenas pela separação de fases aquosa e orgânica em função da redução de miscibilidade entre as fases pelo abaixamento da temperatura. A eficiência de extração avaliada pela resposta cromatográfica (área relativa) dos agrotóxicos obtida por estas 3 técnicas de LLE/LTP é apresentada na Figura 4.

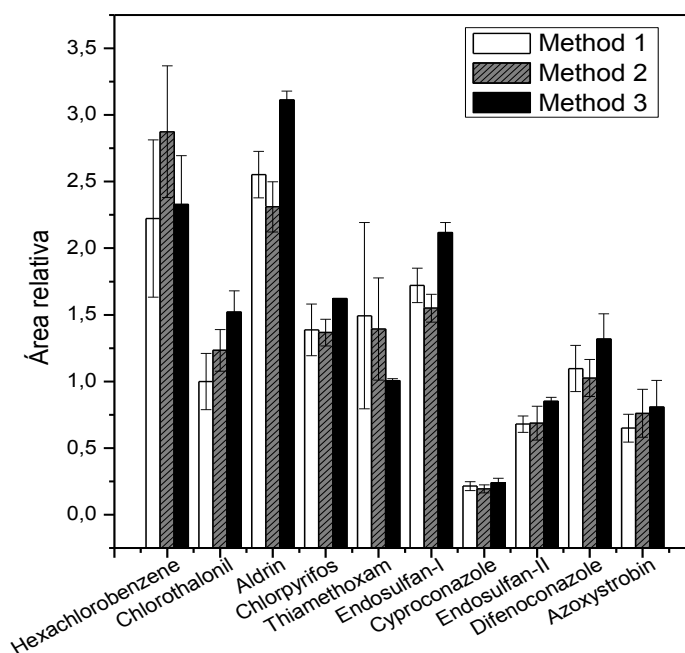


Figura 4. Comparação de técnicas para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que, para a maioria dos agrotóxicos, nenhuma diferença significativa ao nível de 95% de confiança pela ANOVA em relação à área relativa foi encontrada para as técnicas avaliadas. Entretanto, a técnica 3 (GOULART *et al.*, 2010) foi significativamente melhor para aldrin e endosulfam I, fornecendo maiores respostas e menores desvios padrão para todos os compostos. Esse resultado se deve provavelmente por ser uma técnica com menor número de etapas no preparo de amostras. Nos estudos seguintes, a técnica 3 foi selecionada como ponto de partida para a otimização da LLE/LTP.

A segunda etapa na otimização da técnica LLE/LTP consistiu em avaliar diferentes tipos e tempos de agitação na eficiência de extração dos analitos. Para isso foram testadas a agitação em vórtex (VT) por 1, 2 e 3 min e mecânica (MA) por 5, 10, 15 e 20 min. A Figura 5 mostra o comportamento dos agrotóxicos nestes tempos e tipo de agitação.

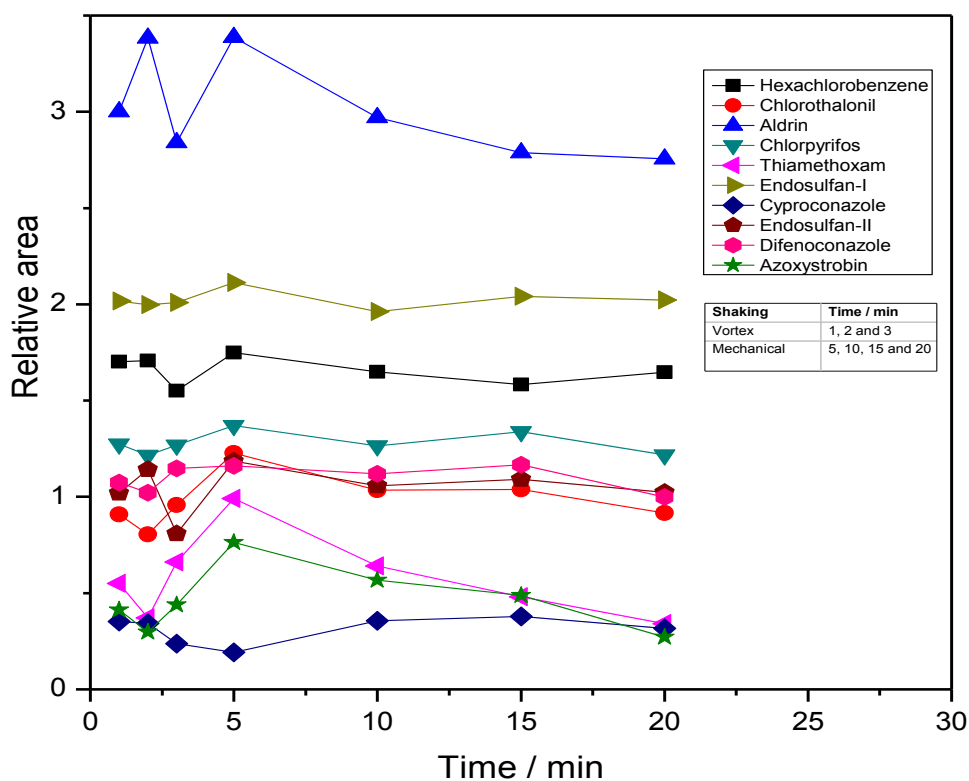


Figura 5. Influência do tipo e tempo de agitação da técnica LLE/LTP na resposta cromatográfica dos analitos. Foram testados agitação em vórtex por 0,5; 1 e 2 min; mesa agitadora por 30, 60, e 120 min.

Como pode ser observado, para a maioria dos compostos a mesa agitadora forneceu melhores respostas na extração dos agrotóxicos por LLE/LTP. Aplicando a ANOVA, percebe-se que, ao nível de 95% de confiança, os tipos e tempos de agitação foram iguais para a maioria dos agrotóxicos. As diferenças significativas verificadas foram para o clorotalonil (VT 2 min e MA 5 min), aldrin (VT 2 min e MA 20 min), tiametoxam (VT 2 min e MA 5 min e entre VT 2 min e MA 20 min) e principalmente para azoxistrobina (VT 1 min e MA 5 min; VT 2 min e MA 5 min; VT 2 min e MA 15 min; VT 3 min e MA 5 min; MA 5 min e MA 20 min e entre MA 10 min e MA 20 min). A correlação ANOVA dos dados apresentados na Figura 5 permite concluir que as piores respostas para esses 4 agrotóxicos foram obtidas quando utilizou-se agitação em vórtex por 1, 2 e 3 min ou mesa agitadora por 20 min. Assim, percebe-se que não há diferença significativa em utilizar a mesa agitadora por 5, 10 ou 15 min. Logo, nos estudos posteriores será utilizada a mesa agitadora por 10 min.

A influência da proporção amostra:acetonitrila na determinação multirresíduo de agrotóxicos em água foi avaliada. Os resultados obtidos são apresentados na

Figura 6. Como pode ser observado, para maioria dos agrotóxicos não há diferenças significativas ao se utilizar a proporção 1:1 ou 1:2 de amostra:solvente extrator e isto foi comprovado pela ANOVA ao nível de 95% de confiança. Apenas para o DDT foi verificado diferenças significativas ao mudar a proporção de amostra:solvente extrator, sendo que a proporção 1:1 de amostra:solvente extrator foi a que forneceu melhor resposta. Desta maneira, visando também a não diluição das amostras e consequentemente obtendo melhores limites de detecção e quantificação, a proporção 4 mL de água para 4 mL de acetonitrila será adotada na técnica LLE/LTP.

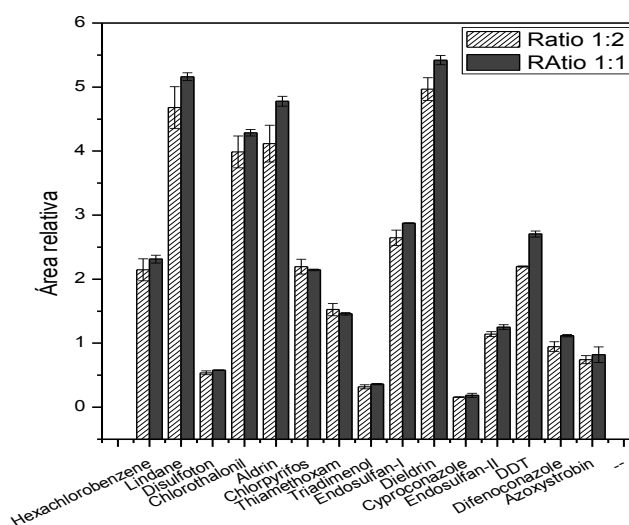


Figura 6. Influência da proporção amostra:acetonitrila na determinação multirresíduo de agrotóxicos em água.

Em seguida, foram otimizados três parâmetros que podem afetar a eficiência de extração através de um planejamento fatorial completo 2^3 . A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor. Os resultados, área relativa total, foram usados para gerar os gráficos de Pareto dos efeitos e interações. Neste gráfico, o comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto de cada efeito estimado e interação, os quais permitem uma comparação da significância relativa de cada um dos fatores na LLE/LTP. Na Figura 7 é apresentado o gráfico dos efeitos dos fatores velocidade de agitação, adição de ácido acético e força iônica na extração multirresíduo de agrotóxicos em água.

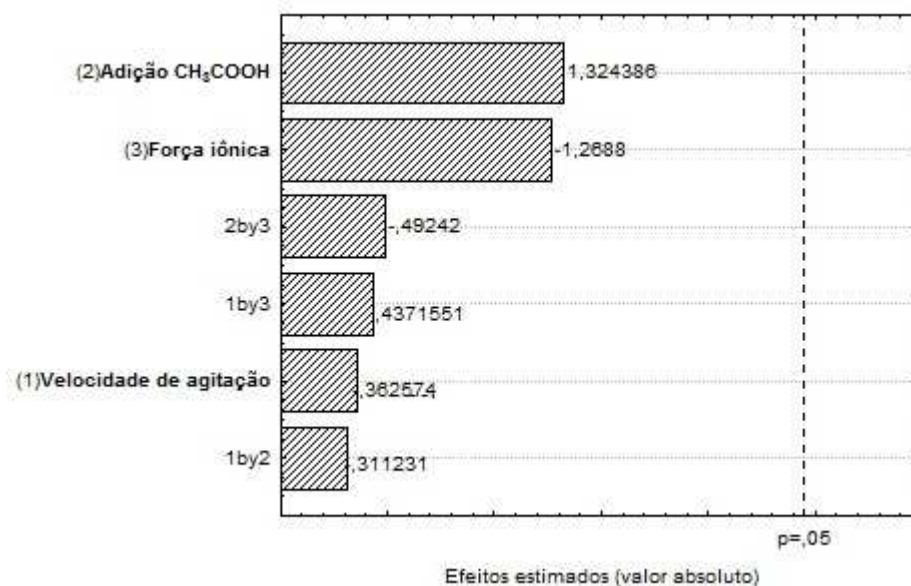


Figura 7. Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores velocidade de agitação, adição de ácido e força iônica sobre a extração de agrotóxicos em amostras de água para otimização da LLE/LTP.

No estudo de campo experimental do planejamento fatorial, as variáveis investigadas (velocidade de agitação – 150 ou 200 opm; adição de CH₃COOH – 0 ou 1% v/v e força iônica 0 ou 0,5 mol L⁻¹) não foram significativas ($p > 0,05$) para todos os agrotóxicos estudados. Assim, optou-se por continuar com a mesa agitadora em 175 opm e não adicionar nem ácido e nem sal na técnica de extração.

Desta maneira, a técnica otimizada para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água consiste em adicionar 4 mL de acetonitrila em 4 mL de água. A mistura é agitada mecanicamente por 10 min à 175 opm e 25 °C e resfriada em freezer (-20 °C) por 2 h. A fase orgânica contendo os analitos de interesse é transferida para vial contendo padrão interno a 0,2 mg L⁻¹ e analisada por cromatografia gasosa. A técnica otimizada é simples e rápido para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água. Para avaliar o desempenho analítico do método LLE/LTP-GC/ECD proposto, este foi validado em termos de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e efeito de matriz.

3.3.2. Otimização da técnica microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME/LDS)

Entre os fatores que afetam o processo de extração DLLME, foram otimizados nesse estudo os solventes extrator e dispersor e os volumes dos mesmos, além de força iônica, pH e tempo de extração.

Para escolha do solvente extrator, três solventes de baixa densidade, n-hexano, 1-octanol e tolueno, foram avaliados neste trabalho. Os solventes orgânicos foram selecionados em virtude da menor toxicidade em relação aos solventes halogenados. Apresentam também baixa solubilidade em água para facilitar a separação de fases e também a obtenção de extrato orgânico praticamente isento de água, de maneira a dispensar a etapa adicional de secagem. Outros requisitos incluem a pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas de solvente durante o processo de extração. Vale destacar que a maioria dos solventes halogenados apesar de possuírem todas as características acima mencionadas, são detectados pelo detector por captura de elétrons gerando um pico com cauda. Na Tabela 16 estão listadas as propriedades dos solventes orgânicos testados na otimização da técnica (MERCK, 2014).

Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos utilizados na otimização de DLLME/LDS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água

Solvente	Massa molar / (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água / (g L ⁻¹ a 20 °C)	Ponto de fusão / °C	Ponto de ebulição / °C	Densidade / (g cm ⁻³ a 20 °C)	Pressão de vapor / mm Hg a 20 °C
Extratores						
n-Hexano	86,2	0,009	-94,3	69	0,66	120
1-Octanol	130,2	0,3	-16	195	0,83	0,026
Tolueno	92,1	0,5	-95	110,6	0,87	22
Solvente	Massa molar / (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água / (g L ⁻¹ a 20 °C)	Ponto de fusão / °C	Ponto de ebulição / °C	Densidade / (g cm ⁻³ a 20 °C)	Pressão de vapor / mm Hg a 20 °C
Dispersores						
Acetona	58,1	solúvel	-95,4	56,2	0,79	175
Acetonitrila	41,5	solúvel	-45,7	81,6	0,786	73
Metanol	32,0	solúvel	-98	64,5	0,792	96

Fonte: Merck, 2014. Atualizado em: 18.06.2014.

Para efeitos de comparação, verificou-se a necessidade de adicionar um volume maior de n-hexano para recuperar igual volume de diferentes solventes extratores na fase orgânica superior, 85 µL. O efeito dos solventes de extração na resposta dos agrotóxicos (área relativa dos picos) é apresentado na Figura 8.

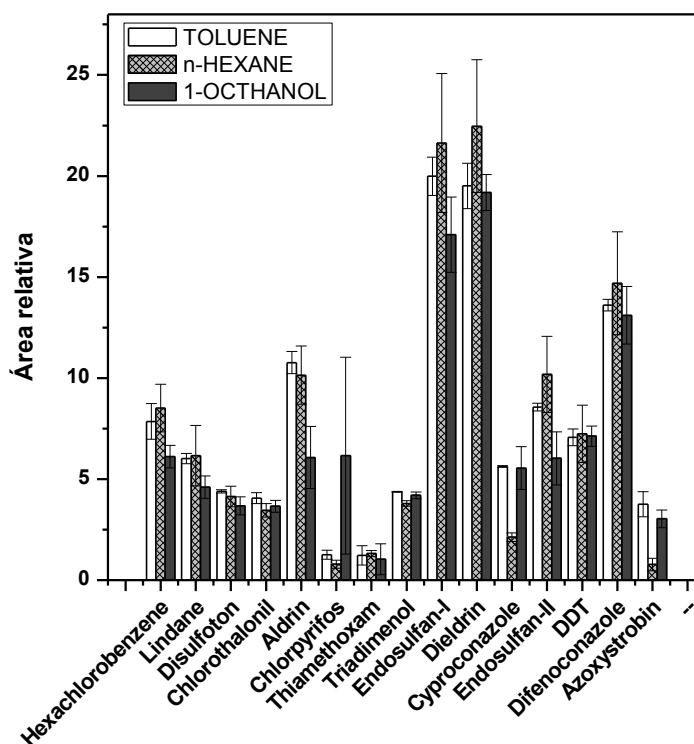


Figura 8. Efeito do solvente de extração na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μ L; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 μ g L⁻¹ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 μ g L⁻¹ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3.

Os resultados mostram que para a maioria dos agrotóxicos (n=9, 60%) não há diferença significativa entre os solventes extratores avaliados ao nível de 95% de confiança pela ANOVA. Para 20% dos agrotóxicos (triadimenol, ciproconazol e azoxistrobina) o n-hexano obteve as piores respostas cromatográficas. Respostas ruins foram obtidas também para 1-octanol para 20% dos compostos avaliados (hexaclorobenzeno, clorpirifós e endosulfam II). Desta maneira, tolueno foi selecionado como solvente de extração. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen et al. (2010) e Moreno-González et al. (2012) na determinação de carbamatos em amostras de água por variações da DLLME. O tolueno também foi o solvente de extração escolhido para determinação de 6 ésteres ftalatos em amostras de água por uma nova técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (LDS-VSLLME) (ZHANG; LEE, 2013).

O solvente dispersor deve ser miscível tanto na amostra aquosa quanto no solvente extrator e possuir a capacidade de diminuir a tensão interfacial do solvente de extração a fim de tornar o tamanho das gotas menores e aumentar a eficiência de

extração (CUNHA *et al.*, 2009). Três solventes orgânicos, acetona, acetonitrila e metanol foram testados como solventes dispersores na extração multirresíduo de agrotóxicos de amostras de água. Foram utilizados 500 μL de cada solvente dispersor e 100 μL de tolueno. A eficiência da extração foi avaliada pela comparação das áreas relativas dos picos cromatográficos (Figura 9).

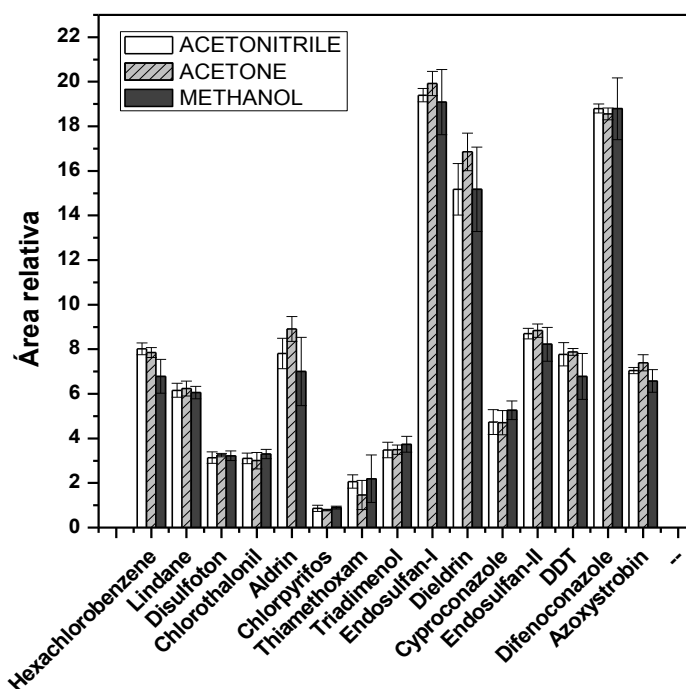


Figura 9. Efeito do solvente dispersor na análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator 100 μL ; volume de solvente dispersor: 500 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3.

De acordo com os resultados apresentados, semelhante eficiência de extração foi atingida pelos três solventes dispersores avaliados para a maioria dos agrotóxicos em estudo, ao nível de 95% de confiança pela ANOVA. O metanol apresentou uma eficiência de extração inferior à acetona e acetonitrila na análise de hexaclorobenzeno e foi também o solvente dispersor que apresentou os maiores desvios na resposta. Adicionalmente, acetona apresenta menor toxicidade e é mais barato que acetonitrila. Desta maneira, acetona foi selecionada como solvente dispersor. Resultados semelhantes foram obtidos por (BERIJANI *et al.*, 2006; REZAAE *et al.*, 2006; FATTAHI *et al.*, 2007a; CUNHA *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2009; GUO; LEE, 2011).

Os volumes dos solventes extrator e dispersor foram otimizados simultaneamente com o objetivo de aumentar o fator de enriquecimento e assim obter menores limites de detecção e quantificação. As condições experimentais foram fixadas e incluíram o uso de 600 μL da mistura de solventes extrator e dispersor, variando os volumes de ambos solventes. As Figuras 10 e 11 mostram as curvas dos volumes de solventes avaliados versus volume de fase orgânica superior recuperado e área relativa, respectivamente.

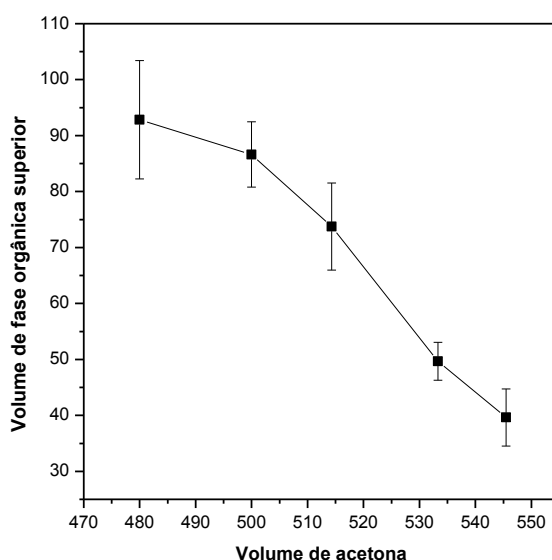


Figura 10. Efeito do volume de solventes dispersor (acetona) no volume de fase orgânica superior recuperado por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; $n \geq 4$.

De acordo com a Figura 10, o aumento do volume de solvente dispersor (acetona, de 480 a 545,5 μL) e a diminuição do volume de solvente extrator (tolueno, de 120 a 54,5 μL) favorecem a diminuição do volume de fase orgânica superior recuperado, de 93 para 40 μL .

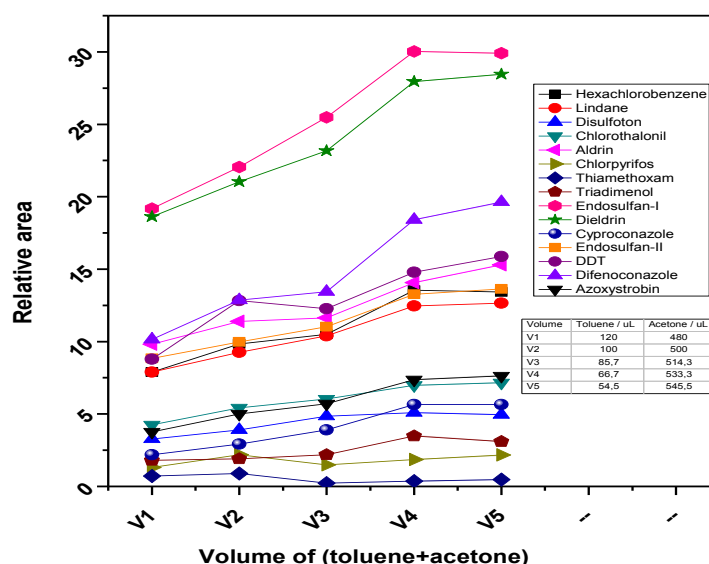


Figura 11. Efeito do volume dos solventes extrator (tolueno) e dispersor (acetona) na resposta cromatográfica dos agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μL ; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hexaclorobenzeno, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina; n=3.

De acordo com a Figura 11, o aumento do volume de solvente dispersor (acetona) com simultânea diminuição do volume de solvente extrator (tolueno) favorece um aumento na resposta para a maioria dos agrotóxicos avaliados até V4, entre V4 e V5, observa-se que alguns agrotóxicos continuam com suas respostas aumentando, enquanto outros têm sua resposta suavemente diminuída.

Em seguida, foi avaliado o efeito da variação dos volumes de solventes extrator e dispersor no fator de enriquecimento dos agrotóxicos (Figura 12).

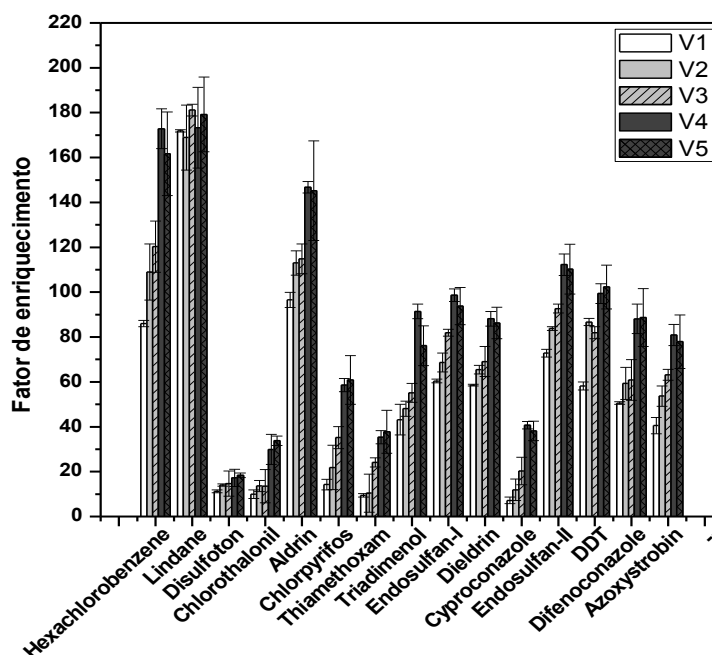


Figura 12. Efeito do volume dos solventes extrator (tolueno) e dispersor (acetona) no fator de enriquecimento dos agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume de solventes extrator e dispersor: 600 μ L; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min; concentração dos analitos: 2 μ g L⁻¹ de hexaclorobenzene, lindano, clorotalonil, aldrin, clorpirifós, dieldrin e DDT e 10 μ g L⁻¹ de Disulfotom, tiametoxam, triadimenol, endosulfam-I, endosulfam-II, ciproconazole, difenoconazole e azoxistrobina; n=3.

Pode-se perceber que à medida em que se aumenta o volume de acetona e diminui o volume de tolueno, aumenta-se o fator de enriquecimento dos agrotóxicos. Pode-se perceber que tanto o aumento do solvente dispersor quanto a diminuição do solvente extrator favorecem a diminuição no volume de fase orgânica superior recuperado e conseqüentemente favorecem o aumento do fator de enriquecimento até V4. Com exceção do triadimenol, cuja melhor resposta foi 533 μ L de acetona e 67 μ L de tolueno (V4), não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança pela ANOVA entre os fatores de enriquecimento dos agrotóxicos entre V4 e V5. Vale destacar que volume muito pequeno de solvente extrator resultam em dificuldade de coletar a fase orgânica superior. Desta maneira, V4 foi escolhido como volume ótimo, ou seja, 67 μ L de tolueno e 533 μ L de acetona os volumes de solvente extrator e dispersor, respectivamente. Vale destacar que recuperação dos agrotóxicos utilizando esses volumes variou de 63 a 115%.

A última etapa da otimização da técnica foi realizada por uma abordagem multivariada utilizando um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central (n=3). As variáveis investigadas foram força iônica com adição de NaCl à amostra (0

e 2% m/v NaCl), pH da amostra (4,3 e 8,7) e tempo de extração (0 e 30 s). Neste tipo de planejamento, as variáveis são definidas em dois níveis, mínimo e máximo, normalizados como (-1) e (+1). O planejamento experimental e os resultados são apresentados na Tabela 17. A área relativa total foi a resposta experimental estudada e os resultados são apresentados na Figura 13. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor. Os resultados foram usados para gerar o gráfico de Pareto dos efeitos e interações (Figura 14).

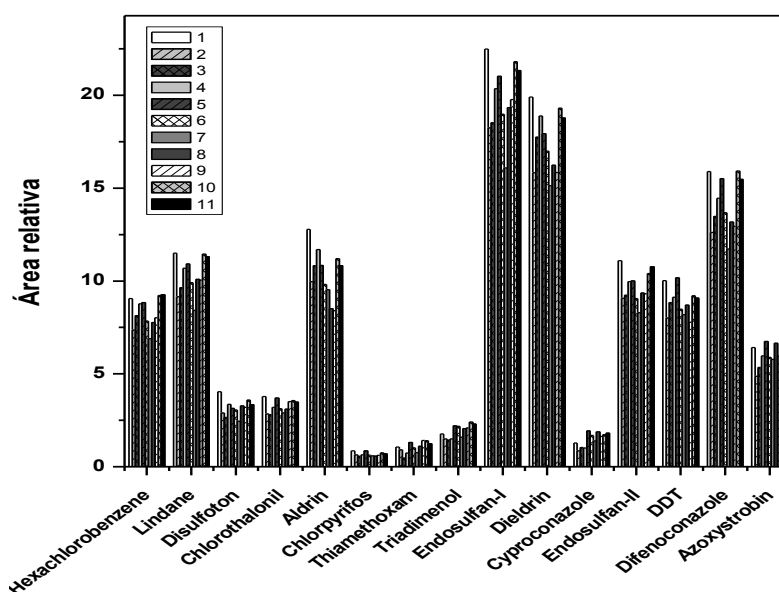


Figura 13. Áreas relativas dos agrotóxicos obtidas no planejamento fatorial 2^3 para otimização de DLLME/LDS em amostras de água.

Tabela 17. Resultados do planejamento fatorial 2^3 completo para otimização DLLME/LDS

Ensaio	Fatores decodificados			Área relativa total
	Adição de NaCl / %NaCl (m/v)	pH	Tempo de extração / s	
1	0	4,2	0	133
2	2	4,2	0	106
3	0	8,7	0	112
4	2	8,7	0	121
5	0	4,2	30	126
6	2	4,2	30	113
7	0	8,7	30	101
8	2	8,7	30	113
9C	1	6,5	15	111
10C	1	6,5	15	130
11C	1	6,5	15	128

C= Ponto central.

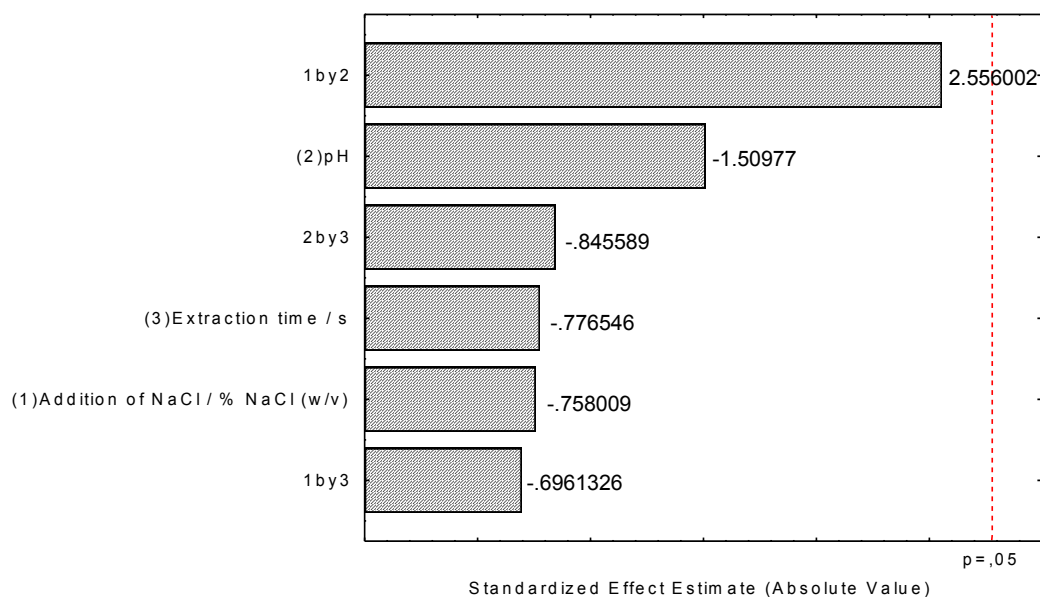


Figura 14. Gráficos de Pareto com os efeitos dos fatores adição de NaCl, pH e tempo de extração na resposta relativa dos agrotóxicos para otimização da DLLME/LDS.

A obtenção de $p \leq 0,05$ implica que os efeitos dos fatores estudados apresentam influência significativa nos resultados. Assim sendo, avaliando os resultados do planejamento fatorial, as variáveis investigadas (adição de NaCl, pH da amostra e tempo de extração) não foram significativas ($p > 0,05$) para os agrotóxicos estudados.

Acreditava-se que a adição de sal poderia aumentar o rendimento da extração em DLLME, principalmente para analitos de baixa solubilidade em função do efeito “salting out”. Contudo, não o foi. Resultados semelhantes a este trabalho, mostrando que a adição de sal não tem efeito na eficiência de extração de DLLME foram obtidos por vários pesquisadores (BERIJANI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho optou-se por não adicionar NaCl nos experimentos posteriores.

O valor do pH da amostra determina as formas existentes dos analitos (íons ou moléculas neutras) por causa da equilíbrio de dissociação o qual pode afetar a eficiência de extração. Entretanto, assim como neste trabalho, Chen *et al.* (2010) mostra que a eficiência de extração não apresentou efeito notável pela variação do pH da amostra. Tendo em conta que o pH da água ultrapura utilizada nos experimentos apresentou valores próximo de 6,4 e que a maioria das amostras de água superficial coletadas na microbacia do rio Manhuaçu apresentaram valores entre 6,4 e 7,0 optou-se por não efetuar qualquer ajuste do pH das amostras de

água. Desta maneira também, mostra-se a aplicabilidade da técnica para amostras de água residuária, cujos valores de pH das mesmas foram inferiores a 6,4, não necessitando de ajuste de pH para a extração multirresíduo de agrotóxicos nas mesmas.

Em DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura de solventes dispersor (acetona) e extrator (tolueno) na amostra aquosa e o início da centrifugação. Vários trabalhos mostram que o tempo de extração não tem nenhum efeito significativo na eficiência de extração (FATTAHI *et al.*, 2007a; CUNHA *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2009; GUO; LEE, 2011). Isto porque a área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa é infinitamente grande. Assim, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica extratora é rápida. O estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, como resultado, o tempo de extração é muito curto. Assim como esperado, este trabalho não verificou nenhum efeito significativo nas áreas dos picos dos analitos. Desta maneira, 30 s de agitação em vórtex foi definido como tempo de extração.

Com base nas discussões acima, as condições de extração mais adequadas para análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de água por DLLME/LDS são as seguintes: em 5 mL de amostra de água superficial foram adicionados 67 µL de tolueno como solvente de extração com 533 µL de acetona como solvente dispersor. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 30 s (tempo de extração) e centrifugada a 3500 rpm por 5 min. A fase orgânica superior (45 µL) foi recolhida e analisada por GC/ECD. Todos os experimentos seguintes foram realizados sob estas condições otimizadas.

3.3.3. Parâmetros analíticos do método

Para avaliar a seletividade, amostras de água superficial coletadas na microbacia do Rio Manhuaçu foram submetidas às técnicas otimizadas (LLE/LTP e DLLME/LDS). Posteriormente essas amostras foram fortificadas com os 15 princípios ativos estudados e submetidos novamente aos métodos de extração e análise. As Figuras 15 e 16 apresentam os cromatogramas de extratos de água (A) sem fortificação e (B) fortificada, submetidas LLE/LTP e DLLME/LDS, respectivamente.

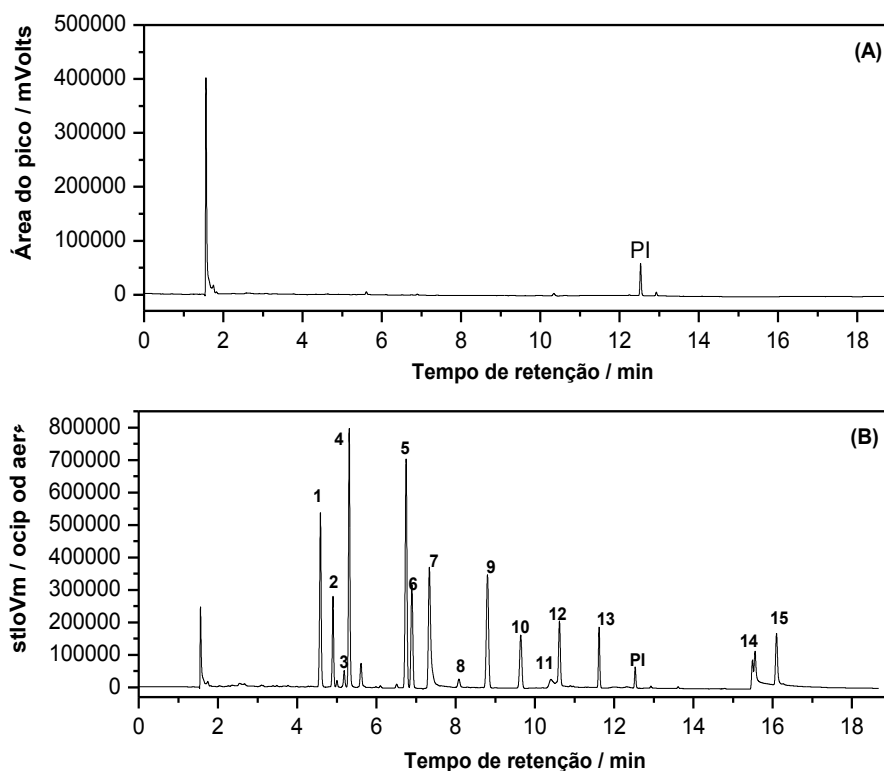


Figura 15. Cromatogramas de extratos de amostra de água superficial (Ponto 1) submetidas à LLE/LTP (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (3) Disulfotom ($900 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (8) Triadimenol ($900 \mu\text{g L}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($160 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); (PI) Bifentrina (PI; $200 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Difenconazol ($800 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($320 \mu\text{g L}^{-1}$).

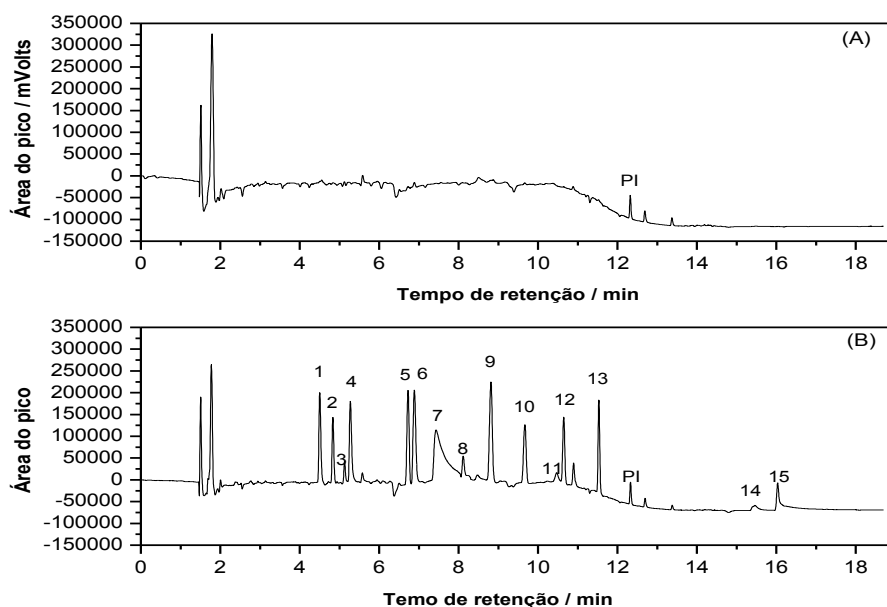


Figura 16. Cromatogramas de extratos de amostra de água superficial (Ponto 1) submetidas à DLLME/LDS (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (2) Lindano ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$);

(3) Disulfotom ($7,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (5) Aldrin ($4 \mu\text{g L}^{-1}$); (6) Clorpirifós (19mg L^{-1}); (7) Tiametoxam (94mg L^{-1}); (8) Triadimenol (62mg L^{-1}); (9) Endosulfam I ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); (10) Dieldrin ($1 \mu\text{g L}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); (13) DDT ($4 \mu\text{g L}^{-1}$); (PI) Bifentrina (PI; $3 \mu\text{g L}^{-1}$); (14) Difenconazol ($7,5 \mu\text{g L}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($25 \mu\text{g L}^{-1}$).

Comparando os dois cromatogramas (A e B) 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. Tais resultados comprovam a boa seletividade dos métodos propostos.

A avaliação da linearidade foi estudada pela análise de amostras de água fortificadas em diferentes concentrações e submetidas aos dois diferentes métodos de extração. Para LLE/LTP as amostras foram fortificadas em vários níveis de concentração correspondentes ao LOQ; 1,5 LOQ; 2 LOQ; 2,5 LOQ; 3 LOQ; 5 LOQ; 7,5 LOQ; 10 LOQ; 12,5 LOQ; 15 LOQ; 17,5 LOQ; 20 LOQ. Ciproconazol e tiametoxam foram estudados numa faixa menor, até 3 LOQ, tendo em vista a saturação do detector. Disulfotom foi estudado até 10 LOQ. Para DLLME/LDS as amostras foram fortificadas em concentrações correspondentes a LOQ; 2,5 LOQ; 5 LOQ; 7,5 LOQ; 10 LOQ; 25 LOQ; 50 LOQ; 75 LOQ, 100 LOQ (hexaclorobenzeno, aldrin, triadimenol, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina), 150 LOQ (disulfotom, clorotalonil, clorpirifós, tiametoxam, endosulfam I e II, dieldrin e DDT) e 250 LOQ (lindano).

O método usado para quantificar as substâncias de interesse foi a padronização interna. As curvas analíticas foram plotadas relacionando área relativa do analito (área do analito/área do padrão interno) versus concentração do analito. Os parâmetros das curvas analíticas, as faixas lineares e os coeficientes de correlação (r) obtidos na validação das técnicas LLE/LTP-GC/ECD e DLLME/LDS-GC/ECD são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Comparação dos parâmetros das equações de regressão da linearidade de dois métodos de extração multirresíduos de agrotóxicos em amostras de água

Agrotóxicos	LLE/LTP				DLLME/LDS			
	a	b	r	Faixa linear/ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	a	b	r	Faixa linear/ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Hexaclorobenzeno	52,1	0,7	0,998	12 – 240	2,6	1,5	0,997	0,1 – 10
Lindano	49,4	0,7	0,998	12 – 240	2,4	0,6	0,997	0,03 - 7,5
Disulfotom	2,5	0,02	0,999	17 – 348	0,1	0,3	0,997	0,3 - 37,5
Clorotalonil	398,2	2	0,999	3,5 – 72	2,6	0,9	0,999	0,1 - 12,5

(Continuação na próxima página)

Tabela 18. (Continuação)

Agrotóxicos	LLE/LTP				DLLME/LDS			
	a	b	r	Faixa linear/ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	a	b	r	Faixa linear/ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aldrin	60,8	0,03	0,999	2 – 46	2,1	0,8	0,995	0,1 - 15
Clorpirifós	16,7	1	0,996	32 – 640	0,3	2,5	0,998	0,7 - 94
Tiametoxam	5,7	-0,7	0,998	300 – 900	0,003	0,1	0,995	4 – 469
Triadimenol	1,3	0,08	0,998	80 – 800	0,04	0,5	0,998	2,5 – 250
Endosulfam-I	33,5	0,4	0,999	10,5 – 210	0,8	2	0,995	0,4 – 50
Dieldrin	65,2	0,2	0,999	3,5 – 72	3,2	1,5	0,995	0,05 – 6
Ciproconazol	0,88	0,004	0,996	280 – 840	0,05	0,3	0,995	0,5 – 50
Endosulfam-II	16,4	0,04	0,998	10,5 – 210	0,3	1	0,995	0,4 – 50
DDT	41,8	0,1	0,999	4 – 84	1,4	0,6	0,998	0,1 – 19
Difenoconazol	4,3	0,04	0,999	32 – 640	0,1	0,2	0,998	0,3 – 30
Azoxistrobina	4,2	0,06	0,997	15 - 300	0,1	0,3	0,995	1 – 100

a= Inclinação; b= Intercepto; r= Coeficiente de correlação.

Os dados da Tabela 18 permitem observar que em termos de r, a linearidade dos dois métodos (LLE/LTP e DLLME/LDS) não diferem entre si. O parâmetro r permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação superior a 0,99 (ANVISA, 2003). Os resultados obtidos estão de acordo com esse requisito, uma vez que para os 15 analitos os valores de r variaram de 0,996 a 0,999 para LLE/LTP, e de 0,995 a 0,999 para DLLME/LDS. Desta maneira, tanto LLE/LTP e DLLME/LDS são lineares na faixa avaliada. Pode-se verificar também que a técnica DLLME/LDS por concentrar a amostra permite a análise de resíduos de agrotóxicos em concentrações bem inferiores à LLE/LTP.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método sinal/ruído. Os resultados obtidos para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água por LLE/LTP e DLLME/LDS são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de água

Agrotóxicos	LLE/LTP		DLLME/LDS		LMR	
	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MS, 2011	WHO, 2011
Hexaclorobenzeno	3,5	12	0,02	0,1	-	-
Lindano	3,5	12	0,01	0,03	2	2
Disulfotom	5	17	0,1	0,3	-	-

(Continuação na próxima página)

Tabela 19. (Continuação)

Agrotóxicos	LLE/LTP		DLLME/LDS		LMR	
	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MS, 2011	WHO, 2011
Clorotalonil	1	3,5	0,02	0,1	-	-
Aldrin	0,7	2	0,02	0,1	0,03 ^(a)	0,03 ^(a)
Clorpirifós	10	32	0,1	0,7	30 ^(b)	30
Tiametoxam	91	300	2	4	-	-
Triadimenol	24	80	0,5	2,5	-	-
Endosulfam-I	3	10,5	0,07	0,4	20 ^(c)	-
Dieldrin	1	3,5	0,007	0,05	-	-
Ciproconazol	85	280	0,1	0,5	-	-
Endosulfam-II	4	14	0,02	0,2	-	-
DDT	1	4	0,01	0,1	1	-
Difenoconazol	10	32	0,07	0,3	-	-
Azoxistrobina	4,5	15	0,1	1	-	-

LMR= Limite máximo de resíduo; LOD= Limite de detecção; LOQ= Limite de quantificação; MS= Ministério da saúde; WHO= World Health Organization. ^(a)Soma da aldrin + dieldrin; ^(b)Soma de clorpirifós + clorpirifós-oxon; ^(c)Soma de Endosulfam I, II e sais.

Os valores de LOD e LOQ dos métodos variaram de 0,7 à 91 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2 à 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LLE/LTP e de 0,007 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,05 a 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DLLME/LDS, respectivamente. Como esperado, DLLME/LDS apresentou menores valores de LOD e LOQ que LLE/LTP, tendo em vista o alto fator de enriquecimento do primeiro.

Considerando os valores dos LMR estabelecidos pela legislação brasileira (Ministério da Saúde, MS) (BRASIL, 2011) e internacional (World Health Organization, WHO) (WHO, 2011) pode-se perceber que apenas DLLME/LDS atende aos requisitos necessários, mostrando-se eficiente para extração e análise de traço de resíduo de agrotóxicos em amostras de água. O método LLE/LTP e GC/ECD não é adequado para análise traço de alguns dos agrotóxicos estudados, os quais são contemplados pela legislação. Sugere-se para trabalhos futuros que seja avaliado a inclusão de uma etapa adicional de concentração dos extratos em LLE/LTP, e assim, aumentar a sensibilidade do mesmo.

Para avaliar a exatidão, testes de recuperação foram realizados pela fortificação de amostras de água superficial (Ponto 1) com soluções padrão contendo os 15 agrotóxicos em três níveis de concentração, com seis replicatas para cada nível. As amostras de água fortificadas em concentrações equivalentes a 1, 2 e 10 LOQ para LLE/LTP e 1, 2,5 e 3,3 LOQ para DLLMS foram submetidas às técnicas de extração otimizadas. As quantificações foram realizadas pelo método de

padronização interna utilizando as respectivas curvas analíticas em solvente. Para LLE/LTP foi utilizada uma curva em acetonitrila contendo os agrotóxicos na mesma faixa de concentração que a curva superposição de matriz utilizada para estudo da linearidade do método, como descrito anteriormente. A curva analítica utilizada para quantificação das amostras fortificadas submetidas ao método DLLME/LDS foi a curva analítica em tolueno. Na Tabela 20 são comparados os dados de exatidão obtidos.

Tabela 20. Comparação das recuperações de agrotóxicos em amostras de água fortificadas e extraídas por LLE/LTP e DLLME/LDS

	Agrotóxicos	NF 1 / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (n=6) / %	NF 2 / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (n=6) / %	NF 3 / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (n=6) / %
LLE/LTP	Hexaclorobenzeno	12	91	24	100	120	96
	Lindano	12	76	24	88	120	92
	Disulfotom	17	90	35	95	174	95
	Clorotalonil	3,5	71	7	79	36	88
	Aldrin	2	112	4,5	100	22,5	108
	Clorpirifós	32	71	64	89	320	93
	Tiametoxam	300	88	600	70	3000	nr
	Triadimenol	80	95	160	94	800	94
	Endosulfam-I	10,5	75	21	87	105	93
	Dieldrin	3,5	95	7	94	36	96
	Ciproconazol	280	94	560	81	2800	nr
	Endosulfam-II	14	97	28	75	140	91
	DDT	4	75	8	84	42	93
	Difenoconazol	32	87	64	87	320	90
	Azoxistrobina	15	65	30	74	150	95
DLLME/LDS	Hexaclorobenzeno	0,1	109	0,2	96	0,3	89
	Lindano	0,06	99	0,1	88	0,2	70
	Disulfotom	0,3	113	0,7	99	1	114
	Clorotalonil	0,1	81	0,2	75	0,3	81
	Aldrin	0,1	75	0,4	66	0,5	63
	Clorpirifós	0,7	88	2	87	2,5	79
	Tiametoxam	4	68	9	66	12,5	64
	Triadimenol	2,5	115	6	114	8	96
	Endosulfam-I	0,4	78	1	79	1	75
	Dieldrin	0,05	72	0,1	95	0,2	95
	Ciproconazol	0,5	65	1	66	2	68
	Endosulfam-II	0,4	79	1	73	1	78
	DDT	0,1	100	0,4	81	0,5	71
	Difenoconazol	0,3	101	0,7	100	1	79
	Azoxistrobina	1	94	2,5	95	3	92

NF= Nível de fortificação; R= Recuperação; nr= não realizado.

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que no primeiro nível de fortificação (LOQ) as recuperações dos 15 agrotóxicos avaliados variaram de 65 a 112 para LLE/LTP e de 65 a 115 para DLLME/LDS. No segundo nível de fortificação, foram obtidos valores de recuperação entre 70 e 100 para LLE/LTP e entre 66 e 114 para DLLME/LDS. No terceiro nível foram obtidos valores entre 88 e 108 para LLE/LTP e entre 63 e 114 para DLLME/LDS. Desta maneira verifica-se que as recuperações de ambos os métodos são semelhantes e foram obtidas boas recuperações para a maioria dos agrotóxicos, com valores entre 70 e 120%, conforme recomendado (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). As recuperações mais baixas por DLLME/LDS foram encontradas para aldrin (em 2 níveis avaliados), tiametoxam e ciproconazol (nos três níveis de fortificação) com valores entre 63 e 68%. Por LLE/LTP, a menor recuperação foi verificada para azoxistrobina no menor nível de concentração (65%). Considerando os baixos níveis de fortificação, pode-se considerar aceitáveis as recuperações obtidas por ambos métodos.

As recuperações obtidas por LLE/LTP para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água nesse estudo são semelhantes às relatadas na literatura, 73-117% (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2012). Resultados semelhantes também foram encontrados para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de água por DLLME (BERIJANI *et al.*, 2006; XIONG; HU, 2008; ALBASEER *et al.*, 2012).

A precisão do método em termos de repetitividade foi avaliada usando desvio padrão relativo (RSD) de replicatas (n=6) obtidas em três níveis de fortificação. Para determinação da repetitividade foi realizada a fortificação de amostras de água destilada com quantidades adequadas da solução padrão contendo os 15 agrotóxicos nos três níveis de concentração avaliados (1, 2 e 10 LOQ para LLE/LTP e 1, 2,5 LOQ e 3,3 LOQ para DLLME/LDS). As amostras fortificadas foram submetidas às técnicas LLE/LTP e DLLME/LDS e analisadas por GC/ECD. As quantificações foram realizadas pelo método de padronização interna usando a curva no solvente adequada, como descrito acima. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Desvio padrão relativo (n=6) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água com os métodos LLE/LTP e DLLME/LDS empregando GC/ECD

Agrotóxicos	LLE/LTP			DLLME/LDS		
	1LOQ	2LOQ	10LOQ	1LOQ	2LOQ	3,33LOQ
	RSD (n=6) / %					
Hexaclorobenzeno	3	8	3	15	12	8
Lindano	3	5	4	10	8	6
Disulfotom	7	9	4	13	11	9
Clorotalonil	2	5	4	16	9	4
Aldrin	7	6	3	9	11	6
Clorpirifós	2	5	2	15	15	6
Tiametoxam	14	5	nr	15	13	4
Triadimenol	5	7	4	15	4	9
Endosulfam-I	4	7	2	17	12	15
Dieldrin	5	5	2	15	14	7
Ciproconazol	3	6	nr	15	14	11
Endosulfam-II	8	6	2	12	10	12
DDT	2	5	2	8	11	4
Difenoconazol	10	8	6	12	18	5
Azoxistrobina	11	12	10	10	5	6

NF= Nível de fortificação; RSD= Desvio padrão relativo; nr= não realizado.

Pelos resultados apresentados, pode-se verificar a boa repetitividade de ambos os métodos, uma vez que, RSD foi inferior a 20% para todos os agrotóxicos estudados e nos três níveis de fortificação avaliados, conforme recomendação para validação de métodos cromatográficos (RIBANI *et al.*, 2004). Os valores dos RSD obtidos variaram de 2 a 14% para método LLE/LTP e de 8 a 17% para DLLME/LDS no menor nível de concentração avaliado (LOQ). Para o nível médio de concentração (2 LOQ), estes variaram de 5 a 12% em LLE/LTP e de 5 a 18% para DLLME/LDS. Para o nível mais alto (10 LOQ e 3,3 LOQ, respectivamente) variaram de 2 a 10% e de 4 a 15% para LLE/LTP e DLLME/LDS, respectivamente. Para os três níveis de concentração avaliados, pode-se perceber que LLE/LTP apresentou menores RSD em relação à DLLME/LDS.

A precisão intermediária foi realizada e analisada da mesma maneira que a repetitividade, porém os ensaios foram realizados em três dias não consecutivos, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. A Tabela 22 apresenta os resultados de RSD obtidos para os níveis de fortificação avaliados nos três dias cujos ensaios foram realizados.

Tabela 22. Comparação da precisão intermediária (n=18) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água com o método LLE/LTP e DLLME/LDS empregando GC/ECD

Agrotóxicos	LLE/LTP			DLLME/LDS		
	1LOQ	2LOQ	10LOQ	1LOQ	2LOQ	3,33LOQ
	RSD (n=18) / %					
Hexaclorobenzeno	5	9	3	14	11	10
Lindano	5	8	3	11	11	6
Disulfotom	11	11	3	14	13	12
Clorotalonil	4	7	3	11	13	9
Aldrin	10	10	4	12	13	9
Clorpirifós	5	7	2	13	15	10
Tiametoxam	13	8	NA	17	17	14
Triadimenol	7	11	4	14	17	15
Endosulfam-I	5	10	3	14	12	12
Dieldrin	6	7	3	11	12	17
Ciproconazol	5	4	NA	18	19	16
Endosulfam-II	8	9	3	12	10	9
DDT	7	6	3	14	15	11
Difenoconazol	13	9	5	17	17	16
Azoxistrobina	12	10	10	13	12	11

NF= Nível de fortificação; RSD= Desvio padrão relativo; NA= Não avaliado.

Foram obtidos resultados aceitáveis para ambos os métodos nos testes de precisão intermediária, nos quais os valores de RSD variaram de 3 a 13% para LLE/LTP e de 6 a 19% para DLLME/LDS. Como nos resultados de repetitividade, LLE/LTP apresentou valores de RSD inferiores para todos os agrotóxicos. Isto provavelmente se deve ao fato de que DLLME/LDS trabalha com quantidades muito pequenas de solventes dispersor (533 μL) e principalmente extrator (67 μL), favorecendo maiores erros. De acordo com os guias de validação de resíduos de agrotóxicos, o desvio padrão relativo não deve exceder 20% (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). Os resultados assim revelam boa precisão dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS tanto em termos de repetitividade como de precisão intermediária.

Para o desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração mesmo para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma longa faixa de concentração do analito. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro (solução padrão) e a outra em extratos de amostra de água (obtidos após submeter as amostras às técnicas de extração). O efeito de matriz foi avaliado pela relação entre as inclinações (a, inclinação) das

curvas analíticas obtidas no extrato da matriz (livre de agrotóxicos) e na solução padrão, solvente, o qual foi multiplicado por 100 para obter a porcentagem de enriquecimento ou supressão (CUNHA; FERNANDES, 2011). Um valor perto de 100% indica que não há efeito de matriz significativo, enquanto que valores maiores ou menores que 100% indicam enriquecimento ou supressão do sinal, respectivamente. Os resultados obtidos para os métodos LLE/LTP e DLLME/LDS são apresentados na Tabela 23. Em seguida, todos os analitos foram classificados em cinco grupos (< -50%; -50% a -20%; \pm 20%; 20% a 50% e >50%) de acordo com o aumento ou diminuição da resposta cromatográfica. Para isso, realizou-se a subtração da resposta obtida no cálculo do efeito de matriz por 100 (resposta esperada). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17.

Tabela 23. Comparação do efeito de matriz obtido após a etapa de preparo de amostras

Agrotóxicos	Efeito de matriz / %	
	LLE/LTP	DLLME/LDS
Hexaclorobenzeno	-10	-7
Lindano	-4	-19
Disulfotom	-8	11
Clorotalonil	-10	-14
Aldrin	-7	-23
Clorpirifós	-9	-11
Tiametoxam	-43	-80
Triadimenol	21	-2
Endosulfam-I	-7	-97
Dieldrin	-3	-15
Ciproconazol	-27	8
Endosulfam-II	-8	-7
DDT	-10	-57
Difenoconazol	-1	39
Azoxistrobina	-54	-18

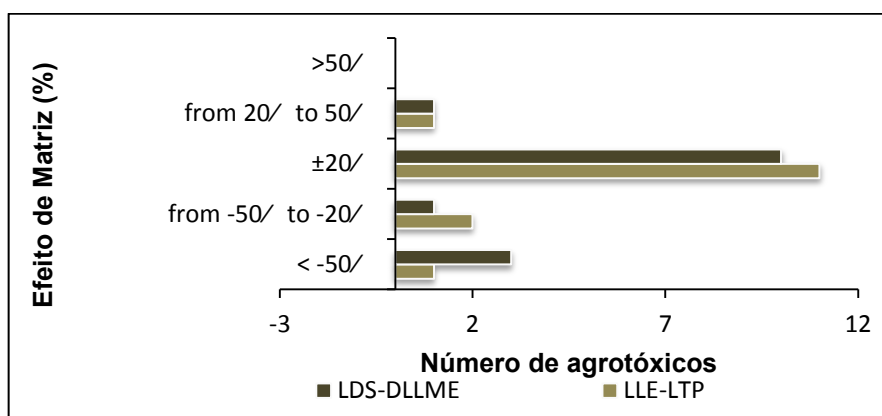


Figura 17. Distribuição dos 15 agrotóxicos de acordo com o efeito de matriz dos métodos LLE/LTP e DLLME/LDS em amostras de água.

Como pode ser observado na Tabela 23, o efeito de matriz obtido para LLE/LTP foi entre 45 e 121% e para DLLME/LDS foi de 3 a 139%. De posse desses resultados, pode-se perceber que ambos os métodos apresentam um efeito de matriz mínimo para a maioria dos agrotóxicos e de maneira geral, o efeito de matriz de LLE/LTP é mais suave que o efeito de matriz de DLLME/LDS. Isto se justifica pelo fato de que LLE/LTP é uma técnica de extração e *clean up* de amostras.

Para ambos os métodos, a maioria dos agrotóxicos (73% para LLE/LTP e 67% para DLLME/LDS) sofre um efeito de matriz suave com ligeira supressão (maioria) ou enriquecimento da resposta cromatográfica. Enriquecimento médio (20 a 50%) foi encontrado para 7% dos agrotóxicos avaliados em ambos os métodos, triadimenol por LLE/LTP e difenoconazol por DLLME/LDS. Alto enriquecimento (>50%) não foi verificado pelos métodos avaliados. Supressão média (-20 a -50%) foi verificada para 13% dos agrotóxicos (tiametoxam e ciproconazol) extraídos por LLE/LTP e por 7% dos agrotóxicos (aldrin) por DLLME/LDS. Alta supressão no sinal cromatográfico foi observada para 7% dos agrotóxicos extraídos por LLE/LTP (azoxistrobina, 54,55% de supressão) e por 20% dos agrotóxicos extraídos por DLLME/LDS (tiametoxam: 80%, endosulfam-I: 97% e DDT: 57% de supressão).

O efeito de matriz na extração de agrotóxicos por LLE/LTP e SLE/LTP também foi verificado por Souza et al. (2012) para análise de 11 agrotóxicos em 7 matrizes diferentes. Segundo esses autores, a matriz água apresentou pequeno efeito de matriz, sendo este, predominantemente negativo (SOUSA et al., 2012). Baixo efeito de matriz na extração de agrotóxicos organofosforado de amostras de água por NHS-DLLME foi verificado por Alves et al. (2012). Matrizes mais complexas

tendem a afetar ainda mais a resposta cromatográfica. A matriz tomate afetou fortemente o sinal analítico ocasionando um efeito de matriz positivo para determinação de resíduos de agrotóxicos por SLE/LTP (PINHO *et al.*, 2012) e por QuEChERS-DLLME (MELO *et al.*, 2012). A matriz milho também afetou fortemente o sinal analítico na determinação de 41 resíduos de agrotóxicos por QuEChERS-DLLME, proporcionando um efeito de matriz positivo (CUNHA; FERNANDES, 2011).

O efeito de matriz, em termos gerais, afeta a exatidão e precisão dos resultados das análises de traços de agrotóxicos por cromatografia gasosa, principalmente quando se utilizam soluções padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro para quantificação dos mesmos (PINHO *et al.*, 2009). De acordo com o relatado, azoxistrobina foi o agrotóxico que apresentou pior eficiência de extração (%R) e também o único que apresentou forte supressão de sinal nas análises de amostras de água por LLE/LTP. O tiametoxam em amostras de água extraídas por DLLME/LDS também apresentou baixa eficiência de extração e significativo efeito de matriz negativo (forte supressão do sinal).

Muitos compostos podem ser extraídos junto com os agrotóxicos da matriz, introduzindo interferências. Para minimizar esta influência, na quantificação dos agrotóxicos, o melhor procedimento é a utilização de curvas analíticas preparadas no extrato da matriz branca (PINHO *et al.*, 2009). Alguns trabalhos relataram a utilização da curva preparada com a matriz fortificada (curva superposição de matriz ou curva matrix-matched) para minimizar o efeito de matriz (CUNHA; FERNANDES, 2011; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013).

Assim, tendo em vista o efeito de matriz encontrado para ambos os métodos, verifica-se a necessidade de uso da curva superposição de matriz para a quantificação dos agrotóxicos em amostras de água superficial e assim, corrigir efeitos de matriz provocados pelos co-extrativos da matriz.

O fator de enriquecimento foi determinado para o método DLLME/LDS. A técnica otimizada foi empregada na extração e análise de 18 amostras de água destilada contendo os 15 agrotóxicos nas mesmas condições em que foi avaliada a precisão intermediária para DLLME/LDS. O fator de enriquecimento para os agrotóxicos submetidos ao DLLME/LDS foi avaliado em um nível de fortificação (NF= 2 LOQ) para seis replicatas durante 3 dias não consecutivos. As quantificações foram realizadas utilizando a curva analítica preparada em tolueno, cujos parâmetros foram apresentados anteriormente. Os valores médios de EF, bem como os desvios

padrão (DP) e desvios padrão relativos (RSD) obtidos são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Fatores de enriquecimento (EF) obtidos para 15 agrotóxicos em amostras de água submetidas à técnica DLLME/LDS e GC/ECD

Agrotóxicos	NF / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EF (n=18) / %	DP	RSD / %
Hexaclorobenzeno	0,2	99	7	7
Lindano	0,1	92	9	10
Disulfotom	0,7	89	28	20
Clorotalonil	0,2	74	5	12
Aldrin	0,4	65	7	11
Clorpirifós	2	91	13	15
Tiametoxam	9	44	16	17
Triadimenol	6	78	18	11
Endosulfam-I	1	37	2	18
Dieldrin	0,1	104	16	15
Ciproconazol	1	59	16	12
Endosulfam-II	1	40	0,7	7
DDT	0,4	84	9	11
Difenoconazol	0,7	110	28	15
Azoxistrobina	2,5	102	63	11

NF= Nível de fortificação; EF= fator de enriquecimento; DP= desvio padrão; RSD= desvio padrão relativo.

Pela análise dos dados da Tabela 24 acima, verifica-se que o fator de enriquecimento de DLLME/LDS variou de 37 a 110% para os 15 agrotóxicos avaliados. Estes resultados estão coerentes com a literatura (FARAJZADEH *et al.*, 2009; ALBASEER *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2012) e apresentaram simultaneamente boa precisão, com RSD < 20%.

Comparando as duas técnicas de extração, vale destacar que LLE/LTP é simples, fácil e rápida para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água. Porém, a mesma não é conveniente para determinação de agrotóxicos em quantidade de traço, uma vez que os limites de detecção de alguns agrotóxicos (contemplados pela legislação) estão acima da concentração limite estipulada pela legislação. Mesmo não apresentando baixos limites de detecção e quantificação, LLE/LTP apresenta boa precisão e exatidão, além de ser uma técnica com suave efeito de matriz e que realiza extração e *clean up* da amostra numa mesma etapa. Em contrapartida, DLLME/LDS pode ser empregada para determinação simultânea de diferentes classes de agrotóxicos (organoclorados, organofosforados,

ciclodienos, estrubilurina, cloronitrila, neonicotinoide e triazóis) em matrizes aquosas. A técnica é simples, linear, exato, preciso, utiliza pouca quantidade de solvente orgânico e apresenta bom fator de enriquecimento de maneira a permitir a utilização desta para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água superficial e residuária coletadas na microbacia do rio Manhuaçu.

3.3.4. Análise de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais

Amostras de água de rio (n=32), coletadas nos rios Manhuaçu, São Luiz e córrego Manhuaçuzinho, e amostras de água residuária da lavagem/despolpa do fruto do café (n=4) foram analisadas por DLLME/LDS combinado com GC/ECD. As amostras foram coletadas próximas a áreas agrícolas sob cultivo de café no período de março de 2012 a março de 2013. Para quantificação das amostras foi utilizado a curva superposição de matriz (matrix-matched calibration curve) cujos parâmetros analíticos foram apresentados na Tabela 18. As amostras foram preparadas em triplicatas. A Figura 18 apresenta os cromatogramas obtidos pela injeção no GC/ECD de extratos de amostras de águas superficial coletadas em março de 2013. Os cromatogramas das amostras de água residuária são apresentados na Figura 19.

Não foram detectados nas amostras analisadas nenhum dos agrotóxicos estudados. Por se tratar de um rio de grande vazão, pode-se inferir que há um efeito de diluição que possivelmente contribuiu para que nenhum agrotóxico fosse encontrado. Para as amostras de água residuária, sugere-se que as mesmas sejam coletadas no período de colheita e processamento dos frutos de café, de maio a julho, para melhor avaliação quanto à possibilidade de presença de resíduos de agrotóxicos.

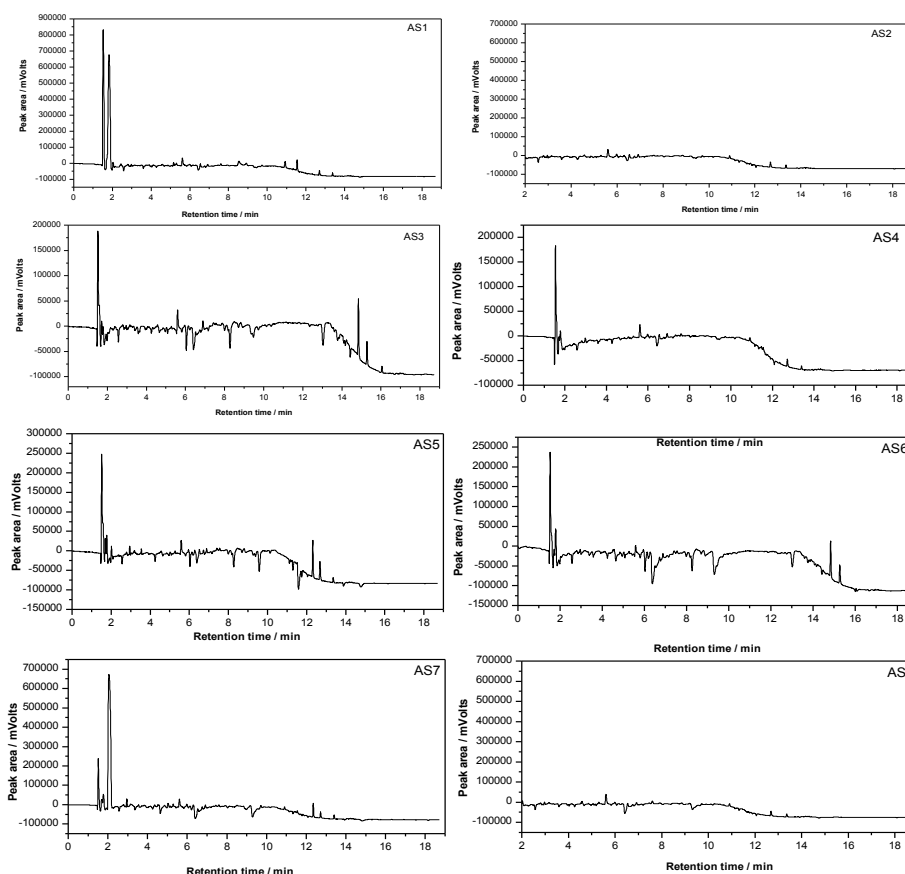


Figura 18. Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de água superficial coletadas em março de 2013 e submetidas ao DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 600 μ L; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min.

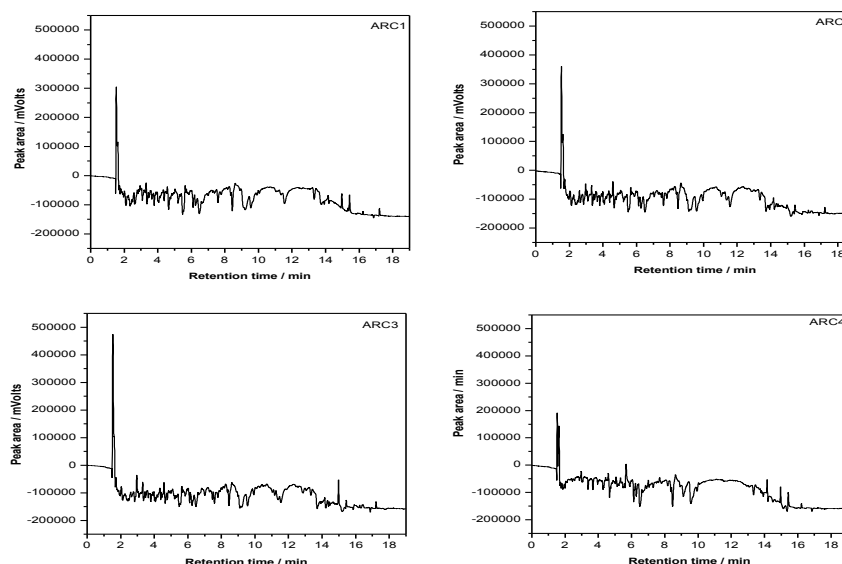


Figura 19. Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de água residuária obtidos por DLLME/LDS. Condições de extração: volume de amostra: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 600 μ L; tempo de extração: 30 s; tempo de centrifugação (3500 rpm): 5 min.

4. CONCLUSÕES

A análise de metais em águas superficiais por ICP-OES identificou e quantificou ferro, manganês e chumbo (uma amostra) em concentrações acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. A concentração de metais nas águas apresentou-se em ordem decrescente, $Fe > Mn > Pb$. A maior porcentagem de amostras está em desacordo com a legislação CONAMA 357/2005 para os limites aceitáveis do metal ferro. De maneira geral, em junho, mês de menor pluviosidade, foram encontradas as menores concentrações de metais característicos do solo.

As técnicas LLE/LTP e DLLME/LDS otimizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água mostraram-se simples, rápidas, com número reduzido de etapas, seletivas, precisas e exatas. Nenhum dos agrotóxicos monitorados foi detectado nas amostras de águas superficiais e residuária no período avaliado. Comparando as duas técnicas de extração, vale destacar que LLE/LTP é simples, fácil e rápida para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água. Porém o mesmo não é conveniente para determinação de agrotóxicos em quantidade de traço, uma vez que os limites de detecção de alguns agrotóxicos (contemplados pela legislação) estão acima da concentração limite estipulada pela legislação. Mesmo não apresentando baixos limites de detecção e quantificação, LLE/LTP apresenta boa precisão e exatidão, além de ser uma técnica com suave efeito de matriz e que realiza extração e *clean up* da amostra numa mesma etapa. Em contrapartida, DLLME/LDS pode ser empregada para determinação simultânea de diferentes classes de agrotóxicos (organoclorados, organofosforados, ciclodienos, estrubilurina, cloronitrila, neonicotinoide e triazóis) em matrizes aquosas. A técnica é simples, linear, exata, precisa, utiliza pouca quantidade de solvente orgânico e apresenta bom fator de enriquecimento de maneira a permitir a utilização desta para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de água superficial e residuária coletadas na microbacia do rio Manhuaçu.

CAPÍTULO 2 – HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM SOLOS AGRÍCOLAS

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das atividades humanas capazes de alterar significativamente o ambiente global. Essa atividade é capaz de converter floresta nativa em campos de cultivo, e também introduzir agrotóxicos em elevadas quantidades causando mudanças irreversíveis ao meio ambiente. O uso eficaz de agrotóxicos deve ser visto num contexto mais amplo do que simplesmente o controle eficiente de pragas e levar em conta os efeitos da acumulação de agrotóxicos no meio ambiente, especialmente no solo, na água e nos alimentos produzidos depois de sucessivas aplicações dos mesmos (KAMMERBAUER; MONCADA, 1998).

Com o uso generalizado de agrotóxicos no meio ambiente, seu destino no solo é de grande preocupação, uma vez que envolve mecanismos complexos de transporte, incluindo volatilização, lixiviação, adsorção e decomposição bioquímica (BAKOURI *et al.*, 2008). A distribuição dos agrotóxicos no perfil do solo depende das propriedades do solo e dos agrotóxicos, além do fluxo e constituição da água de irrigação (GONZALEZ *et al.*, 2010). A lixiviação de agrotóxicos recebe uma atenção especial, pois representa uma grande ameaça aos recursos hídricos (BAKOURI *et al.*, 2008) que em alguns casos podem colocar em risco o abastecimento de água potável (MISHRA *et al.*, 2012). O impacto ambiental dos agrotóxicos tem sido estudado por vários grupos de pesquisa em diversas partes do mundo (KAMMERBAUER; MONCADA, 1998; VEGA *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2007; BAKOURI *et al.*, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2012; SANGCHAN *et al.*, 2012; VARCA, 2012; YANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2014).

Dados recentes da literatura mostram que as águas (QUINETE *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012; VARCA, 2012; BONANSEA *et al.*, 2013; SEQUINATTO *et al.*, 2013) e solos (MORENO *et al.*, 2006; BAKOURI *et al.*, 2008; APARICIO *et al.*, 2013) de áreas agrícolas estão contaminados com resíduos de agrotóxicos e

poluentes orgânicos persistentes. Fu et al. (2009) analisaram amostras de solo coletadas na China por cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência (LC-FLD). As foram submetidas a processos de extração primeiramente com metanol e em seguida, concentradas por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Os solos estavam contaminados com carbaril ($0,7$ a $2 \mu\text{g kg}^{-1}$) e triazofós (28 a $51 \mu\text{g kg}^{-1}$). O mesmo grupo de pesquisa encontrou resíduos de 5 bifenilas policloradas (PCBs) em amostras de solo da mesma região. As amostras de solo foram extraídas com acetona, concentradas por DLLME e analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de elétrons (GC/ECD). As concentrações variaram de 2 a $9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (HU et al., 2009). Resíduos de bifenilas policloradas (RISSATO et al., 2006; ZHU et al., 2014), benzimidazois (WU et al., 2009a), organoclorados (RISSATO et al., 2006; JIANG et al., 2009; ZHOU et al., 2013; ZHU et al., 2014), sulfonilureias (WU et al., 2009b; ZHANG et al., 2011b), triazois (WANG et al., 2011a) e retardantes de chama bromados (BFRs) (ZHU et al., 2014) foram encontrados em solos agrícolas da China. Mishra et al. (2012) encontraram resíduos de DDT e hexaclorociclohexano (HCH) em solos agrícolas da Índia. Cinco amostras de solos de diferentes áreas agrícolas do Chile foram analisadas por extração assistida por micro-ondas (MAE) e cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama. Dos agrotóxicos organofosforado analisados, foram encontrados parationa ($0,02 \text{ mg kg}^{-1}$) e etoprofós ($0,03 \text{ mg kg}^{-1}$) em duas amostras de solo (FUENTES et al., 2007). Resíduos de agrotóxicos em vários níveis de concentração foram encontrados em amostras de solo e água em áreas agrícolas de Andalusia, sul da Espanha (VEGA et al., 2005). A técnica SPE foi aplicada para determinação de 32 agrotóxicos amplamente utilizados na região, seguida de análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC-MS). Previamente à extração dos compostos das amostras de solo, foi realizada uma sonicação usando extração sólido-líquido (ESL) com metanol e água. Carbendazim ($0,2$ - $5,5 \mu\text{g L}^{-1}$), simazina ($0,3$ - $2 \mu\text{g L}^{-1}$) e diurom ($0,3$ - $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$) foram os pesticidas mais frequentemente detectados em amostras de água. Já nas amostras de solo, foram encontrados resíduos dos herbicidas diurom ($0,4$ - 6 mg kg^{-1}) e terbutilazina ($0,7$ - $4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) em 5 das 13 amostras avaliadas e resíduos de simazina também foram encontrados em 4 amostras de solo. Caldas et al. (2011) detectaram tebuconazol e fipronil em solos utilizados para cultivo de arroz no Rio Grande do Sul, Brasil. Tendo em vista os trabalhos apresentados, percebe-se a importância da determinação de

resíduos de agrotóxicos em águas e solos próximos a áreas agrícolas em todo o mundo.

A microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu localiza-se na região de montanhas do leste de Minas Gerais (Brasil) e possui como principal produto agrícola o café. A maior parte de suas montanhas está coberta por essa cultura em plantio em curvas de nível. A região caracteriza-se pelo relevo acidentado, o que favorece a erosão e também, a possibilidade de que agrotóxicos e fertilizantes aplicados nas plantações de café sejam carregados para as águas superficiais, contaminando-as. Até o presente momento, foi encontrado na literatura, apenas um estudo que avaliou a presença de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais em uma sub-bacia dessa região (SOARES *et al.*, 2013). Vinte e quatro agrotóxicos diferentes foram detectados por Soares *et al.* (2013), sendo que pelo menos um agrotóxico foi detectado em 67% das amostras de águas coletadas em período chuvoso, e em 21% das amostras coletadas em período de seca. Desta maneira, faz-se necessário a avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos em águas e solos dessa região cafeicultora.

A etapa de preparo de amostras desempenha um papel importante na análise de resíduos de agrotóxicos. Tradicionalmente, a extração Soxhlet (BAKOURI *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013; ALAMDAR *et al.*, 2014; GAI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014) e extração assistida por ultrassom (UASE) (BABIC *et al.*, 1998; AYDIN *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2009b; YUAN *et al.*, 2014) são as técnicas de pré-tratamento convencionais para extrair agrotóxicos a partir de amostras de solo e sedimento. No entanto, estas técnicas consomem muito tempo e grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos. Nas últimas décadas, as técnicas mais eficientes e ambientalmente mais amigáveis, tais como a extração por fluido supercrítico (SFE) (KREUZIG *et al.*, 2000; FORERO-MENDIETA *et al.*, 2012), extração assistida por micro-ondas (MAE) (FONT *et al.*, 1998; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2002; MERDASSA *et al.*, 2013) e extração acelerada por solvente (ASE) (LI *et al.*, 2003; TAO *et al.*, 2004), têm sido desenvolvidas. As principais vantagens destas técnicas são baixo consumo de solventes orgânicos, o tempo de extração curto e recuperação elevada. Como desvantagem, tem-se o alto custo das mesmas, uma vez que, os instrumentos necessários para estas técnicas são relativamente caros. Nos últimos anos, as técnicas de preparo de amostras simples e miniaturizadas, como microextração em

fase sólida (SPME) (DONG *et al.*, 2005; MENEZES-FILHO *et al.*, 2010; TANKIEWICZ *et al.*, 2013), extração com barra de agitação sortiva (SBSE) (LI *et al.*, 2012; MARGOUM *et al.*, 2013; ASSOUMANI *et al.*, 2014) e microextração em fase líquida (LPME) (BASHEER *et al.*, 2003; CARLOS *et al.*, 2013; ANJOS; ANDRADE, 2014) têm sido relatadas como alternativas aos procedimentos de preparo de amostras convencionais. No entanto, estas técnicas de microextração estão focadas principalmente em amostras líquidas, como água e sucos de frutas. Outras desvantagens citadas são: elevado custo da fibra utilizada em SPME, à qual é frágil e tem um tempo de vida limitado (PROSEN; ZUPANČIČ-KRALJ, 1999; TSENG *et al.*, 2014); problemas de estabilidade da gota e pouca sensibilidade da LPME, além de baixa extração de ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e longos tempos de extração para se atingir limites de detecção satisfatórios (OUYANG *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; TSENG *et al.*, 2014).

Recentemente, uma nova técnica de microextração denominada microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores (REZAEI *et al.*, 2006). DLLME é uma técnica de extração que consome menos solvente orgânico e fatores de enriquecimento muito elevados podem ser obtidos. A técnica é geralmente realizada pela rápida introdução de uma mistura adequada de solventes extrator e dispersor na solução aquosa para formar uma solução nuvem (solução turva). O equilíbrio é alcançado rapidamente devido à maior superfície de contato entre as gotículas do solvente extrator e a amostra aquosa. Em seguida, o solvente de extração pode ser separado por centrifugação. O procedimento é extremamente simples, rápido, de baixo custo, eficiente e com baixo consumo de solvente extrator. Tem sido utilizada com sucesso para extração e pré-concentração de muitas substâncias-traço de amostras de água (BERIJANI *et al.*, 2006; FATTAHI *et al.*, 2007a; GARCÍA-LÓPEZ *et al.*, 2007; JAHROMI *et al.*, 2007; KOZANI *et al.*, 2007; HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010; LEONG *et al.*, 2010; KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; WEN *et al.*, 2011; HERRERA-HERRERA *et al.*, 2013; TEJU *et al.*, 2014), e também em chá (SERESHTI *et al.*, 2013; SERESHTI; SAMADI, 2014), café (SERESHTI; SAMADI, 2014), bebidas (CUNHA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2012), sucos (CUNHA *et al.*, 2009; VICTOR-ORTEGA *et al.*, 2013) e urina (CUNHA; FERNANDES, 2010; ITO *et al.*, 2011). No entanto, apesar das vantagens inerentes sobre outras técnicas clássicas, a metodologia convencional requer o uso de

solventes de extração halogenados extremamente tóxicos (TSENG *et al.*, 2014) e não é muito adequada para extração de amostras sólidas (NAEENI *et al.*, 2011). Assim, para superar os inconvenientes, os pesquisadores têm recentemente utilizado solventes com densidade menor que a água (DLLME/LDS) (FARAJZADEH *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2010; ALBASEER *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2012; BIPARVA *et al.*, 2012; MORENO-GONZALEZ *et al.*, 2012), não adicionado solvente dispersor (MORADI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011a; ZHOU *et al.*, 2011a), não centrifugado a mistura (CHEN *et al.*, 2010; GUO; LEE, 2011; ZHANG *et al.*, 2011a; SEEBUNRUENG *et al.*, 2014) e introduzido uma etapa adicional, a solidificação do solvente extrator em banho de gelo (DLLME-SFO) (LEONG; HUANG, 2008; 2009; XU *et al.*, 2009; CHANG; HUANG, 2010; DAI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011b; ZHENG *et al.*, 2011; SUH *et al.*, 2013). A técnica DLLME tem sido combinada a outras técnicas como extração sólido-líquido (ESL) (FATTAHI *et al.*, 2007b; LIU *et al.*, 2009; HO *et al.*, 2013; BEHBAHANI *et al.*, 2014), UASE (BIDARI *et al.*, 2011; PIRSAHEB *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014a), MAE (MATSADIQ *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011b), SFE (NAEENI *et al.*, 2011), SDME (LI *et al.*, 2013a), μ -SPE (GUO; LEE, 2013), extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (ZHANG; XU, 2014) e QuEChERS (CUNHA; FERNANDES, 2011; CUNHA *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2012; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013; CUNHA; FERNANDES, 2013; MELO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014b) para permitir a extração em amostras sólidas e também obter melhores seletividade, maiores fatores de enriquecimento e menores limites de detecção (LOD) e também clean up das amostras.

Tradicionalmente, apesar de vantagens substanciais de DLLME, ela não é por si só adequado para a extração de analitos a partir de amostras sólidas. Outra técnica que vem sendo empregada com sucesso para a extração de agrotóxicos em matrizes sólidas é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) (VIVIAN *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010; MARTHE *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2010b; DARDENGO *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2013; MAGALHAES *et al.*, 2013; RÜBENSAM *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2014; HELENO *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014). A principal vantagem da técnica é permitir, em uma única etapa, a extração dos agrotóxicos e clean up da amostra (PINHO *et al.*, 2010b; MAGALHAES *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*,

2014). A técnica é baseado na partição dos analitos entre a matriz sólida e o solvente orgânico miscível em água à temperatura ambiente. Com o abaixamento da temperatura (-20 °C), a fase aquosa solidifica-se aprisionando a amostra sólida e a fase líquida superior, solvente orgânico e analitos, é isolada e posteriormente analisada (PINHO *et al.*, 2010b; DARDENGO *et al.*, 2011; MAGALHAES *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2014). Aplicações da técnica também podem ser encontradas para matrizes aquosas (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010; GOULART *et al.*, 2012; SILVÉRIO *et al.*, 2012), gordurosas (LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001a; LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001b; LI *et al.*, 2007a; LI *et al.*, 2007b; LI *et al.*, 2007c; GOULART *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2014) e amostras biológicas (MAGALHÃES *et al.*, 2012). Em relação às técnicas tradicionais, apresenta ainda como vantagens baixo custo, reduzido número de etapas, baixo consumo de solventes orgânicos, além de ser confiável e seletiva (GOULART *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2011; GOULART *et al.*, 2012). A principal desvantagem da técnica é o baixo fator de enriquecimento.

Assim, a técnica SLE/LTP hifenado a uma nova técnica de microextração líquido-líquido dispersiva com partição em baixa temperatura (DLLME/LDS/LTP) parece ter grande potencial para determinação multirresíduo de agrotóxicos de amostras de solo agrícola de região produtora de café. O objetivo desse estudo foi adaptar, otimizar e validar SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP combinada à GC/ECD para determinação multirresíduo de agrotóxicos de solos. A nova técnica é baseada na extração dos analitos e *clean up* da amostra por SLE/LTP (SILVERIO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2014) e na pré-concentração por DLLME/LDS/LTP, uma técnica baseada em DLLME/LDS (FARAJZADEH *et al.*, 2009; MOINFAR; HOSSEINI, 2009; CHEN *et al.*, 2010), porém a separação das fases orgânica e aquosa é acelerada pelo abaixamento da temperatura e não por centrifugação como na técnica convencional. Os efeitos dos parâmetros experimentais sobre o desempenho da extração dos analitos alvo foram investigados, otimizados e validados. Em seguida, a técnica SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD foi aplicada para análise de 15 agrotóxicos de diferentes classes em amostras de solo coletadas na microbacia do rio Manhuaçu no leste de Minas Gerais, Brasil. Ao melhor de nosso conhecimento, a combinação de SLE/LTP com DLLME/LDS/LTP foi realizada pela primeira vez para determinação de níveis traço de agrotóxicos multiclasses em solos agrícolas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados reagentes químicos de grau analítico e água ultrapura ($18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, Estados Unidos da América). Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. O nitrogênio foi utilizado nas análises cromatográficas com 99,999% de pureza (Air Products, São Paulo, Brasil).

Foram utilizados neste experimento acetona (99% v/v) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), tolueno (99,9% v/v) da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos da América) e acetonitrila (99,9% v/v) da Merck (Darmstadt, Alemanha). Cloreto de sódio (99,0% m/m) adquirido da Isofar (Duque de Caxias, Brasil) foi utilizado durante a otimização da técnica.

Os agrotóxicos utilizados nesse estudo foram azoxistrobina (99,9% m/m), ciproconazol (99,8% m/m), clorotalonil (99,3% m/m), dieldrin (97,9% m/m), difenoconazol (97,0% m/m), endosulfam (73,2% e 26,6% m/m para endosulfam I e endosulfam II, respectivamente), hexaclorobenzeno (99,8% m/m), lindano (99,8% m/m) e tiametoxam (99,7% m/m) adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); aldrin (98,5% m/m) e DDT (98,8% m/m) adquiridos da Supelco (Bellefonte, Estados Unidos da América); clorpirifós (99,0 % m/m) da Chem Service (West Chester, Estados Unidos da América) e disulfotom (97,0% m/m), e triadimenol (99,0% m/m) da Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

Soluções padrão estoque de cada princípio ativo individual (1000 mg L^{-1}) foram preparadas em acetonitrila pura e estocadas no escuro a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Soluções padrão estoque intermediárias individuais (100 e 10 mg L^{-1}) foram preparadas por diluição das anteriores em acetonitrila.

As soluções de trabalho de todos os agrotóxicos para otimização da técnica SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP foram preparadas pela diluição das soluções padrão estoque com acetonitrila. Foi preparado uma solução de trabalho 1 (STS1) contendo 10 mg L^{-1} de aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno e lindano e 50 mg L^{-1} de azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, disulfotom, endosulfam, tiametoxam e triadimenol. Após alteração da técnica, visando melhores fatores de enriquecimento foi preparada uma solução de trabalho 2 (STS2) contendo aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno, lindano e

tiametoxam a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, disulfotom, endosulfam e triadimenol a $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para os estudos de recuperação e linearidade do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD, foram preparadas soluções de trabalho em acetonitrila contendo os agrotóxicos em concentrações equivalentes a 100 e 1200 vezes o LOQ do método.

Curva analítica em tolueno (curva no solvente) foi preparada em triplicata para os cálculos de recuperação, efeito de matriz e fator de enriquecimento do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo. A curva analítica foi preparada por diluição das soluções de trabalho para obter aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno, lindano e tiametoxam na faixa de 15 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ e azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, disulfotom, endosulfam e triadimenol de 75 a $2000 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.2. INSTRUMENTAÇÃO

As análises dos agrotóxicos foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo 2014 da Shimadzu (Kioto, Japão) equipado com detector por captura de elétrons ^{63}Ni (GC/ECD) e auto-injetor AOC-20i. Um microlitro da amostra foi injetado no modo *split*, com divisão de fluxo de 1:5. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram 280 e 300 °C, respectivamente. O nitrogênio foi empregado como gás de arraste num fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar ZB-5 (5% de fenil e 95% de dimetilsiloxano), de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$ e $0,10 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Califórnia, Estados Unidos da América). A programação de aquecimento do forno da coluna foi 150 °C (1 min), rampa de 15 °C min^{-1} até 200 °C (4 min), seguida de rampa de 5 °C min^{-1} até 210 °C e rampa de 60 °C min^{-1} até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min. O tempo total de análise foi de 18,6 minutos. As análises foram gerenciadas pelo software Shimadzu GCsolution. A identificação dos picos foi baseada em comparação dos tempos de retenção dos compostos em soluções padrão.

Foram utilizados também, balança analítica BP 221S (Sartorius, Göttingen, Alemanha) de resolução $1,0 \times 10^{-4}$ g, bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, São Paulo, Brasil), evaporador rotatório a vácuo modelo 802 (Fisatom, São Paulo, Brasil), banho termostaticado TE-184 (Tecnal, São Paulo, Brasil) com controle de temperatura, mesa agitadora TE-420 (Tecnal, São Paulo, Brasil), agitador Vortex Certomat MV (B.

Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha), centrífuga Q222-T28 (Quimis, São Paulo, Brasil), freezer 280 L (Consul, Minas Gerais, Brasil), GPS eTrex Vista H (Garmin, Kansas, Estados Unidos da América), micropipetas automáticas monocanal de volume variável da HTL (Labmate Pro LMP100, LMP1000 E LMP10000, Varsóvia, Polônia).

2.3. ÁREA DE ESTUDO

A microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu pertencente à bacia hidrográfica do rio Doce. É composta de três municípios: Manhuaçu, Luisburgo e São João do Manhuaçu, todos eles situados também na zona Leste Mineira. O rio São Luiz, o córrego do Manhuaçuinho, dentre outros também fazem parte desta microbacia hidrográfica.

A formação florestal predominante nesta região é de Floresta Estacional Semidecidual que se insere dentro do domínio da Mata Atlântica, correspondendo, atualmente, cerca de 16% da cobertura de matas nativas para o município de Manhuaçu. O tipo climático de acordo com a classificação de Köeppen é o clima tropical de altitude (Cwb), apresentando verões brandos com estações chuvosas e estiagem no inverno. A temperatura média anual é de 21,2°C, apresentando como máxima e mínimas anuais 27,6 °C e 15,4 °C, respectivamente. O índice médio pluviométrico anual é de 1860,8 mm. A economia local é baseada na cultura do café. Além do café, verifica-se também a presença de pastagens, que juntos perfazem, em alguns casos, mais de 80% de todo o uso do solo. Dentre os tipos de solo que ocorrem na região, destaca-se o Latossolo Húmico. A alta declividade encontrada em toda a bacia faz com que a água precipitada entre imediatamente em todo o sistema, chegando rapidamente na área urbana dos municípios, favorecendo a ocorrência das enchentes (FARIA *et al.*, 2010). A região de estudo da microbacia do rio Manhuaçu encontra-se indicada na Figura 1.

2.4. AMOSTRAS DE SOLO

Amostras de solo (1 kg) foram coletadas na região de café de montanhas do Leste de Minas, nos municípios de Manhuaçu, Luisburgo e São João do Manhuaçu.

Esses municípios destacam-se pela elevada produção cafeeira com uso intensivo de agrotóxicos e insumos agrícolas.

Para análise de resíduos de agrotóxicos foram selecionados oito pontos de amostragem, os quais foram georreferenciados. Foi selecionado um ponto próximo à nascente do rio Manhuaçu (P1: 6794098/7736638) onde foram coletadas amostras de solo sob mata. Em São João do Manhuaçu foram coletadas amostras de solo em 2 pontos sob cultivo de café (P2: 6796951/7739806 e P3: 6797322/7746237). Em Manhuaçu foram coletadas em 2 pontos sob pastagem (P4: 6807886/7755438 e P5: 6812024/7759055). Em Luisburgo foram coletadas em 2 pontos (P6: 6801858/7736710 e P7: 6805163/7738355) e no Manhuaçuzinho foi coletada em 1 ponto (P8: 6800689/7763068), ambos sob cultivo de café. Foram realizadas três campanhas de amostragem: março de 2012, dezembro de 2012 e março de 2013. As amostras de solo foram coletadas com auxílio de cavadeira articulada na profundidade de 0-20 cm e armazenadas em frascos de polipropileno e transportadas até o laboratório, onde foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em malha de 2 mm. Uma amostra de cada ponto de coleta foi caracterizada quanto aos principais parâmetros físicos e químicos.

2.5. EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP)

A extração dos resíduos de agrotóxicos em solo foi realizada com acetonitrila aplicando a metodologia SLE/LTP. Posteriormente, o extrato foi submetido aos procedimentos de DLLME/LDS e analisado por GC/ECD.

Tendo em vista que ambas as técnicas de extração são bem consolidadas na literatura, foi realizada uma rápida otimização dos principais parâmetros que poderiam afetar a extração dos 15 agrotóxicos das amostras de solo. A técnica SLE/LTP utilizada neste trabalho foi adaptada da técnica utilizado para extração de resíduos de agrotóxicos em milho (FREITAS *et al.*, 2014). Já DLLME/LDS foi baseada na técnica otimizada para extração multirresíduo destes mesmos agrotóxicos de amostras de água, descrito no capítulo 1 deste trabalho. Inicialmente utilizou-se a metodologia DLLME/LDS convencional, mas no decorrer do trabalho

uma nova técnica de extração multirresíduo de agrotóxicos de amostras de solo foi proposta.

Após otimização foram verificados os principais parâmetros analíticos da nova técnica de extração proposto. Amostras de solo ambientais coletadas em áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu foram analisadas pela mesma.

2.5.1. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e microextração líquido-líquido dispersiva com partição em baixa temperatura (SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP)

Para otimização da técnica, foi utilizado uma amostra de solo (5 kg) coletada em uma fazenda no município de Manhuaçu (área não cultivada) isento dos analitos estudados.

Amostras de solo (4 g) foram fortificadas com 20 µL da STS1 de maneira a se obter aldrin, clorotalonil, clorpirifós, DDT, dieldrin, hexaclorobenzeno e lindano a 50 µg kg⁻¹; e azoxistrobina, ciproconazol, difenoconazol, disulfotom, endosulfam, tiametoxam e triadimenol a 250 µg kg⁻¹. Após a fortificação, as amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 1 h, antes de serem submetidas à SLE/LTP combinado com DLLME/LDS e análise por GC/ECD.

Inicialmente, 4 g de solo fortificado com agrotóxicos a 50 e 250 µg kg⁻¹ em vials de 22 mL foram deixados em repouso por 1h. Em seguida, 4 mL de água e 8 mL de acetonitrila (MeCN) foram adicionados ao frasco e agitado por vortex (VT) ou mesa agitadora (AM) em diferentes tempos de extração. A amostra foi levada ao freezer por 2 h para partição das fases orgânica e aquosa em baixa temperatura (extração e *clean up* da amostra). Após isso, a fase orgânica foi recolhida e 533 µL de extrato orgânico com 67 µL de tolueno foram injetados rapidamente em 5 mL de água em tubos de ensaio de 9 mL. A solução foi agitada em vórtex por 30 s e a solução nuvem foi formada no tubo. Nesta etapa, os agrotóxicos foram extraídos pelas finas gotas de tolueno. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 5 min para separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica superior (aproximadamente 45 µL) foi removida usando uma micropipeta de 100 µL (LMP100). Esta solução foi injetada no GC/ECD para análise dos agrotóxicos estudados. Nesta primeira etapa da otimização foram testados diferentes tempos de agitação da técnica SLE/LTP. Na agitação em vórtex foram testados 0,5, 1 e 2 min, e, na mesa agitadora foram testados 30, 60 e 120 min.

Em seguida foram avaliados os efeitos do tempo de agitação (F1: vórtex: 1 ou 3 min), força iônica (F2: adição de NaCl : 0 ou 5% m/v), tempo de extração (F3: agitação em vórtex: 30 ou 60 s) e tipo de partição de fases no DLLME/LDS (F4: 5 min de centrifugação ou 25 min de partição em baixa temperatura). Estas variáveis foram otimizadas por uma abordagem multivariada para levar em conta as possíveis interações entre as mesmas. Um planejamento fatorial completo completo 2^4 em duplicata envolvendo 32 ensaios foi realizado. A área relativa total foi utilizada como resposta analítica. Todos os experimentos foram realizados numa sequência randômica. As faixas das variáveis estudadas e os dados do planejamento são apresentadas na Tabela 25. Foram utilizados 4 g de solo fortificado com agrotóxicos a 2,5 e 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em vials de 22 mL. Em seguida, 4 mL de água e 8 mL de acetonitrila (MeCN) foram adicionados ao frasco e agitado por vórtex (VT) em diferentes tempo de extração (F1). A amostra foi levada ao freezer por 2 h para partição em baixa temperatura. Após isso, a fase orgânica sobrenadante foi transferida para balão de fundo redondo e evaporada até próximo à secra em evaporador rotatório sob vácuo a 35 °C. O resíduo foi redissolvido em 5 mL de água ou solução de NaCl 5% m/v (F2) e transferido para tubos de ensaio de 9 mL. Em seguida foi injetado rapidamente 1,2 mL da mistura acetona:tolueno (8:1). A mistura foi agitada em vórtex em diferentes tempos de extração (F3) e submetida a diferentes tipos de partição (F4). Após esta etapa, a fase orgânica sobrenadante formada na parte superior do tubo foi recolhida e analisada por GC/ECD.

Tabela 25. Planejamento fatorial 2^4 em duplicata para otimização SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP na extração multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo

Fatores	Níveis de amostragem	
	-1	1
(F1) Tempo de agitação / min	1	3
(F2) Adição de NaCl / %NaCl (m/v)	0	5
(F3) Tempo de extração / s	30	60
(F4) Tipo de partição	Centrifugação (5 min)	Partição em baixa temperatura (25 min)

Ensaio	Fatores codificados			
	F1	F2	F3	F4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-

(Continuação na próxima página)

Tabela 25. (Continuação)

Ensaio	Fatores codificados			
	F1	F2	F3	F4
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

2.6. PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO

O método extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e microextração líquido-líquido dispersiva com partição em baixa temperatura (SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP) com análise por cromatografia gasosa foi validado quanto aos principais parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito de matriz, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Todas as análises foram conduzidas utilizando amostras de solo livres de agrotóxicos. Os procedimentos realizados para a validação do método foram baseados em orientações encontradas na literatura (ICH, 2005; INMETRO, 2010; MAPA, 2011).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de solo isenta dos agrotóxicos estudados com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada. Ambas amostras foram submetidas ao procedimento de extração otimizado.

A linearidade do método foi estabelecida plotando a área de cada agrotóxico versus a concentração do agrotóxico adicionado às amostras. Para a construção das curvas analíticas foi utilizado extratos obtidos pela técnica otimizada SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP a partir de matriz branca fortificada. A faixa de aplicação foi

preparada com no mínimo seis níveis de concentração, sendo o primeiro nível equivalente ao LOQ e todos os outros níveis, múltiplos dele (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50 e 75 LOQ). Todas as soluções desse ensaio foram preparadas em triplicata. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido pela regressão linear.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos para o método pela análise de amostras de água isentas dos agrotóxicos, fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos e extraídas por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. O LOD foi estabelecido como o menor nível detectável sendo essa concentração igual a três vezes a relação sinal-ruído, enquanto que o LOQ foi considerado como a concentração igual a dez vezes a relação sinal-ruído.

A exatidão, em termos de recuperação, foi determinada através da porcentagem de agrotóxicos recuperada em 3 níveis de fortificação (1, 5 e 10 LOQ). Para cada nível de fortificação foram preparadas seis replicatas. A porcentagem de agrotóxicos recuperada (R) foi calculada através da Equação 1.1.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária e expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) (Equação 1.2) associado às respostas relativas dos agrotóxicos em cada ensaio. A repetitividade foi determinada em um mesmo dia e consistiu na análise de seis replicatas de cada um dos níveis de concentração (1, 5 e 10 LOQ). A precisão intermediária foi avaliada pelo mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento e em diferentes dias (dia 1, dia 3 e dia 5). A precisão intermediária foi calculada com seis replicatas nas três concentrações em que foi avaliada a repetitividade. A extração em cada um dos níveis de fortificação foi realizada em conjunto com brancos das amostras para certificação da integridade dos dados obtidos.

Para avaliação do efeito de matriz (ME), foram preparadas duas curvas analíticas, uma contendo os 15 analitos em tolueno (curva no solvente) e no extrato da matriz branca (curva no extrato da matriz), ambas na mesma faixa de concentração. Os extratos da matriz branca foram obtidos de amostra de solo isenta dos agrotóxicos avaliados e submetida à técnica otimizada, SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. Todas as soluções deste ensaio foram preparadas em triplicatas e com no mínimo cinco níveis de concentração. A Equação 1.3 foi utilizada para cálculo do ME e a porcentagem de enriquecimento ou supressão na resposta cromatográfica foi comparada para ambos os métodos como em Melo et al. (2012), Chen et al. (2013) e Cunha et al. (2011).

O fator de enriquecimento (EF), parâmetro que avalia a partição dos analitos entre as fases, foi avaliado para o método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP nas mesmas condições da precisão intermediária. Amostras de solo (n= 54) fortificada com os 15 princípios ativos em três níveis de concentração foram submetidas ao método por 3 dias diferentes. Para cada nível de fortificação foram realizados 6 ensaios. Para a quantificação foi utilizada a curva analítica em tolueno (curva no solvente) e o fator de enriquecimento foi calculado a partir da Equação 1.4.

Por fim, o novo método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP foi comparado com SLE/LTP-DLLME/LDS para determinação de resíduos de agrotóxicos multiclassés em amostras de solo. Amostras de solo, fortificadas com os princípios ativos foram submetidos à extração. Para SLE/LTP, foram adicionados 4 mL de água e 8 mL de acetonitrila em 4 g de solo. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e levada à partição em baixa temperatura (-20 °C) por 2 horas. Esta primeira etapa de extração é idêntica em ambos os métodos avaliados. No método convencional, SLE/LTP-DLLME/LDS, 1 mL do extrato orgânico em acetonitrila é misturado com 133 µL de tolueno e injetado rapidamente em 5 mL de água destilada. A mistura é agitada em vórtex por 1 min, centrifugada a 3500 rpm por 5 min e a fase orgânica superior é recolhida e analisada por GC/ECD. No novo método, todo extrato orgânico obtido da SLE/LTP é evaporado até próximo a securo a 35 °C em evaporador rotatório sob vácuo e recuperado em 5,00 mL de água destilada. Em seguida são injetados rapidamente 1,2 mL de acetona:tolueno (8:1), agitados por 1 min em vórtex e levados ao freezer (-20 °C) por 25 min para separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica superior é recolhida e analisada por GC/ECD.

2.7. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO

O método otimizado SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD foi empregado para determinação de resíduos de agrotóxicos em 24 amostras de solo coletadas em áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físicas e químicas realizadas nas amostras de solo agrícola coletados na microbacia do rio Manhuaçu são apresentados na Tabela 26.

Pode-se perceber pelos resultados apresentados que a fração argilosa do solo variou de 365 a 505 g kg⁻¹. Com teores de argila superiores a 35%, os mesmos são classificados como solos de textura argilosa, ou seja, solos tipo 3 pela Instrução Normativa nº2 de 09/10/2008 (MAPA, 2008).

Tabela 26. Caracterização física e química das amostras de solo coletadas em área agrícola da microbacia do rio Manhuaçu, MG

Solo	Análise Física**										
	Areia + Silte / (g kg ⁻¹)		Argila / (g kg ⁻¹)		Classe textural*						
Otimização	578		422		Argiloso						
P1	588		412		Argiloso						
P2	610		390		Argiloso						
P3	612		388		Argiloso						
P4	595		405		Argiloso						
P5	635		365		Argiloso						
P6	625		375		Argiloso						
P7	495		505		Argiloso						
P8	585		415		Argiloso						

Solo	Análise Química**											
	pH (H ₂ O)	P / (mg dm ⁻³)	K / (mg dm ⁻³)	Ca / (cmol _c dm ⁻³)	Mg / (cmol _c dm ⁻³)	Al ³⁺ / (cmol _c dm ⁻³)	H+Al / (cmol _c dm ⁻³)	SB / (cmol _c dm ⁻³)	CTC / (cmol _c dm ⁻³)	V / %	IS-Al / %	MO / (dag dm ⁻³)
Otimização	4,5	5	14	0,5	0,3	2	8	1	9	9	15	2
P1	5,2	4	23	2	0,6	0,4	7	2	9	24	4	2
P2	5,8	16	95	5,0	1	0	4	7	11	62	0	3
P3	5,9	9	73	5	1	0	5	7	12	59	0	4
P4	4,8	4	33	1	0,3	0,7	9	2	10	16	7	3
P5	6,0	25	77	4	1	0	3	5	9	59	0	2
P6	4,6	28	29	1	0,3	1	8	1	9	17	10	2
P7	4,5	37	62	1	0,2	1	8	1	9	12	13	2
P8	4,7	10	57	2	0,4	1	10	2	12	18	11	4

SB= Soma de bases trocáveis; CTC= Capacidade de troca catiônica; V= Índice de saturação de bases; IS-Al= Índice de saturação de Alumínio; MO= matéria orgânica; *MAPA, 2008. **Análises realizadas no Laboratório LABOMINAS (Manhuaçu, MG), segundo EMBRAPA (EMBRAPA, 1997).

A necessidade de uma técnica rápida e que fosse capaz de extrair quantidades traço de uma matriz complexa foi o ponto de partida para que fossem combinados duas importantes técnicas de extração de resíduos de agrotóxicos. A combinação de SLE/LTP com DLLME/LDS parece ser eficaz, uma vez que vantagens de ambas as técnicas podem ser obtidas como alta recuperação e fator de enriquecimento, *clean up* da amostra, ambientalmente amigável e de baixo custo.

A primeira etapa deste trabalho consistiu na otimização dos principais parâmetros da técnica de extração que influenciam na determinação de resíduos de agrotóxicos de amostras de solo.

3.1. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP

A primeira etapa na otimização da técnica para extração multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo consistiu em avaliar diferentes tipos e tempos de agitação na eficiência de extração dos analitos. Para isso foram testadas a agitação em vórtex (VT) por 0,5; 1 e 2 min e mecânica (MA) por 30, 60, e 120 min. A Figura 20 apresenta a resposta dos agrotóxicos nestes diferentes tempos e tipo de agitação avaliados.

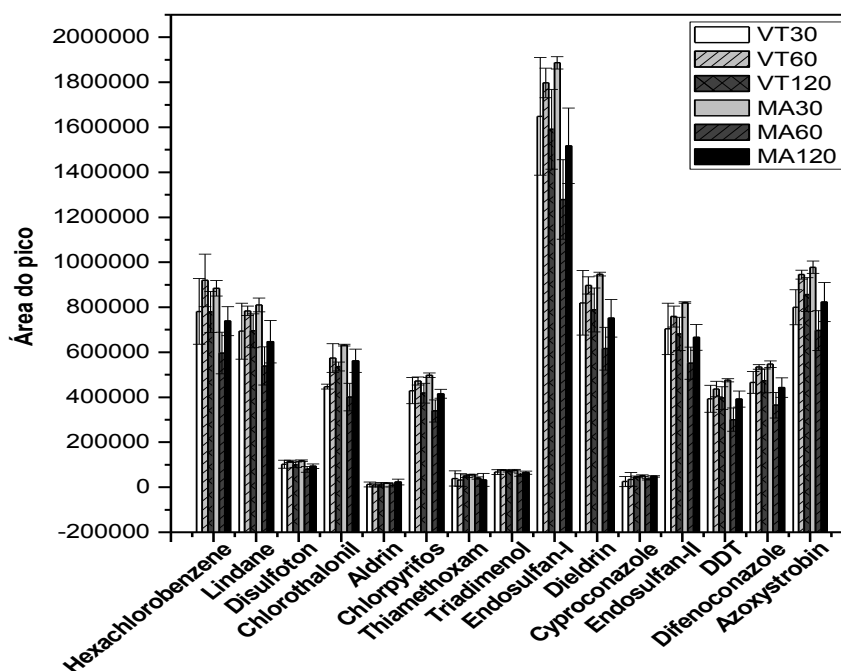


Figura 20. Influência do tipo e tempo de agitação da técnica SLE/LTP-DLLME/LDS na resposta cromatográfica dos analitos. VT= agitação em vórtex e MA= mesa agitadora.

Os diferentes tempos de agitação avaliados não influenciaram significativamente as respostas cromatográficas dos agrotóxicos. Porém, ao nível de 95% de confiança pela ANOVA, observou-se que 60 min de mesa agitadora forneceu as piores respostas para todos analitos com exceção de aldrin. Verificou-se também, para alguns compostos (ciproconazol e clorotalonil), uma resposta significativamente pior quando foi realizado uma agitação por 30 s em vórtex. Desta maneira, agitação em vórtex por 1 ou 2 min ou mesa agitadora por 30 ou 120 min podem ser utilizadas sem diferença significativa na resposta cromatográfica.

Visando aumentar a sensibilidade e o fator de enriquecimento da técnica de extração, decidiu-se concentrar o extrato orgânico obtido da SLE/LTP e recuperar os analitos em água destilada para aplicação dos procedimentos de DLLME/LDS. Propôs-se também neste trabalho uma mudança nos procedimentos tradicionais de DLLME/LDS, em vez de utilizar a centrifugação para separar o solvente extrator da fase aquosa, testou-se o abaixamento da temperatura (LTP), uma vez que o mesmo já é utilizado em SLE para este fim e também como *clean up* da amostra.

Sabe-se que a centrifugação é um processo importante na técnica DLLME para acelerar a coleta de gotas de solvente extrator na parte superior da amostra. Entretanto, em alguns trabalhos (GARCÍA-LÓPEZ *et al.*, 2007; FARAJZADEH; KHOSH MARAM, 2013), nem o tempo e nem a velocidade de centrifugação tem efeito significativo na eficiência de extração dos analitos. Além disso, segundo Zhang e colaboradores (2011) a etapa de centrifugação precisa de instrumento adicional e é um pouco entediante para o preparo de amostras. Tais dados da literatura motivaram ainda mais a avaliação de LTP para separar a fase orgânica extratora.

Para avaliar alguns fatores que poderiam influenciar esta nova técnica de extração, pré-concentração e *clean up* foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^4 em duplicata. O grau de significância de cada fator foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor. As variáveis investigadas foram tempo de agitação (SLE): 1 e 3 min; força iônica com adição de NaCl (DLLME): 0 e 5% m/v NaCl; tempo de extração (DLLME): 30 e 60 s e tipo de partição de fases orgânica e aquosa: 5 min centrifugação ou 20 min de LTP. O planejamento experimental e os resultados são apresentados na Tabela 27. A área total (soma das áreas de todos analitos obtidas em cada ensaio) foi utilizada para gerar o gráfico de Pareto dos efeitos e interações (Figura 21). Neste gráfico, o

comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto de cada efeito estimado e interação, os quais permitem uma comparação da significância relativa de cada um dos fatores em SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP.

Tabela 27. Resultados do planejamento fatorial 2⁴ completo para otimização SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP

Ensaio	Fatores decodificados				Área total / mVolts
	Tempo de agitação / min	Adição de NaCl / %NaCl (m/v)	Tempo de extração / s	Tipo de partição	
1	1	0	30	Centriguação	3600722
2	3	0	30	Centriguação	4532028
3	1	5	30	Centriguação	4717682
4	3	5	30	Centriguação	4863999
5	1	0	60	Centriguação	4632109
6	3	0	60	Centriguação	Nr
7	1	5	60	Centriguação	3635704
8	3	5	60	Centriguação	4869179
9	1	0	30	LTP	4630975
10	3	0	30	LTP	4118956
11	1	5	30	LTP	4521442
12	3	5	30	LTP	1442081
13	1	0	60	LTP	4305687
14	3	0	60	LTP	5044407
15	1	5	60	LTP	4248778
16	3	5	60	LTP	Nr
1R	1	0	30	Centriguação	3582236
2R	3	0	30	Centriguação	3861329
3R	1	5	30	Centriguação	3652352
4R	3	5	30	Centriguação	4374733
5R	1	0	60	Centriguação	4487229
6R	3	0	60	Centriguação	5354418
7R	1	5	60	Centriguação	4968933
8R	3	5	60	Centriguação	3818767
9R	1	0	30	LTP	4058875
10R	3	0	30	LTP	3645401
11R	1	5	30	LTP	5040414
12R	3	5	30	LTP	4058147
13R	1	0	60	LTP	4297541
14R	3	0	60	LTP	4301374
15R	1	5	60	LTP	5392659
16R	3	5	60	LTP	5491300

LTP= Partição em baixa temperatura; nr= não realizado.

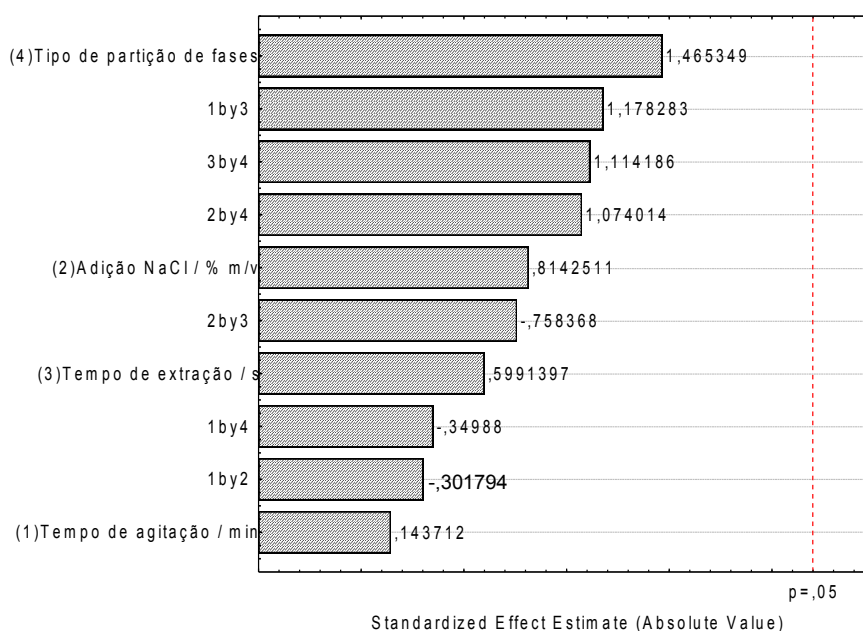


Figura 21. Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores tempo de agitação, adição de NaCl, tempo de extração e tipo de partição na resposta dos agrotóxicos para otimização da SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP.

Neste estudo do planejamento fatorial, as variáveis investigadas (tempo de agitação, adição de NaCl, tempo de extração e tipo de partição) não foram significativas ($p > 0,05$) para todos os agrotóxicos estudados. Baseado nestes resultados, as condições de extração mais favoráveis para análise de 15 agrotóxicos por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP foram: adição de 4 mL de água e 8 mL de acetonitrila em 4 g de solo, seguida de agitação por 1 min em vórtex e partição em baixa temperatura por 2 h, a fase orgânica é evaporada em evaporador rotatório sob vácuo a 35 °C e recuperada em 5 mL de água, onde é injetado rapidamente 1,2 mL de acetona: tolueno (8:1). A mistura é agitada por 1 min em vórtex, seguida de partição em baixa temperatura por 25 min. Finalmente, a fase orgânica superior é recolhida e injetada em GC/ECD.

Vale destacar que é a primeira vez que SLE/LTP tem sido utilizada em combinação com um novo DLLME/LDS/LTP, cujo procedimento não necessita de centrifugação para obter a separação de fases.

3.2. PARÂMETROS ANALÍTICOS SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP

O cromatograma dos 15 agrotóxicos analisados é apresentado na Figura 22. Todos os agrotóxicos foram eluídos em 18,6 minutos, um tempo bem razoável, e

apresentaram picos resolvidos nas condições otimizadas do GC/ECD. Os tempos de retenção (t_R) de cada analito são apresentados na Tabela 28.

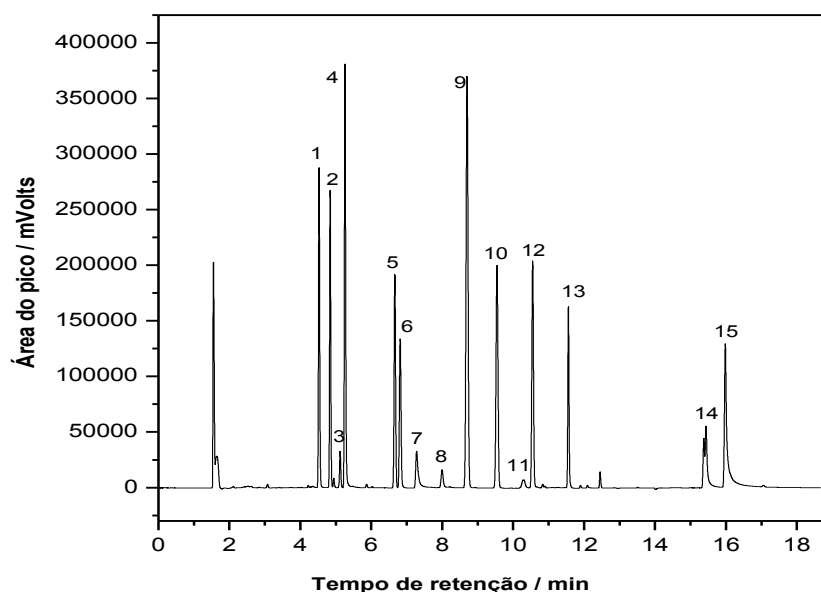


Figura 22. Cromatograma de uma solução padrão dos agrotóxicos em tolueno: 1) Hexaclorobenzeno ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 2) Lindano ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 3) Disulfotom ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); 4) Clorotalonil ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 5) Aldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 6) Clorpirifós ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 7) Tiametoxam ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 8) Triadimenol ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); 9) Endosulfam I ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); 10) Dieldrin ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 11) Ciproconazol ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); 12) Endosulfam II ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$); 13) DDT ($300 \mu\text{g L}^{-1}$); 14) Difenconazol ($15000 \mu\text{g L}^{-1}$); 15) Azoxistrobina ($1500 \mu\text{g L}^{-1}$). As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos.

Curvas analíticas foram preparadas em tolueno para os cálculos de recuperação, efeito de matriz e fator de enriquecimento do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo. Pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação de regressão linear. Os parâmetros das curvas analíticas (inclinação, intercepto e coeficiente de correlação) obtidos são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Tempos de retenção dos agrotóxicos após condições cromatográficas otimizadas e parâmetros das equações de regressão da linearidade da curva analítica preparada em tolueno

Pico	Agrotóxico	Tempo de retenção / min	Parâmetros da curva analítica em tolueno		
			a	b	r
1	Hexaclorobenzeno	4,5	1598	32056	0,996
2	Lindano	4,8	1406	-8581	0,997
3	Disulfotom	5,1	36,5	2890	0,997
4	Clorotalonil	5,3	2266	8614	0,997
5	Aldrin	6,7	1306	-8272	0,997
6	Clorpirifós	6,9	924	16042	0,996
7	Tiametoxam	7,3	385	-7976	0,993
8	Triadimenol	8,0	28,3	1217	0,995
9	Endosulfam-I	8,8	671	47209	0,996
10	Dieldrin	9,6	1828	-4255	0,997
11	Ciproconazol	10,4	22,3	-120	0,997
12	Endosulfam-II	10,6	309	7568	0,997
13	DDT	11,6	775	-35417	0,993
14	Difenoconazol	15,5	149	-2066	0,998
15	Azoxistrobina	16,0	238	-11015	0,998

a= Inclinação; b= Intercepto; r= Coeficiente de correlação.

Coeficientes de correlação maiores que 0,993 para todos os agrotóxicos comprovam a boa linearidade obtida. Desta maneira, as curvas analíticas em tolueno podem ser aplicadas na quantificação de resíduos de agrotóxicos da respectiva técnica de preparo de amostras.

Para avaliar a seletividade, amostras de solo coletadas em áreas agrícolas da microbacia do Rio Manhuaçu foram submetidas ao método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. Posteriormente, essas amostras foram fortificadas com os 15 princípios ativos estudados e também submetidas ao método de extração e análise. A Figura 23 apresenta os cromatogramas de extratos de amostras de solo (A) sem fortificação e (B) fortificada, submetidas SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP.

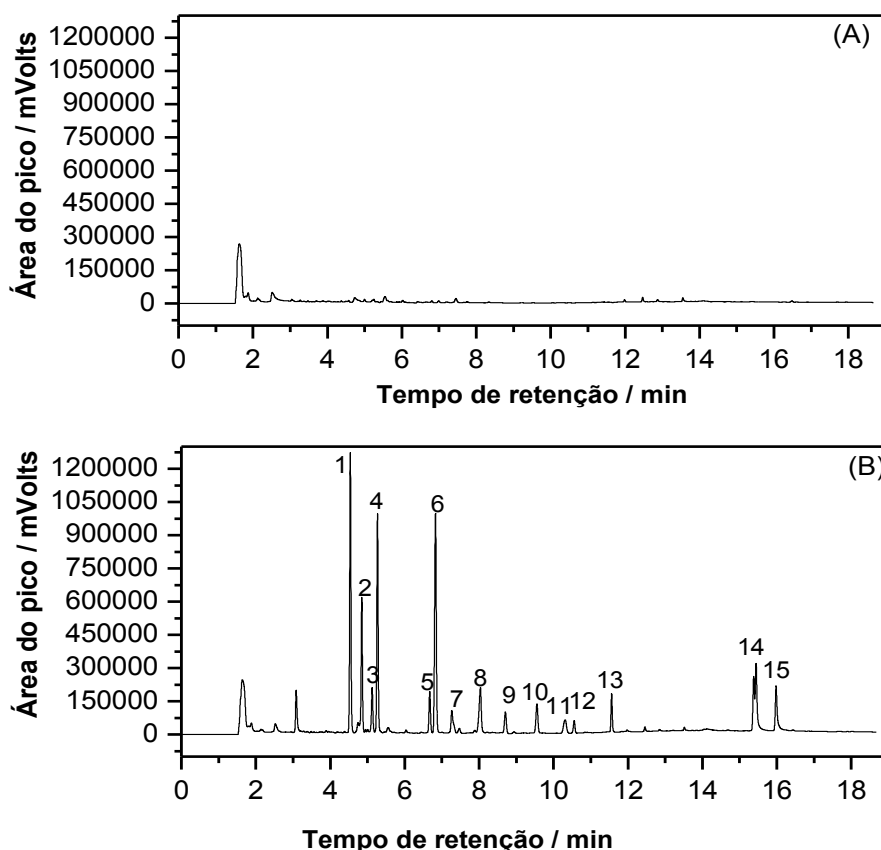


Figura 23. Cromatogramas de extratos de amostra de solo submetidas à SLE-DLLME/LDS (a) sem fortificação; (b) fortificada. As condições cromatográficas foram descritas em Material e métodos. (1) Hexaclorobenzeno ($937 \mu\text{g kg}^{-1}$); (2) Lindano ($12 \mu\text{g kg}^{-1}$); (3) Disulfotom ($312 \mu\text{g kg}^{-1}$); (4) Clorotalonil ($125 \mu\text{g kg}^{-1}$); (5) Aldrin ($125 \mu\text{g kg}^{-1}$); (6) Clorpirifós ($625 \mu\text{g kg}^{-1}$); (7) Tiametoxam ($1562 \mu\text{g kg}^{-1}$); (8) Triadimenol ($937 \mu\text{g kg}^{-1}$); (9) Endosulfam I ($31 \mu\text{g kg}^{-1}$); (10) Dieldrin ($16 \mu\text{g kg}^{-1}$); (11) Ciproconazol ($1562 \mu\text{g kg}^{-1}$); (12) Endosulfam II ($156 \mu\text{g kg}^{-1}$); (13) DDT ($62 \mu\text{g kg}^{-1}$); (14) Difenconazol ($469 \mu\text{g kg}^{-1}$); (15) Azoxistrobina ($78 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Comparando os dois cromatogramas (A e B) 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. Tais resultados comprovam a boa seletividade do método proposto.

A avaliação da linearidade foi estudada pela análise de amostras de solo fortificadas em diferentes concentrações e submetidas ao método de extração. As amostras foram fortificadas em concentrações correspondentes a LOQ; 2,5 LOQ; 5 LOQ; 7,5 LOQ; 10 LOQ e 25 LOQ para hexaclorobenzeno, clorpirifós, tiametoxam, triadimenol, ciproconazol e difenoconazol, além de 50 LOQ e 75 LOQ para lindano, disulfotom, clorotalonil, aldrin, endosulfam I e II, dieldrin, DDT e azoxistrobina). O método usado para quantificar as substâncias de interesse foi a padronização

externa. As curvas analíticas foram plotadas relacionando área do analito versus concentração do mesmo. Os parâmetros das curvas analíticas, as faixas lineares e os coeficientes de correlação (r) obtidos na validação do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP por GC/ECD são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Parâmetros das equações de regressão da linearidade do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo e análise por GC/ECD

Agrotóxicos	a	b	r	Faixa linear / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Hexaclorobenzeno	1.711	1.262.772	0,992	94 - 2344
Lindano	21.646	29.680	0,996	1 - 94
Disulfotom	337	17.488	0,995	31 - 2344
Clorotalonil	9.804	1.029.831	0,991	12,5 - 937,5
Aldrin	4.609	101.514	0,998	12,5 - 937,5
Clorpirifós	3.551	1.400.116	0,993	62,5 - 1562
Tiametoxam	46,8	110.339	0,994	156 - 3906
Triadimenol	167	86.969	0,995	94 - 2344
Endosulfam-I	6.502	15.771	0,999	3 - 469
Dieldrin	17.617	41.332	0,999	1,5 - 234
Ciproconazol	202	89.522	0,997	156 - 3906
Endosulfam-II	622	19.312	0,999	16 - 2344
DDT	3.346	98.510	0,997	6 - 937,5
Difenoconazol	1.885	249.668	0,996	47 - 2344
Azoxistrobina	4.613	92.267	0,996	8 - 1171,85

a= Inclinação; b= Intercepto; r= Coeficiente de correlação.

Pelos resultados da Tabela 29 verifica-se que os coeficientes de correlação variaram de 0,991 a 0,999. Como todos os valores de r obtidos foram superiores a 0,99 (ANVISA, 2003), o método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP é linear na faixa de concentração avaliada.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método sinal/ruído. Os resultados obtidos para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP são apresentados na Tabela 30. São apresentados também os valores orientadores para agrotóxicos em solos no estado de São Paulo de acordo com a legislação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005).

Tabela 30. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo e valores orientadores para agrotóxicos em solos no estado de São Paulo de acordo com CETESB (2005)

Agrotóxicos	LOD / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	VI (CETESB, 2005) / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
			Agrícola	Residencial	Industrial
Hexaclorobenzeno	28	94	5	100	1000
Lindano	0,4	1	20	70	1500
Disulfotom	9	31			
Clorotalonil	3,5	12,5			
Aldrin	3,5	12,5	3	10	30
Clorpirifós	19	62,5			
Tiametoxam	47	156			
Triadimenol	28	94			
Endosulfam-I	0,9	3			
Dieldrin	0,5	1,5	200	600	1300
Ciproconazol	47	156			
Endosulfam-II	5	16			
DDT	2	6	550	2000	5000
Difenoconazol	14	47			
Azoxistrobina	2	8			

LOD= Limite de detecção; LOQ= Limite de quantificação; VI= Valor de intervenção. CETESB= Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

Os valores de LOD do método variaram de 0,4 à 47 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de LOQ do método variaram de 1 à 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Valores semelhantes de LOD foram obtidos na determinação de agrotóxicos multiclases em diferentes matrizes: em trigo por QuEChERS-DLLME e GC-MS foram obtidos de 8 a 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CUNHA; FERNANDES, 2011), em tomate por QuEChERS-DLLME e GC-MS foram obtidos de 3 a 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MELO *et al.*, 2012).

Há uma dificuldade de se estabelecer valores-guia de elementos-traço e agrotóxicos para solos de todo o território nacional devido à grande extensão territorial, à diversificação dos ambientes e às diferenças geológicas que fazem com que certas regiões tenham teores naturalmente altos de elementos-traço. A CETESB estabeleceu, por meio de testes laboratoriais e pesquisas de campo, valores orientadores de elementos-traço e compostos orgânicos em solos e águas subterrâneas para o estado de São Paulo. Os valores de intervenção indicam o limite de contaminação acima do qual, existe risco à saúde humana, havendo necessidade de uma ação imediata na área e a adoção de medidas emergenciais,

utilizados em caráter corretivo. Quando excedido o valor de intervenção, requer-se alguma forma de intervenção na área avaliada, de forma a interceptar as vias de exposição, devendo ser efetuada a avaliação de risco caso a caso. O valor de intervenção foi subdividido em: agrícola, residencial e industrial.

Considerando os valores orientadores, mais restritamente, os valores de intervenção (VI) da CETESB (2005), pode-se perceber que a maioria dos agrotóxicos não é contemplada pela legislação vigente. Dos agrotóxicos contemplados, verificou-se que com exceção de hexaclorobenzeno e aldrin, o valor de LOQ ficou abaixo do limite estabelecido pela legislação para áreas agrícolas, mostrando que SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP é eficiente para extração e análise de traço de resíduo de agrotóxicos em amostras de solo agrícola. Vale destacar que, para áreas residencial e industrial, o método atende perfeitamente a legislação paulista.

A exatidão foi avaliada por testes de recuperação. Amostras de solo foram fortificadas com soluções padrão contendo os 15 agrotóxicos em três níveis de concentração, com seis replicatas para cada nível. As amostras de solo fortificadas foram submetidas ao método de extração SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. Para quantificação utilizaram-se as curvas analíticas em tolueno e superposição de matriz para calcular a recuperação do método e a recuperação relativa, respectivamente. Os resultados de recuperação e recuperação relativa são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31. Recuperações de agrotóxicos em amostras de solo fortificadas e extraídas por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP

Agrotóxicos	NF1			NF2			NF3		
	C	R	RR	C	R	RR	C	R	RR
Hexaclorobenzeno	94	7	81	469	6	105	937,5	6	117
Lindano	1	41	106	6	41	97	12,5	42	97
Disulfotom	31	11	85	156	24	96	312,5	25	98
Clorotalonil	12,5	34	76	62,5	26	101	125	23	98
Aldrin	12,5	9	82	62,5	10	86	125	11	101
Clorpirifós	62,5	21	78	312,5	18	104	625	15	94
Tiametoxam	156	6	108	781	2	108	1562,5	1	104
Triadimenol	94	28	71	469	23	92	937,5	19	89
Endosulfam-I	3	7	73	16	21	100	31	21	96
Dieldrin	1,5	22	74	8	27	100	16	25	94
Ciproconazol	156	33	78	781	28	90	1562,5	25	88
Endosulfam-II	16	7	95	78	6	106	156	5	97
DDT	6	14	74	31	14	96	62,5	13	103
Difenoconazol	47	44	110	234	39	109	469	33	93
Azoxistrobina	8	49	100	39	48	109	78	45	105

NF= Nível de fortificação; C= Concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$; R= Recuperação (n=6); RR= Recuperação relativa (n=6).

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que no primeiro nível de fortificação (LOQ) as recuperações do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP para os 15 agrotóxicos avaliados variaram de 6 a 49%. No segundo nível de fortificação (5 LOQ) foram obtidos valores de recuperação entre 2 e 48%. No terceiro nível foram obtidos valores entre 1 e 45%. Valores de recuperação, também denominado eficiência de extração, abaixo de 70% para a maioria dos analitos, foram obtidos na determinação de clorofenóis em amostras de água por SPE-DLLME e GC/ECD (FATTAHI *et al.*, 2007b), na determinação de 5 piretroides em amostras de óleos vegetais por LLE-DLLME e GC/FID ou GC/MS (FARAJZADEH *et al.*, 2014) e na determinação de 5 piretroides em sucos de frutas e uvas fresca por LLE-DLLME e GC-FID (FARAJZADEH; KHOSH MARAM, 2014). A recuperação de carbendazim e tiabendazol em amostras de solo por DLLME e HPLC-Flu variaram entre 51 e 71% (WU *et al.*, 2009a).

Em muitos trabalhos que utilizam a técnica microextração DLLME (FATTAHI *et al.*, 2007a; FATTAHI *et al.*, 2007b; WANG *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2009a; HU *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009b; LIU *et al.*, 2010; LIU; MIN, 2012; GE; LEE, 2013; WANG *et al.*, 2014c; XUE *et al.*, 2014), tem-se verificado a apresentação da recuperação relativa em vez de eficiência do método. Desta maneira, a quantidade do analito na fase extratora tem sido determinada pela curva de superposição de matriz e não pela curva em solvente e os valores de recuperação obtidos estão entre 70-120%. Neste trabalho, os resultados obtidos foram semelhantes, para o primeiro (LOQ), segundo (5 LOQ) e terceiro nível (10 LOQ) de fortificação, os valores ficaram entre 71-110%, 86-109% e 88-117%, respectivamente.

A precisão do método em termos de repetitividade foi avaliada usando desvio padrão relativo (RSD) de replicatas (n=6) obtidas em três níveis de fortificação. Para determinação da repetitividade foi realizada a fortificação de amostras de solo com quantidades adequadas da solução padrão contendo os 15 agrotóxicos em três níveis de concentração (1, 5 e 10 LOQ). As amostras fortificadas foram submetidas ao método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD. Os resultados de RSD obtidos são apresentados na Tabela 32. O estudo da precisão intermediária foi realizado nas mesmas condições que o de repetitividade, porém em três dias não consecutivos, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. A Tabela 32 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 32. Desvios padrão relativo para avaliação da repetitividade (n=6) e precisão intermediária (n=18) dos agrotóxicos extraídos de amostras de solo pelo método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP empregando GC/ECD

Agrotóxicos	Concentração da amostra / ug kg ⁻¹			RSD _{Rep} (n=6) / %			RSD _{PI} (n=18) / %		
	NF1	NF2	NF3	NF1	NF2	NF3	NF1	NF2	NF3
Hexaclorobenzeno	94	469	937,5	18	16	14	19	15	19
Lindano	1	6	12,5	12	8	16	18	9	15
Disulfotom	31	156	312,5	8	7	9	18	10	17
Clorotalonil	12,5	62,5	125	3	5	5	13	9	11
Aldrin	12,5	62,5	125	8	11	13	9	1	12
Clorpirifós	62,5	312,5	625	6	4	10	11	8	7
Tiametoxam	156	781	1562,5	4	4	6	19	17	15
Triadimenol	94	469	937,5	6	5	6	2	4	6
Endosulfam-I	3	16	31	10	8	18	13	11	11
Dieldrin	1,5	8	16	9	6	18	7	11	10
Ciproconazol	156	781	1562,5	6	6	9	1	5	7
Endosulfam-II	16	78	156	15	8	5	8	10	3
DDT	6	31	62,5	5	10	6	7	10	6
Difenoconazol	47	234	469	7	8	11	18	13	5
Azoxistrobina	8	39	78	7	6	4	19	11	12

NF= Nível de fortificação; RSD_{Rep}= Desvio padrão relativo para repetitividade; RSD_{PI}= Desvio padrão relativo para precisão intermediária.

Os valores de RSD obtidos na avaliação da repetitividade variaram de 3 a 18%, 4 a 16% e 4 a 18% para o primeiro, segundo e terceiro nível de concentração, respectivamente. Na avaliação da precisão intermediária, os valores de RSD obtidos para os três níveis de fortificação avaliados foram de 1 a 19%, 1 a 17% e 3 a 19%, para o primeiro, segundo e terceiro nível de concentração, respectivamente. Pelos resultados apresentados, pode-se verificar a boa precisão do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP, uma vez que, RSD foi inferior a 20% para todos os agrotóxicos estudados, nos três níveis de fortificação avaliados, tanto repetitividade quanto para precisão intermediária conforme recomendação para validação de métodos cromatográficos (RIBANI *et al.*, 2004).

Para o desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz (ME) na análise cromatográfica devem ser levados em consideração. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro (solução padrão) e a outra em extratos de amostra de solo (obtidos após submeter as amostras ao método de extração). O efeito de matriz foi avaliado pela

relação entre as inclinações (a , inclinação) das curvas analíticas obtidas no extrato da matriz (livre de agrotóxicos) e no solvente, o qual foi multiplicado e em seguida subtraído por 100 (CALDAS *et al.*, 2011; CUNHA; FERNANDES, 2011; XUE *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014b). Os resultados obtidos para o método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP são apresentados na Tabela 33. Em seguida, todos os analitos foram classificados em cinco grupos ($< -50\%$; -50% a -20% ; $\pm 20\%$; 20% a 50% e $>50\%$) de acordo com o aumento ou diminuição da sensibilidade, para isso, realizou-se a subtração da resposta obtida no cálculo do efeito de matriz por 100 (resposta esperada). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

Tabela 33. Efeito de matriz (ME) das amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD

Agrotóxicos	a_{CS}	a_{CE}	ME
Hexaclorobenzeno	1.598	924	-42
Lindano	1.406	805	-43
Disulfotom	36	23	-35,5
Clorotalonil	2.266	1.365	-40
Aldrin	1.306	743	-43
Clorpirifós	924	565	-4
Tiametoxam	385	250	-35
Triadimenol	28	19	-33
Endosulfam-I	671	410	-39
Dieldrin	1.829	1.061	-42
Ciproconazol	22	12	-44
Endosulfam-II	309	182	-41
DDT	797	384	-52
Difenoconazol	149	85	-43
Azoxistrobina	238	154	-35

a_{CS} = Inclinação da curva analítica em tolueno; a_{CE} = Inclinação da curva analítica em extrato de solo; ME= Efeito de matriz.

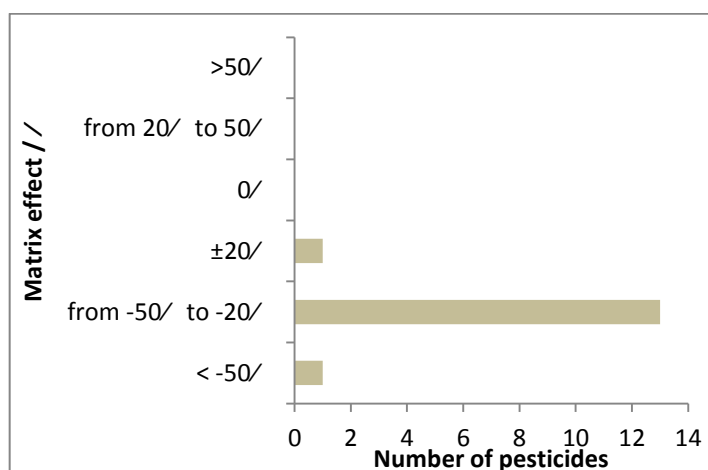


Figura 24. Distribuição dos 15 agrotóxicos de acordo com o efeito de matriz do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP em amostras de solo.

Como pode ser observado na Tabela 33, o efeito de matriz obtido na extração multiresíduo de agrotóxicos de amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP variou de 48 a 96%. Para todos os agrotóxicos analisados, foi verificado um efeito de matriz negativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinho et al (2010) e Sousa et al. (2012).

A maioria dos agrotóxicos avaliados neste estudo (87%) sofre um efeito de matriz com supressão média da resposta cromatográfica (-20 a -50%). Supressão suave foi verificada para clorpirifós (-4% de supressão) e alta supressão no sinal cromatográfico foi observada para DDT (-52% de supressão). Efeito de matriz negativo (-43 a 5%) também foi verificado por Caldas et al (2011) na extração de 5 agrotóxicos de amostras de solo por QuEChERS. Segundo Sousa et al. (2012), isto ocorre porque a matriz solo é rica em matéria orgânica, compostos de alta massa molar, os quais formam novos sítios ativos no *liner* para que os analitos se liguem (SOUSA *et al.*, 2012). Desta maneira, a resposta dos analitos na matriz será menor que a resposta dos analitos em solvente, favorecendo o efeito de matriz negativo.

Para minimizar esta influência, na quantificação dos agrotóxicos, o melhor procedimento é a utilização de curvas analíticas preparadas no extrato da matriz branca (PINHO *et al.*, 2009). Alguns trabalhos relataram a utilização da curva preparada com a matriz fortificada (curva superposição de matriz) para minimizar o efeito de matriz (CALDAS *et al.*, 2011; CUNHA; FERNANDES, 2011; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2014). Assim, tendo em vista o efeito de matriz significativo encontrado para a maioria dos agrotóxicos, a

curva superposição de matriz foi utilizada para a quantificação dos agrotóxicos em amostras de solo para corrigir efeitos de matriz provocados pelos co-extrativos da matriz.

Nas condições otimizadas o fator de enriquecimento foi investigado pela análise de 3 níveis de fortificação de amostras de solo para avaliar o método proposto SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. O método otimizado foi empregado na extração e análise de 54 amostras de solo contendo os 15 agrotóxicos nas mesmas condições em que foi avaliada a precisão intermediária. As amostras de solo foram fortificadas em 3 níveis de concentração (1, 5 e 10 LOQ). Cada nível de fortificação foi preparado em sextuplicatas em 3 diferentes dias. As quantificações foram realizadas utilizando a curva analítica preparada em tolueno, cujos parâmetros foram apresentados anteriormente. Os valores médios de EF, bem como seus desvios padrão (DP) e desvios padrão relativos (RSD) obtidos são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34. Fatores de enriquecimento (EF) obtidos para 15 agrotóxicos em amostras de solo submetidas ao método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e GC/ECD

Agrotóxicos	EF (n=54)	DP	RSD
Hexaclorobenzeno	6	0,4	18
Lindano	21	12	11
Disulfotom	14	0,9	9
Clorotalonil	17	2	18
Aldrin	3	0,6	15
Clorpirifós	9	1	14
Tiametoxam	1,5	0,2	19
Triadimenol	18	2	19
Endosulfam-I	11,5	0,7	9
Dieldrin	9	1	10
Ciproconazol	20	2	17
Endosulfam-II	12,5	0,5	20
DDT	9	0,3	6
Difenoconazol	16	2	11
Azoxistrobina	24,5	2	10

EF= Fator de enriquecimento; DP= Desvio padrão; RSD= Desvio padrão relativo.

Como pode-se observar, o fator de enriquecimento do método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP variou de 1,5 (para o tiametoxam) a 24,5 (para azoxistrobina). Até a presente data, não foi encontrado na literatura, um método de determinação de agrotóxicos multiclasse em solo empregando DLLME combinado com outra técnica

de preparo de amostras que apresentasse EF para comparação dos resultados. Entretanto, a combinação de DLLME com outras técnicas de preparo de amostras para determinação de uma classe de agrotóxicos em matrizes complexas tem sido encontrada na literatura com resultados ligeiramente maiores que os obtidos neste trabalho. A combinação de QuEChERS e DLLME para determinação de 10 agrotóxicos piretroides em sucos de frutas obteve EF na faixa 16-26 (ZHANG *et al.*, 2014b). Extração em fase sólida dispersiva assistida por ultrassom (UA-DSPE) combinada com DLLME/LDS na determinação de 6 agrotóxicos organofosforado em solo obteve EF na faixa de 22-35 (WANG *et al.*, 2014c).

Sob condições otimizadas, foram comparados os métodos SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e SLE/LTP-DLLME/LDS. Os resultados de recuperação e fator de enriquecimento obtidos para ambos os métodos são apresentados na Tabela 35.

Tabela 35. Comparação da recuperação e do fator de enriquecimento obtidos na análise de agrotóxicos multiclasse em amostras de solo por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e por SLE/LTP-DLLME/LDS

Agrotóxicos	SLE/LTP-DLLME/LDS		SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP	
	R (n=4)/ %	EF (n=4)	R (n=6) / %	EF (n=6)
Hexaclorobenzeno	8	0,5	6	5
Lindano	41	3	41	21
Disulfotom	6	0,4	24	14
Clorotalonil	63	6	26	17
Aldrin	3	2	10	3
Clorpirifós	33	2	18	8
Tiametoxam	6	0,4	2	1
Triadimenol	6	0,4	23	17
Endosulfam-I	14	0,9	21	11
Dieldrin	9	0,5	27	10
Ciproconazol	7	0,5	28	18
Endosulfam-II	30	2	6	12
DDT	61	4	13	9
Difenoconazol	27	2	39	16
Azoxistrobina	55	7	48	24

R= Recuperação; EF= Fator de enriquecimento.

O novo método proposto SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP difere do convencional (SLE/LTP-DLLME/LDS) em duas etapas: na evaporação do extrato orgânico obtido de SLE/LTP e também na partição de fases da DLLME/LDS, o primeiro utiliza 25 min de partição em baixa temperatura e o último 5 min de centrifugação. Comparando a

recuperação dos dois métodos, pode-se perceber que para 47% dos compostos a recuperação dos analitos submetido ao novo método diminui. Isto se deve provavelmente pela volatilização dos compostos mais voláteis. Para outros 47%, a recuperação aumenta e, para o lindano, a recuperação é semelhante nos dois métodos de extração. Entretanto, comparando o fator de enriquecimento, pode-se perceber que o mesmo aumenta significativamente para todos os compostos com a utilização do novo método. Isto porque o novo método utiliza todo o extrato orgânico recuperado na primeira etapa da extração. Desta maneira, os resultados indicam que a etapa de evaporação do extrato orgânico obtido da SLE/LTP é necessária para aumentar a sensibilidade do método de extração de agrotóxicos multiclasse em amostras de solo.

O novo método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP pode ser empregado para determinação simultânea de diferentes classes de agrotóxicos (organoclorados, organofosforados, ciclodienos, estrubilurina, cloronitrila, neonicotinoide e triazóis). O método é simples, linear, exato, preciso, utiliza pouca quantidade de solvente orgânico e apresenta bom fator de enriquecimento de maneira a permitir a utilização deste para análise traço de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo.

3.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO

Amostras de solo (n=24) coletadas em áreas agrícolas da microbacia do rio Manhuaçu foram extraídas por SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP e analisadas por GC/ECD. As amostras foram coletadas em áreas agrícolas sob cultivo de café (exceção dos pontos 1, 4 e 5) no período de março de 2012 a março de 2013. Para quantificação das amostras foi utilizado a curva superposição de matriz cujos parâmetros analíticos foram apresentados na Tabela 29. As amostras foram preparadas em triplicatas. Não foram detectados, nas amostras analisadas, nenhum dos agrotóxicos estudados. A Figura 25 apresenta os cromatogramas obtidos pela injeção no GC/ECD de extratos de amostras de solo coletadas em março de 2013.

Comparando os tempos de retenção dos analitos adicionados às amostras com solução padrão em tolueno, não foram verificados picos coincidentes. Entretanto, destaca-se a presença de um composto em concentração significativa no solo coletado no ponto 7, cujo tempo de retenção é 12,8 min.

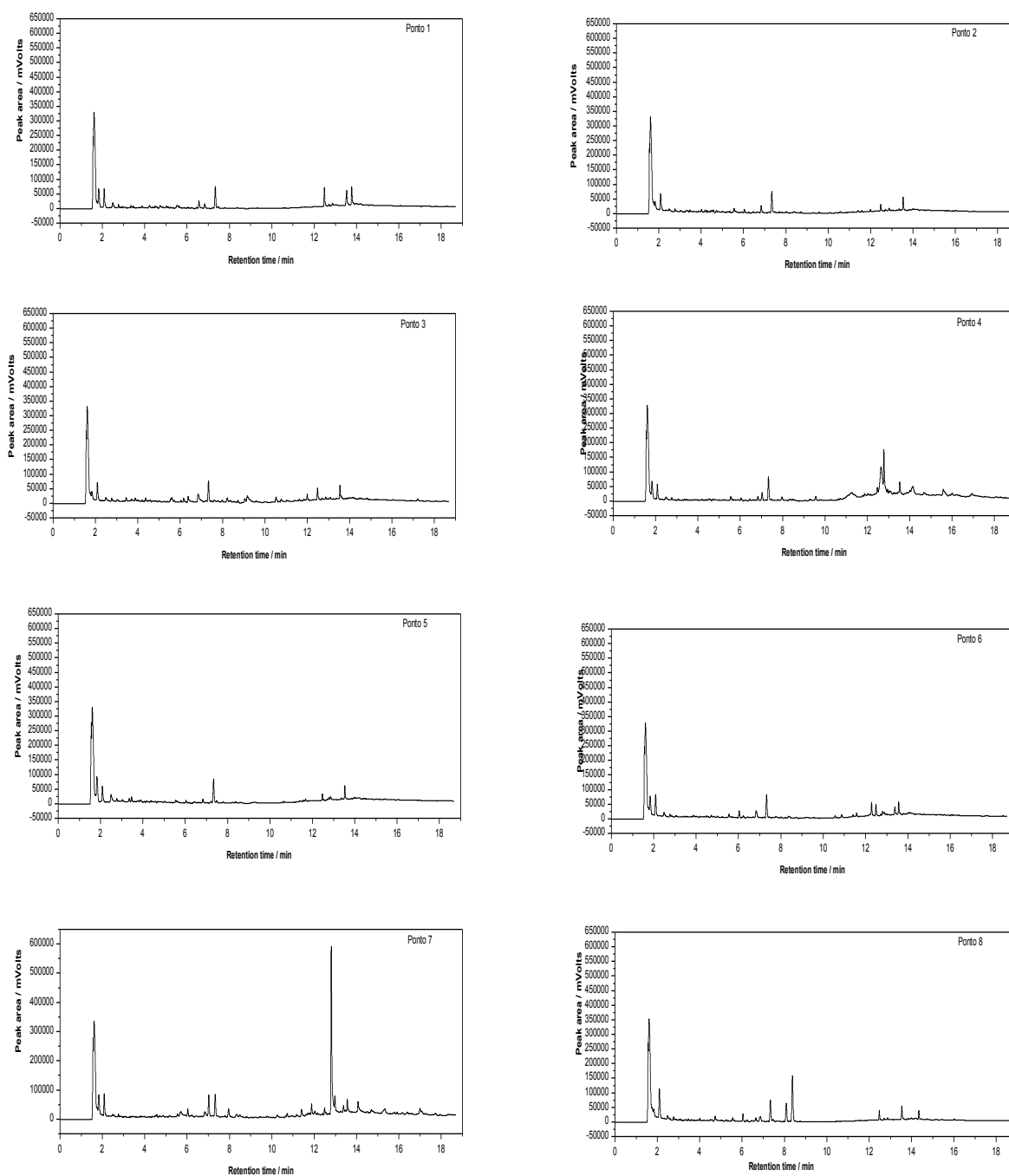


Figura 25. Cromatogramas obtidos por GC/ECD para extratos de amostras de solo coletadas na microbacia do rio Manhuaçu em março de 2013 e submetidas ao SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP. Condições de extração: quantidade de amostra: 4 g; Volume de solvente extrator 1: 12 mL (acetone:água, 1:2); tempo de agitação: 1 min em vórtex; tempo de partição em baixa temperatura (-20 °C): 2 h; Evaporação a 35 °C e recuperação em água: 5 mL; volume da mistura de solventes acetona:tolueno (8:1): 1,20 mL; tempo de extração: 1 min; tempo de partição em baixa temperatura (-20 °C): 25 min.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, o método SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP-GC/ECD foi satisfatoriamente desenvolvido para a extração e determinação de 15 agrotóxicos multiclases em amostras de solo de áreas agrícolas. O método desenvolvido é simples, linear, exato, preciso, efetivo, tem características ambientalmente amigáveis e apresenta bom fator de enriquecimento de maneira a permitir a utilização deste para análise traço de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo.

CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos LLE/LTP e DLLME/LDS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em águas superficiais e residuária e SLE/LTP-DLLME/LDS/LTP em amostras de solos atenderam aos requisitos básicos de validação. Os métodos mostraram-se simples, rápidos, com número reduzido de etapas, seletivos, precisos e exatos. Nenhum dos agrotóxicos monitorados foi detectado nas amostras de solo e águas superficiais e residuárias nos períodos avaliados.

Ferro, manganês e chumbo foram encontrados em amostras de águas superficiais em concentrações acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira.

Com este estudo, pode-se verificar que a região em estudo mesmo sendo de grande importância para o cenário agrícola nacional, ainda não apresenta impactos ambientais severos em relação aos agrotóxicos e metais avaliados.

Por fim, destaca-se que a principal novidade deste trabalho está no desenvolvimento de um novo método analítico para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de solo. O novo método baseou-se na hifenação de SLE/LTP e DLLME/LDS-PBT. Pela primeira vez, a etapa de centrifugação do método DLLME/LDS foi substituída pelo abaixamento da temperatura (LTP) para acelerar a separação de fases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, F.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, S. M. R. M.; REZAEI, M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 307-312, 2006.

ALAMDAR, A.; SYED, J. H.; MALIK, R. N.; KATSOYIANNIS, A.; LIU, J.; LI, J.; ZHANG, G.; JONES, K. C. Organochlorine pesticides in surface soils from obsolete pesticide dumping ground in Hyderabad City, Pakistan: Contamination levels and their potential for air-soil exchange. **Science of The Total Environment**, v. 470-471, p. 733-741, 2014.

ALBASEER, S. S.; RAO, R. N.; SWAMY, Y. V.; MUKKANTI, K. In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatographic determination of synthetic pyrethroids in surface water. **Journal of Analytical Science & Technology**, v. 3, p. 113-120, 2012.

ALMEIDA, C.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, p. 380-388, 2012.

ALPENDURADA, M. D. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14, 2000.

ALVES, A. C. H.; GONÇALVES, M. M. P. B.; BERNARDO, M. M. S.; MENDES, B. S. Dispersive liquid-liquid microextraction of organophosphorous pesticides using nonhalogenated solvents. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 2653-2658, 2012.

ALVES, A. R.; RODRIGUES, A.; BARROS, E. P.; UEKANE, T.; BIZZO, H.; REZENDE, C. Determination of Pesticides Residues in Brazilian Grape Juices Using GC-MS-SIM. **Food Analytical Methods**, v., p. 1-6, 2014a.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013a.

_____. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, p. 65-71, 2014b.

ALVES, R. I. D. S.; CARDOSO, O. D. O.; TONANI, K. A. D. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Water quality of the Ribeirão Preto Stream, a watercourse under anthropogenic influence in the southeast of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1151-1161, 2013b.

ALVES, R. I. S.; SAMPAIO, C. F.; NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Metal concentrations in surface water and sediments

from Pardo River, Brazil: Human health risks. **Environmental Research**, v. 133, p. 149-155, 2014c.

ANDRADE, A. S.; QUEIROZ, V. T.; LIMA, D. T.; DRUMOND, L. C. D.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do Alto Paranaíba - MG. **Química Nova**, v. 34, p. 1129-1135, 2011.

ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; D'ANTONINO, L.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FRANÇA, A. C.; FELIPE, R. S.; VICTORIA FILHO, R. Lixiviação do ametryn em Argissolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Vermelho-Amarelo, com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, v. 28, p. 655-663, 2010.

ANJOS, J. P.; ANDRADE, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 112, p. 119-126, 2014.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE nº 899, 29 de maio de 2003. ANVISA. Brasil. 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de informações sobre agrotóxicos**. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em 23 jun. 2012.

APARICIO, V. C.; DE GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, p. 1866-1873, 2013.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2005, 1368 p.

ARROYO-MANZANARES, N.; GAMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPANA, A. M. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 135, p. 368-372, 2012.

ARROYO-MANZANARES, N.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; GAMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 11-19, 2013.

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

ASSOUMANI, A.; MARGOUM, C.; CHATAING, S.; GUILLEMAIN, C.; COQUERY, M. Use of passive stir bar sorptive extraction as a simple integrative sampling technique

of pesticides in freshwaters: Determination of sampling rates and lag-phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1333, p. 1-8, 2014.

AYDIN, M. E.; TOR, A.; ÖZCAN, S. Determination of selected polychlorinated biphenyls in soil by miniaturised ultrasonic solvent extraction and gas chromatography-mass-selective detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, p. 232-237, 2006.

BABIĆ, S.; PETROVIĆ, M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 3-9, 1998.

BAKOURI, H.; AASSIRI, A.; MORILLO, J.; USERO, J.; KHADDOR, M.; OUASSINI, A. Pesticides and lipids occurrence in Tangier agricultural soil (northern Morocco). **Applied Geochemistry**, v. 23, p. 3487-3497, 2008.

BARBOSA, É. S.; EVANGELISTA, G. F.; PIMENTA, E. M.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. D. Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. **Química Nova**, v. 37, p. 404-410, 2014.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 11-20, 2003.

BEHBAHANI, M.; NAJAFI, F.; BAGHERI, S.; BOJDI, M. K.; HASSANLOU, P. G.; BAGHERI, A. Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 2609-2618, 2014.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 1-9, 2006.

BIDARI, A.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1840-1844, 2011.

BIPARVA, P.; EHSANI, M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 87-94, 2012.

BIRJANDI, A. P.; BIDARI, A.; REZAEI, F.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 19-25, 2008.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, p. 1860-1869, 2013.

BRASIL. Portaria do Ministério da Saúde. Portaria nº 2914/2011, 12 Dez. 2011. Brazil. 2011.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P. D.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11918-11926, 2011.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, p. 808-813, 2002.

CARLOS, E. A.; ALVES, R. D.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1217-1227, 2013.

CETESB. Decisão de Diretoria nº195/2005-E. 23 nov. 2005. CETESB. 2005.

_____. **Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade**. ed. São Paulo: CETESB, 2013, cap. Apêndice C, p. 1-36.

CHAND, V.; PRASAD, S. ICP-OES assessment of heavy metal contamination in tropical marine sediments: A comparative study of two digestion techniques. **Microchemical Journal**, v. 111, p. 53-61, 2013.

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

CHEMSPIDER. **Database of chemical structures and property predictions**. 2012. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em 18 jun. 2012.

CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1244-1248, 2010.

CHEN, L.; YIN, L.; SONG, F.; LIU, Z.; ZHENG, Z.; XING, J.; LIU, S. Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra

high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 917–918, p. 71-77, 2013.

CHIBA, W. A. C.; PASSERINI, M. D.; TUNDISI, J. G. Metal contamination in benthic macroinvertebrates in a sub-basin in the southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 391-399, 2011.

CHO, S.-K.; ABD EL-ATY, A. M.; PARK, K. H.; PARK, J.-H.; ASSAYED, M. E.; JEONG, Y.-M.; PARK, Y.-S.; SHIM, J.-H. Simple multiresidue extraction method for the determination of fungicides and plant growth regulator in bean sprouts using low temperature partitioning and tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1414-1420, 2013.

CID, F. D.; ANTÓN, R. I.; CAVIEDES-VIDAL, E. Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. **Science of The Total Environment**, v. 385, p. 86-96, 2007.

CONAMA. Resolução nº 357. 18 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005.

_____. Resolução nº430/2011. Conselho Nacional do meio ambiente. 2011.

CORBI, J. J.; FROELICH, C. G.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; SANTOS, A. D. Evaluating the use of predatory insects as bioindicators of metals contamination due to sugarcane cultivation in neotropical streams. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, p. 545-554, 2011.

CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A. D.; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, p. 61-65, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 569-579, 2008.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; SANTOS, A. D. Environmental evaluation of metals in sediments and dragonflies due to sugar cane cultivation in neotropical streams. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 195, p. 325-333, 2008.

CRUZ, S.; LINO, C.; SILVEIRA, M. I. Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. **Science of The Total Environment**, v. 317, p. 23-35, 2003.

CUI, C.; HE, M.; HU, B. Membrane solid phase microextraction with alumina hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese and nickel in environmental water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 379-385, 2011.

CUNHA, S. C.; ALMEIDA, C.; MENDES, E.; FERNANDES, J. O. Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant

formula by dispersive liquid-liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 28, p. 513-526, 2011.

CUNHA, S. C.; CUNHA, C.; FERREIRA, A. R.; FERNANDES, J. O. Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining QuEChERS extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2453-2463, 2012.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS). **Talanta**, v. 83, p. 117-125, 2010.

_____. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7748-7757, 2011.

_____. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Control**, v. 33, p. 549-555, 2013.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8835-8844, 2009.

DAI, L.; CHENG, J.; MATSADIQ, G.; LIU, L.; LI, J.-K. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet for the determination of polychlorinated biphenyls in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 201-205, 2010.

DARDENGO, R. P.; GOULART, S. M.; NEVES, A. A.; REIS, C.; ZAMBOLIM, L.; QUEIROZ, M. E. L. R. Pesticide residues analysis in potatoes by gas chromatography. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, p. 136-142, 2011.

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**, v. 39, p. 4204-4210, 2005.

Emater-MG no Simpósio sobre cafeicultura de montanha em Manhuaçu. 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas2&id=13305#U8_JB_IdWK>. Acesso em 23 jul. 2014.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997, 212 p.

ESCUADERO, L. A.; CERUTTI, S.; OLSINA, R. A.; SALONIA, J. A.; GASQUEZ, J. A. Factorial design optimization of experimental variables in the on-line separation/preconcentration of copper in water samples using solid phase extraction and ICP-OES determination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, p. 218-223, 2010.

EZAKI, S.; HYPOLITO, R.; PÉREZ-AGUILAR, A.; MOSCHINI, F. A. Avaliação da qualidade das águas e sedimentos na microbacia hidrográfica do Córrego do Ajudante, Salto (SP). **Geociências**, v. 30, p. 415-430, 2011.

FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM, M.; MEHR, B. G.; JÖNSSON, J. Å. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of copper (II) by atomic absorption spectrometry as its oxinate chelate: Application to determination of copper in different water samples. **Talanta**, v. 75, p. 832-840, 2008.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D.; BAKHTIYARI, R. F. Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid-liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography-flame ionization detection. **Talanta**, v. 81, p. 1360-1367, 2010.

FARAJZADEH, M. A.; KHOSHMARAM, L. Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionisation detection: A fast and simple method for the assessment of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices samples. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1881-1887, 2013.

_____. A rapid and sensitive method for the analysis of pyrethroid pesticides using the combination of liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 9999, p. 1-8, 2014.

FARAJZADEH, M. A.; KHOSHMARAM, L.; NABIL, A. A. A. Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p. 128-135, 2014.

FARAJZADEH, M. A.; SEYEDI, S. E.; SHALAMZARI, M. S.; BAMOROWAT, M. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3191-3200, 2009.

FARIA, A. L. L. D.; SANTOS, E. E. D.; FERNANDES FILHO, E. I.; CERQUEIRA, M. D. S.; SCHAEFER, C. E. G. R. Relatório final do projeto enchentes - A bacia hidrográfica do rio Manhuaçu - Manhuaçu (MG): Uma análise das áreas susceptíveis à erosão. **Revista de Geografia, Recife: UFPE**, v. especial, p., 2010.

FATTAHI, N.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; JAHROMI, E. Z. Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 23-29, 2007a.

- FATTAHI, N.; SAMADI, S.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 63-69, 2007b.
- FONT, N.; HERNÁNDEZ, F.; HOGENDOORN, E. A.; BAUMANN, R. A.; VAN ZOONEN, P. Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 798, p. 179-186, 1998.
- FORERO-MENDIETA, J. R.; CASTRO-VARGAS, H. I.; PARADA-ALFONSO, F.; GUERRERO-DALLOS, J. A. Extraction of pesticides from soil using supercritical carbon dioxide added with methanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 68, p. 64-70, 2012.
- FREIRE, C.; KOIFMAN, R. J.; SARCINELLI, P.; ROSA, A. C.; CLAPAUCH, R.; KOIFMAN, S. Long term exposure to organochlorine pesticides and thyroid function in children from Cidade dos Meninos, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 117, p. 68-74, 2012.
- FREIRE, C.; KOIFMAN, R. J.; SARCINELLI, P. N.; ROSA, A. C. S.; CLAPAUCH, R.; KOIFMAN, S. Association between serum levels of organochlorine pesticides and sex hormones in adults living in a heavily contaminated area in Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, p. 370-378, 2014.
- FREIRE, C.; KOIFMAN, R. J.; SARCINELLI, P. N.; SIMÕES ROSA, A. C.; CLAPAUCH, R.; KOIFMAN, S. Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. **Environmental Research**, v. 127, p. 7-15, 2013.
- FREITAS, R. D. S. D.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; FARONI, L. R. D. A.; HELENO, F. F.; MOURA, V. V. D. Desenvolvimento do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de inseticidas em grãos de milho ozonizados. **Química Nova**, v. 37, p. 238-243, 2014.
- FRIESE, K.; SCHMIDT, G.; LENA, J. C.; ARIAS NALINI JR, H.; ZACHMANN, D. W. Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake – The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 40, p. 114-125, 2010.
- FU, L.; LIU, X.; HU, J.; ZHAO, X.; WANG, H.; HUANG, C.; WANG, X. Determination of two pesticides in soils by dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 70, p. 1697-1701, 2009a.
- FU, S.; CHENG, H.-X.; LIU, Y.-H.; XU, X.-B. Levels and distribution of organochlorine pesticides in various media in a mega-city, China. **Chemosphere**, v. 75, p. 588-594, 2009b.
- FUENTES, E.; BÁEZ, M. E.; LABRA, R. Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 40-46, 2007.

GAI, N.; PAN, J.; TANG, H.; CHEN, S.; CHEN, D.; ZHU, X.; LU, G.; YANG, Y. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in surface soils from Ruoergai high altitude prairie, east edge of Qinghai-Tibet Plateau. **Science of The Total Environment**, v. 478, p. 90-97, 2014.

GARCÍA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1166, p. 9-15, 2007.

GE, D.; LEE, H. K. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with micro-solid phase extraction of antidepressant drugs from environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1317, p. 217-222, 2013.

GERÓNIMO, E. D.; APARICIO, V. C.; BÁRBARO, S.; PORTOCARRERO, R.; JAIME, S.; COSTA, J. L. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. **Chemosphere**, v. 107, p. 423-431, 2014.

GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S. B.; AIZPÚN, J. E.; ISLA, F. I.; PEÑA, A. Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). **Chemosphere**, v. 81, p. 351-358, 2010.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. D.; ASSIS, T. C. D.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, p. 41-47, 2010.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; PAULA, W. X. D.; QUEIROZ, J. H. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Determination of Carbamates in Beverages by Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1154-1165, 2012.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. D. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.

GOWD, S. S.; GOVIL, P. K. Distribution of heavy metals in surface water of Ranipet industrial area in Tamil Nadu, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 136, p. 197-207, 2008.

GUO, L.; LEE, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5040-5046, 2011.

_____. Vortex-assisted micro-solid-phase extraction followed by low-density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction for the fast and efficient determination of phthalate esters in river water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 24-30, 2013.

HARGUINTEGUY, C. A.; CIRELLI, A. F.; PIGNATA, M. L. Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquia river (Argentina). **Microchemical Journal**, v. 114, p. 111-118, 2014.

HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; NEVES, A. A.; OLIVEIRA, A. F. D. Otimização, validação e aplicação de método para determinação da concentração residual de difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações. **Química Nova**, v. 37, p. 153-157, 2014.

HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters. **ELECTROPHORESIS**, v. 31, p. 3457-3465, 2010.

HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 130-137, 2013.

HILDEBRANDT, A.; GUILLAMON, M.; LACORTE, S.; TAULER, R.; BARCELO, D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). **Water Research**, v. 42, p. 3315-26, 2008.

HO, Y. M.; TSOI, Y. K.; LEUNG, K. S. Y. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 775, p. 58-66, 2013.

HOAI, P. M.; SEBESVARI, Z.; MINH, T. B.; VIET, P. H.; RENAUD, F. G. Pesticide pollution in agricultural areas of Northern Vietnam: Case study in Hoang Liet and Minh Dai communes. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 3344-3350, 2011.

HU, J.; FU, L.; ZHAO, X.; LIU, X.; WANG, H.; WANG, X.; DAI, L. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–electron capture detection for the determination of polychlorinated biphenyls in soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 640, p. 100-105, 2009.

HUANG, J.-X.; LU, D.-H.; WAN, K.; WANG, F.-H. Low temperature purification method for the determination of abamectin and ivermectin in edible oils by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 635-639, 2014.

HUI, L. L.; HEDLEY, A. J.; KYPKE, K.; COWLING, B. J.; NELSON, E. A. S.; WONG, T. W.; VAN LEEUWEN, F. X. R.; MALISCH, R. DDT levels in human milk in Hong Kong, 2001-02. **Chemosphere**, v. 73, p. 50-55, 2008.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), November 2005. International Conference on Harmonisation. Geneva. 2005.

IGAM. **Bacia hidrográfica do Rio Doce**. 2012. Disponível em: <<http://www.igam.mg.gov.br/geoprocessamento/mapas/155>>. Acesso em 24 set. 2012.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Brasil. 2010.

ITO, R.; USHIRO, M.; TAKAHASHI, Y.; SAITO, K.; OOKUBO, T.; IWASAKI, Y.; NAKAZAWA, H. Improvement and validation the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3714-3720, 2011.

IUPAC. **Pesticide properties database**. 2012. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/205.htm>>. Acesso em 18 jun. 2012.

JAHROMI, E. Z.; BIDARI, A.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; JAMALI, M. R. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 305-311, 2007.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JIANG, Y.-F.; WANG, X.-T.; JIA, Y.; WANG, F.; WU, M.-H.; SHENG, G.-Y.; FU, J.-M. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides in agricultural soil of Shanghai, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 989-997, 2009.

JUYBARI, M. B.; MEHDINIA, A.; JABBARI, A.; YAMINI, Y. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop followed by gas chromatography-electron capture detector for determination of some pesticides in water samples. **Chromatography Research International**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

KAMMERBAUER, J.; MONCADA, J. Pesticide residue assessment in three selected agricultural production systems in the Choluteca River Basin of Honduras. **Environmental Pollution**, v. 103, p. 171-181, 1998.

KAR, D.; SUR, P.; MANDAI, S. K.; SAHA, T.; KOLE, R. K. Assessment of heavy metal pollution in surface water. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 5, p. 119-124, 2008.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 113-119, 2011.

KOOTSTRA, P. R.; STRAUB, M. H. C.; STIL, G. H.; VAN DER VELDE, E. G.; HESSELINK, W.; LAND, C. C. J. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 123-129, 1995.

KOZANI, R. R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F.; HOSSEINI, M.-R. M.; JAMALI, M. R. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, v. 72, p. 387-393, 2007.

KREUZIG, R.; KOINECKE, A.; BAHADIR, M. Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 43, p. 403-409, 2000.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 135-142, 2001a.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; VISI, E. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 297-304, 2001b.

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

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

LEONG, M. I.; CHANG, C. C.; FUH, M. R.; HUANG, S. D. Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5455-5461, 2010.

LI, B.; ZENG, F.; DONG, Q.; CAO, Y.; FAN, H.; DENG, C. Rapid determination method for 12 pyrethroid pesticide residues in tea by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography. **Physics Procedia**, v. 25, p. 1776-1780, 2012.

LI, K.; LANDRIAULT, M.; FINGAS, M.; LLOMPART, M. Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 102, p. 93-104, 2003.

LI, L.; XU, Y.; PAN, C.; ZHOU, Z.; JIANG, S.; LIU, F. Simplified pesticide multiresidue analysis of soybean oil by low-temperature cleanup and dispersive solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 1387-1394, 2007a.

LI, L.; ZHANG, H.; PAN, C.; ZHOU, Z.; JIANG, S.; LIU, F. Multiresidue analytical method of pesticides in peanut oil using low-temperature cleanup and dispersive

solid phase extraction by GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2097-2104, 2007b.

LI, L.; ZHOU, Z.; PAN, C.; QIAN, C.; JIANG, S.; LIU, F. Determination of organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD. **Chromatographia**, v. 66, p. 625-629, 2007c.

LI, X.; XUE, A.; CHEN, H.; LI, S. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with single-drop microextraction for the fast determination of chlorophenols in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1280, p. 9-15, 2013a.

LI, Y.; CHEN, P. S.; HUANG, S. D. Water with low concentration of surfactant in dispersed solvent-assisted emulsion dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 51-57, 2013b.

LIU, D.; MIN, S. Rapid analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in tea samples by directly suspended droplet microextraction using a gas chromatography-electron capture detector. **J. Chromatogr. A**, v. 1235, p. 166-173, 2012.

LIU, J.; WU, H.; FENG, J.; LI, Z.; LIN, G. Heavy metal contamination and ecological risk assessments in the sediments and zoobenthos of selected mangrove ecosystems, South China. **CATENA**, v. 119, p. 136-142, 2014.

LIU, L.; CHENG, J.; MATSADIQ, G.; ZHOU, H.; LI, J. Application of DLLME to the determination of pyrethroids in aqueous samples. **Chromatographia**, v. 72, p. 1017-1020, 2010.

LIU, X.; LI, J.; ZHAO, Z.; ZHANG, W.; LIN, K.; HUANG, C.; WANG, X. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination for polybrominated diphenyl ethers in different environmental matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2220-2226, 2009.

LOPES, R. P.; AUGUSTI, D. V.; FRANCISCO DE SOUZA, L.; SANTOS, F. A.; LIMA, J. A.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, R. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 3, p. 606-613, 2011.

MA, J. J.; DU, X.; ZHANG, J. W.; LI, J. C.; WANG, L. Z. Ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples. **Talanta**, v. 80, p. 980-984, 2009.

MAGALHÃES, E. J.; NASCENTES, C. C.; AUGUSTI, R.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; SILVA, J. C. C. D.; AFONSO, R. J. D. C. F. Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 118-124, 2012.

MAGALHAES, E. J.; QUEIROZ, M. E. L. R.; PENIDO, M. L. O.; PAIVA, M. A. R.; TEODORO, J. A. R.; AUGUSTI, R.; NASCENTES, C. C. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1309, p. 15-21, 2013.

MALLAH, M. H.; SHEMIRANI, F.; GHANNADI MARAGHEH, M. Use of dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration of samarium, europium, gadolinium and dysprosium. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 278, p. 97-102, 2008.

MALOSCHIK, E.; ERNST, A.; HEGEDŰS, G.; DARVAS, B.; SZÉKÁCS, A. Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. **Microchemical Journal**, v. 85, p. 88-97, 2007.

MAPA. Instrução Normativa SPA nº2. 09 out. 2008. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasil,. 2008.

_____. **Manual de garantia de qualidade analítica - Resíduos e contaminantes em alimentos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011, 248 p.

MARGOUM, C.; GUILLEMAIN, C.; YANG, X.; COQUERY, M. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: method validation and measurement uncertainty. **Talanta**, v. 116, p. 1-7, 2013.

MARQUES, M. N.; COTRIM, M. B.; PIRES, M. A. F.; BELTRAME FILHO, O. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. **Química Nova**, v. 30, p. 1171-1178, 2007.

MARTHE, D. D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.

MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Determination of pesticides and related compounds in water by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5020-5027, 2014.

MATSADIQ, G.; HU, H. L.; REN, H. B.; ZHOU, Y. W.; LIU, L.; CHENG, J. Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid-liquid microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, p. 2113-2118, 2011.

MELO, A.; CUNHA, S. C.; MANSILHA, C.; AGUIAR, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by

gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1071-1077, 2012.

MELO, A.; MANSILHA, C.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Analysis of pesticides in tomato combining QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 559-568, 2013.

MENEZES-FILHO, A.; SANTOS, F. N. D.; PEREIRA, P. A. D. P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 139-145, 2010.

Merck. **High-purity solvents and standards for sensitive applications**. 2014. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/Merck/Products/reagents-chemicals-labware/solvents/solvents-for-instrumental-analysis/solvents-gas-chromatography-supraSolv/jRCb.qB.gGIAAAE_ZvZ3.Lxi,nav>. Acesso em 18 jun. 2014.

MERDASSA, Y.; LIU, J.-F.; MEGERSA, N. Development of a one-step microwave-assisted extraction method for simultaneous determination of organophosphorus pesticides and fungicides in soils by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 114, p. 227-234, 2013.

MISHRA, K.; SHARMA, R. C. Assessment of organochlorine pesticides in human milk and risk exposure to infants from North-East India. **Science of The Total Environment**, v. 409, p. 4939-4949, 2011.

MISHRA, K.; SHARMA, R. C.; KUMAR, S. Contamination levels and spatial distribution of organochlorine pesticides in soils from India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 215-225, 2012.

MOINFAR, S.; HOSSEINI, M.-R. M. Development of dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 907-911, 2009.

MOMPLAISIR, G.-M.; ROSAL, C. G.; HEITHMAR, E. M.; VARNER, K. E.; RIDDICK, L. A.; BRADFORD, D. F.; TALLENT-HALSELL, N. G. Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples. **Talanta**, v. 81, p. 1380-1386, 2010.

MONROY, M.; MACEDA-VEIGA, A.; SOSTOA, A. D. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. **Science of The Total Environment**, v. 487, p. 233-244, 2014.

MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHERI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1722-1729, 2011.

MORAIS, E. H. D. C.; RODRIGUES, A. A. Z.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; NEVES, A. A.; MORAIS, P. H. D. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin

in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, p. 9-17, 2014.

MORENO-GONZALEZ, D.; GAMIZ-GRACIA, L.; BOSQUE-SENDRA, J. M.; GARCIA-CAMPANA, A. M. Dispersive liquid-liquid microextraction using a low density extraction solvent for the determination of 17 N-methylcarbamates by micellar electrokinetic chromatography-electrospray-mass spectrometry employing a volatile surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 26-34, 2012.

MORENO, C. M.; STADLER, T.; SILVA, A. A.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determination of maleic hydrazide residues in garlic bulbs by HPLC. **Talanta**, v. 89, p. 369-376, 2012.

MORENO, D. V.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Use of polyoxyethylene surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 11-17, 2006.

MUCHA, A. P.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; BORDALO, A. A. Macrobenthic community in the Douro estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 169-180, 2003.

NAEENI, M. H.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, p. 219-226, 2011.

NARIN, İ.; SOYLAK, M.; ELÇI, L.; DOĞAN, M. Determination of trace metal ions by AAS in natural water samples after preconcentration of pyrocatechol violet complexes on an activated carbon column. **Talanta**, v. 52, p. 1041-1046, 2000.

NOGUEIRA, E. N.; DORES, E. F. G. C.; PINTO, A. A.; AMORIM, R. S. S.; RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C. Currently used pesticides in water matrices in Central-Western Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1476-1487, 2012.

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

ONG PRÓ RIO MANHUAÇU. **Rio Manhuaçu**. 2011. Disponível em: <http://http://www.proriomanhuaçu.org.br/orio/historia/rio_manhuaçu/>. Acesso em 22 fev. 2011.

OUYANG, G.; ZHAO, W.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, p. 47-54, 2007.

PAVÓN, J. L. P.; MARTÍN, S. H.; PINTO, C. G.; CORDERO, B. M. Determination of trihalomethanes in water samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 6-23, 2008.

PAWLISZYN, J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, p. 113-122, 1995.

PEREIRA, R. C.; MARTÍNEZ, M. C. M.; CORTÍZAS, A. M.; MACÍAS, F. Analysis of composition, distribution and origin of hexachlorocyclohexane residues in agricultural soils from NW Spain. **Science of The Total Environment**, v. 408, p. 5583-5591, 2010.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, p. 61-66, 2008.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O.; MARTHE, D. B. Influence of tomato componentes in the quantification of four pesticides by gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 294-300, 2012.

PINHO, G. P. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010a.

_____. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, p. 251-256, 2010b.

PINTO, M. I.; SONTAG, G.; BERNARDINO, R. J.; NORONHA, J. P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 225-237, 2010.

PIRSAHEB, M.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Determination of organophosphorous pesticides in summer crops using ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. **Food Control**, v. 34, p. 378-385, 2013.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. D. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.

PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 272-282, 1999.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends Anal. Chem.**, v. 22, p. 565-574, 2003.

QUINETE, N. S.; DE OLIVEIRA, E. D. S.; FERNANDES, D. R.; AVELAR, A. D. S.; SANTELLI, R. E. Assessment of organochlorine pesticide residues in Atlantic Rain Forest fragments, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 3604-3612, 2011.

RAHMI, D.; ZHU, Y.; FUJIMORI, E.; UMEMURA, T.; HARAGUCHI, H. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. **Talanta**, v. 72, p. 600-606, 2007.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 1-10, 2004.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

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

RIBEIRO, E. V.; MAGALHAES JUNIOR, A. P. E.; HORN, A. H.; TRINDADE, W. M. Metais pesados e qualidade da água do rio São Francisco no segmento entre Três Marias e Pirapora - MG: índice de contaminação. **Geonomos**, v. 20, p. 49-63, 2012.

RIETZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy metals in tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 363-370, 2001.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; XIMENES, V. F.; DE ANDRADE, R. M. B.; TALAMONI, J. L. B.; LIBÂNIO, M.; DE ALMEIDA, M. V.; APON, B. M.; CAVALARI, A. A. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil. **Chemosphere**, v. 65, p. 1949-1958, 2006.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, p. 24-29, 2011.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, p. 55-60, 2013.

SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/10684/2009, SANCO. European Union or Sweden. 2009.

SANGCHAN, W.; HUGENSCHMIDT, C.; INGWERSEN, J.; SCHWADORF, K.; THAVORNYUTIKARN, P.; PANSOMBAT, K.; STRECK, T. Short-term dynamics of pesticide concentrations and loads in a river of an agricultural watershed in the outer tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, p. 1-14, 2012.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1-14, 2010.

Sarojam, Praveen. **Analysis of wastewater for metals using ICP-OES**. 2010. Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/APP_MetalsinWastewater.pdf>. Acesso em 18 jun. 2014.

Sarojam, Praveen. **Analysis of trace metals in drinkink water with the Optima 7000 DV ICP-OES**. 2012. Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44-74318app_tracemetalsindrinkingwaterbyoptima7000.pdf>. Acesso em 18 jun. 2014.

SCHMITZ, J.; HAHN, M.; BRÜHL, C. A. Agrochemicals in field margins – An experimental field study to assess the impacts of pesticides and fertilizers on a natural plant community. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 193, p. 60-69, 2014a.

SCHMITZ, J.; SCHÄFER, K.; BRÜHL, C. A. Agrochemicals in field margins—Field evaluation of plant reproduction effects. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 189, p. 82-91, 2014b.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. **Chemosphere**, v. 103, p. 51-58, 2014.

SEQUINATTO, L.; REICHERT, J. M.; SANTOS, D. R. D.; REINERT, D. J.; COPETTI, A. C. C. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. **Química Nova**, v. 36, p. 768-772, 2013.

SERESHTI, H.; ENTEZARI HERAVI, Y.; SAMADI, S. Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES. **Talanta**, v. 97, p. 235-241, 2012.

SERESHTI, H.; KHOJEH, V.; SAMADI, S. Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters. **Talanta**, v. 83, p. 885-890, 2011.

SERESHTI, H.; SAMADI, S. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. **Food Chemistry**, v. 158, p. 8-13, 2014.

SERESHTI, H.; SAMADI, S.; JALALI-HERAVI, M. Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1280, p. 1-8, 2013.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 648-654, 2002.

SILVA, E. L.; ROLDAN, P. D. S.; GINÉ, M. F. Simultaneous preconcentration of copper, zinc, cadmium, and nickel in water samples by cloud point extraction using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol and their determination by inductively coupled plasma optic emission spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 1133-1138, 2009.

SILVA, L. O. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; SILVA, L. L.; D'ANTONINO, L. Mobilidade do ametryn em latossolos brasileiros. **Planta Daninha**, v. 30, p. 883-890, 2012.

SILVERIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; DE PINHO, G. P. ANALYSIS OF PESTICIDES IN WATER USING LIQUID-LIQUID EXTRACTION WITH PARTITION AT LOW TEMPERATURE AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-214, 2012.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. D. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, 2012.

SOARES, A. F. S.; LEÃO, M. M. D.; FARIA, V. H. F. D.; COSTA, M. C. M. D.; MOURA, A. C. M.; RAMOS, V. D. V.; VIANNA NETO, M. R.; COSTA, E. P. D. Occurrence of pesticides from coffee crops in surface water. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 62-72, 2013.

SOARES, A. F. S.; LEÃO, M. M. D.; VIANA NETO, M. R.; OLIVEIRA, S. M. A. C. Risk estimate of water contamination by pesticides used in coffee crops. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 425-432, 2012.

SOUSA, D. A.; GONÇALVES, R. M.; HELENO, F. F.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; DE MARCHI, M. R. R. Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266-272, 2014.

SOUSA, F. A. D.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A.; PINHO, G. P. D. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, p. 179-185, 2012.

SOUSA, F. A. D.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; TEÓFILO, R. F.; PINHO, G. P. D.; NEVES, A. A. Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides. **Chromatographia**, v. 76, p. 67-73, 2013.

SUH, J. H.; LEE, Y. Y.; LEE, H. J.; KANG, M.; HUR, Y.; LEE, S. N.; YANG, D.-H.; HAN, S. B. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 214-219, 2013.

TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC-MS. **Talanta**, v. 107, p. 1-10, 2013.

TAO, S.; GUO, L. Q.; WANG, X. J.; LIU, W. X.; JU, T. Z.; DAWSON, R.; CAO, J.; XU, F. L.; LI, B. G. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. **Science of The Total Environment**, v. 320, p. 1-9, 2004.

TEJU, E.; TADESSE, B.; MEGERSA, N. Trace level enrichment of lead from environmental water samples utilizing dispersive liquid-liquid microextraction and quantitative determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 49, p. 833-842, 2014.

TRAN, A. T. K.; HYNNE, R. V.; DOBLE, P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. **Chemosphere**, v. 67, p. 944-953, 2007.

TRUJILLO, I. S.; ALONSO, E. V.; TORRES, A. G. D.; PAVÓN, J. M. C. Development of a solid phase extraction method for the multielement determination of trace metals in natural waters including sea-water by FI-ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 101, p. 87-94, 2012.

TSENG, W. C.; CHEN, P. S.; HUANG, S. D. Optimization of two different dispersive liquid-liquid microextraction methods followed by gas chromatography-mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. **Talanta**, v. 120, p. 425-432, 2014.

TURGUT, C. The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Küçük Menderes River in Turkey, 2000–2002. **Environment International**, v. 29, p. 29-32, 2003.

USEPA. Alkalinity (Titrimetric, pH 4.5). EPA Method 310.1, United States Environmental Protecting Agency. 1978.

VARCA, L. M. Pesticide residues in surface waters of Pagsanjan-Lumban catchment of Laguna de Bay, Philippines. **Agricultural Water Management**, v. 106, p. 35-41, 2012.

VAREJÃO, E. V.; BELLATO, C. R.; FONTES, M. P.; MELLO, J. W. Arsenic and trace metals in river water and sediments from the southeast portion of the Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 172, p. 631-642, 2011.

VEGA, A. B.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 117-127, 2005.

VICTOR-ORTEGA, M. D.; LARA, F. J.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; OLMO-IRUELA, M. D. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Control**, v. 31, p. 353-358, 2013.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, p. 535-540, 2007.

VIVIAN, R.; QUEIROZ, M. E. L. R.; JAKELAITIS, A.; GUIMARÃES, A. A.; REIS, M. R.; CARNEIRO, P. M.; SILVA, A. A. Persistência e lixiviação de ametryn e trifloxysulfuron-sodium em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 25, p. 111-124, 2007.

VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Determination of Triazine and Chloroacetanilide Herbicides in Soils by Microwave-Assisted Extraction (MAE) Coupled to Gas Chromatographic Analysis with Either GC-NPD or GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5026-5033, 2002.

WANG, B.-S.; LEE, C.-P.; HO, T.-Y. Trace metal determination in natural waters by automated solid phase extraction system and ICP-MS: The influence of low level Mg and Ca. **Talanta**, v. 128, p. 337-344, 2014a.

WANG, C.; JI, S.; WU, Q.; WU, C.; WANG, Z. Determination of triazine herbicides in environmental samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 689-694, 2011a.

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

WANG, D.; WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. **Talanta**, v. 78, p. 1345-1351, 2009.

WANG, K.-D.; CHEN, P.-S.; HUANG, S.-D. Simultaneous derivatization and extraction of chlorophenols in water samples with up-and-down shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 2123-2131, 2014b.

WANG, Q.; YIN, J.; PAN, H.; XU, F.; YANG, Y. A novel method based on combining ultrasonic-assisted dispersive solid-phase extraction and low-density solvent

dispersive liquid-liquid microextraction (UA-DSPE-LDS-DLLME) for the determination of organophosphorus pesticides in soil. **Analytical Methods**, v. in Press, p., 2014c.

WANG, S. L.; LIU, C. Y.; LIU, F. M.; REN, L. P. IL-USA-DLLME method to simultaneously extract and determine four phenylurea herbicides in water samples. **Current Analytical Chemistry**, v. 7, p. 357-364, 2011c.

WANG, X.; ZHAO, X.; LIU, X.; LI, Y.; FU, L.; HU, J.; HUANG, C. Homogeneous liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 162-169, 2008.

WEN, Y.; LI, J.; ZHANG, W.; CHEN, L. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. **Electrophoresis**, v. 32, p. 2131-2138, 2011.

World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 2011, 564 p.

WU, J.; LU, J.; WILSON, C.; LIN, Y.; LU, H. Effective liquid-liquid extraction method for analysis of pyrethroid and phenylpyrazole pesticides in emulsion-prone surface water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6327-6333, 2010.

WU, Q.; LI, Y.; WANG, C.; LIU, Z.; ZANG, X.; ZHOU, X.; WANG, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 139-145, 2009a.

WU, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; WU, C.; ZENG, X.; WEN, J.; WANG, Z. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5504-5510, 2009b.

WU, T.; LIU, Y.; YANG, Z.; GAO, H.; ZHOU, Z. Determination of pyrethroid pesticides in environmental samples using ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1327-1333, 2012.

XIA, L.; HU, B.; JIANG, Z.; WU, Y.; LIANG, Y. Single-Drop Microextraction Combined with Low-Temperature Electrothermal Vaporization ICPMS for the Determination of Trace Be, Co, Pd, and Cd in Biological Samples. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 2910-2915, 2004.

XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 7-18, 2008.

XU, H.; DING, Z.; LV, L.; SONG, D.; FENG, Y.-Q. A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, p. 28-33, 2009.

XUE, J.; LI, H.; LIU, F.; JIANG, W.; CHEN, X. Determination of strobilurin fungicides in cotton seed by combination of acetonitrile extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 845-852, 2014.

YANG, D.; QI, S.-H.; ZHANG, J.-Q.; TAN, L.-Z.; ZHANG, J.-P.; ZHANG, Y.; XU, F.; XING, X.-L.; HU, Y.; CHEN, W.; YANG, J.-H.; XU, M.-H. Residues of organochlorine pesticides (OCPs) in agricultural soils of Zhangzhou City, China. **Pedosphere**, v. 22, p. 178-189, 2012.

YANG, X.; YANG, M.; HOU, B.; LI, S.; ZHANG, Y.; LU, R.; ZHANG, S. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets using an orthogonal array design and its application for the determination of fungicide concentrations in environmental water samples. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 1996-2001, 2014.

YOHANNES, Y. B.; IKENAKA, Y.; NAKAYAMA, S. M. M.; ISHIZUKA, M. Organochlorine pesticides in bird species and their prey (fish) from the Ethiopian Rift Valley region, Ethiopia. **Environmental Pollution**, v. 192, p. 121-128, 2014.

YUAN, G.-L.; WU, H.-Z.; FU, S.; HAN, P.; LANG, X.-X. Persistent organic pollutants (POPs) in the topsoil of typical urban renewal area in Beijing, China: Status, sources and potential risk. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 138, p. 94-103, 2014.

ZACHARIA, J. T.; KISHIMBA, M. A.; MASAHIKO, H. Biota uptake of pesticides by selected plant species; the case study of Kilombero sugarcane plantations in Morogoro Region, Tanzania. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 71-75, 2010.

ZHANG, M.; CHENG, J.; WU, M.; DU, T.; WANG, X.; CHENG, M. Gas chromatographic determination of three chlorophenols in toilet paper by ultrasonic assisted extraction and synchronous derivative dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytical Methods**, v. 6, p. 207-214, 2014a.

ZHANG, P.-P.; SHI, Z.-G.; YU, Q.-W.; FENG, Y.-Q. A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples. **Talanta**, v. 83, p. 1711-1715, 2011a.

ZHANG, S.; YIN, X.; YANG, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Determination of some sulfonylurea herbicides in soil by a novel liquid-phase microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1071-1081, 2011b.

ZHANG, X.; STARNER, K.; SPURLOCK, F. Analysis of chlorpyrifos agricultural use in regions of frequent surface water detections in California, USA. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 978-984, 2012.

ZHANG, Y.; LEE, H. K. Low-density solvent-based vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction combined with gas

chromatography-mass spectrometry for the fast determination of phthalate esters in bottled water. **Journal of Chromatography A**, v. 1274, p. 28-35, 2013.

ZHANG, Y.; XU, H. Determination of triazoles in tea samples using dispersive solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 189-196, 2014.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.; JIAO, B. Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: comparison of dispersive liquid-liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 159, p. 367-373, 2014b.

ZHENG, C.; ZHAO, J.; BAO, P.; GAO, J.; HE, J. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and 2,4-dichlorophenol in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3830-3836, 2011.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Ultratrace determination of carbamate pesticides in water samples by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with high performance liquid phase chromatography. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 477-483, 2011a.

ZHOU, Q.; WANG, J.; MENG, B.; CHENG, J.; LIN, G.; CHEN, J.; ZHENG, D.; YU, Y. Distribution and sources of organochlorine pesticides in agricultural soils from central China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 163-170, 2013.

ZHOU, S.; TANG, Q.; JIN, M.; LIU, W.; NIU, L.; YE, H. Residues and chiral signatures of organochlorine pesticides in mollusks from the coastal regions of the Yangtze River Delta: Source and health risk implication. **Chemosphere**, v. 114, p. 40-50, 2014.

ZHOU, Y.; HAN, L.; CHENG, J.; GUO, F.; ZHI, X.; HU, H.; CHEN, G. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 1901-1906, 2011b.

ZHU, Z.-C.; CHEN, S.-J.; ZHENG, J.; TIAN, M.; FENG, A.-H.; LUO, X.-J.; MAI, B.-X. Occurrence of brominated flame retardants (BFRs), organochlorine pesticides (OCPs), and polychlorinated biphenyls (PCBs) in agricultural soils in a BFR-manufacturing region of North China. **Science of The Total Environment**, v. 481, p. 47-54, 2014.