

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA PRUSSAK GABARDO

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE
HERBICIDAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM ÁGUAS NATURAIS

CURITIBA-PR

2023

RENATA PRUSSAK GABARDO

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE
HERBICIDAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM ÁGUAS NATURAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná – Campus Curitiba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora
Co-orientador: Profa. Dra. Gilcélia Aparecida Cordeiro

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Gabardo, Renata Prussak

Estabelecimento de métodos de extração para determinação de herbicidas e produtos de degradação em águas naturais / Renata Prussak Gabardo. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Patricio Guillermo Peralta Zamora

Coorientador: Gilcélia Aparecida Cordeiro

1. Herbicidas. 2. Produtos químicos agrícolas. 3. Água potável – Contaminação. 4. Troca iônica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Peralta Zamora, Patricio Guillermo. IV. Cordeiro, Gilcélia Aparecida. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RENATA PRUSSAK GABARDO** intitulada: **Estabelecimento de métodos de extração para determinação de herbicidas e produtos de degradação em águas naturais**, sob orientação do Prof. Dr. PATRICIO GUILLERMO PERALTA ZAMORA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 13 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

13/02/2023 18:26:10.0

PATRICIO GUILLERMO PERALTA ZAMORA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/02/2023 17:56:11.0

BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/02/2023 08:50:06.0

MARCUS VINICIUS DE LIZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/02/2023 11:14:22.0

EDMAR MARTENDAL DIAS DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

14/02/2023 05:43:09.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 255865

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 255865

Dedico a todos aqueles
que me incentivaram, apoiaram e me deram forças
para não desistir durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela força que tive durante essa jornada.

À minha família, minha base, por todo apoio e compreensão durante esse período e por me incentivaram a seguir em frente.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Patrício G. Peralta-Zamora agradeço a oportunidade de aprendizagem durante a orientação, repleta de dedicação, apoio e paciência. Agradeço imensamente a oportunidade de poder ter sido sua aluna, saiba que te admiro muito!

À minha co-orientadora Prof^a Dra. Gilcélia A. Cordeiro, obrigada por ter confiado em meu trabalho e me convidado, novamente, a participar de um projeto tão grandioso como é o Micropoluentes.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação desde a infância até hoje, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Bruno J. G. da Silva, pela dedicação na avaliação do projeto, correção de relatórios anuais, bem como incontáveis contribuições no exame de qualificação. Agradeço também, por mais uma vez, aceitar participar desta etapa de defesa. Suas contribuições foram e serão muito valiosas.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelas contribuições realizadas no exame de qualificação, por aceitar participar desta etapa de defesa e pelas considerações para melhoria do texto final.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz e ao Prof. Dr. Edmar Martendal Dias de Souza, por aceitarem participar da banca de defesa e pelas contribuições que farão para o documento final.

Aos amigos e colegas dos grupos de pesquisa Tecnotrater, GAQQ, CroMe e GQA, pelas conversas, consultas, companhia, momentos de distração e de terapia em grupo que facilitaram muito nessa jornada.

Aos amigos e colegas do lab Ambiental e PTI, que me ajudaram inúmeras vezes dentro e fora do laboratório.

À parceria entre ITAIPU Binacional, UNILA e Fundação Parque Tecnológico Itaipu que proporcionou a execução desse projeto, bem como, pelo apoio técnico e financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

Ana Vilela

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que
você realmente para e encara o medo de frente.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

A produção agrícola mundial cresceu exponencialmente após a década de 50, graças a avanços tecnológicos na agricultura, incluindo a disponibilização de uma grande variedade de agrotóxicos. O Brasil destaca-se entre os maiores produtores de grãos do mundo, o que resulta em um consumo exacerbado de agrotóxicos, alguns de elevado potencial poluente. Em função desta realidade, existe uma urgente necessidade de contar com estratégias que permitam a detecção e quantificação de agrotóxicos em matrizes ambientais. Desta forma, no presente trabalho teve-se como objetivo o estabelecimento de sistemas de extração em fase líquida (microextração líquido-líquido dispersiva, DLLME) e fase sólida (extração em resina de troca iônica - Amberlite IRA900) para a determinação de herbicidas e alguns produtos de degradação em águas superficiais, utilizando cromatografia em fase líquida (LC) acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e com detecção por fluorescência (LC-FLD). Um método DLLME-LC-MS/MS foi desenvolvido para a determinação de 7 herbicidas triazínicos e 3 produtos de degradação em águas superficiais, sendo otimizado e posteriormente validado de acordo com as orientações do INMETRO. Nesta etapa foi observada um ótimo coeficiente de determinação ($R^2 > 0,991$) na faixa de concentração avaliada, limites de quantificação entre 0,025 e 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ e recuperações de 87,3 a 116,9%, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 30%. O método foi aplicado na análise de amostras de águas superficiais da região oeste do Paraná e leste do Paraguai, obtidas em amostragens bimestrais realizadas durante um ano. Na margem brasileira foi detectada a presença de atrazina (ATZ), desisopropilatrizona (DIA) e desetilatrizona (DEA), em concentrações máximas de 0,621, 0,151 e 0,429 $\mu\text{g L}^{-1}$, para ATZ, DIA e DEA respectivamente, estando a primeira presente em 11 dos 12 pontos amostrais, em uma campanha amostral. Na margem paraguaia foi detectada a presença de ametrina (AMT) em todas as amostras, enquanto ATZ, DIA, DEA, simazina (SMZ), prometrina (PMT), propazina (PPZ) e terbutilazina-desetil (TBZD) foram detectados em concentrações máximas de 1,47, 1,09, 0,151, 2,94, 0,17, 0,07 e 0,032 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O método de extração com resina de troca iônica-LC-FLD foi utilizado para a determinação de glifosato (GLY), ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glufosinato (GLU) em águas superficiais da mesma região. O método otimizado e validado, apresentou linearidade na faixa de concentração avaliada ($R^2 > 0,984$), limites de quantificação entre 0,2 e 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e recuperações entre 91,7 e 113,3% com RSD inferior a 20%. O método foi aplicado em amostras de águas naturais, detectando-se a presença de GLY e AMPA em dois pontos amostrais na margem brasileira. Na margem paraguaia foi detectado a presença de GLY em duas campanhas amostrais, em pontos de amostragem distintos, não sendo encontrados indícios da presença de AMPA e GLU nessa margem do reservatório.

Palavras-chave: herbicidas; amostra de água superficial; DLLME; resina de troca iônica; LC-MS/MS; LC-FLD.

ABSTRACT

World agricultural production grew exponentially after the 1950s due to technological advances in agriculture, including the availability of a wide variety of pesticides. Brazil stands out among the world's largest grain producers, resulting in an exacerbated consumption of pesticides, some with high pollutant potential. Because of this, there is an urgent need for strategies to detect and quantify pesticides in environmental matrices. Thus, the present work aims to establish extraction systems in liquid phase (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) and solid phase (ion exchange resin extraction - Amberlite IRA900) for the determination of herbicides and some degradation products in surface waters using liquid chromatography (LC) with tandem mass detection (LC-MS/MS) and fluorescence detection (LC-FLD). A DLLME-LC-MS/MS method was developed to determine seven triazine herbicides and 3 degradation products in surface waters, optimized and later validated according to INMETRO guidelines. At this stage, good linearity ($R^2 > 0.991$) was observed in the evaluated concentration range, quantification limits between 0.025 to 0.15 $\mu\text{g L}^{-1}$ and recoveries from 87.3 to 116.9%, with lower relative standard deviation (RSD) up to 30%. The method was applied to analyze surface water samples from western Paraná and eastern Paraguay, obtained in bimonthly samplings carried out over one year. On the Brazilian shore, the presence of atrazine (ATZ), desisopropylatrazine (DIA), and desethylatrazine (DEA) were detected at maximum concentrations of 0.621, 0.151 and 0.429 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ATZ, DIA and DEA respectively, with the first present in 11 of the 12 sampling points, in a sampling campaign. On the Paraguayan shore, the presence of ametryn (AMT) was detected in all samples, while ATZ, DIA, DEA, simazine (SMZ), promethrin (PMT), propazine (PPZ), and terbutylazine-desethyl (TBZD) were detected in maximum concentrations of 1.47, 1.09, 0.151, 2.94, 0.17, 0.07 and 0.032 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The extraction method with ion exchange resin-LC-FLD was used for the determination of glyphosate (GLY), aminomethylphosphonic acid (AMPA), and glufosinate (GLU) in surface waters of the same region. The optimized and validated method showed linearity in the evaluated concentration range ($R^2 > 0.984$), quantification limits between 0.2 and 0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, and recoveries between 91.7 and 113.3% with RSD lower than 20 %. The method was applied to samples of natural waters, detecting the presence of GLY and AMPA in two samples on the Brazilian shore. On the Paraguayan bank, the presence of GLY was detected in two sampling campaigns from different points, and no evidence of the presence of AMPA and GLU was found on that reservoir bank.

Keywords: herbicides; surface water sample; DLLME; ion exchange resin; LC-MS/MS; LC-FLD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - LOCALIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3 E MAPA DOS PRINCIPAIS USOS E TIPOS DE SOLO DA REGIÃO.	24
FIGURA 1.2 - REPRESENTAÇÃO DOS TIPOS DE INTERAÇÃO E TRANSPORTE DOS AGROTÓXICOS NO AMBIENTE	25
FIGURA 1.3 – REPRESENTAÇÃO DAS DISSOCIAÇÕES DA MOLÉCULA DE GLIFOSATO NOS DIFERENTES VALORES DE pHs.	32
FIGURA 1.4 - REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA COM FMOC-Cl.....	35
FIGURA 1.5 - REPRESENTAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE IONIZAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM pH PRÓXIMO À NEUTRALIDADE	36
FIGURA 1.6 – REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO BIFÁSICO (A) E SISTEMA DE EXTRAÇÃO TRIFÁSICO(B)	39
FIGURA 1.7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO EM “U” (A) E CONFIGURAÇÃO EM “HASTE” (B) PARA HF-SPME	40
FIGURA 1.8 – ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVO (DLLME)	45
FIGURA 1.9 - REPRESENTAÇÃO DO PREPARO DA RESINA DE TROCA ANIÔNICA IRA-900	51
FIGURA 1.10 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO EM RESINA IRA-900.....	53
FIGURA 2.1 – REPRESENTAÇÃO DE UMA BACIA HIDROGRÁFICA COM A CLASSIFICAÇÃO DOS CORPOS HÍDRICOS.....	57
FIGURA 2.2 - MAPA COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM NA MARGEM DIREITA (PARAGUAI) E ESQUERDA (BRASIL) DO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU.	58
FIGURA 2.3 – CROMATOGRAMAS DOS ANALITOS INVESTIGADOS (200 µg L ⁻¹) EM CADA SEGMENTO DE TEMPO, PARA O ÍON DE QUANTIFICAÇÃO (Q1).....	68
FIGURA 2.4 – REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO PARA COMPARAR A SENSIBILIDADE ENTRE ELES PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO.	69

FIGURA 2.5 – COMPARAÇÃO DA ÁREA DE PICO DOS ANALITOS APÓS A EXTRAÇÃO POR HF-LPME, DE ACORDO COM O SOLVENTE ORGÂNICO E A FORÇA IÔNICA UTILIZADA.....	72
FIGURA 2.6 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DE PICO DOS ANALITOS APÓS A EXTRAÇÃO POR HF-LPME, PARA O PONTO CENTRAL AVALIADO EM QUINTUPLICATA	73
FIGURA 2.7 – ESQUEMA DOS EQUILÍBRIOS ENVOLVIDOS DURANTE A FASE DE EXTRAÇÃO (A) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) PARA A FIBRA OCA (B), COM AUMENTO DE 55 VEZES (BA) E DE 350 VEZES (BB).	74
FIGURA 2.8 – RESULTADO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 , COM PONTO CENTRAL EM TRIPLICATA, SEM A NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.	75
FIGURA 2.9 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ÁREAS OBTIDAS PARA TESTES NO MÉTODO HF-LPME NA FAIXA DE 0,5 A 10,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE	75
FIGURA 2.10 – RECUPERAÇÕES ABSOLUTAS (%) OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL	77
FIGURA 2.11 – COMPARAÇÃO ENTRE O SOLVENTE DISPERSOR E SOLVENTE EXTRATOR UTILIZADO NO TESTE DE SOLVENTES PARA A EXTRAÇÃO POR DLLME PARA TRIAZINAS EM TERMOS DE RECUPERAÇÃO (%), $n=3$	79
FIGURA 2.12 – GRÁFICO DE PARETO PARA CADA ANALITO.	81
FIGURA 2.13 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA PROVA EM BRANCO E AMOSTRA FORTIFICADA (0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$) APÓS MÉTODO DLLME-LC-MS/MS.....	84
FIGURA 2.14 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA MATRIZ BRASILEIRA DE ÁGUA FORTIFICADA, INCLUINDO A PROVA EM BRANCO APÓS EXTRAÇÃO POR DLLME-LC-MS/MS.	92
FIGURA 2.15 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA MATRIZ PARAGUAIA DE ÁGUA FORTIFICADA, INCLUINDO A PROVA EM BRANCO APÓS EXTRAÇÃO POR DLLME-LC-MS/MS.....	93
FIGURA 2.16 –ENSAIOS DE REPETIBILIDADE EXPRESSOS PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA OS DIFERENTES NÍVEIS DE	

CONCENTRAÇÃO PARA A MATRIZ BRASILEIRA (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$) E PARA A MATRIZ PARAGUAIA (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$). (n=5).	96
FIGURA 2.17 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA EXPRESSA PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA A MATRIZ BRASILEIRA E PARAGUAIA, NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO TESTADOS PARA AMOSTRAS DE DIFERENTES COLETAS	98
FIGURA 2.18 – GRÁFICO DE PARETO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS – AMOSTRAS MARGEM ESQUERDA - BRASIL	101
FIGURA 2.19 – GRÁFICO DE PARETO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS – AMOSTRAS MARGEM DIREITA - PARAGUAI	102
FIGURA 3.1 – COLUNA MONTADA COM RESINA IRA-900 PARA A EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO.....	111
FIGURA 3.2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO, UTILIZANDO RESINA DE TROCA IÔNICA	112
FIGURA 3.3 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES INDIVIDUAIS DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO DERIVATIZADOS COM FMOC-Cl (100 $\mu\text{g L}^{-1}$).	115
FIGURA 3.4 – REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO DERIVATIZADO PARA COMPARAR A SENSIBILIDADE ENTRE ELES PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-FLD.....	116
FIGURA 3.5 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA A PROVA EM BRANCO DA MATRIZ, PARA A MATRIZ FORTIFICADA (1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) E PARA UMA AMOSTRA DA COLETA DE MARÇO/22 PARA A MARGEM BRASILEIRA (A) E MARGEM PARAGUAIA (B), APÓS A EXTRAÇÃO UTILIZANDO A RESINA DE TROCA IÔNICA.....	119
FIGURA 3.6 –ENSAIOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA EXPRESSOS PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA OS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO PARA A MATRIZ BRASILEIRA (0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) E PARA A MATRIZ PARAGUAIA (0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) (n=3).	124

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.1 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DE HF-LPME EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, COM FOCO NOS DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES UTILIZADOS. DADOS COMPILADOS A PARTIR DA LITERATURA (2002-2018).....	44
QUADRO 1.2 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DE DLLME EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, COM FOCO NOS DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES UTILIZADOS. DADOS COMPILADOS A PARTIR DA LITERATURA (2006-2022).....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS TRIAZINICOS DE INTERESSE	29
TABELA 1.2 – ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO.....	31
TABELA 2.1 – VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.....	61
TABELA 2.2 – VARIÁVEIS SELECIONADAS E PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL PARA OTIMIZAÇÃO DA DLLME.	61
TABELA 2.3 – VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA DLLME UTILIZANDO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.....	63
TABELA 2.4 – FATORES, NÍVEIS E MATRIZ UTILIZADA PARA O TESTE DE YOUTDEN PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.....	66
TABELA 2.5 – COMPOSTOS TRIAZINICOS DETERMINADOS E INFORMAÇÕES SOBRE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODO MRM, MODO POSITIVO.	67
TABELA 2.6 – DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE EM SOLVENTE (n=3).....	70
TABELA 2.7 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE DAS ESPÉCIES DE INTERESSE POR LC-MS/MS (n=3)	71
TABELA 2.8 - CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PARA OS ENSAIOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL.....	77
TABELA 2.9 – RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL	80
TABELA 2.10 - RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO (%) PARA OS TESTES DE VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO (n=3).....	83
TABELA 2.11 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE, APLICANDO O MÉTODO EM ÁGUA ULTRAPURA.....	85

TABELA 2.12 – COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E PORCENTAGEM DO EFEITO MATRIZ NAS MATRIZES AVALIADAS.	87
TABELA 2.13 – RESULTADO DO TESTE F PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO DLLME-LC-MS/MS (n=3)	88
TABELA 2.14 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ BRASIL (MARGEM ESQUERDA)	90
TABELA 2.15 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ PARAGUAI (MARGEM DIREITA)	91
TABELA 2.16 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), (n=5)	94
TABELA 2.17 – COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE OBTIDOS NA LITERATURA.	94
TABELA 2.18 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS NAS MATRIZES BRASILEIRA E PARAGUAIA, CALCULADOS COM BASE NA CURVA PREPARADA NA MATRIZ	99
TABELA 2.19 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DA MARGEM ESQUERDA (BRASIL) DURANTE AS 6 CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM ($\mu\text{g L}^{-1}$).	104
TABELA 2.20 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DA MARGEM DIREITA (PARAGUAI) DURANTE AS 6 CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	106
TABELA 3.1 – PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO EM ÁGUA ULTRAPURA	115
TABELA 3.2 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE DAS ESPÉCIES DE INTERESSE POR LC-FLD (n=3)	116
TABELA 3.3 – COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E PORCENTAGEM DO EFEITO MATRIZ NAS MATRIZES AVALIADAS.	117

TABELA 3.4 – RESULTADO DO TESTE F PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD (n=3).	120
TABELA 3.5 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ BRASIL E PARAGUAI	121
TABELA 3.6 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO EMPREGANDO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD ($\mu\text{g L}^{-1}$).....	122
TABELA 3.7 – COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO OBTIDOS NA LITERATURA.	122
TABELA 3.8 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO (%) DOS ANALITOS UTILIZANDO O MÉTODO EMPREGANDO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD NAS MATRIZES BRASILEIRA E PARAGUAIA	125

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	- Acetonitrila
AMPA	- Ácido aminometilfosfônico
AMT	- Ametrina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A _p	- Área de pico
ATZ	- Atrazina
ATZ-d5	- Atrazina deuterada
BP3	- Bacia Hidrográfica do Paraná 3
BR	- Brasil
CLF	- Clorofórmio
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYZ	- Cianazina
DAD	- <i>Diode Array Detector</i> - Detector de arranjo de diodos
DCM	- Diclorometano
DEA	- Desetilatrazina
DIA	- Desisopropilatrazina
DIU	- Diuron
DLLME	- <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> - Microextração líquido-líquido dispersiva
DP	- Desvio Padrão Relativo
EF	- <i>Enrichment fator</i> - Fator de enriquecimento
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> - Ionização por eletrospray
ESPS	- Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato
FLT	- Faixa Linear de Trabalho
FMOC-Cl	- Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GC	- <i>Gas Chromatography</i> - Cromatografia em fase gasosa
GC-MS	- <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
GLU	- Glufosinato
GLY	- Glifosato

HF-LPME	- <i>Hollow Fiber-based Liquid Phase Microextraction</i> - Microextração em fase líquida com fibra oca
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPARDES	- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
K _{oc}	- Coeficiente de partição entre água e carbono orgânico do solo
K _{ow}	- Coeficiente de partição octanol-água
LC	- <i>Liquid Chromatography</i> – Cromatografia em fase líquida
LC-FLD	- <i>Liquid Chromatography Fluorescence Detector</i> – Cromatografia em fase líquida acoplada com detector de fluorescência
LC-MS/MS	- <i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i> – Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LC-QTOF-MS	- <i>Liquid Chromatography coupled to Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry</i> – Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo
LLE	- <i>Liquid-Liquid Extraction</i> – Extração líquido-líquido
LOD	- <i>Limit of Detection</i> – Limite de detecção
LOQ	- <i>Limit of Quantification</i> – Limite de quantificação
MeOH	- Metanol
MMQO	- Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MOF	- <i>Metal-Organic Framework</i>
MRM	- <i>Multiple Reaction Monitoring</i> – Monitoramento de reações múltiplas
MS	- <i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas
PMT	- Prometrina
PPZ	- Propazina
PY	- Paraguai
R ²	- Coeficiente de determinação
RCF	- <i>Relative Centrifugal Force</i> – Força centrífuga relativa
rpm	- <i>Rotações por minuto</i>
RSD	- <i>Relative Standard Deviation</i> – Desvio padrão relativo

SMZ	- Simazina
TBZ	- Terbutilazina
TBZD	- Terbutilazina-desetil
TFB	- Teflubenzuron
t _R	- Tempo de retenção
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNILA	- Universidade Federal da Integração Latino-Americana
USEPA	- <i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

PREFÁCIO	21
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	22
1.1. AGROTÓXICOS – VISÃO GERAL.....	23
1.1.1. Aspectos ambientais dos herbicidas triazínicos	27
1.1.2. Aspectos ambientais do glifosato	31
1.1.2.1. <i>Métodos para a determinação de glifosato e seus produtos de degradação</i>	34
1.2. MÉTODOS PARA PREPARO DE AMOSTRA.....	37
1.2.1. Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)	38
1.2.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	45
1.2.3. Método de extração com resina de troca iônica	51
1.3. OBJETIVOS	54
1.3.1. Objetivo geral	54
1.3.2. Objetivos específicos.....	54
CAPÍTULO 2 – HERBICIDAS TRIAZÍNICOS	55
2.1. INTRODUÇÃO	55
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.2.1. Reagentes e insumos.....	55
2.2.2. Caracterização do local de amostragem	56
2.2.3. Método de amostragem.....	57
2.2.4. Método cromatográfico.....	58
2.2.5. Técnicas de extração	60
2.2.5.1. <i>Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)</i>	60
2.2.5.2. <i>Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)</i>	61
2.2.6. Validação do método DLLME-LC-MS/MS	63
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.3.1. Determinações cromatográficas	67
2.3.2. Extração de Triazinas por Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)	71
2.3.3. Extração de Triazinas por Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	76

2.3.4.	Validação do método DLLME-LC-MS/MS	86
2.3.5.	Análise das amostras	103
2.4.	CONCLUSÕES	107
CAPÍTULO 3 – GLIFOSATO		109
3.1.	INTRODUÇÃO	109
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	109
3.2.1.	Reagentes e insumos	109
3.2.2.	Amostragem de águas naturais	110
3.2.3.	Método cromatográfico	110
3.2.3.1.	<i>Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de fluorescência – LC-FLD</i>	<i>110</i>
3.2.3.2.	<i>Curva de calibração, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão – parâmetros instrumentais</i>	<i>110</i>
3.2.4.	Técnica de extração	111
3.2.4.1.	<i>Método de extração para determinação de glifosato, AMPA e glufosinato utilizando resina de troca iônica</i>	<i>111</i>
3.2.4.2.	<i>Método de derivatização para a determinação de glifosato, AMPA e glufosinato</i>	<i>112</i>
3.2.5.	Validação do método resina de troca iônica-LC-FLD	113
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
3.3.1.	Determinação Cromatográfica	114
3.3.1.1.	<i>Determinação de Glifosato, AMPA e Glufosinato por cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência (LC-FLD)</i>	<i>114</i>
3.3.2.	Validação do método resina de troca iônica-LC-FLD	117
3.3.3.	Análise das amostras	125
3.4.	CONCLUSÕES	127
4.	CONCLUSÃO GERAL	128
REFERÊNCIAS		130
APÊNDICE A - COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS TRIAZÍNICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO PARA REPRESENTAÇÃO DO EFEITO MATRIZ CALCULADO		142

APÊNDICE B – CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS TRIÁZINICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONSTRUÍDAS NA MATRIZ BRASILEIRA UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS.	143
APÊNDICE C – CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS TRIAZÍNICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONSTRUÍDAS NA MATRIZ PARAGUAIA UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS.....	144
APÊNDICE D - COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA REPRESENTAÇÃO DO EFEITO MATRIZ CALCULADO PARA GLY, AMPA E GLU.....	145

PREFÁCIO

Para facilitar a elaboração e o entendimento deste documento, a sua redação foi organizada em três capítulos.

No Capítulo 1 se apresenta uma revisão bibliográfica direcionada a contextualizar a proposta de trabalho, incluindo-se tópicos relacionados com os problemas ambientais associados ao uso de agrotóxicos, com ênfase em glifosato e herbicidas triazínicos, e com as técnicas de preparo de amostra que foram utilizadas no decorrer do trabalho.

O Capítulo 2 aborda o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica baseada no método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a determinação de herbicidas triazínicos em águas superficiais da região transfronteiriça (Brasil-Paraguai) do reservatório de Itaipu, por cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas. Neste capítulo também se apresentam resultados associados ao uso de microextração em fase líquida utilizando fibra oca (HF-LPME).

O Capítulo 3 trata sobre o desenvolvimento e validação de uma metodologia fundamentada no uso de resina de troca iônica para a determinação do herbicida glifosato e seus principais produtos de degradação em águas superficiais das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório de Itaipu, determinação esta que foi realizada por cromatografia em fase líquida com detecção por fluorescência.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

Em grande parte dos países de vocação agrícola, incluindo o Brasil, observa-se que a produtividade cresceu significativamente, sem um crescimento proporcional da área plantada. Esta disparidade pode ser explicada pelo notório avanço da tecnologia agrícola, representada pelo desenvolvimento de melhores práticas e equipamentos, pela introdução de espécies mais resistentes e pelo uso de agrotóxicos. Estes últimos, correspondem a espécies químicas legalmente permitidas para o combate de pragas e doenças, o que tem sido de fundamental importância para o aumento da produtividade agrícola.

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos no mundo, com safras de soja, trigo, arroz e milho que se superam a cada ano. Assim, o Brasil também aparece na lista dos maiores consumidores de agrotóxicos, incluindo herbicidas e inseticidas que têm sido proibidos em várias partes do mundo, em razão de sérios problemas de saúde pública. O glifosato, por exemplo, um dos herbicidas mais utilizados no mundo, tem sido objeto de intensas campanhas internacionais para proibição, em razão da constatação da sua presença em praticamente todos os compartimentos ambientais, de efeitos deletérios bem comprovados na biota aquática e de suspeitas de carcinogenicidade em humanos.

Em função do anteriormente exposto, a necessidade de contar com estratégias que permitam a detecção e a quantificação deste tipo de micropoluentes em matrizes ambientais é evidente, o que incentivou a presente proposta de trabalho. Assim, o principal objetivo desta pesquisa consistiu em estabelecer sistemas de extração em fase líquida e/ou sólida para viabilizar a determinação de agrotóxicos em águas naturais, utilizando-se métodos cromatográficos em fase líquida na etapa de quantificação.

Este projeto faz parte de um projeto de maior porte (Estudo da dinâmica de micropoluentes em diferentes matrizes ambientais na região transfronteiriça Brasil - Paraguai), coordenado pela Prof^a. Dra. Gilcélia Cordeiro (Universidade da Integração Latino-Americana, UNILA) e financiado pela ITAIPU Binacional, que objetiva estabelecer ferramentas que permitam avaliar o impacto causado pelo uso de agrotóxicos em importantes áreas agrícolas de ambos os países, contribuindo, finalmente, com o estabelecimento de ações que permitam minimizar o impacto da agricultura intensiva nos corpos hídricos da região.

1.1. AGROTÓXICOS – VISÃO GERAL

Com o advento da Revolução Verde na década de 50, foi possível verificar o surgimento de novas tecnologias de produção agrícola, as quais permitiram aumentar a produtividade no campo, sem estender proporcionalmente a área plantada. Neste contexto destaca-se o uso de equipamentos e o acesso dos agricultores a sementes adaptadas a diversos climas e resistentes a pragas. Assim, o setor agrícola se transformou em um dos principais responsáveis pela economia brasileira, contribuindo significativamente com o produto interno bruto do país (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017). Tendo por base a safra de grão do ano de 2017, o milho e a soja foram os grãos com maior porcentagem de produção representando 41 e 48%, respectivamente (IBGE, 2018).

Nestas condições, entretanto, a prática do monocultivo favoreceu a proliferação de pragas, o que propiciou o uso intensivo de agrotóxicos (ANDRADES; GANIMI, 2007; BRASIL, 1989, 2017). Além disso, com o crescimento acelerado da população mundial, que em novembro de 2022 atingiu a marca de 8 bilhões de habitantes e, de acordo com a Organização das Nações Unidas em 15 anos atingirá a marca de 9 bilhões de habitantes (ONU, 2022), a questão da produção de alimentos deverá aumentar e, conseqüentemente, o uso de agrotóxicos deverá acompanhar esse crescente aumento.

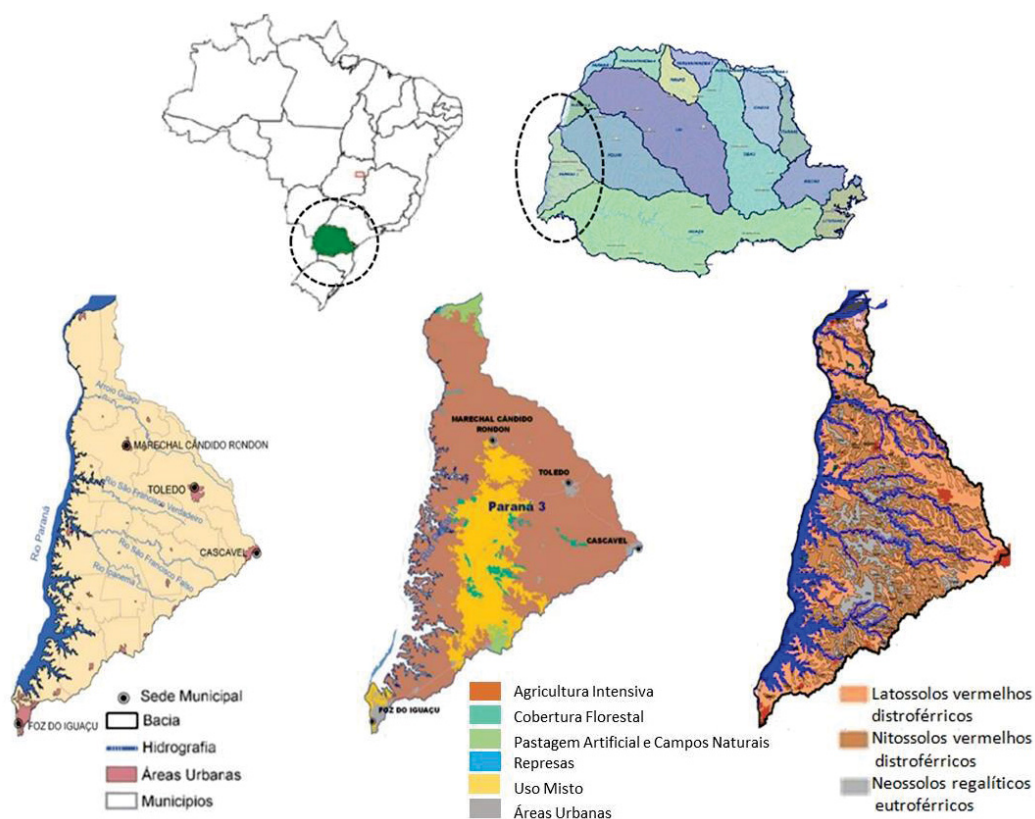
No ano de 2020, o Brasil ficou classificado como o segundo maior consumidor de agrotóxicos do mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos (FAO, 2022). De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2020), no mesmo ano a Região Sul foi responsável por 22,5% das vendas de agrotóxicos no país, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os que mais contribuíram para essa estatística.

A produção agrícola paranaense é em sua maioria composta de soja, milho e trigo, estando concentrada na porção centro-oeste do estado. É nesta mesma região que o consumo de agrotóxicos varia de 5 a 45 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (IPARDES, 2017), envolvendo principalmente herbicidas, como glifosato, paraquat, atrazina e 2,4-D, inseticidas, como acefato e imidacloprido e fungicidas, como trifloxistrobina e ciproconazol. Além disso, no ano de 2015 o Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES), também realizou a análise do consumo de

agrotóxicos por Bacias Hidrográficas, verificando que os maiores índices de consumo de agrotóxico também estão localizados na região centro-oeste do estado, incluindo as Bacias Hidrográficas do Piquiri, Baixo Iguaçu, Alto Ivaí, Alto Tibagi e Paraná 3.

A Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3) é uma extensa região localizada no extremo oeste do estado do Paraná, compreendendo uma área de cerca de 8 mil km² de afluentes da margem esquerda do Rio Paraná. Embora importantes cidades do estado se localizem nesta região, as áreas urbanas representam uma pequena fração da área total da Bacia (FIGURA 1.1), a qual é principalmente dedicada à agricultura intensiva das culturas de soja e milho. A região apresenta predomínio de agricultura mecanizada intensiva com sucessão de culturas, o que usualmente não permite a regeneração do solo e contribui com o seu esgotamento.

FIGURA 1.1 - LOCALIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3 E MAPA DOS PRINCIPAIS USOS E TIPOS DE SOLO DA REGIÃO.



Fonte: Autoria própria, (2022)

De acordo com informações do IPARDES, (2017), a quantidade de agrotóxicos consumida na região ($9,63 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) é superior à média consumida no estado ($8,25 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), sendo representada principalmente por herbicidas.

O uso excessivo de agrotóxicos e a disposição inadequada das embalagens podem levar à contaminação do solo e dos recursos hídricos. Estes compostos podem ser transportados por grandes distâncias, seja por meio da volatilização das moléculas, as quais retornam ao sistema por meio da água da chuva, através da dispersão aérea durante a aplicação na lavoura, do escoamento superficial e ou por meio da lixiviação chegando às águas subterrâneas (FIGURA 1.2) (CARVALHO, 2013; RIBEIRO et al., 2007). Consequentemente, estas substâncias podem vir a atingir organismos não-alvo ou ainda serem disponibilizados para o consumo humano, uma vez que os sistemas de tratamento convencional de água não têm como foco a remoção desses poluentes (BILA; DEZOTTI, 2007).

FIGURA 1.2 - REPRESENTAÇÃO DOS TIPOS DE INTERAÇÃO E TRANSPORTE DOS AGROTÓXICOS NO AMBIENTE



Fonte: Autoria própria, (2022)
Foto - Google Images, Copyright: © R.R.Rufino

A dinâmica dos agrotóxicos no ambiente é bastante diversa, sendo comandada por processos físicos, químicos e biológicos que dependem tanto das suas propriedades físico-químicas, como das características do meio onde está inserido. Assim, a persistência e mobilidade dos agrotóxicos no ambiente depende de

propriedades como solubilidade em água, coeficiente de partição entre água e carbono orgânico do solo (K_{oc}) e tempo de meia vida (CARVALHO, 2013; GAVRILESCU, 2005), assim como da temperatura e pH do meio, da textura do solo e da presença de matéria orgânica, dentre outras características relevantes (CARVALHO, 2013; GAVRILESCU, 2005).

A solubilidade em água refere-se à concentração máxima de uma substância que se dissolve em uma determinada quantidade de água numa dada temperatura, o que pode ser correlacionado com a sua tendência a ser lixiviado ou percolado através do solo (CARVALHO, 2013; MILHOME et al., 2009). Desta forma, compostos com maior solubilidade tendem a se mobilizar através do solo, alcançando com frequência, as águas subterrâneas. Porém, as condições ambientais (temperatura e pH) podem influenciar na solubilidade do composto (ATSDR, 2022).

O coeficiente de partição K_{oc} é utilizado como uma medida de afinidade de sorção de um composto com o carbono orgânico, presente no solo ou no sedimento. Assim, um elevado valor de K_{oc} indica forte adsorção do composto na matéria orgânica do solo e, portanto, reduzida mobilidade (ATSDR, 2022). O tempo de meia vida, por sua vez, está relacionado com a estabilidade do composto em determinadas condições ambientais (CARVALHO, 2013; MILHOME et al., 2009).

A atrazina, por exemplo, é um herbicida que é solúvel em água (35 mg L^{-1}) e apresenta um K_{oc} de 100, o que indica que pode ser carregada pelo escoamento superficial ou, ainda, percolar através do solo. Por outro lado, o seu tempo de meia vida é estimado em até 578 dias em água e na faixa de 28 a 150 dias no solo (AERU, 2022; USEPA, 2003, 2018), o que permite a sua classificação como moderadamente persistente. A grande variação entre os tempos de meia-vida se dá, principalmente, devido a efeitos do clima, sendo que estudos já mostraram que a atrazina é mais resistente em climas mais frios (USEPA, 2003). Desta forma, de acordo com estes antecedentes, a atrazina pode ser efetivamente mobilizada nas águas superficiais.

Em função dos antecedentes comentados, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de detectar a presença de agrotóxicos nos recursos hídricos em diversos estados brasileiros, com destaque para as regiões com elevada produção agrícola (ACAYABA et al., 2021; AMADORI et al., 2016; BARIZON et al., 2020; BECKER et al., 2021; DELLA-FLORA et al., 2019; VIEIRA et al., 2017). Na avaliação da contaminação por agrotóxicos em mananciais de municípios da região sudoeste do Paraná realizada por Vieira et al. (2017), por exemplo, foram quantificados oito

compostos em concentrações que variavam de 0,005 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estudos realizados por Amadori et al. (2016) relatam concentrações de 5,2 a 28 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina em águas superficiais, enquanto que relatos de Della-Flora et al. (2019) indicaram concentrações de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina após um evento de chuva.

1.1.1. Aspectos ambientais dos herbicidas triazínicos

Os herbicidas triazínicos selecionados neste estudo pertencem à família das s-triazinas (triazinas simétricas), que se caracterizam por um anel aromático constituído de átomos alternados de carbono e nitrogênio.

Compostos deste tipo interferem no desenvolvimento das plantas, interrompendo o fluxo de elétrons no fotossistema II e impedindo a fixação de CO_2 e a geração de energia (MOJIRI et al., 2020). Assim, estes herbicidas são amplamente utilizados no controle pré e pós emergência de ervas daninhas, principalmente em culturas de cana de açúcar e milho.

Dos herbicidas triazínicos, a atrazina (ATZ; 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) ocupa um lugar de destaque, em razão de aplicação autorizada em onze culturas, incluindo soja, milho, sorgo, cana de açúcar, abacaxi e, em alguns casos, aplicações residenciais em gramados (ANVISA, 2022a; USEPA, 2022a). Em função da sua versatilidade frente a pragas de folha longa, no ano de 2020 foram comercializadas em torno de 2700 toneladas do pesticida (IBAMA, 2021).

Os dois principais produtos de degradação da atrazina, desetilatrizona (DEA; 2-amino-4-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) e desisopropilatrizona (DIA; 2-amino-4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazina), são gerados por um processo de desalquilação microbiana e possuem toxicidade similar da ATZ (SHIPITALO; OWENS, 2003).

Com relação aos limites aceitáveis no ambiente, a Resolução CONAMA 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e diretrizes ambientais para seu enquadramento, determina que em águas doces superficiais de classe I e II pode ser encontrado até 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina e simazina (BRASIL, 2005), mesmo valor é aceito para águas de abastecimento pela Portaria do Ministério da Saúde nº888 de 2021. No entanto, para os valores de atrazina também são consideradas as concentrações de seus produtos de degradação (BRASIL, 2021).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos determina para a qualidade de água potável, concentrações de até 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de

simazina em água de consumo (USEPA, 2022b). Já no Canadá, o valor permitido de atrazina e seus produtos de degradação na água potável não deve ser superior a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (CANADA, 2022). Valores similares são aceitos na União Europeia, com limite de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4 \mu\text{g L}^{-1}$ para atrazina e simazina, respectivamente, na água potável e em águas superficiais (UE, 2008, 2020). Cabe ressaltar que os demais herbicidas avaliados (ametrina, prometrina, propazina, cianazina, terbutilazina e terbutilazina-desetil) não são contemplados nas normativas.

Algumas características físico-químicas dos herbicidas triazínicos avaliados são apresentadas na TABELA 1.1. Como pode ser observado, os valores de solubilidade em água são relativamente elevados, o que sugere um transporte facilitado em direção às águas superficiais e subterrâneas. Por outro lado, os valores de K_{oc} podem ser considerados intermediários, o que sugere retenção das triazinas nos componentes do solo. Embora esta última característica também seja dependente das características do solo, incluindo fatores como o teor de matéria orgânica e de argila, o pH e a capacidade de troca catiônica (BACHETTI et al., 2021), estima-se que, em geral, o conjunto de características dos herbicidas triazínicos permite a sua presença no solo e em águas superficiais e subterrâneas.

Devido a essas características e ao uso intensivo na agricultura, esses compostos são facilmente encontrados no ambiente. Estudos realizados por Bachetti et al., (2021) durante 5 anos em uma bacia hidrográfica na Argentina, por exemplo, detectaram a presença de atrazina em áreas rurais e urbanas, em concentrações médias da ordem de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. De acordo com os autores, os processos que mais contribuem para a poluição pontual e difusa são de origem antrópica, associados a eventos de chuva e escoamento superficial. Os autores também ressaltam que as concentrações detectadas no estudo representam risco à saúde humana, bem como ao meio ambiente, sendo necessário estabelecer programas de monitoramento da qualidade ambiental das águas superficiais em área mais expostas ao uso de agrotóxicos.

TABELA 1.1 – ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS TRIAZINICOS DE INTERESSE.

Analito	Estrutura	Fórmula Molecular	Coefficiente de partição (Log K _{ow}) (pH 7, 20°C)	Constante de ionização (pKa) (25°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹) (20°C)	t 1/2 vida solo (dias)	t 1/2 vida água (dias)	K _{oc}
Desisopropilatrazina		C ₅ H ₈ ClN ₅	1,15	-	980	-	-	130
Desetilatrazina		C ₆ H ₁₀ ClN ₅	1,51	-	2700	45-170	-	110
Ametrina		C ₉ H ₁₇ N ₅ S	2,63	10,07	200	37-120	-	316
Simazina		C ₇ H ₁₂ ClN ₅	2,3	1,62	5	27-102	46	130
Cianazina		C ₉ H ₁₃ ClN ₆	2,1	12,9	171	12-25	-	190
Terbutilazina-desetil		C ₇ H ₁₂ ClN ₅	2,3	-	327,1	40,7-93,8	-	-
Prometrina		C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	3,34	4,1	33	41-60	56	400
Atrazina		C ₈ H ₁₄ ClN ₅	2,7	1,7	35	28-150	-	100
Propazina		C ₉ H ₁₆ N ₅ Cl	3,95	1,7	8,6	135	77	154
Terbutilazina		C ₉ H ₁₆ ClN ₅	3,4	1,9	6,6	38-167	6	-

Fonte: Pesticides Properties Data Base (PPDB)(AERU, 2022);

Notas: K_{ow}: Coeficiente de partição octanol-água; K_{oc}: Coeficiente de partição de carbono orgânico (descreve a tendência de um pesticida se ligar a partículas do solo); -: sem informação.

Outro estudo realizado na mesma região da Argentina avaliou a contaminação de atrazina em águas subterrâneas e seu potencial de bioacumulação no leite bovino (Urseler et al., 2022). A presença de atrazina foi detectada em 50% das amostras de água subterrânea, em concentrações de até $1,40 \mu\text{g L}^{-1}$, e em 89% das amostras de leite, em concentrações entre 2,51 e $20,97 \mu\text{g L}^{-1}$. Em função destes resultados, os autores alertaram que os níveis de atrazina ultrapassaram os limites seguros de consumo humano em 44,4% das amostras de água subterrânea e 11% das amostras de leite.

No Brasil, também há relatos de diversos estudos sobre a presença de agrotóxicos triazínicos em águas naturais. Como no estudo de Perin et al. (2021), onde avaliaram a presença de fármacos, agrotóxicos e metais no rio Guaíba, no Rio Grande do Sul. Detectaram a presença de atrazina e simazina nas amostras analisadas, sendo obtidas concentrações de até $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Outro relato para a presença de atrazina em águas superficiais do mesmo estado foi realizado no estudo de Donato et al. (2017) onde os autores detectaram concentrações de até $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ para a atrazina.

Estudos realizados por Montagner et al. (2019) durante 10 anos no estado de São Paulo, detectaram a presença de herbicidas triazínicos em amostras de água superficial e potável em concentrações de até 0,61, 0,15 e $0,031 \mu\text{g L}^{-1}$, para atrazina, ametrina e simazina, respectivamente. De acordo com os autores, a atrazina está entre os compostos que requer uma preocupação prioritária, levando em conta a sua frequência de detecção (superior a 69%) e número de amostras positivas acima dos critérios de qualidade da água avaliados por eles.

Acayaba et al. (2021), avaliaram a ocorrência de agrotóxicos em águas superficiais próximas a região canavieira, do estado de São Paulo. Os autores relataram a presença de 14 agrotóxicos, dentre eles ametrina, atrazina e simazina, com concentrações de até 1,1, 0,5 e $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os autores também realizaram avaliação de risco para águas superficiais e concluíram que a ametrina é um dos compostos avaliados que apresenta possível risco para a vida aquática. Com isso, ressaltaram a necessidade de ações para reduzir a quantidade de agrotóxicos utilizadas na agricultura, bem como a implantação de programas de monitoramento da qualidade da água.

1.1.2. Aspectos ambientais do glifosato

O glifosato (GLY; N-(fosfonometil)-glicina) é o herbicida mais consumido no Brasil, com cerca de 2 milhões de toneladas comercializadas em 2020 (IBAMA, 2021).

Trata-se de um herbicida não-seletivo de controle pós-emergente amplamente utilizado em diversas culturas, dentre elas, soja, milho e trigo (ANVISA, 2022b). Seu modo de ação afeta processos bioquímicos da planta, como a síntese de aminoácidos e proteínas (COUTINHO; MAZO, 2005). Ao inibir a formação da enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (ESPS), responsável pela síntese de aminoácidos, a síntese de proteínas também é comprometida, afetando o desenvolvimento da planta (CASTRO BERMAN et al., 2018).

São conhecidas duas vias de degradação do glifosato realizada por bactérias, que utilizam o produto da degradação como fonte de energia e fósforo: a primeira é a transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal produto de degradação (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002), enquanto que a segunda é a transformação do glifosato em sarcosina, uma rota alternativa pouco citada na literatura.

Algumas características físico-químicas das espécies de interesse são apresentadas na TABELA 1.2.

TABELA 1.2 – ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO.

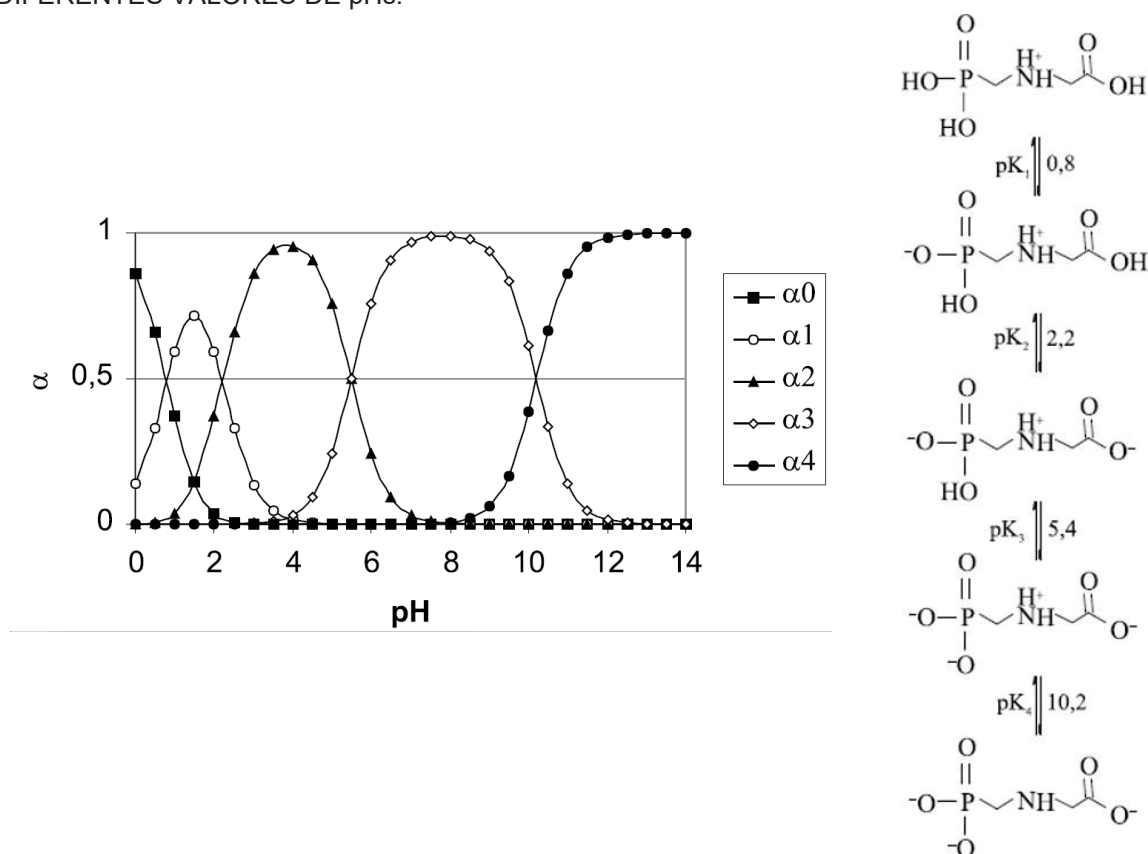
Analito	Fórmula Molecular	Coefficiente de partição (Log K _{ow}) (pH 7, 20°C)	Constante de ionização (pK _a) (25°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹) (20°C)	t ½vida solo (dias)	t ½vida água (dias)	K _{oc}
Glifosato	C ₃ H ₈ NO ₅ P	-6,28	pK ₁ =0,8; pK ₂ =2,2, pK ₃ =5,4 e pK ₄ =10,2	100000	6,45-78	9,9	1424
AMPA	CH ₆ NO ₃ P	-1,63	-	1466561	-	-	-
Glufosinato	C ₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ P	-4,01	9,15	500000	28-1000	5,47	2002

Fonte: Pesticides Properties Data Base (PPDB)(AERU, 2022);

Notas: K_{ow}: Coeficiente de partição octanol-água; K_{oc}: Coeficiente de partição de carbono orgânico (descreve a tendência de um pesticida se ligar a partículas do solo); -: sem informação.

Como pode ser observado, o glifosato, diferentemente do AMPA e do glufosinato, apresenta 4 constantes de ionização. Para melhor compreensão a FIGURA 1.3 apresenta o diagrama de distribuição de espécies em função do pH, bem como as reações de dissociação.

FIGURA 1.3 – REPRESENTAÇÃO DAS DISSOCIAÇÕES DA MOLÉCULA DE GLIFOSATO NOS DIFERENTES VALORES DE pHs.



Nota: α_0 , composto com uma protonação; α_1 , molécula com uma dissociação; α_2 , molécula com duas dissociações; α_3 , molécula com três dissociações; α_4 , molécula totalmente dissociada

Fonte: Adaptado de Amarante Junior; Santos, (2002)

O glifosato é um composto zwitteriônico e existe principalmente na forma de ânions, no pH normal da água. De acordo com Amarante Junior e Santos (2002), quando em pH abaixo de 0,8, há a predominância de glifosato com uma protonação no sítio amina. Já no valor da primeira constante ($pK_1 = 0,8$), metade das moléculas encontram-se protonadas e a outra metade apresenta uma dissociação no grupo fosfato. Até o valor da segunda constante ($pK_2 = 2,2$), há o predomínio da forma molecular, com uma dissociação e uma protonação, e 50% das moléculas vão possuir duas dissociações. Na faixa de $2,2 < \text{pH} < 5,4$, haverá o predomínio da forma com duas dissociações, tendo, da mesma forma, 50% das moléculas com três dissociações em

pH 5,5. A partir desse pH até 10,2 haverá as três dissociações ocorrendo, então, neste pH as formas com três e quatro dissociações estarão presentes, estando o glifosato totalmente dissociado em pH superior a 11.

De acordo com Amarante Junior e Santos, (2002), o glifosato tende a ser inativo quando em contato com o solo, desde que seja adsorvido. A degradação do composto adsorvido, quando ocorre, é lenta, levando, portanto, à persistência do composto durante anos no ambiente. Desta forma, glifosato e AMPA tendem a não serem detectados em águas subterrâneas, porém, podem contaminar águas superficiais através de partículas que possam ter sido carregadas até o corpo hídrico e que contenham glifosato.

O glufosinato (GLU; sal de amônio do ácido 2-amino-4-(hidroximetilfosfinil) butírico) é um herbicida não seletivo de controle pós-emergente, de amplo espectro, utilizado em culturas como soja, milho, trigo, canola e algodão (ANVISA, 2022c; TAKANO et al., 2019). Assim como o glifosato, seu modo de ação afeta processos bioquímicos importantes, neste caso, inibe a enzima glutamina sintetase responsável pela assimilação de nitrogênio pela planta (MOJIRI et al., 2020; TAKANO et al., 2019).

Com relação às legislações ambientais, no Brasil, são aceitáveis concentrações de até $65 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em águas doces superficiais de classe I e II pela Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005), enquanto que a Portaria do Ministério da Saúde nº888 de 2021, determina para águas utilizadas no abastecimento o limite aceitável é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e AMPA (BRASIL, 2021).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, determina para a qualidade de água potável, que são aceitáveis concentrações de até $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em água de consumo (USEPA, 2022b). Já no Canadá, o valor permitido de glifosato na água potável não deve ultrapassar $280 \mu\text{g L}^{-1}$ (CANADA, 2022). Valores muito inferiores são encontrados nas diretrizes da União Europeia, com limite de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para glifosato na água potável (UE, 2020). Cabe ressaltar que, nenhuma das normativas contempla limites aceitáveis para o glufosinato e AMPA.

Diversos estudos vem sendo realizados com o intuito de detectar a presença desses agrotóxicos em diferentes matrizes, como é o caso de um estudo recente realizado na região oeste do estado do Paraná, o qual relata a presença de glifosato no leite materno ($1,45 \mu\text{g L}^{-1}$), nas 67 amostras avaliadas (CAMICCIA et al., 2022). Os autores sugerem que a população de lactantes avaliada foi contaminada com o glifosato devido a uma exposição ambiental contínua, não estando necessariamente,

ligado ao trabalho exercido, uma vez que buscaram ter um grupo heterogêneo composto por população da área urbana e rural.

Há também relatos de concentrações desses agrotóxicos em amostras de água. Wirth, Schulz-Bull e Kanwischer, (2021) desenvolveram um método para a determinação de glifosato e AMPA no ambiente marinho e, após a validação, aplicaram o método em amostras de um estuário na Alemanha, onde detectaram a presença dos agrotóxicos. Observaram concentrações de 28 ng L⁻¹ e 181 ng L⁻¹, para glifosato e AMPA, respectivamente. Os autores relatam que essas concentrações foram obtidas próximas a área de descarga de um rio da região e que, quanto mais próximo ao mar, as concentrações foram reduzindo devido ao efeito de diluição que ocorre na região.

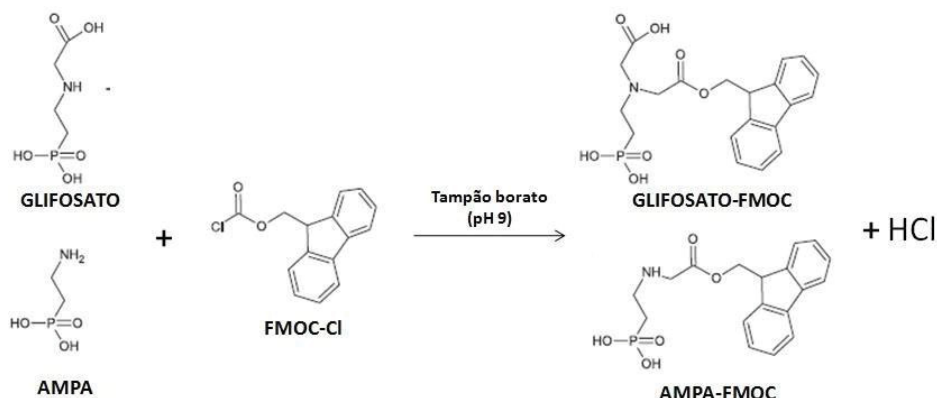
Castro Berman et al., (2018) avaliaram a presença de glifosato e AMPA em lagos na região do pampa argentino coletando amostras de água e sedimento da região. Detectaram com maior frequência, resíduo de glifosato em amostras de sedimento do que nas águas superficiais. No sedimento, foram determinadas concentrações de até 20,34 µg kg⁻¹ e 32,89 µg kg⁻¹ para glifosato e AMPA, respectivamente. Já para águas superficiais, detectaram concentrações de até 4,52 µg L⁻¹ para glifosato e 0,90 µg L⁻¹ para AMPA foram observadas. Com base nesses antecedentes, nota-se a importância da avaliação da presença de glifosato nos diferentes compartimentos ambientais.

1.1.2.1. Métodos para a determinação de glifosato e seus produtos de degradação

Embora glifosato e AMPA não apresentem grupos cromóforos, a sua derivatização preliminar permite uma excelente detectabilidade por técnicas cromatográficas acopladas a detectores DAD ou de fluorescência. Por este motivo, a determinação destas espécies sempre está associada a uma etapa de derivatização, usualmente envolvendo o uso de cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl).

A reação de substituição nucleofílica ocorre em condições alcalinas e, favorece a substituição de um hidrogênio do grupo amino (BRESSÁN et al., 2021), levando a formação de derivados que absorvem e fluorescem intensamente, em razão da conjugação favorecer transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (FIGURA 1.4).

FIGURA 1.4 - REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA COM FMOC-Cl



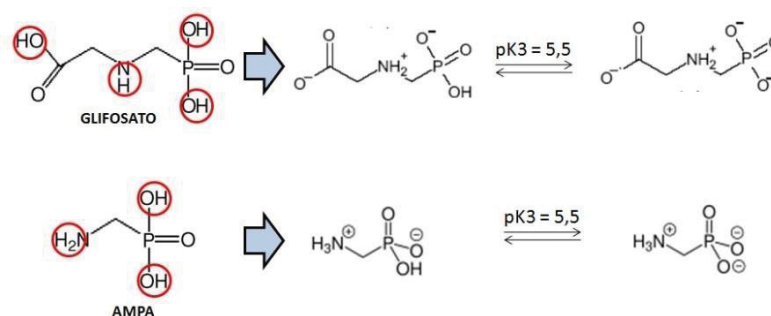
Fonte: Adaptado de CATRINCK et al., (2014)

Embora a derivatização aumente a sensibilidade das técnicas instrumentais de análise, a determinação destas espécies em amostras de águas naturais deve envolver processos de extração, objetivando operações de pré-concentração e *clean-up*.

Pelo fato da sua estrutura ser formada por 4 (e 3) grupos ionizáveis de natureza diferente (amínico, carboxílico e fosfônico), o glifosato e AMPA apresentam um comportamento anfótero, o que faz com que em valores de pH próximos à neutralidade ambas as espécies se apresentam ionizadas (FIGURA 1.5). Devido a esta característica, ambas espécies apresentam elevada solubilidade em água e baixa solubilidade em solventes orgânicos, o que dificulta a extração mediada por solventes.

Em função desta peculiaridade, ênfase tem sido dada à proposta de métodos de extração em fase sólida, utilizando-se sorventes diversos. De maneira geral, entretanto, observa-se que sorventes clássicos, como os constituídos de octadecilsílica (C18), (SANCHÍS et al., 2012) e de fases poliméricas, como Strata X (HANKE; SINGER; HOLLENDER, 2008) e Oasis HLB (IBÁÑEZ et al., 2005), somente apresentam uma elevada capacidade de recuperação quando precedidos de etapas de derivatização.

FIGURA 1.5 - REPRESENTAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE IONIZAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM pH PRÓXIMO À NEUTRALIDADE



Fonte: Autoria própria (2022)

Novos materiais têm sido desenvolvidos, com claro destaque para polímeros molecularmente impressos (PUZIO et al., 2014) alguns, inclusive, de disponibilidade comercial. Claude et al., (2017), por exemplo, utilizaram polímeros comerciais especificamente impressos para glifosato e AMPA, o que permitiu recuperações da ordem de 80% em amostras de água subterrânea fortificada com 100 ng L^{-1} de ambos os analitos. O método, fundamentado na determinação dos analitos por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas, permitiu confiável determinação na faixa compreendida entre 25 e 750 ng L^{-1} , após derivatização com FMOC-Cl e extração com SPE on line.

Dentro do contexto dos novos materiais, destaque deve ser dado ao uso de compósitos magnéticos contendo estruturas orgânicas associadas a nanopartículas metálicas (MOF, do inglês "*metal-organic framework*"), utilizadas com sucesso na determinação de glifosato e AMPA (PAN et al., 2019). O método, associado à técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, permitiu recuperações entre 86 e 104% e limites de detecção entre 10 e 30 g L^{-1} .

Como visto, esforços são dedicados ao preparo de fase sorventes que permitam a extração destes analitos do meio aquoso. Muitas vezes, entretanto, os materiais propostos são caros e de difícil obtenção, o que dificulta a sua universalização. Por outro lado, existe uma classe de materiais sorventes já consolidados, os quais, em razão de apresentar elevada afinidade com a estrutura do glifosato e do AMPA, têm sido utilizados com sucesso na extração destes analitos,

desde a década de 1990. Trata-se da extração fundamentada no uso de resinas trocadoras de íons, tema que será aprofundado a seguir.

1.2. MÉTODOS PARA PREPARO DE AMOSTRA

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de relevância ambiental exige o uso de métodos de preparo de amostra, de maneira a compatibilizar a concentração da espécie de interesse e a complexidade da matriz com a sensibilidade e seletividade da técnica analítica disponível. Trata-se de uma etapa importante no procedimento analítico, uma vez que garante a remoção de interferentes, a concentração e o isolamento da espécie de interesse (CALDAS et al., 2011). Assim, não é de hoje que diversas técnicas vêm sendo propostas com esta finalidade, envolvendo sistemas de extração em fase líquida e sólida.

Dentro do contexto dos sistemas de extração em fase líquida se destaca a extração líquido-líquido convencional (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), que se fundamenta na transferência de um soluto de uma fase, usualmente aquosa, para outra fase receptora, normalmente um solvente orgânico imiscível, de acordo com o coeficiente de partição do soluto entre as duas fases. Embora maciçamente utilizadas durante muito tempo, estas técnicas foram perdendo popularidade em razão de desvantagens como baixa seletividade, elevado consumo de solventes orgânicos e, nos casos em que há formação de emulsões, dificuldade na separação de fases (CALDAS et al., 2011).

Buscando reduzir a quantidade de solventes, o tempo de análise e o custo por amostra, novas técnicas de preparo de amostra foram sendo desenvolvidas no âmbito da extração em fase líquida, incluindo técnicas miniaturizadas envolvendo sistemas de microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*) (PINTO et al., 2010; RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007), microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber-based Liquid Phase Microextraction*) (HORTA et al., 2018; LETSEKA; GEORGE, 2017; LIOU et al., 2018; MENEZES et al., 2016; SALVATIERRA-STAMP et al., 2018; YANG et al., 2018) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (AGUILAR-ARTEAGA et al., 2020; DA SILVA; DORES; VILLA, 2017; DELLA-FLORA et al., 2018; PRIMEL et al., 2017; SERESHTI et al., 2022; YANG et al., 2019)

1.2.1. Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

A técnica de extração em fibra oca (HF-LPME) foi desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) para a determinação de meta-anfetamina em amostras de plasma e urina humana. O método de HF-LPME é fundamentado na utilização de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca), na qual se imobiliza um solvente orgânico que atua como uma barreira entre a amostra (fase doadora) e o solvente orgânico ou solução aquosa presente no interior da fibra (fase aceptora). Em função do baixo custo do material, cada unidade de extração é utilizada uma única vez, evitando assim a contaminação entre análises (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

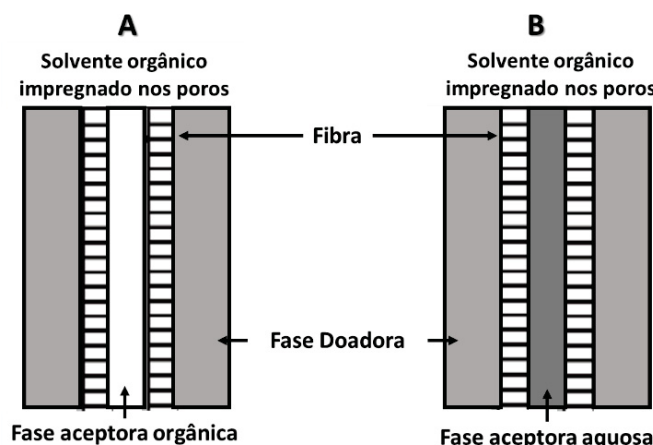
Na técnica, os analitos são extraídos de uma fase doadora (amostra), usualmente em volumes da ordem de mL, ao interior de um fragmento de fibra oca (1,5 a 10 cm) que imobiliza cerca de 15 a 20 μL de solvente nos poros e que contém no seu interior (lúmen) uma fase aceptora em volumes da ordem de 5 a 25 μL (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

A HF-LPME pode ser realizada de dois modos: bifásico ou trifásico, dependendo das características do analito (OLIVEIRA et al., 2008; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016). No modo bifásico, a solução aceptora, neste caso é um solvente orgânico hidrofóbico presente no interior da fibra, é também imobilizada nos poros. O sistema é então colocado em contato com a fase doadora (amostra) contendo o analito (FIGURA 1.6 A), que é extraído através dos poros da membrana (OLIVEIRA et al., 2008; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). O extrato obtido é um solvente orgânico hidrofóbico, que pode ser analisado diretamente por cromatografia em fase gasosa (GC) ou cromatografia em fase líquida (LC) em fase normal, ou por LC em fase reversa, incluindo-se, neste último caso, uma etapa de secagem e reconstituição em fase móvel (MAGALHÃES; BONATO; DE OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2008).

No modo trifásico, a solução aceptora no interior da fibra é uma solução aquosa (FIGURA 1.6 B), o que favorece a extração de analitos moderadamente hidrofóbicos, com grupos ionizáveis. Neste caso, o pH das fases doadora e aceptora se mostra muito relevante, sendo necessário o seu ajuste (MAGALHÃES; BONATO; DE OLIVEIRA, 2009). Após a extração, para ambos os modos, a fase aceptora é

retirada com o auxílio de uma microseringa, usualmente para análise por cromatografia (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

FIGURA 1.6 – REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO BIFÁSICO (A) E SISTEMA DE EXTRAÇÃO TRIFÁSICO(B)

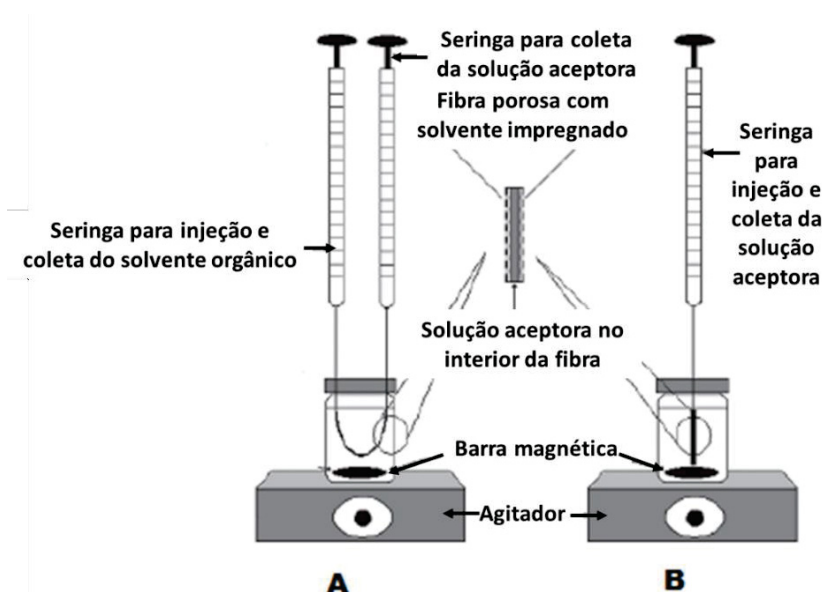


Fonte: OLIVEIRA et al., (2008)

Desde a sua criação, em 1999, existem duas principais configurações empregadas nas análises utilizando HF-LPME: a configuração em “U” e tipo “haste” (FIGURA 1.7). Na configuração em “U” (FIGURA 1.7 A), a mais empregada, se utilizam duas microseringas, uma em cada extremidade da fibra, para prevenir a perda de solvente durante a extração. Na configuração em “haste” (FIGURA 1.7 B), somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora; neste caso, a outra extremidade da fibra é selada por pressão ou calor, para evitar que a fase aceptora entre em contato com a amostra (OLIVEIRA et al., 2008; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Além das características dos analitos, existem outros parâmetros que podem afetar a eficiência do processo de extração, incluindo o material da membrana (fibra), o tipo de solvente orgânico, o pH da fase doadora e aceptora, a força iônica, a agitação do sistema e o tempo e a temperatura de extração (OLIVEIRA et al., 2008; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

FIGURA 1.7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO EM “U” (A) E CONFIGURAÇÃO EM “HASTE” (B) PARA HF-SPME



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., (2008)

Além das características dos analitos, existem outros parâmetros que podem afetar a eficiência do processo de extração, incluindo o material da membrana (fibra), o tipo de solvente orgânico, o pH da fase doadora e aceptora, a força iônica, a agitação do sistema e o tempo e a temperatura de extração (OLIVEIRA et al., 2008; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

Desde as primeiras aplicações da HF-LPME, em 1999, as fibras foram constituídas de propileno, em razão da compatibilidade deste material com uma ampla gama de solventes orgânicos. Além disso, o tamanho típico dos poros ($0,2\ \mu\text{m}$) presentes no material imobiliza fortemente o solvente orgânico, evitando perdas durante o processo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). A espessura da parede interna da fibra foi padronizada em $200\ \mu\text{m}$, valor tipicamente encontrado nas fibras comerciais. De acordo com Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, espessuras inferiores a $200\ \mu\text{m}$ resultariam em baixa estabilidade mecânica da fibra, enquanto que valores superiores resultariam em elevados tempos de extração, com baixas recuperações (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O solvente utilizado deve ser imiscível em água, pouco volátil e apresentar compatibilidade com o material da membrana capilar, pois desta forma serão fortemente imobilizados nos poros da fibra. Além disso, devem solubilizar as espécies de interesse e serem compatíveis com a técnica de análise instrumental (SHARIFI;

ABBASI; NOSRATI, 2016). Cabe ressaltar, que a membrana capilar irá atuar como suporte para esse solvente, que por sua vez atuará como uma membrana líquida suportada no processo de extração. A maioria dos solventes utilizados na extração trifásica também podem ser aplicados no modo bifásico, sendo 1-octanol, tolueno e éter-dihexílico, os mais empregados (OLIVEIRA et al., 2008; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

O efeito do pH é de extrema importância, principalmente quando os analitos apresentam grupos ionizáveis. Nesses casos, o pH da fase doadora deve garantir a neutralidade dos analitos, reduzindo a solubilidade na amostra, enquanto que o pH da fase aceptora deve garantir a sua ionização, ocorrendo assim a extração através do solvente orgânico presente nos poros da fibra oca (SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

Para o ajuste de pH, encontram-se na literatura informações de que o valor deve ser de pelo menos 1,5 unidade (SIMÃO, 2015) até 3 unidades do pKa das espécies de interesse, para que a espécie predominante seja a espécie eletricamente neutra, facilitando a extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Portanto, em um sistema trifásico, para a extração de analitos ácidos, a solução aceptora deve ser básica e, soluções aceptoras ácidas devem ser empregadas para a extração de analitos básicos, pois dessa forma garantirá a ionização do analitos.

Como as moléculas foram ionizadas na fase aceptora, devido ao ajuste do pH, a fibra atua como uma barreira evitando o retorno do analito para a solução doadora. Desta forma, o analito deve ser mais solúvel na fase aceptora do que no solvente orgânico impregnado na fibra (MAGALHÃES; BONATO; DE OLIVEIRA, 2009; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999).

A força iônica, por outro lado, pode influenciar de diferentes maneiras no processo de extração. Geralmente, a adição de sal à solução resulta no aumento da taxa de extração do analito, devido ao efeito *salting-out*, pois o aumento da força iônica favorece a migração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica, assim como ocorre na técnica de DLLME (DE BAIRROS et al., 2015; PRIMEL et al., 2017; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016; YANG et al., 2018).

De acordo com Alsharif et al., (2017) o efeito da força iônica pode variar dependendo das propriedades do analito. Ao adicionar uma concentração de sal à fase receptora aumenta-se a partição dos analitos nesta fase. Por outro lado, ao se adicionar uma elevada concentração de sal à fase doadora, as propriedades físicas

da membrana líquida suportada podem ser alteradas, o que pode reduzir a taxa de extração dos analitos (ALSHARIF et al., 2017).

A velocidade de agitação, tempo de extração e temperatura, são parâmetros que afetam a transferência de massa durante a extração, por isso, devem ser otimizados. Conforme a velocidade de agitação aumenta, a transferência de massa também aumenta e, conseqüentemente, o equilíbrio termodinâmico é atingido em um menor tempo (SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

O tempo, por sua vez, é outro parâmetro de grande importância e deve ser o mais curto possível. Na literatura é possível encontrar tempos de 30 a 60 minutos, como valores tipicamente utilizados para a extração (GURE et al., 2013; SALVATIERRA-STAMP et al., 2018; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016), porém, existem casos de tempos superiores (240 min) (HU et al., 2010).

Já a temperatura, assim como a velocidade de agitação, além de afetar a transferência de massa, também afeta os coeficientes de partição do soluto entre a fase orgânica e aquosa. Cabe ressaltar que a utilização de temperaturas elevadas pode prejudicar a eficiência de extração, devido à evaporação do solvente orgânico e a formação de bolhas de ar que aderem à fibra (SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

A HF-LPME apresenta como vantagens, em relação aos métodos convencionais de extração com solventes, a facilidade de operação, rapidez, custo reduzido, elevada taxa de recuperação e alto fator de enriquecimento. Por outro lado, possui algumas limitações, como a dificuldade de determinar espécies altamente polares e hidrofílicas. Espécies deste tipo apresentam coeficientes de partição desfavoráveis, sendo fracamente extraídas em sistemas baseados somente em difusão. Nestes casos, torna-se necessária a formação de pares iônicos (SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016), que podem ser extraídos na fase orgânica presentes nos poros da fibra (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

A técnica é limitada ao uso de solventes com elevados pontos de ebulição e insolúveis em água, o que é um dos seus diferenciais, principalmente no modo trifásico, onde é possível o controle do pH. A barreira física criada pelos poros da membrana é outro destaque da técnica, pois acaba selecionando os analitos por exclusão de tamanho, por isso, é uma técnica amplamente utilizada para amostras biológicas. Por outro lado, a técnica é totalmente manual, o que desfavorece a precisão do método, sendo recomendado o uso de padronização interna (SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016), como na maioria das técnicas de extração miniaturizadas.

Diversos são os trabalhos envolvendo a aplicação de HF-LPME na análise de amostras ambientais. Dentro deste contexto merece destaque o trabalho de Salvatierra-Stamp et al., (2018) que avaliaram o uso da técnica para a determinação de contaminantes emergentes em amostras de águas superficiais, utilizando cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS). O processo de extração foi realizado em modo bifásico, empregando como solvente orgânico 1-octanol. Envolveu o ajuste do pH da amostra (7), a adição de 3% de NaCl (m/v), um tempo de extração de 30 min, a 100 rpm e temperatura de 24°C, o que permitiu limites de quantificação (LOQ) entre 2 e 126 ng L⁻¹ para amostras de água. Para atrazina, o LOQ foi de 5,84 ng L⁻¹ e o EF da ordem de 1300 vezes.

Hu et al., (2010), avaliaram a técnica para a determinação de herbicidas em água, utilizando modo bifásico, éter dihexílico como solvente e, para facilitar a extração de alguns analitos, um solvente de transporte (óxido de trioctilfosfina, TOPO). O sistema de extração foi diferente, envolvendo o uso de uma fibra selada em ambas as extremidades e recheada com água ultrapura. Nestas condições, os analitos ficaram retidos nos poros da fibra e não no seu interior. Após a extração, as extremidades da fibra eram cortadas e, com o auxílio de uma seringa, a água presente no lúmen era coletada e descartada. Posteriormente, uma seringa contendo metanol foi conectada a uma das extremidades para realizar a eluição dos analitos que estavam na parede da fibra, para posterior determinação por LC-DAD. Sob essas condições, os autores obtiveram EF de 156 a 442 vezes.

Peng et al., (2007), também utilizaram a fibra oca em uma configuração diferente da usual. Eles avaliaram a determinação de atrazina e seus produtos de degradação (DIA e DEA) através do modo trifásico, porém utilizando a fibra oca na horizontal, em uma placa de petri. Utilizaram como solvente orgânico o 1-octanol para impregnar os poros da fibra e preencheram seu interior com HCl 4 mol L⁻¹. Depois disso, as extremidades da fibra foram seladas com o auxílio de uma pinça aquecida e a fibra foi levada para o processo de extração. Após o procedimento, uma extremidade da fibra foi cortada para facilitar a retirada da solução aceptora e a esta foi adicionado NaOH para neutralizar a solução e prosseguir a análise por LC-DAD.

No QUADRO 1.1 são apresentados dados compilados da literatura sobre a utilização do método HF-LPME para a extração de diferentes analitos, principalmente agrotóxicos, de amostras de matrizes ambientais.

QUADRO 1.1– APLICAÇÃO DO MÉTODO DE HF-LPME EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, COM FOCO NOS DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES UTILIZADOS. DADOS COMPILADOS A PARTIR DA LITERATURA (2002-2018).

Autor	Análitos	Matriz	Modo	Fase Doadora	Solvente Orgânico	Fase Aceptor	Tempo	Agitação	Força Iônica	T (°C)	Fibra	Técnica Cromatográfica
Shen; Hian, (2002)	Triazinas	Água e sedimento	Bifásico	3 mL, pH 7	Tolueno	Tolueno	20 min	100 rpm	10 % NaCl	-	1,3 cm	GC-MS
Peng et al., (2007)	ATZ, DIA e DEA	Água	Trifásico	50 mL, pH 7	1-octanol	HCl 4 mol L ⁻¹	30 min	Média	20 % NaCl	-	5,0 cm	LC-DAD
Hu et al., (2010)	Herbicidas	Água	Bifásico	50 mL, pH 1,3	Éter-dihexílico +10% TOPO	Água ultrapura	240 min	200 rpm	5 % NaCl	-	25 cm	LC-DAD
Gure et al., (2013)	Herbicidas	Água	Trifásico	12 mL, pH 2,3	Éter-dihexílico	Tampão fosfato 0,5 mM pH11	60 min	1200 rpm	5 % NaCl	-	10 cm	cLC-DAD
Menezes et al., (2016)	Agrotóxicos multiclasses	Água superficial	Bifásico	15 mL	Octanoato de etila	Octanoato de etila	30 min	200 rpm	-	-	6,0 cm	GC-MS
Salvaterra-Stamp et al., (2018)	Agrotóxicos Fármacos Produtos de higiene pessoal Produtos industriais Cafelna	Água superficial	Bifásico	1 L, pH 7	1-octanol	1-octanol	30 min	100 rpm	3 % NaCl	24 °C	5,5 cm	LC-MS/MS
Yang et al., (2018)	Triazinas	Água, mel e tomate	Trifásico	6 mL	Decano	H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹	40 min	1200 rpm	15 % NaCl	-	3,0 cm	Cromatografia de eletroforese capilar (MEKC-UV)
Liou et al., (2018)	Glifosato e AMPA	Soja e pimenta	Trifásico	2 mL pH 12	Mistura de solventes*	HCl 0,1 mol L ⁻¹	15 min	600 rpm	-	-	3,5 cm	LC-MS/MS

Notas: ATZ: Atrazina; T: temperatura; cLC: Cromatografia Líquida Capilar; DIA: Desisopropilatraxina; DEA: Desetilatraxina; TOPO: Óxido de trioctilfosfina.

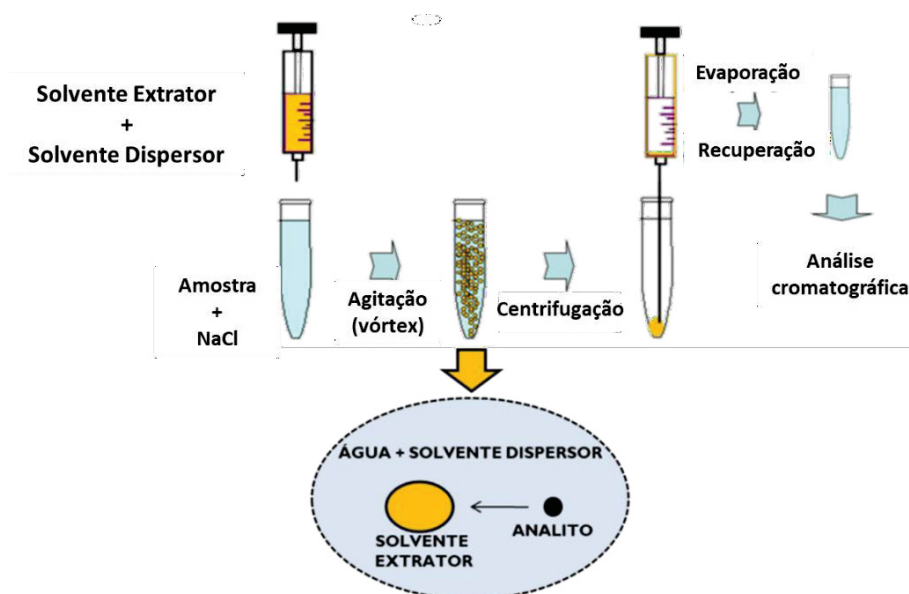
*: 0,4 mL 1-octanol, 1 mL Aliquat 336, 8,6 mL n-dodecano

1.2.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A técnica de DLLME foi desenvolvida em 2006, por Rezaee e colaboradores, e é fundamentada na formação de uma fina dispersão do solvente extrator (emulsão) na solução aquosa, graças à adição conjunta de um solvente auxiliar (dispersor). Assim, a rápida injeção desta mistura de solventes cria uma dispersão de micro-gotas de solvente extrator, o que representa uma elevada área de contato para a transferência de solutos entre as fases aquosa e orgânica (CALDAS et al., 2011; PRIMEL et al., 2017).

Assim como representado na FIGURA 1.8 o processo envolve a rápida adição de uma mistura contendo o solvente extrator (na faixa de μL) e o solvente dispersor (mL) na solução aquosa, usualmente utilizando-se uma seringa ou micropipeta. Após leve agitação, forma-se uma solução turva contendo micro-gotas do solvente extrator, o que viabiliza a rápida extração dos analitos. Depois da centrifugação ocorre a formação de uma fase sedimentada constituída pela fase orgânica, a qual pode ser retirada com o auxílio de uma seringa para posterior quantificação por técnicas apropriadas (CALDAS et al., 2011).

FIGURA 1.8 – ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVO (DLLME)



Fonte: Adaptado de MOREIRA; MICHICO; YOKOYA, (2014)

Em relação aos métodos convencionais de extração com solventes, a DLLME oferece significativas vantagens, incluindo simplicidade operacional, rapidez, baixo consumo de solventes, baixo custo, elevada taxa de recuperação, elevado fator de enriquecimento e compatibilidade com GC e LC (CALDAS et al., 2011; PRIMEL et al., 2017). Por outro lado, existem algumas desvantagens relacionadas, principalmente, com os pré-requisitos do solvente extrator, o qual, além de ter a capacidade de extrair os analitos, deve apresentar baixa solubilidade em água, formar uma solução turva quando em contato com a amostra juntamente com o solvente dispersor e ser compatível com a instrumentação analítica (PRIMEL et al., 2017).

Grande parte das aplicações ambientais da DLLME envolve o uso de solventes clorados, como clorobenzeno, diclorometano, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno, associados a solventes dispersantes, como acetona, acetonitrila e metanol (PRIMEL et al., 2017). A técnica tem sido particularmente relevante na determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas (CALDAS et al., 2011; MARTINS et al., 2012), mostrando excelente desempenho e evidenciando a importância de parâmetros experimentais como volume e tipo de solventes (extrator e dispersor), tempo de extração, pH e adição de sais (força iônica).

Estes parâmetros afetam diretamente a eficiência de extração, o que faz com que a otimização preliminar seja essencial. O volume ideal de solvente extrator, por exemplo, será aquele que proporcione uma elevada eficiência de extração dos analitos, juntamente com elevados fatores de enriquecimento. Por outro lado, o solvente dispersor deve ser miscível na fase aquosa e no solvente extrator, devendo ser utilizado em um volume que garanta a formação de uma fina dispersão de solvente extrator, o que, por sua vez, depende do volume de fase aquosa e do solvente extrator. Além disso, é do volume de solvente dispersor que depende o volume da fase sedimentada e o consequente fator de enriquecimento do método (MARTINS et al., 2012; PRIMEL et al., 2017).

O tempo de extração, usualmente definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes (extrator e dispersor) e o início da centrifugação (REZAEI et al., 2006), é relativamente curto, em razão do equilíbrio de distribuição ser alcançado rapidamente. Assim, o tempo de extração não é um parâmetro tão crítico no processo de extração por DLLME.

Outros parâmetros, como pH e força iônica, também influenciam a eficiência de extração. O efeito do pH torna-se mais significativo quando os analitos avaliados

apresentam um ou mais grupos ionizáveis, em razão do equilíbrio de protonação/desprotonação modificar sensivelmente a sua polaridade e, desta forma, a sua partição nas microgotas do solvente extrator (CALDAS et al., 2016; PRIMEL et al., 2017). Por outro lado, a adição de sais pode aumentar a recuperação dos analitos da fase aquosa, graças ao efeito *salting-out* (PRIMEL et al., 2017). Entretanto, este efeito deve ser avaliado com cautela, em razão do sal também diminuir a solubilidade do solvente extrator na água, o que faz aumentar o volume da fase sedimentada e, conseqüentemente, diminuir o fator de enriquecimento (SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Inicialmente, a DLLME foi fundamentada no uso de solventes clorados, por serem mais densos que a água. Porém, a sua elevada toxicidade e baixa capacidade para extração de compostos mais polares (PRIMEL et al., 2017) incentivou o uso de solventes menos tóxicos, como líquidos iônicos e surfactantes, e menos densos que a água, como 1-undecanol, 1-dodecanol, 1-hexanol, hexano e ciclo-hexano (PRIMEL et al., 2017; SPIETELUN et al., 2014). De acordo com Spietelun et al., (2014), o uso de solventes extratores menos densos possibilita a extração dos analitos sem o uso de um solvente dispersor e também elimina a etapa de centrifugação da amostra.

Outras modificações incluíram o uso de ultrassom e vórtex, o que também permite a eliminação do uso do solvente dispersor. Nesses casos, essas técnicas auxiliam na dispersão do solvente extrator na amostra e no efeito de aquecimento induzido pela agitação, o que ajuda na separação das fases após a centrifugação (ANDRUCH et al., 2013; SPIETELUN et al., 2014). Com isso, diversas modificações do método foram surgindo com a combinação de métodos que utilizavam surfactantes ou líquidos iônicos assistidos por ultrassom ou vórtex, como é o caso da microextração por emulsificação aprimorada por surfactante assistida por ultrassom (PRIMEL et al., 2017; SPIETELUN et al., 2014).

Diversos são os trabalhos envolvendo a aplicação de DLLME em amostras ambientais. Pastor-Belda et al., (2017), por exemplo, avaliaram o uso combinado de solventes pela técnica de DLLME para a determinação de fungicidas em amostras de água e frutas, utilizando como técnica de quantificação a cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). A proposta envolveu o uso de solvente extrator constituído de 1-undecanol (100 µL) e clorofórmio (150µL), e acetonitrila (3,0 mL) como solvente dispersante. O método permitiu limites de quantificação entre 1 e 5 ng L⁻¹ para a determinação de fungicidas em água. Estevão; Peralta-Zamora e Nagata, (2018), avaliaram a técnica de DLLME para a determinação

de diuron (DIU), teflubenzuron (TFB), atrazina (ATZ), desisopropilatrizona (DIA) e desetilatrizona (DEA) em amostras de água, utilizando cromatografia líquida acoplada a detecção por arranjo de diodos (LC-DAD). O processo de extração envolveu o uso de uma mistura de clorofórmio (418 μL) e diclorometano (56,6 μL), como solvente extrator, e de acetonitrila (906 μL) como solvente dispersor, permitindo limites de quantificação de 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,049 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DIA, DEA, DIU e TFB respectivamente.

Della-Flora et al. (2018) relatam o uso de DLLME associada a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (DLLME-GC-MS), para a determinação da atrazina e seus metabólitos (DIA e DEA) em amostras de água. Para isso, utilizaram diclorometano (163 μL) como solvente extrator e acetona (550 μL) como solvente dispersor, obtendo limites de quantificação de 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ATZ), 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DIA) e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DEA).

Dados compilados entre 2006 e 2022, relacionados com a extração de diferentes analitos orgânicos, principalmente agrotóxicos em matrizes ambientais, são apresentados no QUADRO 1.2. Como pode ser observado, grande parte dos trabalhos envolve o uso de solventes clorados e de acetona, como solvente dispersor. Entretanto, observa-se também o interesse por solventes menos densos do que a água, usualmente dodecanol, que podem ser recolhidos da superfície, às vezes na forma de uma gota congelada quando empregado o método baseado em solidificação de gota orgânica flutuante. Destaca-se também o uso de solventes eutéticos profundos (EL-DEEN; SHIMIZU, 2019; SERESHTI et al., 2022), principalmente como agentes dispersantes.

QUADRO 1.2 - APLICAÇÃO DO MÉTODO DE DLLME EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, COM FOCO NOS DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES UTILIZADOS. DADOS COMPILADOS A PARTIR DA LITERATURA (2006-2022).

Autor	Analitos	Matriz	Solvente Extrator	Solvente Dispersor	NaCl	Centrifugação	Evaporação	Técnica – Técnica Cromatográfica
Rezaee et al., (2006)	PAH's	Água superficial (5 mL)	Tetracloreto de carbono Dissulfeto de carbono	Acetona* Acetonitrila Metanol	4,0 %	1,5 min 6000 rpm	Não	DLLME – GC-FID
Nagaraju; Huang, (2007)	Triazinas	Água superficial e torneira (5 mL)	Clorobenzeno* Tetracloreto de Carbono Tetracloreto de carbono	Acetona* Acetonitrila Metanol	4,0 %	5 min 6000 rpm	Não	DLLME -GC-MS
Farhadi; Matin; Hashemi, (2009)	2,4-D, MCPA	Água de irrigação (5 mL, pH 1,5)	Clorobenzeno* Tetracloreto de carbono	Acetona* Acetonitrila Metanol	10,0 %	5 min 5000 rpm	Não	DLLME – LC-DAD
Rodríguez-González et al., (2015)	Triazinas	Água do mar (25 mL)	1-octanol* Diclorometano Hexano	Não utiliza Uso de agitação para a dispersão	-	3 min 3500 rpm	Não	DLLME – LC-DAD
Pastor-Belda et al., (2017)	Fungicidas	Água superficial e frutas (10 mL)	1-undecanol:clorofórmio (1:1,5, v/v)* 1-undecanol Clorofórmio 1-octanol 1-dodecanol	Acetonitrila* Acetona Metanol	0,5 g (para as frutas)	3 min 1157 g	Sim	DLLME – LC-MS
Da Silva; Dorez; Villa, (2017)	Trifluoralina, metribuzin, metacloz, endossulfan, λ-cialotrina, malation, permetrina	Água superficial (7,5 mL)	Tolueno:N-hexano (40:60, v/v)* Clorofórmio N-hexano	Acetona*	-	15 min 4000 rpm -4°C	Não	DLLME – GC-MS

Notas: PAH's: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; 2,4-D: ácido 2,4-dicloro fenóxiacético; MCPA: ácido 4-cloro-2-metil fenóxiacético

QUADRO 1.2 - APLICAÇÃO DO MÉTODO DE DLLME EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, COM FOCO NOS DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES UTILIZADOS. DADOS COMPILADOS A PARTIR DA LITERATURA (2006-2022) (conclusão)

Autor	Análitos	Matriz	Solvente Extrator	Solvente Dispersor	NaCl	Centrifugação	Evaporação	Técnica – Técnica Cromatográfica
Pinto; Soares; Ferreira, et al., (2018)	Glifosato e AMPA	Água de irrigação (2,5 mL)	Diclorometano* Clorofórmio Tricloroetileno Tetracloroetileno	Acetona* Acetonitrila Metanol	700 mg	5 min 5000 rpm	Sim	DLLME – LC- MS/MS
Della- Flora et al., (2018)	ATZ, DIA, DEA	Água superficial (5 mL)	Diclorometano*	Acetona*	10,0 %	5 min 2000 rpm	Não	DLLME – GC-MS
Estevão; Peralta- Zamora; Nagata, et al., (2018)	Diuron, teflubenzuron, ATZ, DIA e DEA	Água superficial (5 mL)	Clorofórmio * Diclorometano * N-octanol Tolueno Ciclohexano	Acetonitrila* Acetona Metanol Etanol	10,0 %	6 min 4400 rpm	Sim	BS-DLLME-LC- DAD
Yang et al., (2019)	Compostos Orgânicos Voláteis	Água de abastecimento (5 mL)	Tetracloreto de Carbono	Acetonitrila Acetona (1:1)	Não informado	1 min 4000 rpm	Não	DLLME-GC-MS
El-Deen e Shimizu, et al., (2019)	Esteroides	Águas Naturais (5 mL)	2-dodecanol	**Brometo de tetrautilamônio Ácido acético (1:2)	Não informado	15 min 3500 rpm	Não	DLLME-SFOD- LC-DAD
Aguilar- Arteaga et al., (2020)	ATZ e SMZ	Águas residuais (5mL)	Tetracloreto de carbono	Metanol	Não informado	2min 5000 rpm	Não	DLLME- MDMSPE-HPLC- DAD
Sereshti et al., (2022)	Agrotóxicos multiclasses	Água superficial, subterrânea, do mar e de torneira (5mL)	** Timol: álcool miristílico (2:1)	*** Alanina:Ác. Kójico: água (1:2:5)	1%	4 min 1792 xg	Não	DLLME-GC-µECD

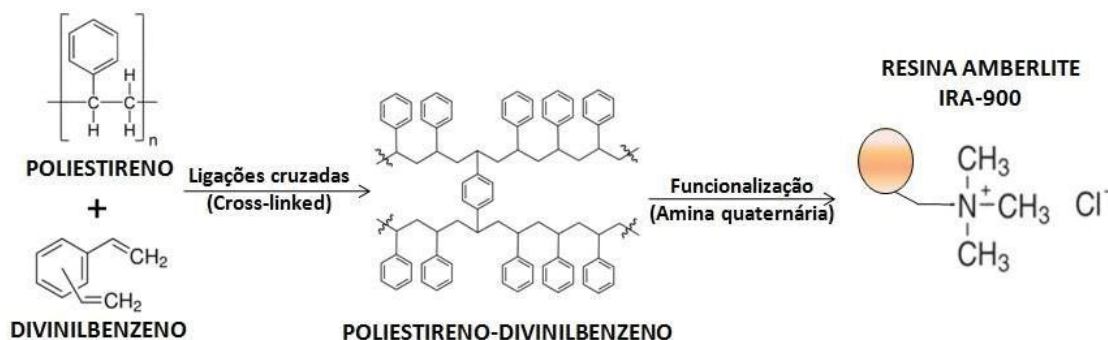
Notas: (*): solvente(s) utilizados; (**): Solvente eutético profundo; PAH: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; ATZ: Atrazina; DIA: Desisopropilatrizona; DEA: Desetilatrizona; AMPA: ácido aminometilfosfônico; SFOD: gota orgânica fluante solidificada; µECD: microdetector de captura de elétrons; MDMSPE: extração magnética dispersiva em fase microssólida

1.2.3. Método de extração com resina de troca iônica

Dentre os vários sistemas de extração em fase sólida existentes, cabe à extração por troca iônica um lugar de destaque, particularmente para a separação e pré-concentração de espécies iônicas. Em geral, o processo envolve o uso de resinas esféricas com diâmetro entre 0,3 e 1,2 mm, constituídas de um polímero macroporoso funcionalizado com grupos ionizáveis. Dependendo da natureza do grupo funcional, as resinas são classificadas em aniônica e catiônica, com capacidade de troca forte ou fraca.

A resina Amberlite IRA 900, por exemplo, é constituída de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno (reticulação da ordem de 95%), o que lhe confere uma estrutura macroporosa de elevada resistência e homogeneidade em tamanho (650 a 800 μm). Funcionalizada com grupos feniltrialquilamônio é considerada uma resina de troca aniônica forte, com capacidade para a extração até de espécies fracamente ionizadas (FIGURA 1.9).

FIGURA 1.9 - REPRESENTAÇÃO DO PREPARO DA RESINA DE TROCA ANIÔNICA IRA-900



Fonte: Autoria própria (2022)

O processo de troca iônica envolve basicamente 4 etapas, incluindo o condicionamento da resina, a passagem de amostra, a eliminação de interferentes não retidos por lavagem e, finalmente, a eluição da espécie de interesse com o uso de uma solução aquosa de um contra-íon, no caso das resinas de troca aniônica forte, NaCl.

Em 1998, Mallat e Barceló utilizaram a resina aniônica forte Amberlite IRA-410 para pré-concentração de glifosato e AMPA de amostras de água, observando eficientes recuperações em valores de pH entre 6 e 9. Em associação com

cromatografia líquida acoplada a detectores de fluorescência, o método permitiu limites de detecção entre 2 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, após reações de derivatização com FMOC-Cl.

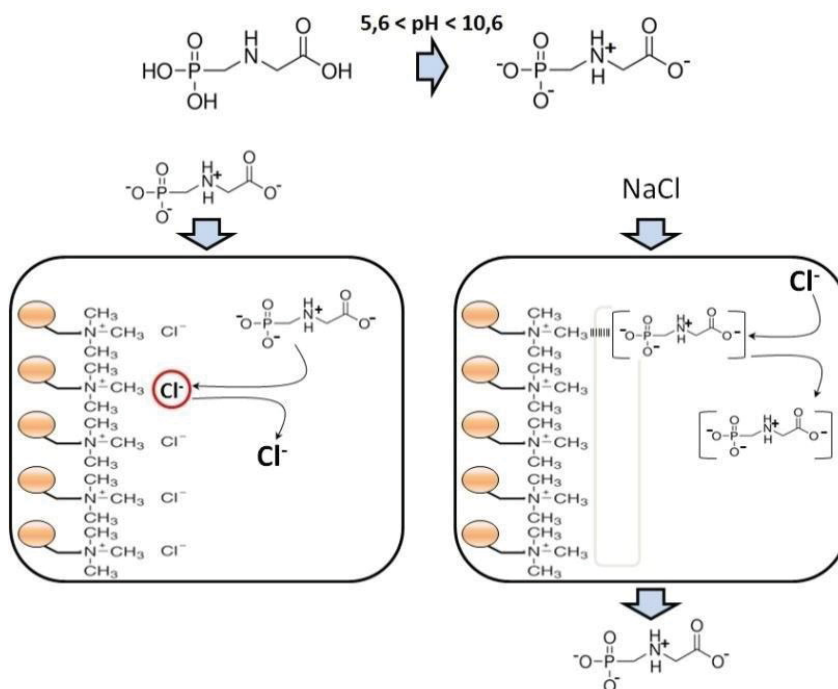
Börjesson e Torstensson, (2000) utilizaram uma sequência de duas extrações para a determinação de glifosato e AMPA em águas subterrâneas. Inicialmente, amostras em pH 2 foram passadas por uma coluna recheada com resina aniônica fraca contendo grupos iminodiacéticos (Chelex-100). Após eluição em meio ácido, o extrato foi passado por uma coluna contendo resina aniônica forte (AG1-X8), sendo finalmente eluída com HCl. Após derivatização, as determinações foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, obtendo-se limites de detecção da ordem de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em 2001, Patsias, Papadopoulou e Papadopoulou-Mourkidou propuseram um sistema de extração on-line para a determinação de traços de glifosato e AMPA em amostras de água, utilizando cromatografia de troca iônica com detector de fluorescência, após derivatização. A etapa de extração foi realizada em resinas aniônicas PRPX-100, funcionalizadas com grupos amônio quaternário. Processando amostras de 100 mL de água, foram observados limites de detecção da ordem de 0,02 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para glifosato e AMPA, respectivamente.

Finalmente, Corbera et al., (2005) propuseram um método de análise fundamentado em eletroforese capilar, precedido de extração de glifosato e AMPA na resina de troca aniônica Amberlite IRA-900. Recuperações da ordem de 80% e fatores de enriquecimento de 65 vezes permitiram alcançar limites de quantificação de 85 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para glifosato e AMPA, respectivamente.

Funcionalizada com grupos de amina quaternária, a resina IRA-900 apresenta uma grande afinidade por glifosato e AMPA, notadamente em valores de pH superiores a 6. Nestas condições, os analitos são trocados pelo contra-íon cloreto, sendo posteriormente eluídos com solução aquosa de NaCl (FIGURA 1.10). Isso porque, grupos de aminas quaternárias são sabidamente trocadores fortes. Assim, a eluição de substratos retidos deve ser realizada com excesso de cloreto.

FIGURA 1.10 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO EM RESINA IRA-900



Fonte: Autoria própria (2022)

Por motivos óbvios, aumentar a produtividade da atividade agrícola tem sido um dos grandes desafios dos últimos tempos, de maneira a atender uma demanda que cresce a cada ano. Assim, estratégias, técnicas e equipamentos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a produção, sem aumentar a área plantada. Desafortunadamente, o avanço tecnológico também propiciou a exacerbação do consumo de agrotóxicos, espécies químicas que contaminam praticamente todos os compartimentos ambientais e provocam efeitos nocivos de diversa natureza. Em função desta constatação, o monitoramento ambiental se tornou uma necessidade urgente, o que oportuniza a criação de métodos e estratégias que permitam a determinação de contaminantes em baixas concentrações, presentes em matrizes de elevada complexidade.

O presente trabalho se insere neste contexto, propondo o uso de diferentes métodos de extração para viabilizar a determinação de herbicidas em águas naturais, recorrendo ao uso de técnicas cromatográficas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo geral

No presente projeto de pesquisa, teve-se como objetivo o estabelecimento de rotinas de extração/pré-concentração/*clean-up* que viabilizem a determinação cromatográfica de herbicidas e alguns dos respectivos produtos de degradação, em águas naturais que fazem parte das microbacias da região transfronteiriça do entorno do reservatório de Itaipu (Brasil e Paraguai).

1.3.2. Objetivos específicos

Selecionar agrotóxicos de interesse, principalmente associados à produção de soja e milho (ex. glifosato e atrazina), com base em resultados de uma triagem preliminar realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (LC-QTOF-MS), sob a coordenação da Prof^a. Dra. Carla Sirtori (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS).

Estabelecer método cromatográfico para detecção de agrotóxicos, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de fluorescência (LC-FLD).

Desenvolver método de extração/pré-concentração de agrotóxicos, utilizando técnicas de extração em fase líquida (ex: microextração líquido-líquido dispersiva – DLLME e microextração em fibra oca – HF-LPME).

Desenvolver método de extração/pré-concentração de agrotóxicos, utilizando-se técnicas de extração em fase sólida (ex: extração com resina de troca iônica).

Estabelecer e validar métodos analíticos para a determinação de herbicidas e seus principais produtos de degradação em amostras de águas naturais.

Efetuar a determinação de agrotóxicos em amostras de água coletadas em riachos da região transfronteiriça do reservatório de ITAIPU, incluindo ambientes impactados pela agricultura e ambientes mais conservados.

CAPÍTULO 2 – HERBICIDAS TRIAZÍNICOS

2.1. INTRODUÇÃO

Como mencionado nos objetivos do trabalho, os objetos de estudo foram selecionados com base em informações sobre o uso agrícola do solo na região monitorada, assim como nos resultados de uma triagem preliminar realizada por LC-QTOF-MS, sob a coordenação da Prof^a Dra. Carla Sirtori (UFRGS). Neste último estudo foi constatada a presença de 36 agrotóxicos em águas naturais da região brasileira e 28 na região paraguaia, com uma alta frequência de herbicidas triazínicos e seus metabólitos (Becker et al., 2021).

Em função desta constatação, a primeira parte do trabalho foi dedicada ao estabelecimento de um método de extração de herbicidas triazínicos por HF-LPME e DLLME, para sua determinação em águas naturais por LC-MS/MS.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes e insumos

Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), Diclorometano (DCM), Acetona, Tetracloroetileno (C₂Cl₄), Clorofórmio (CLF), Tolueno e 1-octanol foram de grau cromatográfico de pureza, assim como o cloreto de sódio (NaCl), sendo todos procedentes da Sigma-Aldrich®. O Ácido Fórmico de grau cromatográfico foi adquirido da LiChropur®, enquanto a água ultrapura, com resistividade de 18,2 MΩ cm, foi obtida através de sistema de purificação Merck - Synergy®UV.

A fibra oca hidrofóbica de polipropileno (Q3/2 Accurel) com diâmetro interno de 600 µm, espessura da parede de 200 µm e tamanho de poros de 0,2 µm (Membrana®, Wuppertal, Alemanha), foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Bruno J. Gonçalves (DQ-UFPR).

Os padrões analíticos de Atrazina (ATZ), Desisopropilatrizona (DIA), Desetilatrizona (DEA), Ametrina (AMT), Propazina (PPZ), Prometrina (PMT), Cianazina (CYZ), Terbutilazina (TBZ), Terbutilazina-desetil (TBZD) e Simazina (SMZ), foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (pureza >96%). Soluções estoque dos triazínicos foram preparadas, na concentração de 500 mg L⁻¹, pesando-se 10,00 mg e diluindo-

os em 20,00 mL de metanol grau cromatográfico. Esses padrões foram armazenados ao abrigo da luz e mantidos sob refrigeração a -20 °C. A partir destas soluções, foram preparadas soluções de trabalho, individuais ou misturas, por diluição em água ultrapura.

As vidrarias utilizadas nas análises foram lavadas com solução de Extran (20%), e colocadas em banho de ultrassom durante 10 min. Em seguida, as vidrarias foram enxaguadas abundantemente com água da torneira, retornando ao banho de ultrassom, por mais 10 min. Na sequência, eram enxaguadas com água destilada e água ultrapura, sendo secas ao ar ou em estufa. Finalmente, as vidrarias foram enxaguadas com acetona e novamente secas. Cabe ressaltar que apenas vidrarias não volumétricas eram colocadas no banho de ultrassom e levadas a estufa.

A limpeza dos frascos para a coleta consistia em: esfregar os frascos com solução de Extran, enxaguar abundantemente com água da torneira, levar ao banho de ultrassom com água da torneira durante 10 min a 60°C, enxaguar com água destilada e água ultrapura. Na sequência, os frascos foram colocados para secar em estufa e posteriormente, calcinados a 200°C durante 2h. Após a calcinação, os frascos foram enxaguados com acetona e secos em estufa.

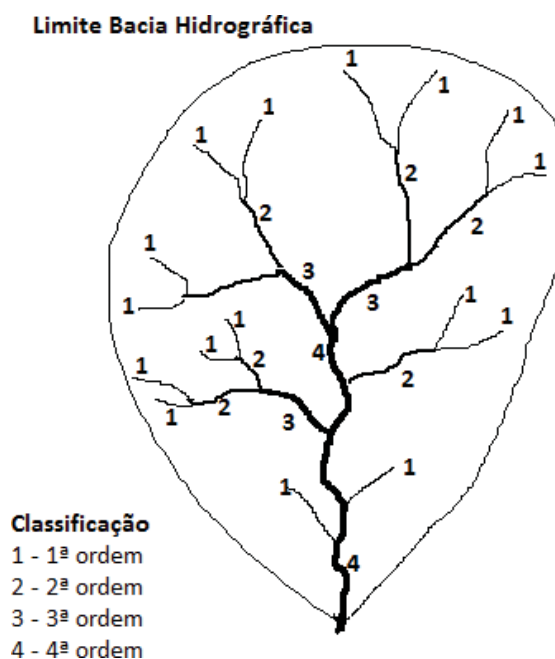
2.2.2. Caracterização do local de amostragem

Os pontos de amostragem estão localizados na bacia hidrográfica do Paraná 3, na região transfronteiriça Brasil-Paraguai. Foram selecionados corpos hídricos de até 3ª ordem, sendo que cada um pertence a uma microbacia que faz parte de uma rede hídrica maior e que, por sua vez, deságua no reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu.

Para compreender a ordem dos corpos hídricos, faz-se necessário a definição de bacia hidrográfica, que corresponde a uma área delimitada por divisores de águas (terrenos com maior altitude) a qual faz a drenagem de um rio principal e seus afluentes. Esses afluentes, que formam o curso principal da bacia, são classificados de acordo com uma hierarquia. Desta forma, rios menores que não recebem nenhum afluente, são denominados de rios de 1ª ordem. O encontro de dois rios de 1ª ordem, origina um rio de 2ª ordem. Assim como, o encontro de dois rios de 2ª ordem, origina um rio de 3ª ordem e assim sucessivamente. Caso haja o encontro de rios de ordens diferentes, prevalece a classificação do rio de maior ordem (TUCCI, 2002). A FIGURA

2.1 mostra a representação de uma bacia hidrográfica com a classificação dos corpos hídricos.

FIGURA 2.1 – REPRESENTAÇÃO DE UMA BACIA HIDROGRÁFICA COM A CLASSIFICAÇÃO DOS CORPOS HÍDRICOS



Fonte: Autoria própria (2022)

Para este estudo foram selecionados 24 pontos amostrais, 12 na margem brasileira e 12 na margem paraguaia, sendo divididos em três categorias: córregos muito impactados pela atividade agrícola e com pouca mata ciliar (C), córregos com atividade agrícola, mas com preservação de mata ciliar (B) e córregos com menor atividade agrícola e maior cobertura de mata ciliar (A).

Na FIGURA 2.2 é apresentado o mapa da região de estudo com a localização dos 24 pontos amostrais.

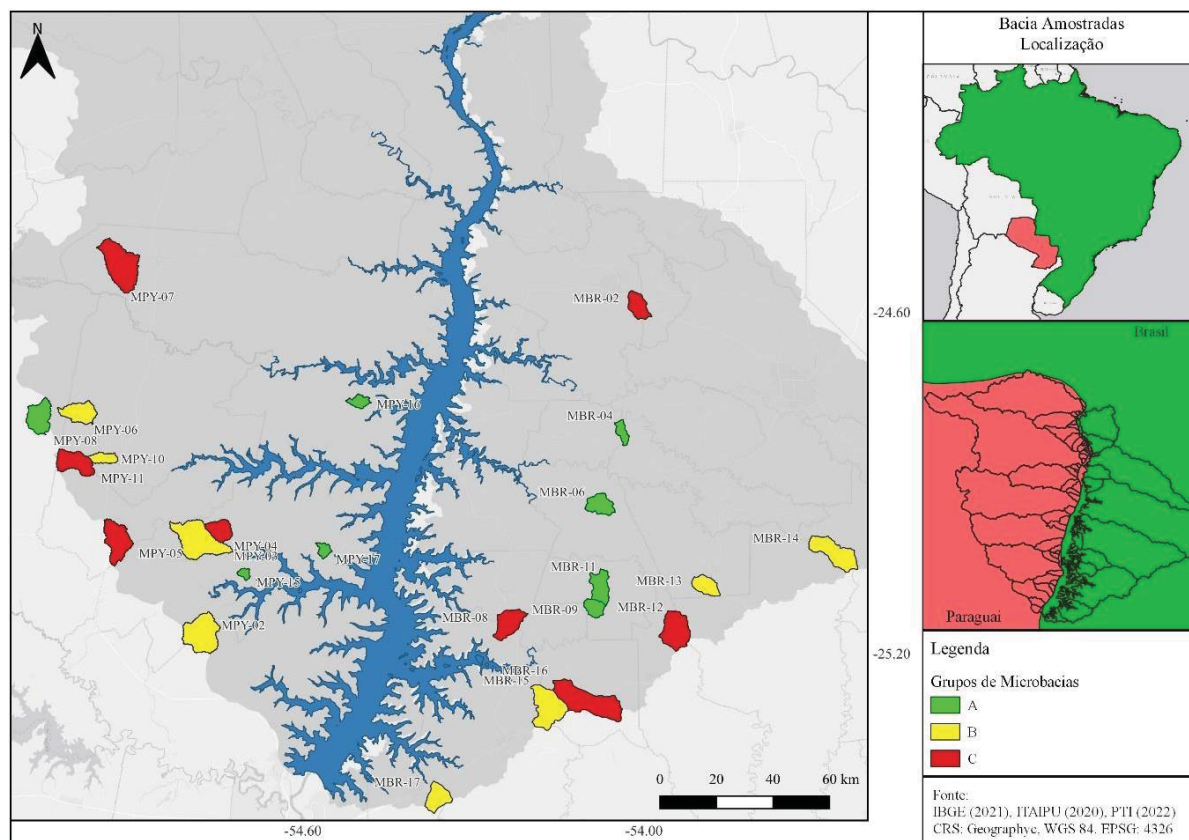
2.2.3. Método de amostragem

As amostras foram obtidas de coletas pontuais utilizando frascos de borossilicato âmbar de 1 L cada, os quais foram armazenados sob a temperatura de 4 °C em caixa térmica provida de gelo para transporte.

Ao final do dia de coleta, as amostras passaram por uma dupla filtração, utilizando os filtros de fibra de vidro de 0,7 µm (GF55/F, HNM) e 0,7 µm (GF/F,

Whatman). Após a filtração, as amostras foram armazenadas em freezer, -20 °C, até a sua análise.

FIGURA 2.2 - MAPA COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM NA MARGEM DIREITA (PARAGUAI) E ESQUERDA (BRASIL) DO RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU.



Fonte: Adaptado de BECKER et al., (2021)

2.2.4. Método cromatográfico

As determinações do conjunto de triazinas foram realizadas por cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas – LC-MS/MS, utilizando-se equipamento Shimadzu® (Japão) LC-2040C 3D Plus, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo LCMS-8045, com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e autoamostrador LC-2040. Todas as determinações envolveram o uso de uma coluna Shimadzu® Shim-pack GIST C18 (100x2,1mm, 2,0 µm), e software LabSolution TM LCMS.

A separação foi realizada em modo de eluição por gradiente, utilizando-se fase móvel constituída de ácido fórmico 0,1% (v/v) (pH 3) (fase A) e acetonitrila

acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (fase B) (BLANCHOU et al., 2020; PANTHI et al., 2019; SALVATIERRA-STAMP et al., 2018).

Foram realizados diversos testes alterando a proporção do gradiente, com rampas íngremes ou mais suaves. Ao fim dos ensaios, foi definido como o método cromatográfico a seguinte programação: iniciando com 20% de B; chegando a 30% de B em 5 min, continuando a subir até 40% em 10min, alcançando 50% em 13 min; mantendo por 3 min nesta condição; retornando à condição inicial (20% de B) em 18 min e, mantendo durante 2 min para estabilização da coluna, totalizando 20 min de corrida cromatográfica, com vazão de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e com temperatura da coluna de 40°C .

O espectrômetro de massas (MS) foi operado com ionização eletrospray (ESI) em modo positivo. Argônio (5.0, White Martins) foi utilizado como gás de colisão, enquanto o nitrogênio usado como gás de nebulização ($3,0 \text{ L min}^{-1}$) foi produzido por meio de um gerador de nitrogênio (Genius 1051, Peak Scientific, UK). A temperatura da fonte foi de 300°C e a aquisição do sinal MS/MS foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Para a otimização das condições de ionização, soluções individuais na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram injetadas diretamente no triplo quadrupolo. A seletividade do método foi garantida pelo monitoramento das transições mais intensas entre o íon precursor e íon produto. Sendo a mais intensa monitorada como transição de quantificação e a segunda mais intensa como transição de confirmação.

Curvas de calibração em água ultrapura, foram preparadas em triplicata, usualmente na faixa compreendida entre 15 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação das curvas de calibração em água ultrapura foram utilizados os dados da regressão linear, como recomendado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020). Sendo assim, para a determinação do LOD foi utilizada a razão da estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva, multiplicando por 3,3, enquanto para o cálculo do LOQ foi utilizada a mesma razão do LOD, porém multiplicada por 10.

Também foram avaliados os parâmetros de precisão e exatidão para a curva de calibração. A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) e a exatidão expressa em termos de recuperação relativa.

2.2.5. Técnicas de extração

2.2.5.1. *Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)*

Foram realizados testes preliminares para a escolha do solvente orgânico com base nos trabalhos da literatura de Peng et al. (2007) e Yang et al. (2018), os quais avaliaram triazinas em diferentes matrizes, dentre elas a água. Os autores utilizaram amostras aquosas sem ajuste de pH e contendo NaCl, n-octanol como solvente e HCl ou H₃PO₄ como fase aceptora.

Inicialmente a fibra passou por um processo de limpeza, sendo submersa em acetona e levada ao ultrassom durante 5 minutos. Após esse período, a fibra foi seca ao ar e cortada no comprimento desejado. Todos os testes foram realizados com 40 mL de fase doadora e 10 cm de comprimento da fibra oca.

- **Ensaio para a escolha do solvente orgânico a ser utilizado na extração por HF-LPME**

Para os testes de escolha do solvente orgânico a fibra foi exposta ao solvente orgânico (1-octanol ou tolueno) durante 1 minuto em ultrassom. Em seguida, a fibra foi mergulhada em água ultrapura durante 30 segundos, também em ultrassom, para retirada do excesso de solvente. Na sequência, o solvente orgânico ou fase aquosa foi injetado no interior da fibra e o sistema foi montado na configuração em “U” com o auxílio de microseringas, e submerso na amostra para que o procedimento de extração fosse realizado. Também foi avaliado o efeito da força iônica, realizando ensaios na ausência e presença de NaCl (10%, m/v). Cabe ressaltar que cada seguimento de fibra foi utilizado uma única vez.

- **Planejamento de experimentos 2³ com ponto central para HF-LPME**

Definido o solvente a ser utilizado, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da força iônica (A), da velocidade de agitação (B) e do tempo de extração (C) na eficiência do processo, utilizando-se o planejamento 2³ com ponto central definido pelas condições apresentadas na TABELA 2.1. Para esse planejamento, a fase doadora foi fortificada com 80 µg L⁻¹ das espécies de interesse e os valores de força iônica e tempo de extração foram selecionados com base em antecedentes da

literatura (GURE et al., 2013; MENEZES et al., 2016; SALVATIERRA-STAMP et al., 2018; SHEN; HIAN, 2002; YANG et al., 2018).

TABELA 2.1 – VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA HF-LPME UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
Força Iônica - % NaCl (A)	0%	10%	20 %
Agitação (B)	Baixa	Média	Alta
Tempo de extração (C)	10 min	35 min	60 min

2.2.5.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Estudos preliminares de Della-Flora et al., (2018) mostraram a elevada eficiência de extração deste sistema frente a atrazina e produtos de degradação. Assim, neste momento se torna necessário verificar a capacidade de extração frente a outros herbicidas do grupo das triazinas, realizando-se os estudos descritos a seguir:

- **Ensaio preliminares para DLLME**

Uma alíquota de 5,0 mL de amostra preparada em solução salina (10% NaCl, m/v) foi adicionada de 500 µL de acetona (solvente dispersor) e diferentes volumes de solvente extrator (DCM) de acordo com o planejamento experimental apresentado na TABELA 2.2.

TABELA 2.2. – VARIÁVEIS SELECIONADAS E PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL PARA OTIMIZAÇÃO DA DLLME.

Fator	Variável	Níveis		
		-1	0	+1
1	Força Iônica (A)	0,5%	5,25	10,0 %
2	Volume solvente extrator (B)	0,50 mL	0,75 mL	1,00 mL
Experimento	Força Iônica (% NaCl)	Volume Solvente Extrator (mL)		
1	0,5	0,5		
2	10,0	0,5		
3	0,5	1,0		
4	10,0	1,0		
5/6/7	5,25	0,75		

A mistura foi agitada durante 30 s em vórtex e na sequência foi centrifugada a 4000 rpm (2504 RCF - *relative centrifugal force*) durante 5 minutos. Após a centrifugação, a fase sedimentada foi coletada com o auxílio de uma microseringa, a qual foi seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 250 μ L da proporção inicial da fase móvel (80:20, 0,1% ácido fórmico e ACN+0,1% ácido fórmico) e analisada por LC-MS/MS. Desta forma, um fator de concentração nominal de 20 vezes foi alcançado.

- **Avaliação de solventes para o método de extração DLLME para as triazinas**

Foram testadas diferentes combinações de solvente extrator (diclorometano, clorofórmio e tetracloroetileno) e dispersor (acetonitrila, acetona e metanol) para a extração das triazinas, utilizando a condição otimizada no planejamento fatorial durante os ensaios preliminares. Assim, as extrações foram realizadas a partir de 5,0 mL de uma mistura contendo todos os padrões de triazinas em concentração de 5 μ g L⁻¹, em solução aquosa de NaCl (10%, m/v). A extração foi promovida pela adição de 500 μ L do solvente extrator e 500 μ L do solvente dispersor, seguida de agitação em vórtex por 30 s. Na sequência, a solução foi centrifugada a 4000 rpm (2504 RCF - *relative centrifugal force*) durante 5 minutos a 20°C, coletando-se a fase sedimentada com o auxílio de uma microseringa. Finalmente, a fase coletada foi seca sob fluxo de nitrogênio, reconstituída em 250 μ L da proporção inicial da fase móvel (80:20, 0,1% ácido fórmico e ACN+0,1% ácido fórmico), filtrada com filtro membrana de PTFE 0,22 μ m e analisada por LC-MS/MS.

- **Planejamento composto central para o método de DLLME**

Definidas as primeiras condições experimentais, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da força iônica, do volume de solvente extrator e do volume de solvente dispersor na eficiência do processo de extração, utilizando-se o planejamento composto central definido pelas condições apresentadas na TABELA 2.3. Para isso, utilizou-se uma mistura de triazínicos na concentração de 5 μ g L⁻¹, e condições semelhantes às utilizadas nos testes preliminares.

TABELA 2.3 – VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA DLLME UTILIZANDO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.

Variável	Níveis					
	—	-α	-1	0	+1	+ α
Força iônica (%)		3,3	5	7,5	10	11,7
Vol. solvente extrator (µL) - DCM		63,6	200	400	600	736,4
Vol. Solvente dispersor (µL) - Acetona		329,5	500	750	1000	1170,5

Experimento	Força Iônica (% NaCl)	Volume Solvente Extrator (µL)	Volume Solvente Dispersor (µL)
1	5	200	500
2	10	200	500
3	5	600	500
4	10	600	500
5	5	200	1000
6	10	200	1000
7	5	600	1000
8	10	600	1000
9	3,3	400	750
10	11,7	400	750
11	7,5	63,6	750
12	7,5	736,4	750
13	7,5	400	329,5
14	7,5	400	1170,5
15/16/17	7,5	400	750

- **Análise das amostras**

Foi utilizada uma alíquota de 5,0 mL de amostra preparada em solução salina 10% NaCl (m/v), à qual foi adicionado 600 μL de DCM (solvente extrator) e 1000 μL de acetona (solvente dispersor). A mistura foi agitada durante 30 s em vórtex e na sequência foi centrifugada a 4000 rpm (2504 RCF - *relative centrifugal force*) durante 5 minutos. Após a centrifugação, a fase sedimentada foi coletada com o auxílio de uma microseringa, a qual foi seca no concentrador de amostras e reconstituída em 100 μL da proporção inicial da fase móvel (80:20, 0,1% ácido fórmico e ACN+0,1% ácido fórmico), filtrada com filtro membrana de PTFE 0,22 μm e analisada por LC-MS/MS. Desta forma, um fator de enriquecimento máximo de 50 vezes pode ser alcançado.

2.2.6. Validação do método DLLME-LC-MS/MS

O método foi validado de acordo com os critérios recomendados pelo INMETRO (DQO-CGCRE-008, 2020) (INMETRO, 2020), avaliando-se os parâmetros:

seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Sendo todos os parâmetros avaliados na matriz, a qual foi constituída de um *pool* de amostra para cada margem.

O estudo de seletividade foi avaliado pelo efeito matriz. Para isso, foram preparadas curvas analíticas com no mínimo 7 níveis de concentração em quintuplicata ($n=5$), em água ultrapura e na matriz. Para se ter uma matriz mais representativa, foi preparado um *pool* de amostra, com uma alíquota de todos os pontos, para cada margem do reservatório analisada. O efeito matriz foi estimado pela comparação entre a inclinação das curvas analíticas conforme a Eq. 2.1.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Coeficiente angular curva matriz}}{\text{Coeficiente angular curva solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

Também foi realizado um teste F entre a variância da solução padrão em dois níveis de concentração (20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) a qual foi comparada com a variância dessas mesmas concentrações na matriz.

A linearidade foi avaliada na faixa de 0,0125 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, em quintuplicata ($n=5$), utilizando o método de adição de padrão à matriz. Quando havia a presença dos analitos no *pool* de amostra, as áreas obtidas a partir da fortificação das amostras foram descontadas do valor médio da prova em branco. As curvas analíticas foram construídas com pelo menos 7 níveis de concentração. A linearidade de cada analito foi expressa pela equação da reta e pelo coeficiente de determinação (R^2), calculado pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Também foi realizada uma análise de resíduos para avaliar a aleatoriedade, homoscedasticidade e independência.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são utilizados para conhecer a detectabilidade do método. Ambos foram avaliados pelo método de percepção visual, o qual consiste em sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração em que o analito pode ser detectado ou quantificado com confiança. Desta forma, o LOQ foi estabelecido quando o valor mínimo apresentava precisão (30%) e exatidão (40-120%) aceitáveis para a faixa de concentração analisada (inferior a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$), enquanto o LOD apresentava precisão ou exatidão aceitáveis.

A precisão foi avaliada, em três níveis de fortificação, através da repetibilidade e precisão intermediária, que são expressas pelo desvio padrão relativo (RSD), conforme Eq.2.2.

$$RSD = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.2}$$

A repetibilidade é a precisão avaliada sob as mesmas condições experimentais (mesmo operador, equipamento, amostra, solução, dentre outros) em um curto intervalo de tempo e é conhecida como precisão intradia. Já a precisão intermediária, também conhecida como reprodutibilidade intralaboratorial, avalia a precisão em condições similares a da repetitividade, mas diferindo em uma ou mais condições como: diferentes analistas, dias, equipamentos, dentre outros (INMETRO, 2020).

Neste estudo, foram avaliados três níveis, contemplando valores de baixa, média e alta concentração de acordo com a faixa linear de trabalho de cada analito e em cada matriz (Brasil e Paraguai), sendo avaliadas as concentrações de 0,15 µg L⁻¹, 0,25 µg L⁻¹ e 0,40 µg L⁻¹ para a margem brasileira e para 0,15 µg L⁻¹, 0,30 µg L⁻¹ e 0,50 µg L⁻¹ para a margem paraguaia.

Para a precisão intermediária foram realizados ensaios em diferentes coletas (Janeiro/22 e Maio/22) avaliando os mesmos níveis de concentração da repetibilidade.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação relativa. A recuperação é obtida a partir de amostras que foram fortificadas e, posteriormente, submetidas à análise. Para os métodos de adição de padrão, quando não se tem a matriz isenta dos analitos, a recuperação é calculada de acordo com a Eq. 2.3. Foram avaliados os mesmos níveis de concentração dos ensaios de precisão.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração após fortificação} - \text{concentração antes fortificação}}{\text{concentração de fortificação}} \times 100 \quad \text{Eq. 2.3}$$

A avaliação da robustez de um procedimento analítico é utilizada para verificar a sensibilidade do resultado analítico, quando pequenas variações nas condições experimentais ocorrem. Para isso, foi empregado o Teste de Youden, que além de avaliar a robustez do método, também ordena a influência de cada fator no resultado. No Teste de Youden, são avaliados sete fatores em oito ensaios, sendo realizados em duplicata para cálculo dos efeitos. A avaliação, portanto, é em relação à significância do efeito sobre a resposta esperada. O método será considerado robusto, se não houver efeito significativo.

Os fatores selecionados e seus níveis (valores nominais – letras maiúsculas e variação – letras minúsculas) e a matriz ensaiada são apresentados na TABELA 2.4.

Para a realização do Teste de Youden, foi utilizado o *pool* de amostras da margem direita e esquerda, assim como foi empregado na construção das curvas analíticas na matriz, e este foi fortificado no nível de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$. As variáveis avaliadas compreendem tanto fatores que podem influenciar o preparo de amostra como o método cromatográfico.

TABELA 2.4 – FATORES, NÍVEIS E MATRIZ UTILIZADA PARA O TESTE DE YOUTEN PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.

Fator	Nominal				Variação			
Força iônica (% NaCl)	10 (A)				9,8 (a)			
Tempo de agitação (s)	30 (B)				25 (b)			
Tempo de centrifugação (min)	5 (C)				8 (c)			
Tempo de agitação – reconstituição (s)	10 (D)				5 (d)			
Modo de secagem	Concentrador (E)				Nitrogênio (e)			
Temperatura coluna (°C)	40 (F)				39 (f)			
Temperatura interface (°C)	300 (G)				298 (g)			
Fatores	1	2	3	4	5	6	7	8
Força iônica (% NaCl)	A (+)	A (+)	A (+)	A (+)	a (-)	a (-)	a (-)	a (-)
Tempo de agitação (s)	B (+)	B (+)	b (-)	b (-)	B (+)	B (+)	b (-)	b (-)
Tempo de centrifugação (min)	C (+)	c (-)	C (+)	c (-)	C (+)	c (-)	C (+)	c (-)
Tempo de agitação – reconstituição (s)	D (+)	D (+)	d (-)	d (-)	d (-)	d (-)	D (+)	D (+)
Modo de secagem	E (+)	e (-)	E (+)	e (-)	e (-)	E (+)	e (-)	E (+)
Temperatura coluna (°C)	F (+)	f (-)	f (-)	F (+)	F (+)	f (-)	f (-)	F (+)
Temperatura interface (°C)	G (+)	g (-)	g (-)	G (+)	g (-)	G (+)	G (+)	g (-)
Resultado	s	t	u	v	w	x	Y	z

O cálculo do efeito de cada fator foi realizado pela diferença da média dos valores nominais e da média dos valores da variação analisada, como apresentado na Eq. 2.4, tendo como exemplo o efeito da força iônica, sendo os demais fatores calculados de forma análoga.

$$\frac{\sum A_i}{4} - \frac{\sum a_i}{4} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad \text{Eq.2.4}$$

Para avaliar a significância dos efeitos é necessário calcular a estimativa do erro experimental, a partir das réplicas verdadeiras de cada ensaio (Eq. 2.5).

$$s(\text{efeito}) = \sqrt{\frac{4 s^2}{N}} \quad \text{Eq.2.5}$$

Onde, s^2 é a variância agrupada dos efeitos e N é o número de ensaios. O efeito só será considerado significativo estatisticamente quando o valor do erro

absoluto for superior a linha de significância calculada por $t_{0=8} \times s$ (efeito), sendo o valor de t de *Student* para oito graus de liberdade e 95% de confiança igual a 2,306.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Determinações cromatográficas

Foi realizada a otimização das condições MS/MS como: modo de ionização, identificação da fragmentação dos analitos, selecionando-se íons precursores e íons produtos, juntamente com as energias de colisão mais favoráveis para cada analito (TABELA 2.5), sendo todos esses parâmetros otimizados automaticamente pelo software do programa. Para isso foram preparadas soluções individuais dos analitos (1 mg L^{-1}), as quais foram injetadas na ausência da coluna cromatográfica. As duas transições do modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) mais sensíveis foram selecionadas, sendo a mais intensa para a quantificação e a segunda para a qualificação.

TABELA 2.5 – COMPOSTOS TRIAZINICOS DETERMINADOS E INFORMAÇÕES SOBRE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODO MRM, MODO POSITIVO.

Analito	t_R (min)	MM (g mol^{-1})	Transição de Quantificação		1ª Transição de confirmação		2ª Transição de confirmação	
			Íon precursor > íon produto	EC (eV)	Íon precursor > íon produto	EC (eV)	Íon precursor > íon produto	EC (eV)
DIA	2,8	173,60	174,1>132,2	18	174,1>68,15	12	174,1>91,15	18
DEA	4,8	187,63	188,25>104	28	188,25>146,05	13	188,25>146,95	20
SMZ	8,7	201,66	202,1>132	20	202,1>104	24	202,1>124	16
AMT	8,8	227,33	228,33>186,1	11	228,33>96,05	11	228,33>68,1	11
CYZ	9,3	240,69	241,1>214,1	23	241,1>104,1	41		
TBZD	9,5	201,66	202,1>146	15	202,1>79	28	202,1>110	21
PMT	11,6	241,36	242,15>158,05	25	242,15>200,1	19	242,15>68,10	43
ATZ	12,1	215,68	216,3>174,1	17	216,3>96,15	25	216,3>104	29
PPZ	15,1	229,71	230,3>146,05	16	230,3>188,1	11	230,3>104,05	11
TBZ	15,8	229,71	230,3>174,1	11	230,3>96,1	16	230,3>68,1	11

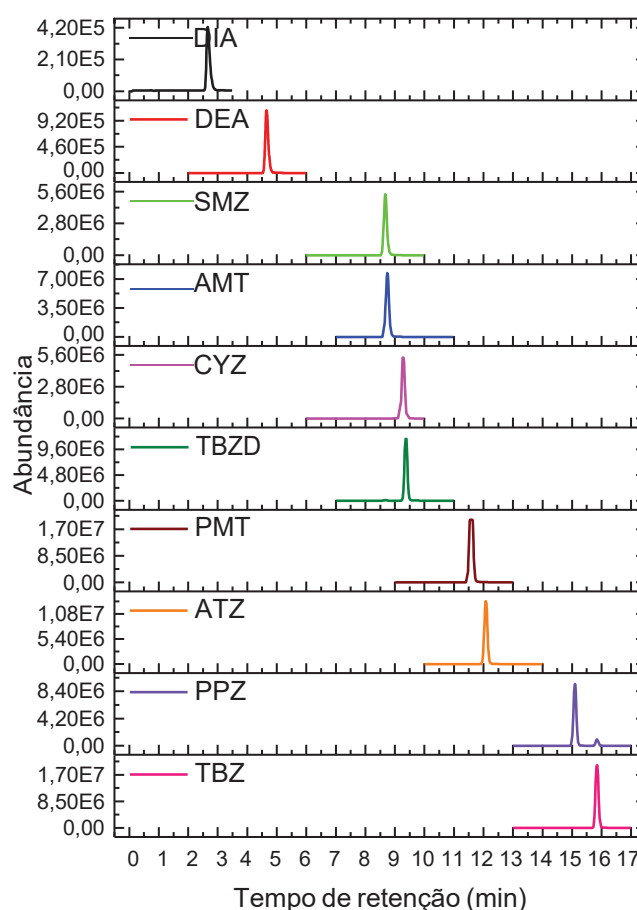
Nota: Tempo de retenção (t_R); Massa Molar (MM); Energia de colisão (EC); Elétron Volt (eV).

Conhecendo as fragmentações de todas as espécies, o método cromatográfico foi desenvolvido utilizando-se uma mistura contendo todos os analitos em concentração de $0,75 \text{ mg L}^{-1}$. As condições cromatográficas foram selecionadas a partir de antecedentes da literatura (BLANCHOU et al., 2020, PANTHI et al., 2019 e SALVATIERRA-STAMP et al., 2018), envolvendo eluição por gradiente com os

solventes ácido fórmico 0,1% v/v (fase A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase B).

Diversos estudos foram realizados para otimização do gradiente, tendo sido selecionada a seguinte programação: início com 20% de B; chegando a 30% de B em 5 min, continuando a subir até 40% em 10 min, alcançando 50% em 13 min; mantendo por 3 min nesta condição; retornando à condição inicial (20% de B) em 18 min e, mantendo durante 2 min para estabilização da coluna, totalizando 20 min de corrida cromatográfica, com vazão de 0,25 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e com temperatura da coluna de 40 °C. Os cromatogramas dos seguimentos para cada analito de acordo com o íon quantificador são apresentados na FIGURA 2.3.

FIGURA 2.3 – CROMATOGRAMAS DOS ANALITOS INVESTIGADOS (200 µg L⁻¹) EM CADA SEGMENTO DE TEMPO, PARA O ÍON DE QUANTIFICAÇÃO (Q1).



Após a otimização do método cromatográfico foi preparada uma curva de calibração, em solvente, para conhecer os limites de detecção e quantificação do instrumento. Para isso, foram avaliadas as concentrações de 10, 15, 20, 40, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg L⁻¹, em triplicata, para todas as espécies de interesse

(FIGURA 2.4). A partir dos dados de regressão foi possível avaliar a faixa linear de trabalho (FLT), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do equipamento, como pode ser observado na TABELA 2.6. De acordo com estes resultados, o método cromatográfico apresentou boa linearidade ($R^2 > 0,99$) para todos os analitos, assim como limites de quantificação instrumental em torno de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

A inclinação das curvas analíticas apresentou sensibilidades diferenciadas do método cromatográfico. Sendo possível identificar três faixas de sensibilidade, sendo notadamente menor para DIA, enquanto a sensibilidade mais expressiva foi notada para PMT e TBZ.

FIGURA 2.4 – REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO PARA COMPARAR A SENSIBILIDADE ENTRE ELES PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

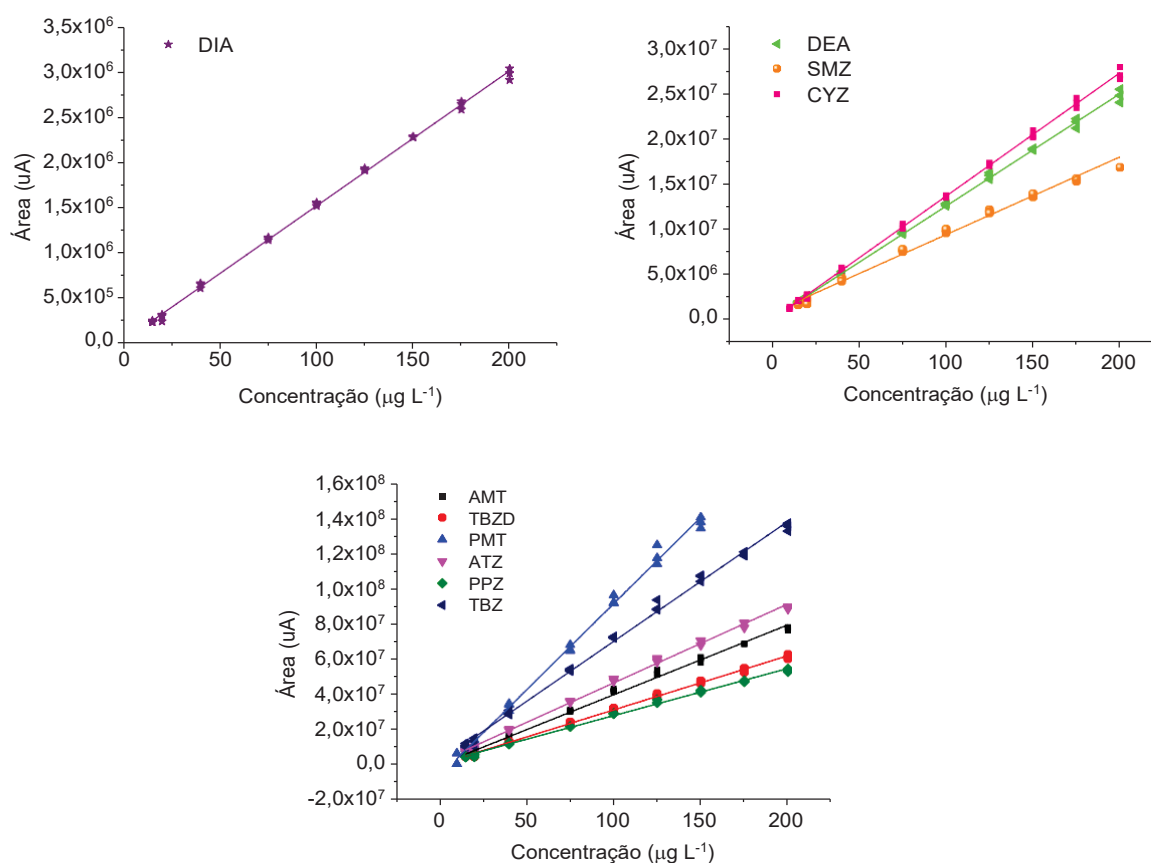


TABELA 2.6 – DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE EM SOLVENTE (n=3).

Analitos	T _R (min)	FLT (µg L ⁻¹)	Equação de regressão	R ²	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
DIA	2,8	15 a 200	$A_p = 14978C_{DIA} + 21403$	0,9999	2,6	8,7
DEA	4,8	15 a 200	$A_p = 123999C_{DEA} + 170773$	0,9995	3,1	10
SMZ	8,7	15 a 175	$A_p = 87107C_{SMZ} + 754901$	0,9947	6,1	20
AMT	8,8	15 a 200	$A_p = 397358C_{AMT} + 19128$	0,9960	5,0	16
CYZ	9,3	10 a 200	$A_p = 136150C_{CYZ} + 56048$	0,9999	2,1	7,0
TBZD	9,5	15 a 200	$A_p = 308158C_{TBZD} + 313582$	0,9992	3,1	10
PMT	11,6	15 a 175	$A_p = 949493C_{PMT} - 4663945$	0,9972	5,1	15
ATZ	12,1	15 a 200	$A_p = 449089C_{ATZ} + 1,57 \times 10^6$	0,9978	3,9	13
PPZ	15,1	15 a 200	$A_p = 268252C_{PPZ} + 1,03 \times 10^6$	0,9974	4,2	14
TBZ	15,8	15 a 200	$A_p = 682215C_{TBZ} + 1,88 \times 10^6$	0,9977	4,2	13

Nota: T_R: Tempo de retenção; A_p: Área de pico; c: concentração.

Também foi avaliada a precisão e exatidão da curva de calibração. Para isso, foram selecionados três níveis de concentração, contemplando pontos de baixa, média e alta concentração, os quais foram avaliados em triplicata (TABELA 2.7).

O INMETRO preconiza diferentes valores de precisão e exatidão de acordo com a faixa de concentração avaliada. Desta forma, para a faixa de 10 µg L⁻¹ é aceitável valores de 21% de precisão e a faixa de 60 a 115% de exatidão, enquanto que para concentração de 100 µg L⁻¹, os valores passam a ser de 15% e 80 a 110% de precisão e exatidão, respectivamente (INMETRO, 2020).

Com isso, avaliando os dados da TABELA 2.7, pode-se observar que o método cromatográfico apresentou precisão e exatidão aceitáveis em todos os níveis avaliados, com exceção da precisão da AMT e PMT na concentração de 20 µg L⁻¹ que apresentaram valores levemente superiores ao limite aceitável.

TABELA 2.7 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE DAS ESPÉCIES DE INTERESSE POR LC-MS/MS (n=3)

	Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração média obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$) $\pm$ DP	Precisão (%)	Exatidão (%)
DIA	20	17,46 $\pm$ 2,6	13,9	87,3
	100	101,3 $\pm$ 1,3	1,3	101,3
	175	174,6 $\pm$ 3,1	1,7	99,8
DEA	20	17,54 $\pm$ 3,2	16,7	87,7
	100	101,5 $\pm$ 1,1	1,0	101,5
	175	174,0 $\pm$ 4,3	2,4	99,4
AMT	20	14,62 $\pm$ 3,4	23,2	73,1
	100	106,0 $\pm$ 2,1	1,9	106,0
	175	172,5 $\pm$ 0,4	0,3	98,6
SMZ	20	15,40 $\pm$ 3,3	13,7	77,0
	100	104,4 $\pm$ 2,6	2,3	104,4
	175	168,8 $\pm$ 1,6	0,9	96,5
CYZ	20	18,96 $\pm$ 1,9	9,6	94,8
	100	99,79 $\pm$ 1,0	1,0	99,8
	175	175,5 $\pm$ 4,1	2,3	100,3
TBZD	20	17,45 $\pm$ 3,4	18,5	87,2
	100	102,2 $\pm$ 0,9	0,8	102,2
	175	173,4 $\pm$ 3,6	2,0	99,1
PMT	20	16,64 $\pm$ 3,0	25,2	83,2
	100	103,3 $\pm$ 2,7	2,7	103,3
	175	170,2 $\pm$ 2,5	1,5	97,3
ATZ	20	16,20 $\pm$ 3,4	17,4	81,0
	100	104,1 $\pm$ 1,6	1,5	104,1
	175	173,9 $\pm$ 3,5	2,0	99,4
PPZ	20	15,86 $\pm$ 3,4	17,5	79,3
	100	104,3 $\pm$ 0,6	0,5	104,3
	175	172,3 $\pm$ 1,7	1,0	98,5
TBZD	20	16,20 $\pm$ 3,5	18,4	81,0
	100	103,4 $\pm$ 0,6	0,6	103,4
	175	172,6 $\pm$ 1,7	1,0	98,6

Nota: DP=desvio padrão

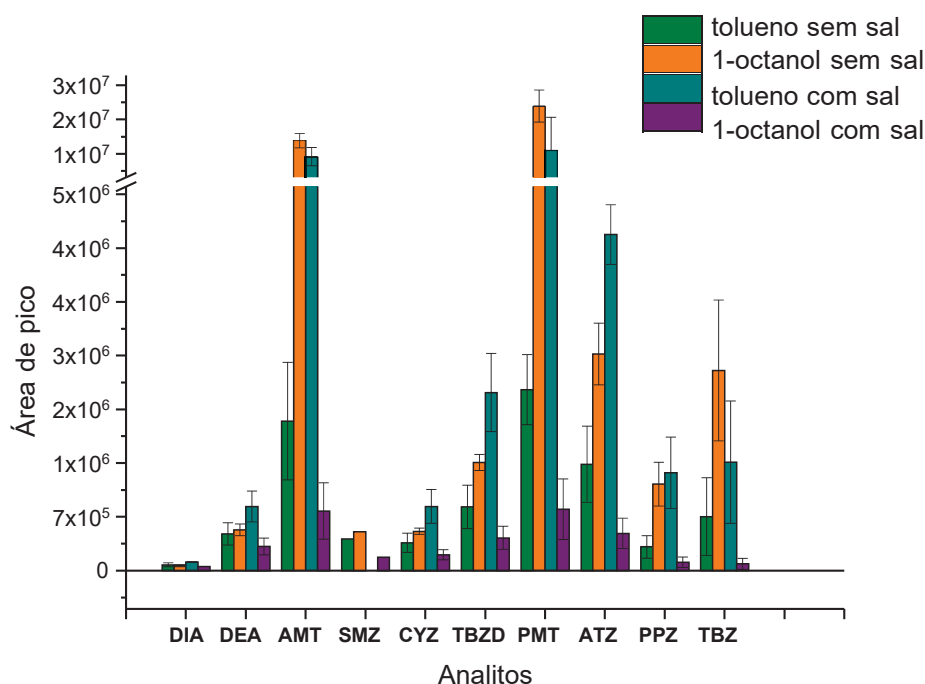
2.3.2. Extração de Triazinas por Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

Os estudos de extração por HF-LPME foram realizados no modo bifásico e trifásico. Entretanto, os testes no modo bifásico mostraram baixa reprodutibilidade quanto à recuperação do volume interno do lúmen, para ambos os solventes testados (1-octanol e tolueno). Sendo assim, optou-se por realizar testes no modo trifásico, tendo como fase doadora uma solução aquosa com a presença das espécies de interesse (pH 6-7, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$), como fase aceptora solução de ácido fórmico 0,1% e nos poros da fibra 1-octanol ou tolueno, sendo utilizado uma fibra com 10 cm. Os ensaios foram realizados em triplicata, avolumando-se para 100 μL o volume coletado

do interior da fibra, e mantendo-se a proporção inicial da fase móvel utilizada na análise cromatográfica (80:20; ácido fórmico 0,1%: ACN+0,1% ácido fórmico). Neste estudo também foi avaliado o efeito da força iônica, realizando-se ensaios na ausência e presença de NaCl, em concentração de 10% (m/v).

A área de pico registrada para cada analito após extração nas condições ensaiadas é apresentada na FIGURA 2.5. De acordo com estes resultados, as maiores áreas de pico foram obtidas com o uso de tolueno e NaCl ou com o uso de 1-octanol sem NaCl. Ao avaliar o desvio padrão das replicatas, observa-se que ambos resultados praticamente não diferem entre si. Desta forma, optou-se por utilizar como solvente orgânico o 1-octanol, por ser menos tóxico que o tolueno.

FIGURA 2.5 – COMPARAÇÃO DA ÁREA DE PICO DOS ANALITOS APÓS A EXTRAÇÃO POR HF-LPME, DE ACORDO COM O SOLVENTE ORGÂNICO E A FORÇA IÔNICA UTILIZADA.

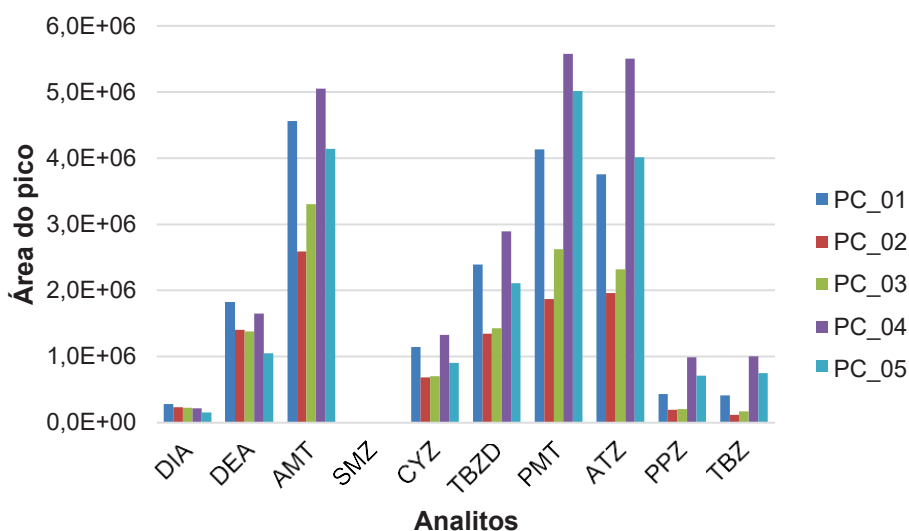


Definido o solvente a ser utilizado, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da força iônica (A), da velocidade de agitação (B) e do tempo de extração (C) na eficiência do processo, utilizando-se o planejamento 2³ com ponto central.

Em um primeiro momento, os resultados dos ensaios para o ponto central apresentaram muita variação, tendo uma das réplicas apresentado áreas superiores as demais. Desta forma, a análise do ponto central foi refeita em quintuplicata, obtendo-se os resultados apresentados na FIGURA 2.6. Os resultados mostram uma

grande disparidade nas replicatas, com desvios que alcançam valores próximos a 200%.

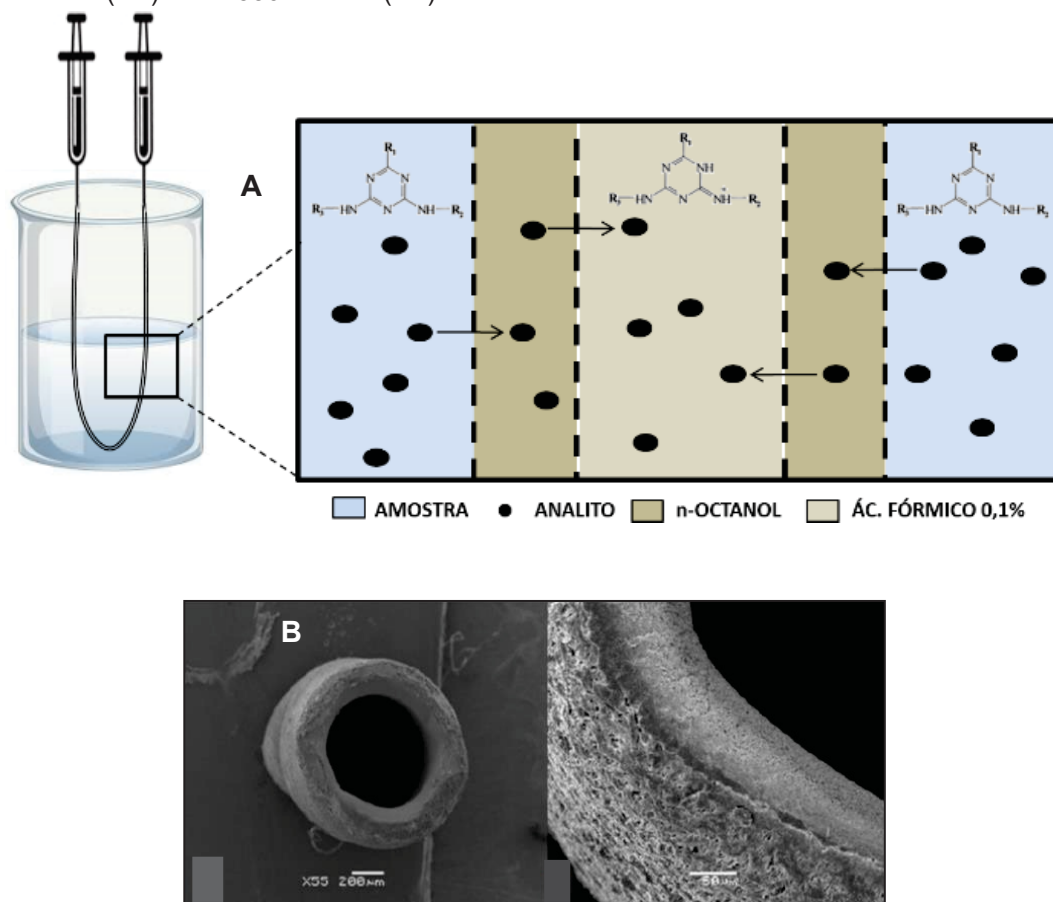
FIGURA 2.6 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DE PICO DOS ANALITOS APÓS A EXTRAÇÃO POR HF-LPME, PARA O PONTO CENTRAL AVALIADO EM QUINTUPLICATA



A HF-LPME é uma técnica de extração não exaustiva, cuja reprodutibilidade depende de dois equilíbrios de distribuição, um entre a fase doadora e o solvente orgânico na fibra e outro entre o solvente orgânico e a fase aceptora presente no lúmen (FIGURA 2.7 A). Adicionalmente, os poros presentes na fibra (FIGURA 2.7 B), podem vir a interferir na extração uma vez que os compostos podem estar interagindo com a fibra e ficando retidos nela, sem haver a transferência do analito para a solução aceptora.

Este fato foi observado em um estudo realizado por Castilhos et al., (2017), em que, ao avaliarem a extração da fibra recoberta com um hidrogel e apenas a fibra de polipropileno, notaram que esta atuou como fase extratora e afirmaram que essa interação também deve ser considerada nos processos de extração.

FIGURA 2.7 – ESQUEMA DOS EQUILÍRIOS ENVOLVIDOS DURANTE A FASE DE EXTRAÇÃO (A) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) PARA A FIBRA OCA (B), COM AUMENTO DE 55 VEZES (BA) E DE 350 VEZES (BB).



Fonte: A) Autoria própria (2022); B) HORTA et al., (2018)

Desta forma, os resultados do planejamento 2^3 foram avaliados sem considerar o sinal anômalo de uma das replicatas do ponto central. Como pode ser observado na FIGURA 2.8, as condições do ensaio 4 permitiram eficiente extração dos analitos mais polares (DIA, DEA e AMT), enquanto as condições do ensaio 8 favoreceram a extração dos analitos menos polares.

Utilizando-se as condições do ensaio 8, foram elaboradas curvas analíticas na faixa de concentração compreendida entre 0,2 e 10,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo-se os resultados apresentados na FIGURA 2.9. Estes resultados confirmam a baixa repetibilidade do método nas condições utilizadas, o que inviabiliza o seu uso para os fins pretendidos.

FIGURA 2.8 – RESULTADO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 , COM PONTO CENTRAL EM TRIPLICATA, SEM A NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.

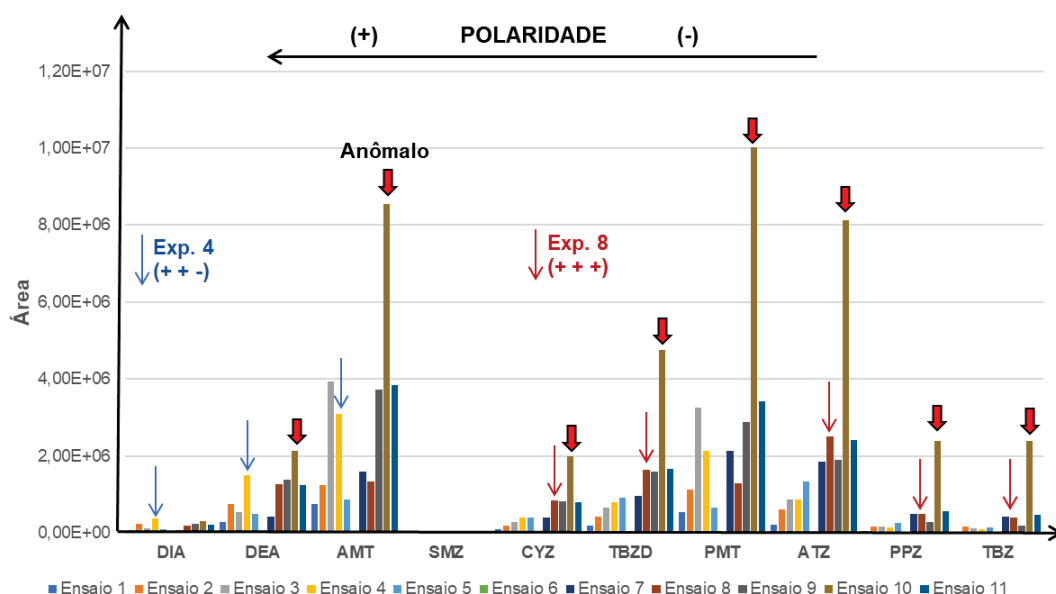
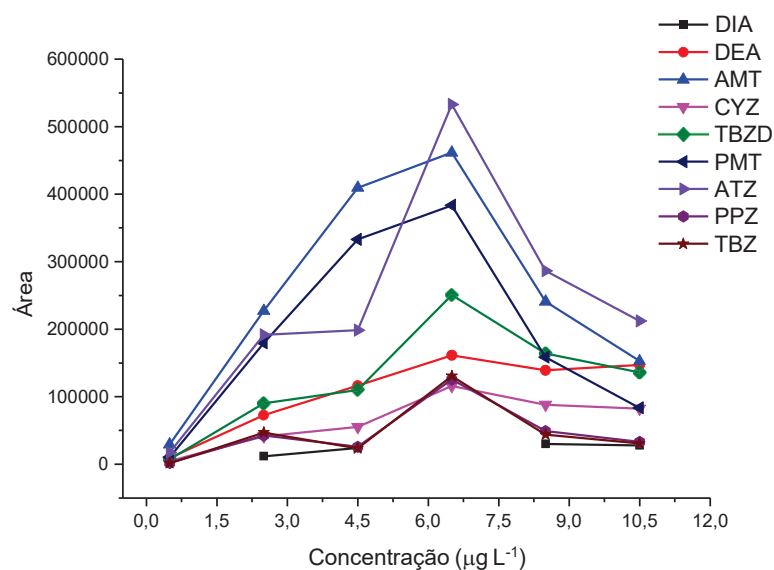


FIGURA 2.9 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ÁREAS OBTIDAS PARA TESTES NO MÉTODO HF-LPME NA FAIXA DE 0,5 A 10,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE



Vários testes adicionais foram realizados para melhorar a repetibilidade do processo de extração, incluindo o aumento da concentração de ácido fórmico na fase aceptora. Infelizmente, não foram observadas melhoras no método, o que permite concluir que a técnica de extração HF-LPME, nas condições avaliadas, não foi uma técnica viável para a quantificação de triazinas em águas superficiais.

Cabe ressaltar, que a HF-LPME é uma técnica não exaustiva baseada em equilíbrio de partição, o que indica, que muito provavelmente, as condições avaliadas não estão adequadas para se obter o equilíbrio de partição, o que desfavorece a precisão do método.

Existem estudos em que a fibra oca está livre na fase doadora, essa modificação do método HF-LPME é denominada de barra de solvente de fibra oca, onde o lúmen da fibra é preenchido com o solvente extrator e ambas as extremidades da fibra são seladas. Desta forma, a fibra pode se locomover livremente pela fase doadora, aumentando a eficiência de extração para a fase aceptora (ALSHARIF et al., 2017).

Outra forma de utilização da técnica HF-LPME encontrada na literatura, é a combinação com outras técnicas como a DLLME (LOPES et al., 2017; SIMÃO et al., 2016). A HF-LPME vem sendo usada não só como etapa de pré-concentração, mas também como etapa de limpeza para amostras de maior complexidade, como é o caso de amostras biológicas em que se tem uma infinidade de macromoléculas, que nem sempre, são de interesse da análise. Nestes casos, os poros da fibra atuam como barreira, fazendo com que a técnica seja bem seletiva (ALSHARIF et al., 2017).

Nas condições em que este estudo foi realizado, a HF-LPME apresentou baixa repetibilidade na extração de herbicidas triazínicos. Adicionalmente, o modo de aplicação da técnica se mostrou menos conveniente para a análise simultânea de um elevado número de amostras, o que, definitivamente, fez com que a técnica DLLME tenha sido selecionada para estudos adicionais.

Entretanto, é importante salientar que a técnica de extração fundamentada no uso de fibra oca apresenta vantagens de ordem prática, destacando a possibilidade de aplicação em amostras de maior complexidade, o que a qualifica como boa alternativa para a realização de etapas de *screening*.

2.3.3. Extração de Triazinas por Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Estudos preliminares foram conduzidos em condições experimentais descritas na literatura para a extração de triazinas (Della-Flora et al., 2018) em amostras de águas naturais, utilizando-se diclorometano como solvente extrator e acetona como agente dispersor.

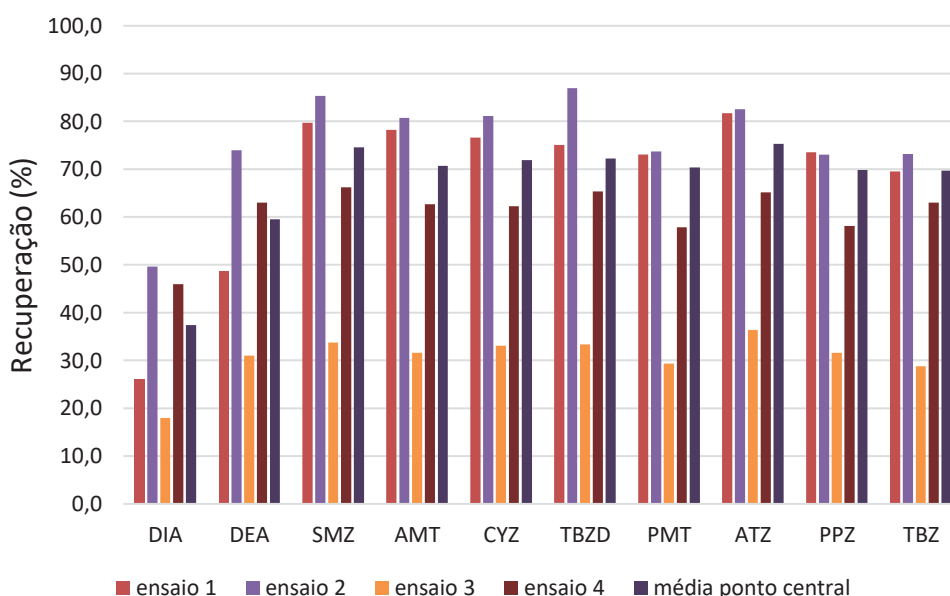
Primeiramente foi realizado um estudo para avaliar o efeito da força iônica e do volume de solvente extrator na extração de triazinas, mantendo-se fixo o volume de solvente dispersante (acetona) em 500 μL . Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 2.2.5.2 (ensaios preliminares para DLLME).

O procedimento de extração consistiu no preparo da amostra em solução salina, de acordo com o planejamento fatorial (TABELA 2.2), e a ela foram adicionados os padrões analíticos do conjunto de triazinas de modo a se obter a concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, para posterior realização do método de extração. Foram obtidos os resultados apresentados na TABELA 2.8 e os percentuais de recuperação apresentados na FIGURA 2.10.

TABELA 2.8 - CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PARA OS ENSAIOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL.

Analitos	Experimentos				
	1	2	3	4	5/6/7
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
DIA	26,8	51,1	18,5	47,4	38,6
DEA	48,7	74,0	31,0	63,0	59,5
SMZ	79,7	85,3	33,8	66,2	74,5
AMT	78,2	80,7	31,6	62,6	70,7
CYZ	76,6	81,1	33,1	62,2	71,9
TBZD	75,1	86,9	33,3	65,3	72,2
PMT	73,0	73,7	29,3	57,8	70,3
ATZ	81,7	82,5	36,4	65,1	75,3
PPZ	73,5	73,0	31,6	58,1	69,8
TBZ	69,6	73,1	28,8	63,0	69,6

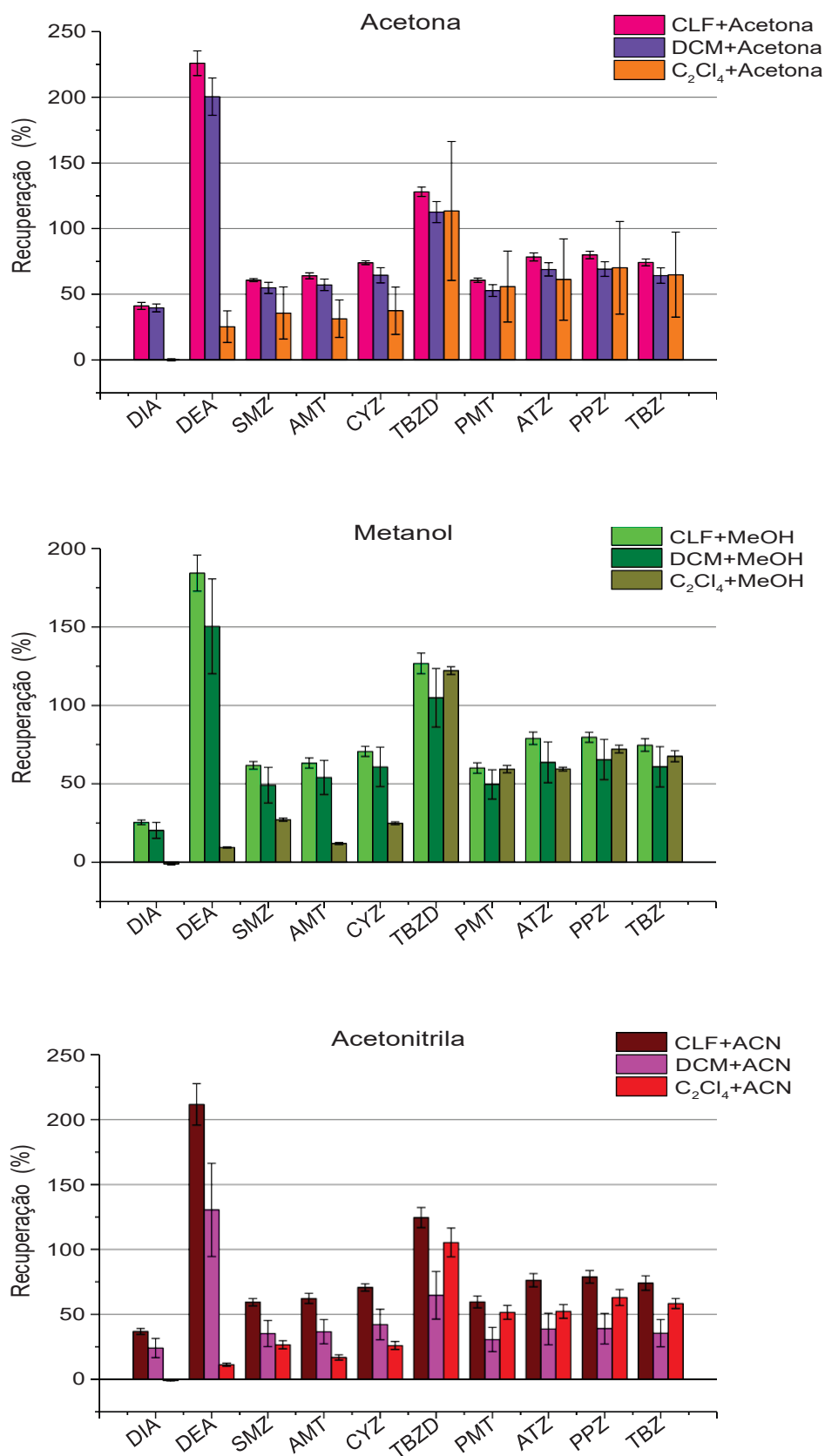
FIGURA 2.10 – RECUPERAÇÕES ABSOLUTAS (%) OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



As espécies avaliadas apresentaram percentuais de recuperação satisfatórios, principalmente nas condições do experimento 2, que envolve o uso de NaCl 10% e 500 µL de diclorometano. Nestas condições, recuperações superiores a 70% foram observadas na maioria dos casos.

A seguir, ensaios foram realizados para otimizar a extração das triazinas por DLLME, avaliando-se, em primeiro lugar, o efeito dos solventes. Os resultados apresentados na FIGURA 2.11 indicam pouca influência do sistema de solventes na eficiência do processo de extração. Sendo assim, o sistema diclorometano-acetona foi selecionado para estudos posteriores, apenas em função de aspectos relacionados com toxicidade. Nestas condições, recuperações próximas a 70% foram observadas para o maior número de analitos.

FIGURA 2.11 – COMPARAÇÃO ENTRE O SOLVENTE DISPERSOR E SOLVENTE EXTRATOR UTILIZADO NO TESTE DE SOLVENTES PARA A EXTRAÇÃO POR DLLME PARA TRIAZINAS EM TERMOS DE RECUPERAÇÃO (%), n=3.



Na etapa seguinte, o efeito das variáveis força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor na eficiência do processo de extração foram avaliados por meio de um planejamento fatorial composto central, definido pelas condições apresentadas na TABELA 2.3, conforme descrito no item 2.2.5.2. Com este objetivo foi utilizada uma mistura de triazínicos na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, assim como as condições gerais utilizadas nos testes preliminares.

Os resultados, expressos na forma de recuperação, são apresentados na TABELA 2.9, enquanto os efeitos, apresentados na forma de gráficos de Pareto, são apresentados na FIGURA 2.12.

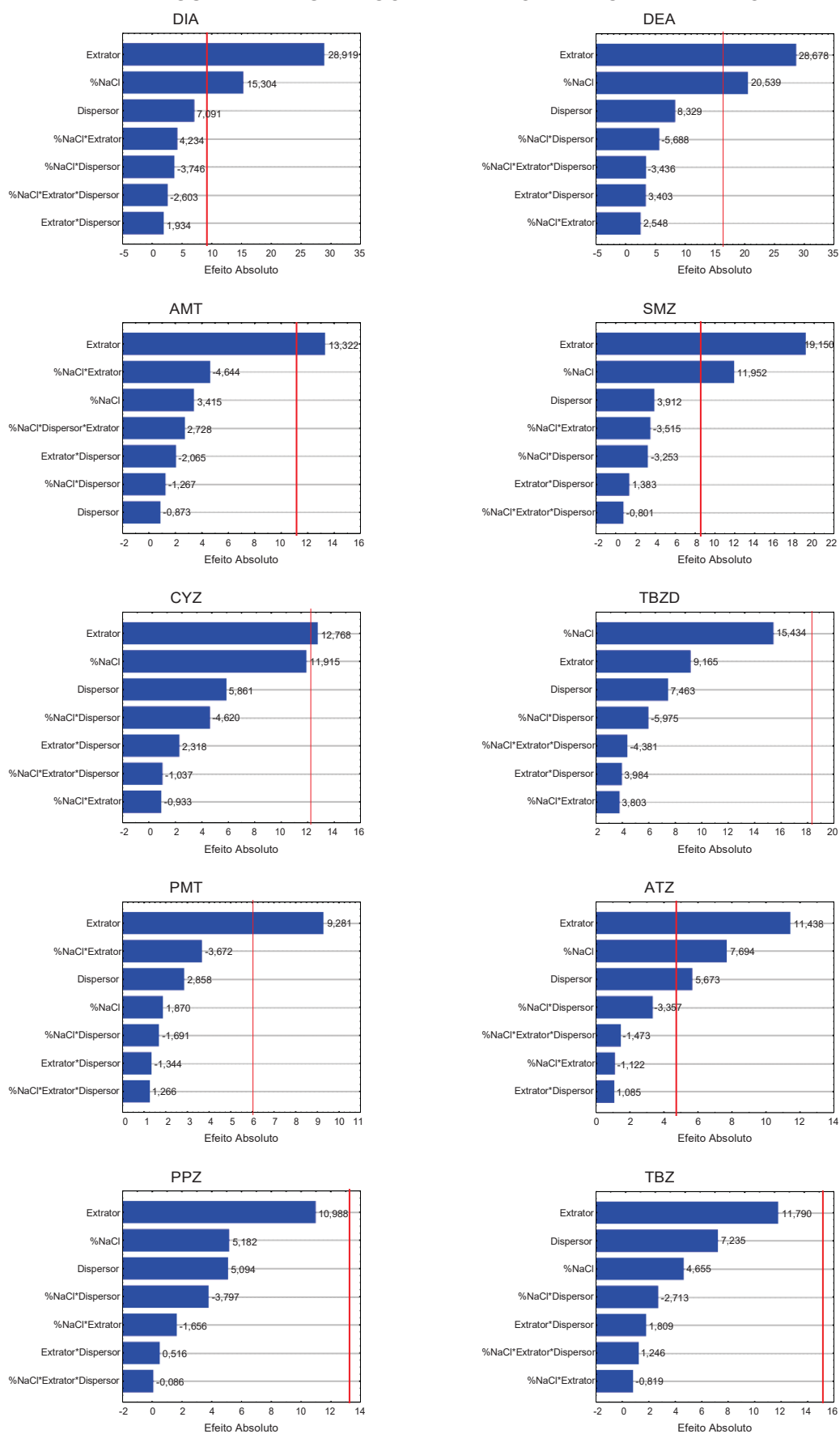
TABELA 2.9 – RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.

Condições Experimentais				Analitos									
Ensaio	% NaCl	Vol. DCM (μL)	Vol. Acetona (μL)	DIA	DEA	AMT	SMZ	CYZ	TBZD	PMT	ATZ	PPZ	TBZ
1	5	200	500	9,6	23,6	82,7	53,7	51,6	48,5	68,8	58,2	68,6	70,4
2	10	200	500	21,8	43,8	94,7	71,6	68,0	61,7	77,3	68,9	79,1	79,8
3	5	600	500	29,8	42,9	105,4	74,2	61,9	45,5	84,3	68,2	80,6	82,4
4	10	600	500	55,7	75,1	102,8	86,7	78,6	75,1	82,9	79,6	88,0	87,7
5	5	200	1000	15,9	30,8	87,9	58,7	58,7	53,6	75,9	64,7	76,9	79,8
6	10	200	1000	25,9	46,5	91,9	71,7	68,0	63,6	78,5	71,6	80,0	81,3
7	5	600	1000	45,2	63,7	101,0	83,5	75,8	67,3	86,3	79,8	90,1	92,9
8	10	600	1000	58,3	77,7	101,3	87,9	81,1	76,2	84,0	81,6	89,7	95,3
9	3,3	400	750	25,4	45,4	89,5	71,3	65,9	60,1	74,2	69,5	77,4	79,9
10	11,7	400	750	49,4	69,6	97,3	82,8	75,9	72,1	82,2	77,6	84,4	89,7
11	7,5	63,6	750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	7,5	736,4	750	54,3	73,7	100,7	87,4	77,1	77,7	82,7	78,1	88,9	92,7
13	7,5	400	329,5	31,9	58,0	96,1	81,6	74,9	73,7	82,3	77,8	86,0	88,6
14	7,5	400	1170,5	41,1	61,2	97,1	79,8	75,1	72,1	82,9	77,4	84,8	88,3
PC	7,5	400	750	38,0	59,5	96,7	80,4	73,1	70,1	80,9	75,6	84,8	87,7
Desvio PC				2,2	3,8	2,6	2,1	2,8	4,3	1,5	1,1	3,1	3,5

Nota: A recuperação observada no experimento 11 foi considerada nula, pois não houve formação de fase sedimentada após a adição dos solventes extrator e dispersor.

PC: ponto central (n=3)

FIGURA 2.12 – GRÁFICO DE PARETO PARA CADA ANALITO.



De acordo com estes resultados, o volume de solvente extrator e a força iônica apresentaram um efeito positivo em grande parte dos casos, enquanto o volume de solvente dispersante praticamente não mostrou efeito significativo.

A explicação desse efeito positivo, leva em consideração que a extração se dá por transferência dos substratos no solvente orgânico e que o referido processo é usualmente favorecido pelo aumento da força iônica (efeito *salting out*), o que diminui o poder solvatador da água e favorece a transferência. Por outro lado, o efeito insignificante do volume de solvente dispersor sugere que o volume das microgotas de solvente extrator e a sua área superficial alcançam valores limites com o uso de menores volumes de solvente dispersor, não sendo necessário o uso de volumes maiores.

Em função destes efeitos, as melhores recuperações, para a maioria dos analitos, foram observadas nas condições dos experimentos 4 e 8, em que o volume de solvente extrator e a força iônica se encontram no seu nível (+), enquanto o volume de solvente dispersor se encontra nos níveis (-) ou (+), respectivamente.

Com base nestas observações, as condições selecionadas correspondem a força iônica equivalente a 10% de NaCl, 600 µL de solvente extrator (DCM) e 1000 µL de solvente dispersor (acetona). A seguir, foi avaliado o efeito do volume da amostra (5 ou 10 mL) e do volume de reconstituição final (100 µL), objetivando-se aumentar o fator de pré-concentração das espécies de interesse (50 e 100 vezes). Cabe ressaltar que até então estava sendo empregado como volume de reconstituição 250 µL.

Os experimentos foram efetuados com a intenção de que fosse obtida a mesma concentração final dos analitos ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), após o processamento da amostra. Desta forma, a concentração da mistura de triazínicos adicionada em cada alíquota foi de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$, para o fator de concentração de 50 e 100 vezes, respectivamente. Os resultados (TABELA 2.10) indicam que a taxa de recuperação não foi influenciada pelo uso de volumes que levam a um maior EF, o que se mostra bastante promissor para a determinação de triazinas em baixas concentrações.

TABELA 2.10 - RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO (%) PARA OS TESTES DE VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO (n=3).

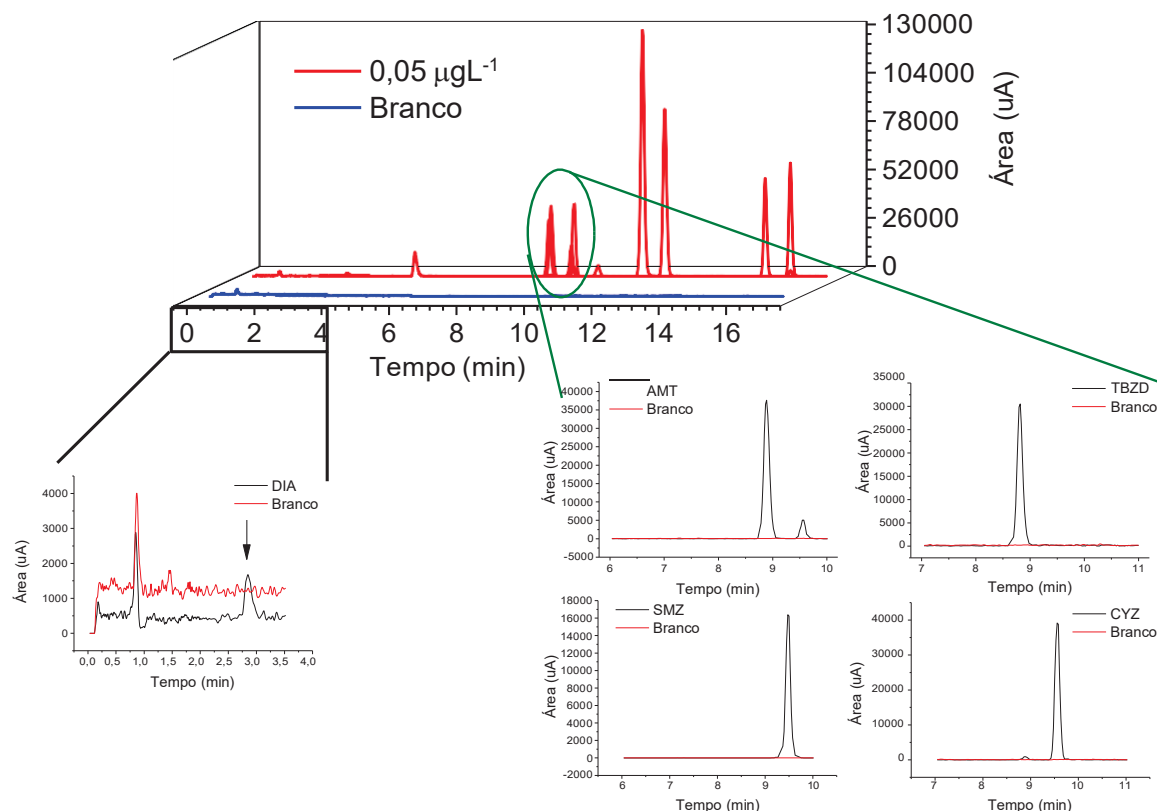
Fator de enriquecimento		50x			100x			100x(D)*		
Analitos		Média	DP	Variância	Média	DP	Variância	Média	DP	Variância
Recuperação	DIA	71,87	0,35	0,12	43,89	0,21	0,04	62,66	3,68	13,56
	DEA	88,29	0,21	0,04	72,06	0,78	0,60	83,61	4,04	16,29
	AMT	102,70	0,58	0,33	103,55	2,78	7,71	100,31	1,14	1,31
	SMZ	49,81	0,74	0,54	47,71	0,62	0,39	45,71	0,63	0,40
	CYZ	77,51	0,59	0,35	76,44	1,21	1,46	75,85	0,82	0,67
	TBZD	87,09	0,29	0,08	84,19	1,62	2,63	81,60	0,28	0,08
	PMT	86,26	0,69	0,47	87,25	2,88	8,31	84,95	2,04	4,14
	ATZ	86,04	0,15	0,02	84,65	0,68	0,46	84,45	3,32	11,06
	PPZ	85,81	0,32	0,10	85,75	1,67	2,79	83,02	2,13	4,52
	TBZ	102,68	0,99	0,99	101,73	2,76	7,60	99,71	4,61	21,28

Nota: DP: Desvio padrão; (D)*: dobro de amostra e dobro de solvente extrator e dispersor.

Contudo, os menores desvios foram observados na condição que leva a um EF de 50 vezes (5 mL de amostra e 100 µL de reconstituição), tendo sido a condição selecionada para estudos posteriores. Considerando que o LOQ instrumental calculado com base na curva de calibração preparada em solvente, foi de 10 µg L⁻¹ e o EF do método de 50 vezes, pode-se inferir que o método DLLME-LC-MS/MS permitiu a determinação de concentrações de até 200 ng L⁻¹, o que se mostra compatível com o monitoramento ambiental.

Finalmente, foi elaborada uma curva analítica, em água ultrapura, objetivando a determinação dos limites de detecção e de quantificação do método. Para isso, foram avaliadas as concentrações de 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 e 0,50 µg L⁻¹, em quintuplicata, para DEA, AMT, CYZ e PMT, para os demais analitos as curvas foram preparadas em triplicata, as quais foram submetidas ao método de extração nas condições otimizadas. A FIGURA 2.13 apresenta a comparação dos cromatogramas da prova em branco e da concentração de 0,05 µg L⁻¹, em água ultrapura.

FIGURA 2.13 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA PROVA EM BRANCO E AMOSTRA FORTIFICADA ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) APÓS MÉTODO DLLME-LC-MS/MS.



Com base nos parâmetros da curva analítica, foram obtidas as equações de regressão, coeficiente de determinação (R^2), bem como limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para cada analito, os quais são apresentados na TABELA 2.11.

Além disso, foram avaliados os parâmetros de validação para a linearidade. Para que a regressão linear seja válida, além do coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ser independentes entre si, homocedásticos e apresentar distribuição aleatória. Desta forma, a distribuição aleatória é avaliada visualmente através do gráfico de distribuição de resíduos, a homoscedasticidade é avaliada em termos da análise das variâncias das respostas instrumentais através do teste F, entre os níveis de concentração avaliados. Se o valor de F calculado entre dois níveis da curva analítica for inferior ao valor de F tabelado, os resíduos são homocedásticos.

Por fim, a independência dos resíduos foi calculada pelo teste de Durbin-Watson, sendo que são considerados independentes quando $d_{\text{cal}} > d_U$, onde d_U é tabelado e depende do tamanho do conjunto amostral (TABELA 2.11).

TABELA 2.11 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE, APLICANDO O MÉTODO EM ÁGUA ULTRAPURA.

Analitos	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão	Desvio coef. linear	Desvio coef. angular	R ²	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste F** F _{cal}	Teste D-W*** d _{cal}
DIA*	0,05 a 0,5	$A_p = 1,775 \times 10^5 \text{CDIA} - 780$	4235,30	13651,59	0,9979	0,025	0,05	$F_{1,2}=12,70; F_{2,3}=3,56; F_{3,4}=1,08; F_{4,5}=4,37; F_{5,6}=1,30; F_{6,7}=1,68; F_{7,8}=1,39; F_{8,9}=1,11; F_{9,10}=2,10$	2,63
DEA	0,05 a 0,5	$A_p = 1,488 \times 10^6 \text{CDEA} - 11862$	34364,63	110767,24	0,9981	0,025	0,05	$F_{1,2}=4,33; F_{2,3}=3,05; F_{3,4}=2,29; F_{4,5}=1,69; F_{5,6}=1,27; F_{6,7}=1,08; F_{7,8}=1,51; F_{8,9}=1,58; F_{9,10}=1,06$	1,75
AMT	0,05 a 0,5	$A_p = 4,859 \times 10^6 \text{CAMT} - 46650$	89865,50	289662,74	0,9939	0,025	0,05	$F_{1,2}=8,39; F_{2,3}=2,64; F_{3,4}=1,82; F_{4,5}=1,67; F_{5,6}=1,77; F_{6,7}=1,60; F_{7,8}=2,38; F_{8,9}=1,53; F_{9,10}=1,08$	1,65
SMZ*	0,05 a 0,5	$A_p = 1,546 \times 10^6 \text{CSMZ} + 3301$	34801,06	112173,97	0,9955	0,025	0,05	$F_{1,2}=3,54; F_{2,3}=3,12; F_{3,4}=2,23; F_{4,5}=4,33; F_{5,6}=2,02; F_{6,7}=3,25; F_{7,8}=1,056; F_{8,9}=1,79; F_{9,10}=1,03$	2,58
CYZ	0,05 a 0,5	$A_p = 2,245 \times 10^6 \text{CCYZ} - 6278$	37904,65	122177,74	0,9990	0,025	0,05	$F_{1,2}=4,58; F_{2,3}=3,53; F_{3,4}=1,89; F_{4,5}=1,37; F_{5,6}=1,22; F_{6,7}=1,22; F_{7,8}=2,43; F_{8,9}=1,11; F_{9,10}=1,20$	1,81
TBZD*	0,05 a 0,5	$A_p = 15,550 \times 10^6 \text{CTBZD} - 47389$	129326,11	416855,80	0,9956	0,025	0,05	$F_{1,2}=15,61; F_{2,3}=2,22; F_{3,4}=1,85; F_{4,5}=1,44; F_{5,6}=1,37; F_{6,7}=1,38; F_{7,8}=1,52; F_{8,9}=1,21; F_{9,10}=1,63$	2,67
PMT	0,05 a 0,5	$A_p = 2,287 \times 10^7 \text{CPMT} - 357373$	467911,43	$1,53 \times 10^6$	0,9959	0,025	0,05	$F_{1,2}=3,06; F_{2,3}=3,29; F_{3,4}=2,12; F_{4,5}=1,45; F_{5,6}=2,54; F_{6,7}=1,19; F_{7,8}=1,49; F_{8,9}=1,04; F_{1,2}=7,49; F_{2,3}=8,60; F_{3,4}=1,95; F_{4,5}=3,87; F_{5,6}=1,30; F_{6,7}=2,06; F_{7,8}=1,96; F_{8,9}=3,36; F_{9,10}=1,01; F_{10,11}=1,67$	1,73
ATZ*	0,025 a 0,5	$A_p = 1,028 \times 10^7 \text{CATZ} + 81090$	112129,27	378943,12	0,9966	0,0125	0,025		2,34
PPZ*	0,05 a 0,5	$A_p = 3,838 \times 10^6 \text{CPPZ} + 7995$	53669,82	172993,49	0,9943	0,025	0,05	$F_{1,2}=2,20; F_{2,3}=2,81; F_{3,4}=1,00; F_{4,5}=1,61; F_{5,6}=1,86; F_{6,7}=3,15; F_{7,8}=1,08; F_{8,9}=1,23; F_{9,10}=1,08$	2,31
TBZ*	0,05 a 0,5	$A_p = 6,389 \times 10^6 \text{CTBZ} + 64164$	229767,47	703516,33	0,9908	0,025	0,05	$F_{1,2}=19,15; F_{2,3}=2,38; F_{3,4}=1,69; F_{4,5}=2,11; F_{5,6}=1,42; F_{6,7}=1,07; F_{7,8}=1,93; F_{8,9}=1,38; F_{9,10}=1,99$	2,55

Notas: FLT: Faixa Linear de Trabalho; *n=3; **Valor crítico $F_{4,4,95\%}=9,604$ (bicaudal) para DEA, CYZ, AMT e PMT; $F_{2,2,95\%}=39,0$ (bicaudal) para DIA, SMZ, TBZD, ATZ, PPZ e TBZ.; ***Teste D-W: teste Durbin-Watson: DEA, AMT, CYZ d_{crítico}: d_L=1,50; d_U=1,59; PMT: d_L=1,40; d_U=1,52; DIA, SMZ, TBZD, ATZ, PPZ, TBZ: d_L=1,35; d_U=1,49.

Os coeficientes de determinação obtidos foram satisfatórios para a faixa de concentração avaliada ($R^2 > 0,996$). Realizando a análise da aleatoriedade dos gráficos de resíduos, não foi identificada nenhuma tendência nos resultados, garantindo assim a sua distribuição aleatória. Diante disso, pode-se dizer que a linearidade foi atendida para todos os analitos na amostra de água ultrapura.

2.3.4. Validação do método DLLME-LC-MS/MS

A seletividade diz respeito a capacidade do método quantificar o analito na presença de outros analitos ou interferentes da matriz (INMETRO, 2020). Técnicas como a LC-MS/MS são reconhecidas por apresentarem alta seletividade e alta resolução.

A seletividade foi avaliada pelo estudo do efeito matriz, pois, a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no sinal analítico. O efeito matriz foi estimado comparando as inclinações da curva analítica preparada na matriz e da curva analítica preparada em água ultrapura (matriz de análise similar e isenta de interferentes) e foi calculado de acordo com a Eq. 2.1. Portanto, valores determinados como 0 significam que não há efeito de matriz, valores positivos indicam aumento do sinal analítico na presença da matriz, e valores negativos indicam supressão do sinal analítico na presença da matriz. Os coeficientes das curvas analíticas, bem como o efeito matriz calculado são apresentados na TABELA 2.12. A comparação entre as curvas analíticas, na matriz e em água ultrapura, para cada analito estão no APÊNDICE A.

Como pode ser observado, o efeito matriz está presente tanto na margem brasileira, como na margem paraguaia, sendo mais pronunciado na primeira. Mesmo após a filtração na margem brasileira as amostras apresentavam uma leve coloração, quando comparada com a matriz paraguaia, isso pode estar relacionado a presença de material particulado solúvel, conhecidos como colóides, que inclusive podem ter auxiliado na concentração dos analitos na amostra. Então, para compensar os efeitos da matriz sobre os analitos, as curvas analíticas utilizadas para a quantificação das espécies, foram construídas em um *pool* de amostras para cada margem do reservatório, a fim de avaliar de uma forma mais real a determinação das espécies de interesse.

TABELA 2.12 – COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E PORCENTAGEM DO EFEITO MATRIZ NAS MATRIZES AVALIADAS.

	DIA	DEA	AMT	SMZ	CYZ	TBZD	PMT	ATZ	PPZ	TBZ
Solvente	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,05-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5	0,025-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5
	Coef.angular	177500	1487554	4859339	1546042	2244796	22868902	10281716	3838144	6388532
	Coef.linear	-780	-11863	-46651	3301	-6279	-357373	81090	7995	64164
	R ²	0,9979	0,9981	0,9939	0,9955	0,9990	0,9959	0,9966	0,9943	0,9901
Matriz BR	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,025-0,4	0,15-0,5	0,1-0,5	0,15-0,5	0,05-0,35	0,1-0,5	0,025-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5
	Coef.angular	738766	8281399	26470936	15052443	9662759	23974403	40393373	28776283	34564144
	Coef.linear	-4462	184924	-564320	-86972	29456	-56258	102586	-205840	-429545
	R ²	0,9983	0,9933	0,9945	0,9909	0,9961	0,9981	0,9976	0,9986	0,9979
Matriz PY	%Efeito matriz	316,2	456,7	444,7	873,6	330,5	332,0	292,9	649,7	441,0
	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,5	0,025-0,5	0,05-0,5	0,05-0,5	0,05-0,45	0,1-0,5
	Coef.angular	411205	4979761	15705222	8961732	6559031	16137809	23897555	18781702	21128401
	Coef.linear	-582	150293	-864610	213905	-17334	-32486	162431	-134416	439780
Matriz PY	R ²	0,9958	0,9909	0,9964	0,9941	0,9988	0,9984	0,9988	0,9927	0,9978
	%Efeito matriz	131,7	234,8	223,2	479,7	192,2	190,8	132,4	389,3	230,7

Nota: FLT: faixa linear de trabalho.

O teste F (TABELA 2.13) entre as variâncias das áreas de pico obtidas, em triplicata, para as soluções padrão e para a matriz fortificada, indicou que o método pode ser considerado seletivo, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{crítico}} = 19,0$, para 95% de confiança) para todos os analitos em ambas as matrizes avaliadas.

TABELA 2.13 – RESULTADO DO TESTE F PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO DLLME-LC-MS/MS (n=3)

	DIA	DEA	AMT	SMZ	CYZ	TBZD	PMT	ATZ	PPZ	TBZ
Padrão	RSD	21,03	20,99	16,99	29,71	13,99	18,66	19,87	21,13	29,37
	Variância	0,0005	0,0007	0,0005	0,0019	0,0003	0,0006	0,0005	0,0009	0,0005
BR	RSD	14,84	25,17	22,86	40,90	16,31*	32,84	25,89	16,55	28,78
	Variância	0,0004	0,0015	0,0006	0,0022	0,0009	0,0019	0,0008	0,0005	0,0010
	Fcal	1,04	2,10	1,13	1,15	2,70	3,30	2,88	1,87	1,91
PY	RSD	13,71	29,29	24,07	25,45	13,02	15,52	19,80	31,91	17,47
	Variância	0,0003	0,0024	0,0003	0,0014	0,0006	0,0005	0,0007	0,0010	0,0006
	Fcal	1,47	3,31	1,59	1,32	1,78	1,13	1,34	1,11	0,88
Padrão	RSD	15,97	13,94	13,17	19,70	14,25	14,62	11,53	12,16	16,88
	Variância	0,0018	0,0021	0,0022	0,0063	0,0023	0,0022	0,0014	0,0024	0,0017
BR	RSD	6,28	12,12	5,80	26,12	9,54	12,59	3,41	4,19	7,23
	Variância	0,0006	0,0024	0,0005	0,0058	0,0009	0,0027	0,0002	0,0002	0,0015
	Fcal	3,05	1,13	4,54	1,08	2,45	1,20	5,78	10,39	0,85
PY	RSD	19,37	19,77	19,45	29,76	14,35	11,35	15,57	19,56	18,90
	Variância	0,0053	0,0069	0,0050	0,0151	0,0078	0,0050	0,0065	0,0115	0,0112
	Fcal	2,97	3,32	2,28	2,40	3,43	2,24	4,66	4,82	6,44

Nota: *0,35 µg L⁻¹ CYZ - BR

A linearidade foi avaliada pela construção da curva analítica, elaborada nas concentrações de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$, em quintuplicata, para todas as espécies de interesse, a exceção de DIA e DEA que foram avaliados em triplicata. Para que uma regressão linear seja válida, além de existir relação linear entre a área do pico e a concentração do analito expressa pelo coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ser independentes entre si, homocedásticos e apresentar distribuição aleatória. Esses parâmetros foram avaliados para cada analito em curvas de superposição de matriz para cada margem do reservatório de ITAIPU margem esquerda – Brasil (BR) e margem direita – Paraguai (PY), sendo os resultados apresentados nas TABELAS 2.14 e 2.15, respectivamente.

A correlação entre as áreas de pico e as concentrações avaliadas foi linear, dentro da faixa estudada, para as duas matrizes avaliadas (APÊNDICE B e C). Os coeficientes de determinação obtidos foram satisfatórios para a faixa de concentração avaliada ($R^2 > 0,991$). A avaliação dos resíduos não identificou nenhuma tendência nos resultados, indicando uma distribuição aleatória. Em alguns casos os resíduos não foram considerados homocedásticos (valores destacados - TABELAS 2.15 e 2.16), porém por serem pontos isolados e a independência dos resíduos ter sido assegurada pelo teste de Durbin-Watson, foi optado por manter esses níveis de concentração. Desta forma, a linearidade foi atendida para todos os analitos tanto na matriz brasileira, como na matriz paraguaia.

Nas FIGURAS 2.14 e 2.15 são apresentadas as sobreposições dos cromatogramas da prova em branco da matriz e da matriz fortificada nas concentrações do LOQ de cada analito, para a margem brasileira e margem paraguaia, respectivamente.

TABELA 2.14 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ BRASIL (MARGEM ESQUERDA)

Análitos	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão	Desvio coef. linear	Desvio coef. angular	R ²	Teste F** F _{cal}	Teste D- W*** d _{cal}
DIA*	0,025 a 0,4	A _p =738766 C _{DIA} - 4462	4272,49	17937,08	0,9983	F _{1,2} =7,28; F _{2,3} =1,59; F _{3,4} =2,65; F _{4,5} =1,37; F _{5,6} =4,00; F _{6,7} =3,30; F _{7,8} =2,83	2,50
DEA*	0,15 a 0,5	A _p =8281398 C _{DEA} + 184923	214645,05	622879,54	0,9933	F _{1,2} =1,49; F _{2,3} =1,18; F _{3,4} =1,20; F _{4,5} =1,84; F _{5,6} =1,81; F _{6,7} =2,64; F _{7,8} =1,35	2,49
AMT	0,10 a 0,5	A _p =26470935 C _{AMT} - 564319	365015,79	1,13 x 10 ⁶	0,9945	F _{1,2} =1,63; F _{2,3} =1,47; F _{3,4} =1,06; F _{4,5} =1,59; F _{5,6} =2,95; F _{6,7} =7,82; F _{7,8} =1,10	1,58
SMZ	0,15 a 0,5	A _p =15052443 C _{SMZ} - 86971	478620,35	1,39 x 10 ⁶	0,9909	F _{1,2} =1,13; F _{2,3} =1,95; F _{3,4} =20,69; F _{4,5} =18,09; F _{5,6} =1,76; F _{6,7} =2,22; F _{7,8} =1,16	1,93
CYZ	0,05 a 0,35	A _p =9662758 C _{CYZ} + 29456	85899,38	384153,69	0,9961	F _{1,2} =5,86; F _{2,3} =2,54; F _{3,4} =1,64; F _{4,5} =1,89; F _{5,6} =2,47; F _{6,7} =2,23	1,65
TBZD	0,10 a 0,5	A _p =23974402 C _{TBZD} - 56258	410703,24	1,24 x 10 ⁶	0,9981	F _{1,2} =3,00; F _{2,3} =2,69; F _{3,4} =2,09; F _{4,5} =1,64; F _{5,6} =2,93; F _{6,7} =3,22; F _{7,8} =4,58	1,56
PMT	0,10 a 0,5	A _p =118859482 C _{PMT} - 4666674	1,99 x 10 ⁶	6,15 x 10 ⁶	0,9936	F _{1,2} =4,21; F _{2,3} =1,09; F _{3,4} =1,67; F _{4,5} =1,70; F _{5,6} =3,09; F _{6,7} =3,53; F _{7,8} =2,19	1,81
ATZ	0,025 a 0,5	A _p =40393373 C _{ATZ} + 102585	357170,87	1,21 x 10 ⁶	0,9976	F _{1,2} =1,97; F _{2,3} =7,19; F _{3,4} =1,69; F _{4,5} =2,21; F _{5,6} =3,06; F _{6,7} =1,05; F _{7,8} =2,08; F _{8,9} =4,18; F _{9,10} =20,69; F _{10,11} =4,00	1,67
PPZ	0,05 a 0,5	A _p =28776282 C _{PPZ} - 205840	276462,49	887921,87	0,9986	F _{1,2} =3,63; F _{2,3} =1,98; F _{3,4} =1,15; F _{4,5} =1,61; F _{5,6} =1,14; F _{6,7} =3,58; F _{7,8} =20,66; F _{8,9} =2,41	1,61
TBZ	0,05 a 0,5	A _p =34564144 C _{TBZ} - 429545	448119,51	1,44 x 10 ⁶	0,9979	F _{1,2} =2,30; F _{2,3} =3,49; F _{3,4} =1,53; F _{4,5} =1,73; F _{5,6} =1,93; F _{6,7} =2,50; F _{7,8} =5,14; F _{8,9} =1,36	1,62

Notas: FLT= Faixa linear de trabalho; A_p= Área de pico; c= Concentração

*n=3

** Valor crítico F_{4,4,95%}=9,605 (bicaudal) para AMT, SMZ, CYZ, TBZD, PMT, ATZ, PPZ e TBZ; F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal) para DIA e DEA.

***Teste D-W: teste Durbin-Watson; DIA d_{crítico}: d_L=1,32; d_U=1,47; DEA: d_L=1,27; d_U=1,45; AMT, SMZ, TBZD, PMT: d_L=1,44; d_U=1,54; CYZ: d_L=1,40; d_U=1,52; ATZ: d_L=1,53; d_U=1,60; PPZ, TBZ: d_L=1,47; d_U=1,57.

TABELA 2.15 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ PARAGUAI (MARGEM DIREITA)

Análitos	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão	Desvio coef. linear	Desvio coef. angular	R ²	Teste F** F _{cal}	Teste D-W*** d _{cal}
DIA	0,10 a 0,5	A _p =411205 CDIA – 581	10442,79	31974,38	0,9958	F _{1,2} =1,24; F _{2,3} =5,72; F _{3,4} =1,13; F _{4,5} =1,19; F _{5,6} =1,78; F _{6,7} =1,37; F _{7,8} =1,50; F _{8,9} =1,08	1,72
DEA*	0,10 a 0,5	A _p =4979761 CDEA + 150293	130253,46	384096,51	0,9909	F _{1,2} =9,13; F _{2,3} =12,70; F _{3,4} =1,10; F _{4,5} =4,64; F _{5,6} =1,71; F _{6,7} =1,24; F _{7,8} =1,27	2,46
AMT	0,10 a 0,5	A _p =15705221 CAMT – 864609	317611,38	972482,26	0,9964	F _{1,2} =2,78; F _{2,3} =2,58; F _{3,4} =2,43; F _{4,5} =1,02; F _{5,6} =2,09; F _{6,7} =1,17; F _{7,8} =1,32; F _{8,9} =1,41	1,87
SMZ*	0,10 a 0,5	A _p =8961731 CSMZ + 213904	322523,29	987521,86	0,9941	F _{1,2} =1,42; F _{2,3} =2,78; F _{3,4} =2,85; F _{4,5} =2,72; F _{5,6} =3,17; F _{6,7} =1,18; F _{7,8} =1,27; F _{8,9} =1,68	2,70
CYZ	0,025 a 0,5	A _p =6559030 CCYZ – 17333	95119,55	321458,42	0,9988	F _{1,2} =2,25; F _{2,3} =5,37; F _{3,4} =1,70; F _{4,5} =2,57; F _{5,6} =1,53; F _{6,7} =1,32; F _{7,8} =1,81; F _{8,9} =1,42; F _{9,10} =1,20; F _{10,11} =1,17; F _{1,2} =1,63; F _{2,3} =11,63; F _{3,4} =2,11; F _{4,5} =1,95;	1,63
TBZD	0,025 a 0,5	A _p =16137809 CTBZD – 32485	197283,25	666722,68	0,9984	F _{5,6} =1,56; F _{6,7} =1,62; F _{7,8} =1,51; F _{8,9} =1,30; F _{9,10} =1,35; F _{10,11} =1,16	2,12
PMT	0,05 a 0,5	A _p =77228528 CPMT – 950381	1,62 x 10 ⁶	5,22 x 10 ⁶	0,9931	F _{1,2} =3,98; F _{2,3} =2,45; F _{3,4} =2,69; F _{4,5} =1,34; F _{5,6} =1,84; F _{6,7} =1,11; F _{7,8} =1,35; F _{8,9} =1,19; F _{9,10} =1,01	1,94
ATZ	0,05 a 0,5	A _p =23897554 CATZ + 162430	365169,37	1,18 x 10 ⁶	0,9988	F _{1,2} =4,95; F _{2,3} =1,79; F _{3,4} =1,63; F _{4,5} =1,59; F _{5,6} =1,22; F _{6,7} =1,68; F _{7,8} =1,82; F _{8,9} =1,26; F _{9,10} =1,55	2,23
PPZ	0,05 a 0,45	A _p =18781702 CPPZ – 134415	375203,64	1,33 x 10 ⁶	0,9927	F _{1,2} =7,73; F _{2,3} =3,62; F _{3,4} =1,51; F _{4,5} =1,95; F _{5,6} =1,08; F _{6,7} =1,50; F _{7,8} =2,31; F _{8,9} =1,16; F _{9,10} =2,07	2,63
TBZ	0,10 a 0,5	A _p =21128401 CTBZ + 439780	562797,68	1,72 x 10 ⁶	0,9978	F _{1,2} =2,07; F _{2,3} =3,34; F _{3,4} =1,79; F _{4,5} =1,27; F _{5,6} =1,55; F _{6,7} =1,56; F _{7,8} =1,53; F _{8,9} =2,68	1,80

Notas: Valor crítico F_{4,4,95%}=9,605 (bicaudal) para DIA, AMT, CYZ, TBZD, PMT, ATZ, PPZ e TBZ; F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal) para DEA e SMZ.

***Teste D-W: teste Durbin-Watson; DIA, AMT, PPZ, TBZ d_{crítico}: d_L=1,47; d_U=1,57; DEA: d_L=1,32; d_U=1,47; CYZ, TBZD: d_L=1,53; d_U=1,60; PMT, ATZ: d_L=1,50; d_U=1,59.

FIGURA 2.14 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA MATRIZ BRASILEIRA DE ÁGUA FORTIFICADA, INCLUINDO A PROVA EM BRANCO APÓS EXTRAÇÃO POR DLLME-LC-MS/MS.

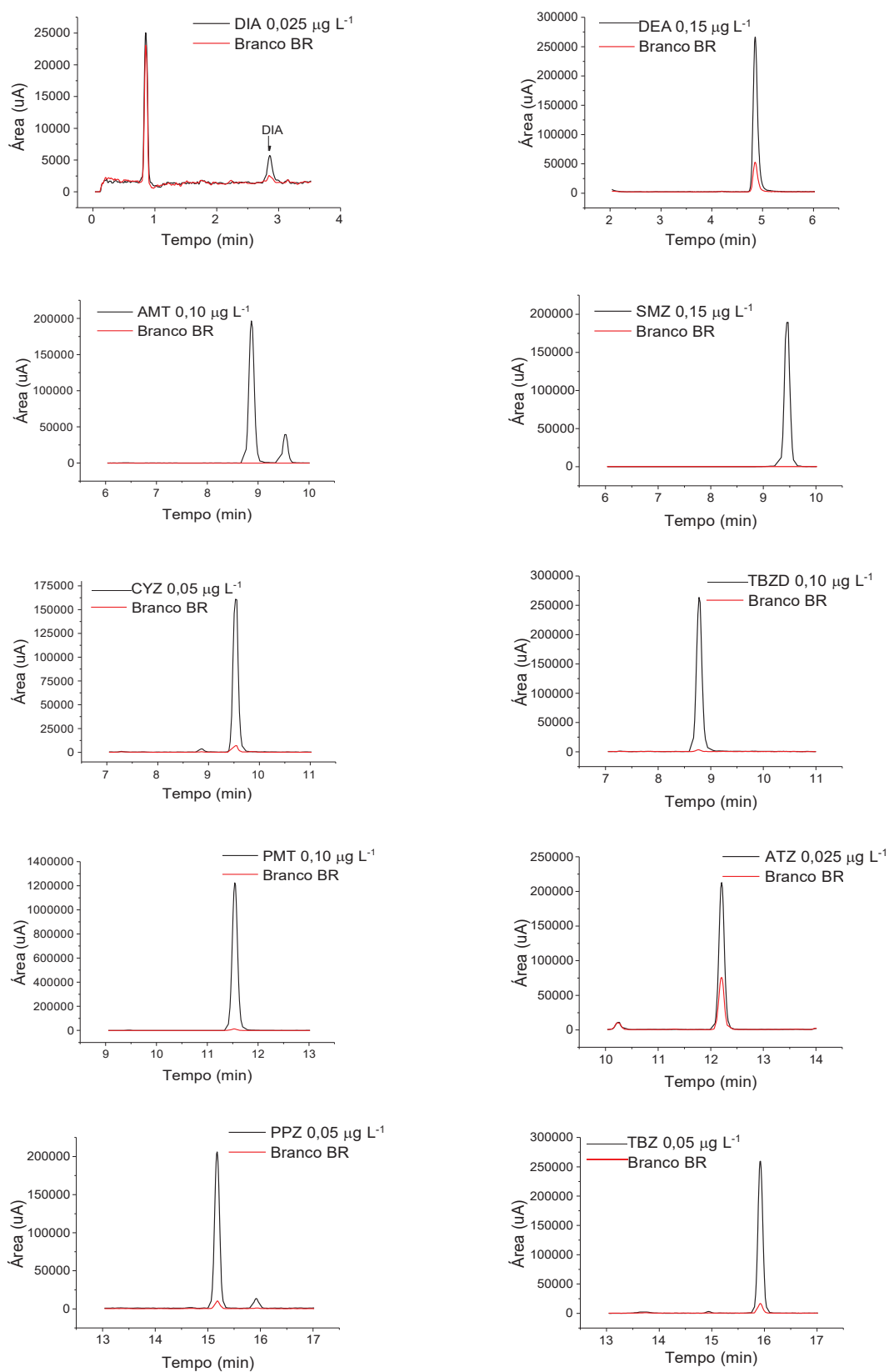
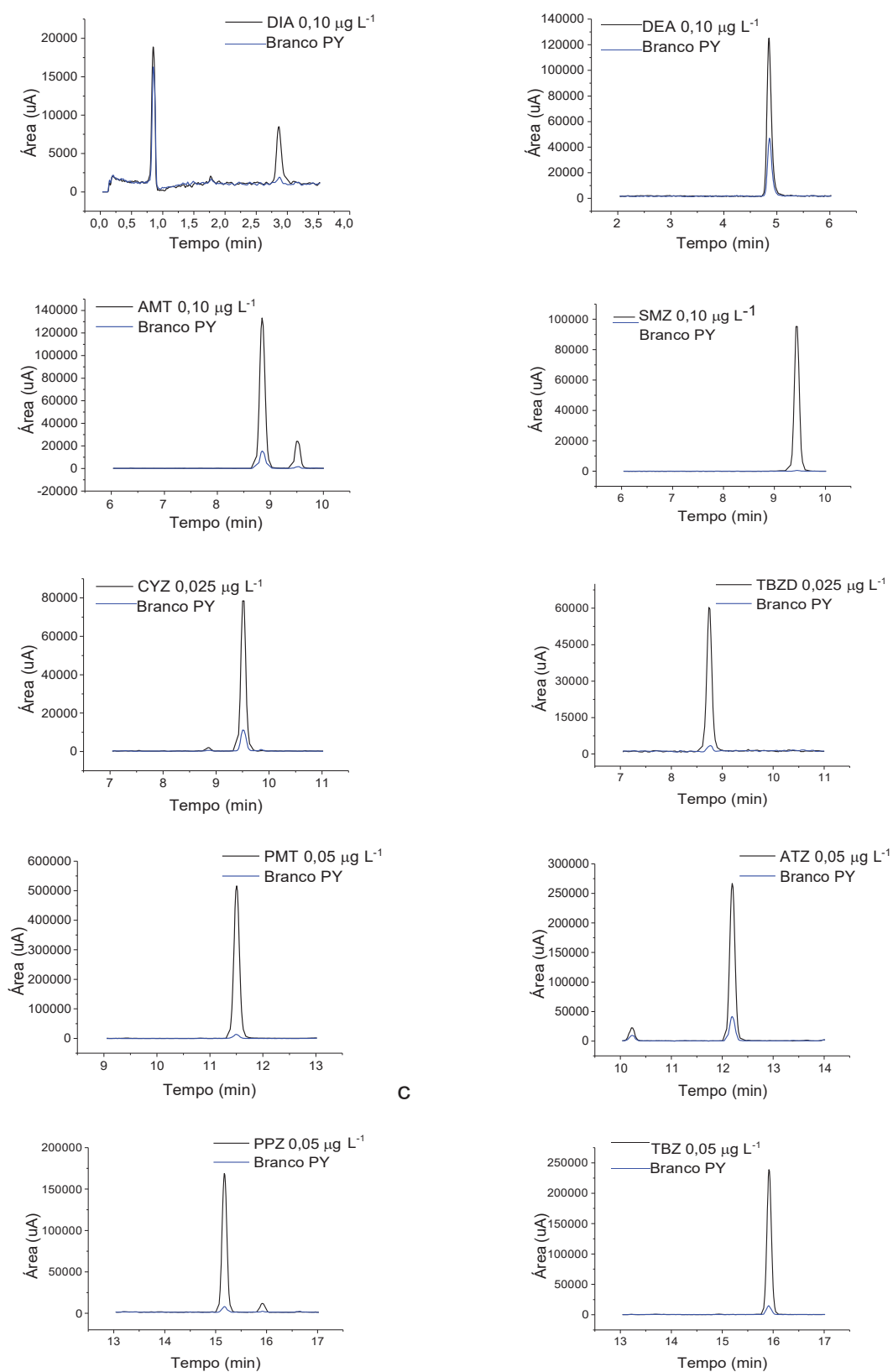


FIGURA 2.15 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA MATRIZ PARAGUAIA DE ÁGUA FORTIFICADA, INCLUINDO A PROVA EM BRANCO APÓS EXTRAÇÃO POR DLLME-LC-MS/MS.



Os valores de LOD e LOQ, para as curvas preparadas na matriz, foram avaliados pelo método visual e os valores obtidos para o método DLLME-LC-MS/MS são apresentados na TABELA 2.16.

TABELA 2.16 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS ($\mu\text{g L}^{-1}$), (n=5)

		DIA	DEA	AMT	SMZ	CYZ	TBZD	PMT	ATZ	PPZ	TBZ
BR	LOD	0,0125*	0,10*	0,05	0,10	0,025	0,05	0,05	0,0125	0,025	0,025
	LOQ	0,025*	0,15*	0,10	0,15	0,05	0,10	0,10	0,025	0,05	0,05
PY	LOD	0,05	0,05*	0,05	0,05*	0,0125	0,0125	0,025	0,025	0,025	0,05
	LOQ	0,10	0,10*	0,10	0,10*	0,025	0,025	0,05	0,05	0,05	0,05

Nota: *n=3

Os menores valores de LOQ, calculados pelo método visual, foram obtidos para a matriz paraguaia para a maioria dos analitos (DEA, SMZ, CYZ, TBZD e PMT). Houve casos em que o LOQ foi igual para ambas as matrizes para AMT, PPZ e TBZ. Já para DIA e ATZ, os menores valores de LOQ foram observados na matriz brasileira.

Quando se compara os LOQ atingidos nesse estudo com dados da literatura (TABELA 2.17), verifica-se que os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza.

TABELA 2.17 – COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE OBTIDOS NA LITERATURA.

Método	Analito	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EF	Referência
DLLME-GC-MS	ATZ	0,15	-	Della-Flora et al., (2018)
	DIA	0,9		
	DEA	0,5		
DLLME-LC-DAD	AMT	0,27	25x	Rodríguez-González et al., (2015)
	ATZ	0,19		
	CYZ	0,40		
	PPZ	0,47		
	SMZ	1,10		
	TBZ	0,43		
DLLME-LC-DAD	ATZ	0,29	20x	Estevão, Peralta-Zamora e Nagata, (2018)
	DIA	0,15		
	DEA	0,22		
DLLME-LC-MS/MS	ATZ	0,005	100x	Bolzan et al., (2015)
	SMZ	0,010		
DLLME-SFO-LC-MS/MS	ATZ	0,5	20x	Marube et al., (2015)
SPE-LC-MS/MS	ATZ	0,07	4x	Rodríguez-González et al., (2017)
	AMT	0,05		
	CYZ	0,09		
	DEA	0,08		
	TBZD	0,08		
	DIA	0,08		
	PMT	0,05		
	PPZ	0,07		
	SMZ	0,07		
	TBZ	0,08		

Rodríguez-González et al., (2017) determinaram compostos triazínicos em água do mar e obtiveram LOQ de 0,05 a 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$, considerando um EF de 4 vezes, apenas. O método proposto atingiu limites iguais ou muito próximos aos relatados por Rodríguez-González e colaboradores.

Marube et al., (2015) realizaram a extração simultânea de agrotóxicos, fármacos e produtos de higiene pessoal em amostras de água. Dentre os agrotóxicos avaliados está a ATZ e obtiveram LOQ de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, considerando um EF de 20 vezes. Levando em consideração que os valores de LOQ foram obtidos na matriz, fazendo com que haja uma maior e melhor representatividade do que ocorre no meio ambiente, o método proposto apresentou-se mais sensível para a ATZ (0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, BR e PY respectivamente).

Já Bolzan et al., (2015) avaliaram a pré-concentração de agrotóxicos, dentre eles ATZ e SMZ, em água e obtiveram LOQ de 0,005 e 0,010 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e SMZ, respectivamente (BOLZAN et al., 2015). Tais valores chegam a ser 10 e 15 vezes menores que os obtidos nesse estudo para ATZ e SMZ, respectivamente. Porém, além do EF de Bolzan e colaboradores ser de 100 vezes, o dobro desse estudo, os autores relataram baixo efeito matriz nas análises (-1 a 18%). Cenário muito diferente do que foi encontrado durante este trabalho, já que foram relatados efeito matriz superiores a 131%. Isso pode estar relacionado com a complexidade da matriz aqui avaliada, uma vez que foi necessário a confecção de um *pool* de amostras para uma melhor representatividade.

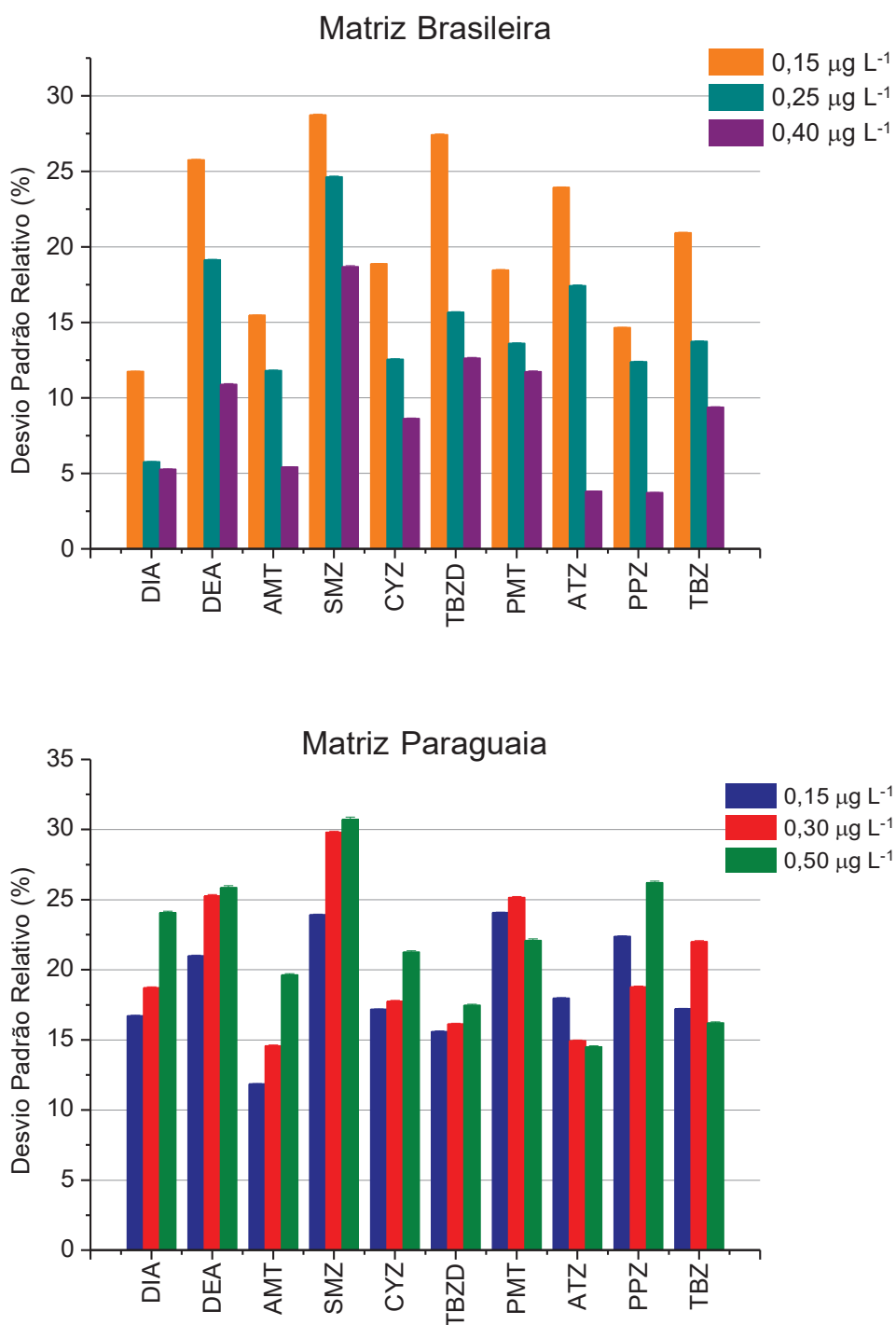
Desta forma, pode-se dizer que o método proposto no presente trabalho pode ser considerado compatível ou superior com alguns dados da literatura e, além disso, atende as necessidades ambientais uma vez que os LOQ são inferiores aos valores aceitáveis pelos órgãos regulamentadores.

A precisão mede a dispersão dos dados em uma faixa de concentração e em determinadas condições de análise e pode ser expressa pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Na condição de laboratório de pesquisa, o estudo de precisão é aceito nas duas primeiras formas.

Sendo assim, a precisão foi avaliada pela repetibilidade em três níveis de fortificação, em quintuplicata, e através da precisão intermediária. Para a reprodutibilidade, valores inferiores a 30% foram observados para a maioria dos analitos, desta forma os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação do

INMETRO para a faixa de concentração avaliada. Os resultados de repetibilidade são apresentados na FIGURA 2.16.

FIGURA 2.16 –ENSAIOS DE REPETIBILIDADE EXPRESSOS PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA OS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO PARA A MATRIZ BRASILEIRA (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ E 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$) E PARA A MATRIZ PARAGUAIA (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ E 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$). (n=5).



Ao analisar as matrizes de forma independente, nota-se que os RSD da margem brasileira tendem a ser maiores nas menores concentrações, alcançando RSD superior a 20% para DEA, SMZ, TBZD, ATZ e TBZ. Para os níveis de fortificação de 0,25 e 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$, os desvios foram inferiores a 20% para a maioria dos analitos, exceto para a concentração de 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a SMZ.

Já para a matriz paraguaia, nota-se que para a maioria dos analitos, o RSD aumenta com o aumento da concentração e o RSD é mais uniforme entre os analitos, estando a maioria muito próximo a 20% independentemente do nível de concentração avaliado, exceto para AMT e ATZ onde foi obtido RSD inferior a 15%.

Pelo fato de a matriz paraguaia ter apresentado um menor efeito matriz, esperava-se que no estudo de precisão os desvios também fossem inferiores aos da matriz brasileira. No entanto, os resultados nos mostram que o comportamento foi diferente, mas a matriz apresentou maior homogeneidade dos desvios frente ao conjunto de analitos avaliados. Cabe ressaltar, que tal fato não interferiu na repetibilidade do método, sendo preciso para ambas as matrizes.

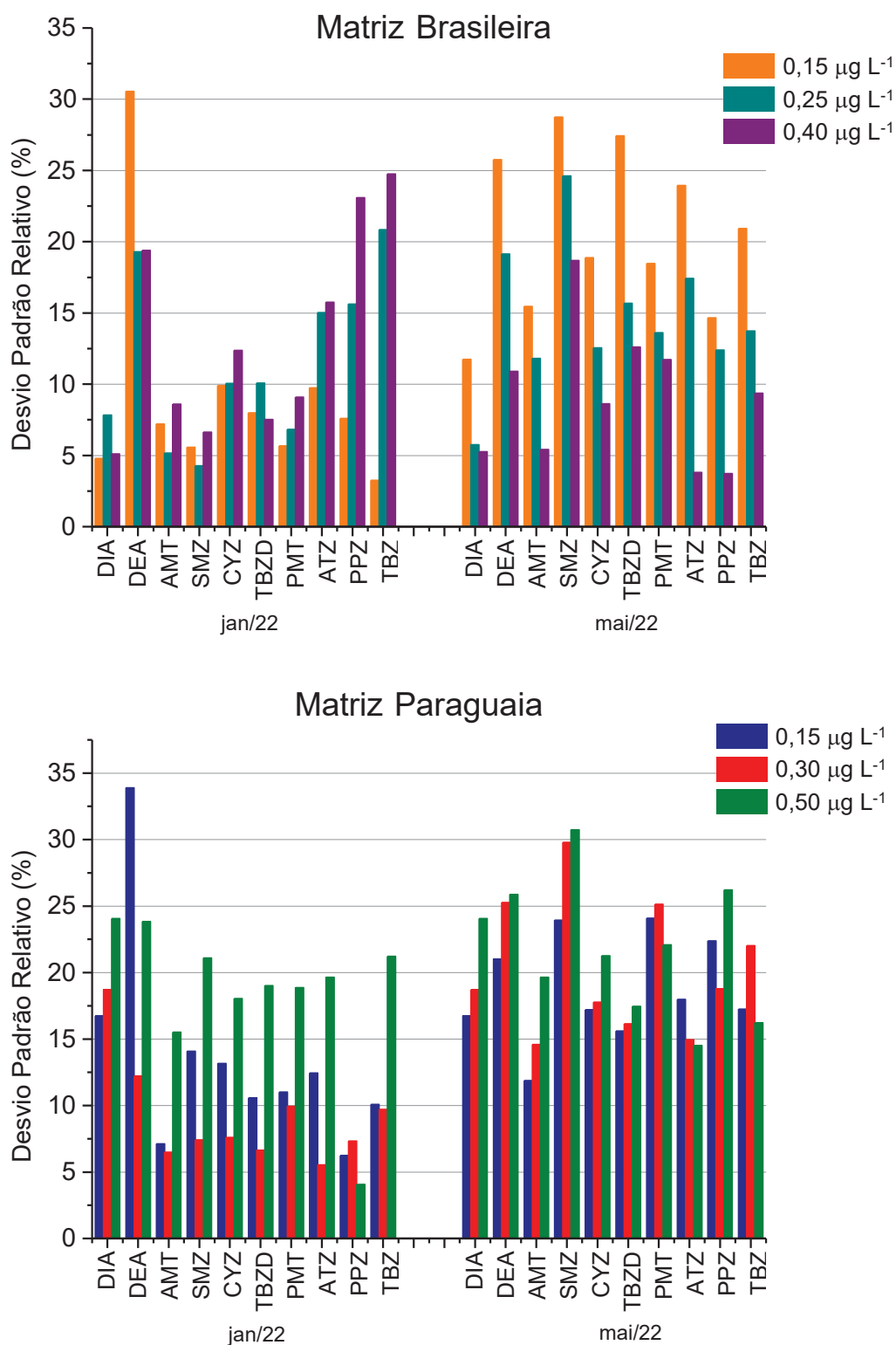
Com relação à precisão intermediária, esta foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos em diferentes coletas (janeiro/22 e maio/22), sendo avaliados os mesmos níveis de concentração de acordo com a matriz. Os resultados são apresentados na FIGURA 2.17.

Como pode ser observado, mesmo em diferentes coletas o RSD em ambas as matrizes está abaixo de 30% valor aceitável pelo INMETRO para a maioria dos analitos. A exceção ocorreu para o DEA na matriz paraguaia durante a amostragem de janeiro (33,9%).

Na matriz brasileira, nota-se que houve mais casos em que o RSD foi inferior a 10% (DIA, AMT, CYZ, TBZD e PMT), na coleta de janeiro, tal fato pode estar relacionado a composição do *pool* de amostra dessa margem, uma vez que o Estado do Paraná, estava passando por um longo período de estiagem, fato este que reduziu e em alguns casos, cessou, o fluxo de água de alguns pontos de coleta. E com isso, havia a presença de menor quantidade de material em suspensão nas amostras.

Apesar disso, é possível afirmar que o método é preciso quanto à sua aplicação em amostras de diferentes coletas.

FIGURA 2.17 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA EXPRESSA PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA A MATRIZ BRASILEIRA E PARAGUAIA, NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO TESTADOS PARA AMOSTRAS DE DIFERENTES COLETAS



A exatidão foi avaliada em termos de recuperação relativa, sendo que os experimentos foram realizados em quintuplicata e em três níveis de fortificação 0,15; 0,25 e 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a matriz brasileira e 0,15; 0,25 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a matriz paraguaia. Os resultados são apresentados TABELA 2.18.

TABELA 2.18 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS NAS MATRIZES BRASILEIRA E PARAGUAIA, CALCULADOS COM BASE NA CURVA PREPARADA NA MATRIZ

	BR			PY		
	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$
DIA	105,7 $\pm$ 0,02	99,8 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,02	88,2 $\pm$ 0,02	100,2 $\pm$ 0,06	90,6 $\pm$ 0,11
DEA	92,4 $\pm$ 0,04	93,5 $\pm$ 0,04	100,1 $\pm$ 0,04	116,9 $\pm$ 0,04	114,1 $\pm$ 0,09	101,3 $\pm$ 0,13
AMT	102,6 $\pm$ 0,02	100,8 $\pm$ 0,03	101,0 $\pm$ 0,02	99,9 $\pm$ 0,02	102,9 $\pm$ 0,05	97,9 $\pm$ 0,10
SMZ	108,8 $\pm$ 0,05	99,9 $\pm$ 0,06	102,0 $\pm$ 0,08	93,8 $\pm$ 0,03	105,3 $\pm$ 0,09	99,8 $\pm$ 0,15
CYZ	105,5 $\pm$ 0,03	102,2 $\pm$ 0,03	100,8 $\pm$ 0,03*	94,0 $\pm$ 0,02	103,3 $\pm$ 0,06	98,5 $\pm$ 0,10
TBZD	106,5 $\pm$ 0,04	98,6 $\pm$ 0,04	102,5 $\pm$ 0,05	96,9 $\pm$ 0,02	104,0 $\pm$ 0,05	101,0 $\pm$ 0,09
PMT	102,9 $\pm$ 0,03	103,5 $\pm$ 0,04	101,0 $\pm$ 0,05	87,3 $\pm$ 0,03	107,5 $\pm$ 0,08	97,3 $\pm$ 0,11
ATZ	106,0 $\pm$ 0,04	102,7 $\pm$ 0,04	102,2 $\pm$ 0,02	96,2 $\pm$ 0,03	102,9 $\pm$ 0,05	100,5 $\pm$ 0,07
PPZ	102,5 $\pm$ 0,02	98,9 $\pm$ 0,03	101,9 $\pm$ 0,02	96,4 $\pm$ 0,03	102,4 $\pm$ 0,06	88,1 $\pm$ 0,12**
TBZ	101,7 $\pm$ 0,03	98,7 $\pm$ 0,03	102,9 $\pm$ 0,04	95,6 $\pm$ 0,02	103,3 $\pm$ 0,07	98,7 $\pm$ 0,08

Nota: *0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$; **0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$

De acordo com os critérios de aceitação do INMETRO para a faixa de concentração avaliada, é aceitável valores de recuperação na faixa de 40 a 120%. Desta forma, todos os analitos nas duas matrizes avaliadas apresentaram recuperações dentro da faixa aceitável.

Os ensaios da robustez para o método DLLME-LC-MS/MS para a determinação de triazinas pelo teste de Youden, avaliaram variáveis que poderiam influenciar o método de preparo de amostra (força iônica, tempo de agitação, tempo de centrifugação, tempo de agitação durante a etapa de reconstituição e modo de secagem), quanto o método cromatográfico (temperatura da coluna e temperatura da interface).

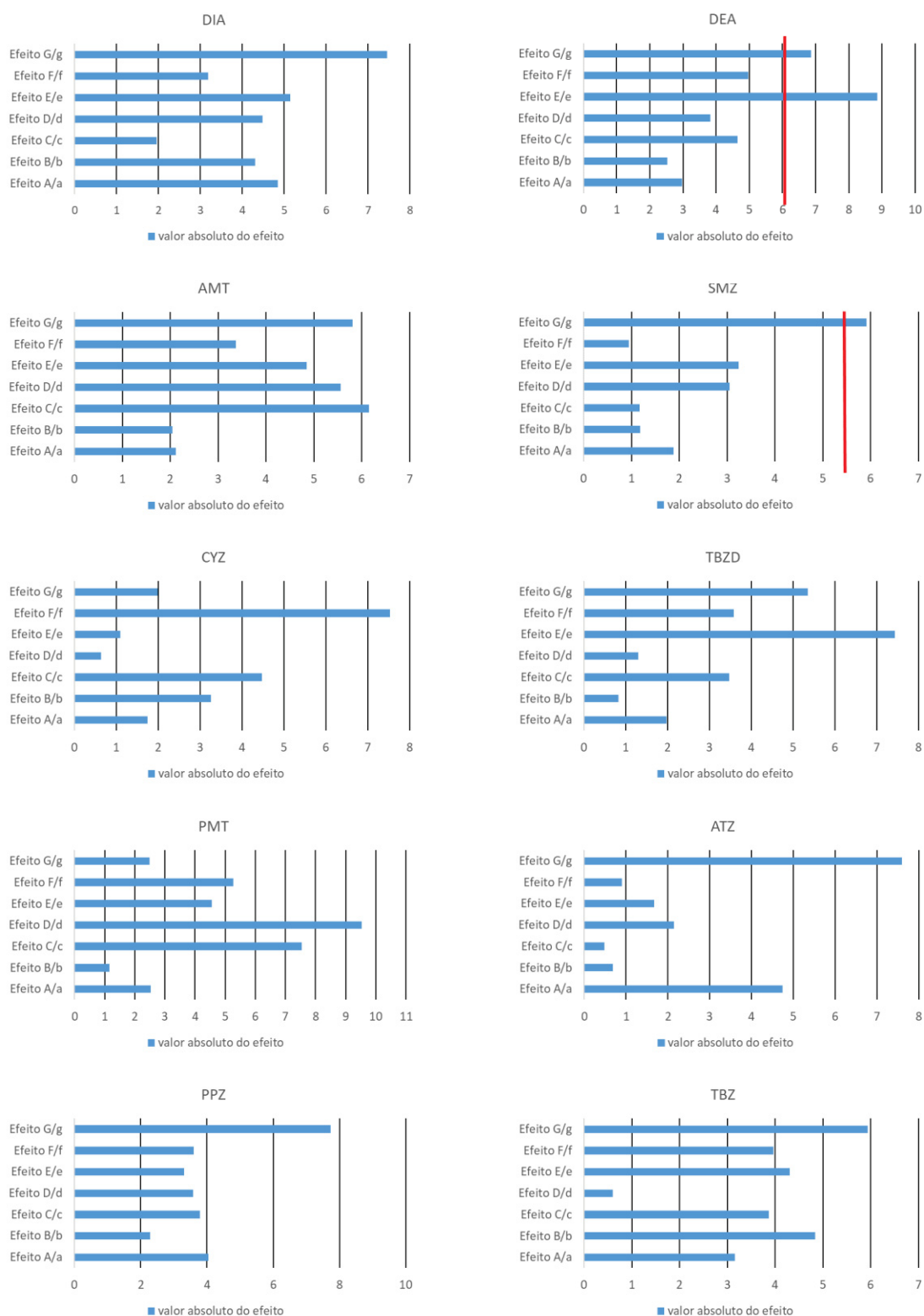
A avaliação da robustez na margem esquerda (Brasil) (FIGURA 2.18), mostrou que para os analitos DIA, AMT, CYZ, TBZD, PMT, ATZ, PPZ e TBZ nenhum dos fatores avaliados influenciou significativamente as respostas em termos de recuperação das espécies de interesse.

A variação do tipo de secagem foi significativa para o DEA (efeito positivo). No entanto, as recuperações obtidas nos ensaios para o analito estão na faixa de 73 a 98% com RSD de 7,6%. O efeito da variação na temperatura da interface foi significativo para DEA e SMZ (ambos com efeito negativo). Da mesma forma que o

efeito do tipo de secagem, as recuperações estão na faixa aceitável para a ordem de grandeza estudada, tendo, portanto, menor relevância na robustez do método. Os fatores de menor influência para a maioria dos analitos foram: tempo de agitação, tempo de centrifugação e tempo de agitação – reconstituição.

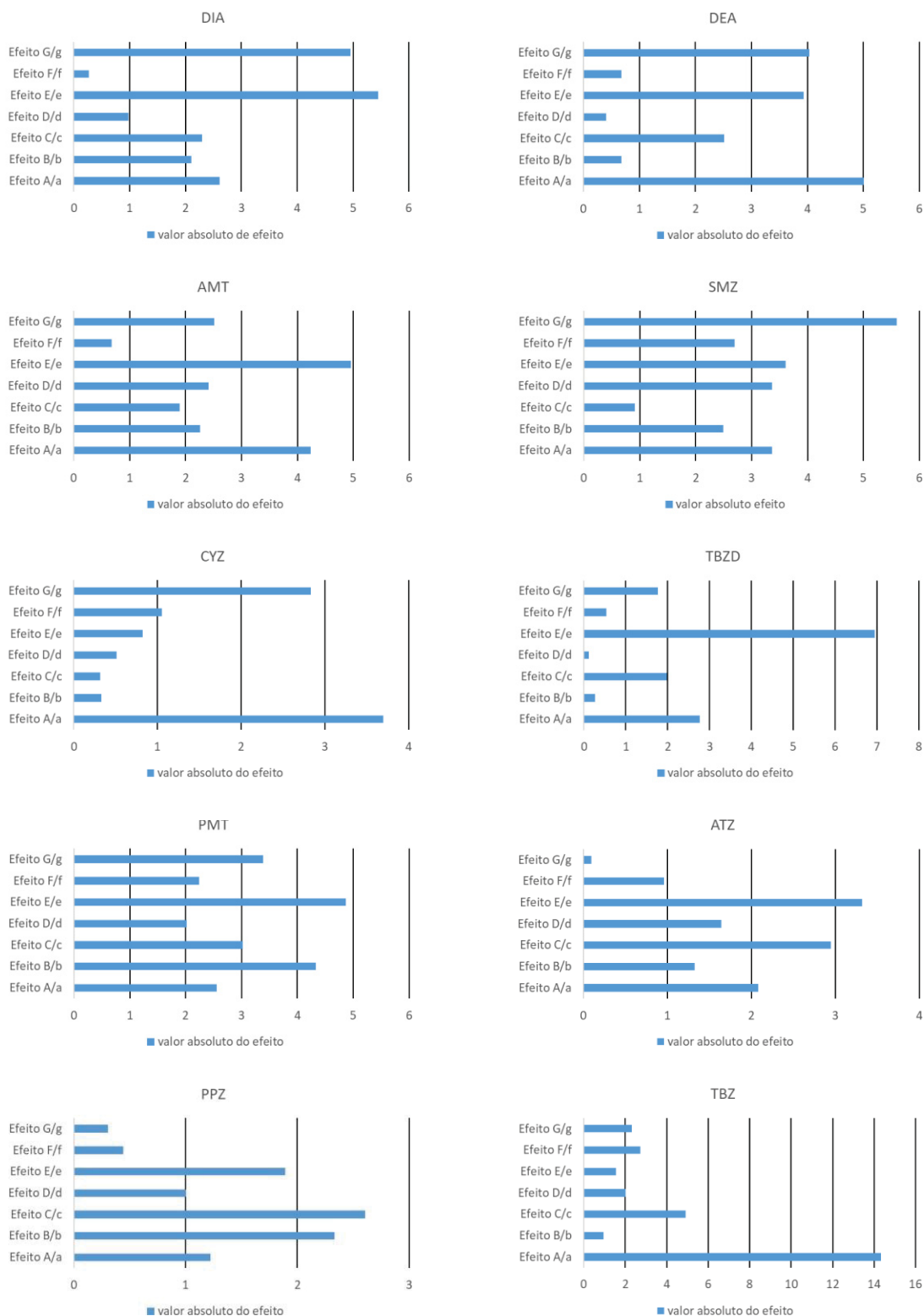
Com relação aos resultados da margem direita (Paraguai) (FIGURA 2.19), nenhum dos fatores avaliados influenciou significativamente as respostas em termos de recuperação.

FIGURA 2.18 – GRÁFICO DE PARETO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS – AMOSTRAS MARGEM ESQUERDA - BRASIL.



Notas: Linha de significância (p 95% confiança) DIA (8,4); DEA (6,1); AMT (25,4); SMZ (5,6); CYZ (8,7); TBZD (9,2); PMT (34,5); ATZ (8,7); PPZ (15,2); TBZ (16,1). A TABELA 2.4 apresenta as faixas de cada variável estudada.

FIGURA 2.19 – GRÁFICO DE PARETO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS – AMOSTRAS MARGEM DIREITA - PARAGUAI



Notas: Linha de significância (p 95% confiança) DIA (7,4); DEA (7,9); AMT (15,4); SMZ (9,8); CYZ (5,7); TBZD (6,9); PMT (22,7); ATZ (5,1); PPZ (8,2); TBZ (18,4). A TABELA 2.4 apresenta as faixas de cada variável estudada.

Desta forma, com base nos resultados da validação do método desenvolvido, para ambas as matrizes, o método DLLME-LC-MS/MS foi considerado adequado em termos dos parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez), garantindo a confiabilidade dos resultados para a aplicação em águas superficiais objetivando a quantificação dos analitos estudados.

2.3.5. Análise das amostras

As amostras coletadas bimestralmente no período de novembro/21 a setembro/22 foram analisadas de acordo com o método DLLME-LC-MS/MS desenvolvido e validado para a determinação de compostos triazínicos em águas superficiais.

Nesta análise foram utilizadas curvas analíticas preparadas na própria matriz de análise, subtraindo-se o valor da área média observada nas provas em branco.

Os resultados obtidos para os analitos detectados e/ou quantificados nas amostras da margem esquerda (Brasil) são apresentados na TABELA 2.19. De modo geral, na margem brasileira, as concentrações determinadas para a maioria dos analitos foram inferiores ao limite de detecção do método, sendo que AMT, SMZ, CYZ e TBZD, não foram detectados em nenhuma das campanhas de coleta. Em alguns casos, os analitos foram detectados, porém, estavam abaixo do limite de quantificação do método como é o caso do DIA, PMT, ATZ, PPZ e TBZ.

Na margem brasileira, especificamente na coleta de março/22, nota-se a presença de ATZ, DIA e DEA, sendo que a ATZ está presente em todos os pontos amostrais, com exceção do ponto BR-12. Tal fato, está relacionado com o período de colheita da soja para a entrada da cultura de milho safrinha, momento em que a ATZ pode ser utilizada no controle pré emergente de plantas daninhas, logo após a semeadura do milho. Nesse período foram encontradas concentrações entre 0,023 e 0,621 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ.

TABELA 2.19 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DA MARGEM ESQUERDA (BRASIL) DURANTE AS 6 CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Analitos	BR02	BR04	BR06	BR08	BR09	BR11	BR12	BR13	BR14	BR15	BR16	BR17
DIA	nov/21	nd	0,031	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	jan/22	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	0,072	0,023	0,336	0,151	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	0,030
DEA	mar/22	nd	nd	nd	0,429	0,140	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PMT	nov/21	nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd
ATZ	nov/21	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	jan/22	0,149	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	0,082	0,250	0,112	0,621	0,197	nd	0,038	0,061	0,109	0,048	0,105
	mai/22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd
PPZ	nov/21	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZ	jan/22	nd	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	jul/22	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Notas: nd: Não detectado; <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

Para o mesmo período, nota-se que o DIA foi encontrado com frequência similar à ATZ sendo quantificado em seis dos doze pontos amostrais. Já o DEA foi encontrado em apenas dois locais de amostragem, sugerindo que a via de degradação da ATZ tem preferência para a formação de DIA. Este fato também foi relatado por Amadori et al. (2016) e Mahía; Martín; Díaz-Raviña (2008) quando avaliaram o comportamento da ATZ e seus produtos de degradação em amostras de solo. Outro fato que vale a pena destacar, é que as maiores concentrações de ATZ, DIA e DEA ocorreram no ponto de amostragem BR-09, classificado como área com menor atividade agrícola e maior quantidade de mata ciliar. No entanto, durante as coletas, notou-se que em alguns terrenos acima do ponto de coleta, ocorreu uma forte erosão e esta pode ter contribuído para o aporte desses agrotóxicos no córrego.

Cabe ressaltar também, que na coleta de janeiro/22 este córrego teve seu fluxo interrompido devido ao período de escassez de chuvas no estado do Paraná, sendo a coleta realizada na água que havia sido represada pelas pedras do leito do córrego. Já na coleta de março, após alguns eventos de chuva, não muito significativos, o córrego voltou a apresentar vazão.

Com relação aos resultados dos analitos detectados e/ou quantificados nas amostras da margem direita (Paraguai), apresentados na TABELA 2.20, pode-se observar que, assim como na margem esquerda, a maioria dos analitos não foi detectada pelo método, sendo que em nenhuma das campanhas amostrais foi detectada a presença de CYZ. Porém, a AMT esteve presente em todos os pontos de coleta mesmo estando abaixo do limite de quantificação. A AMT é um herbicida de controle pré e pós-emergente utilizado em diversas culturas, dentre elas no cultivo de mandioca (ANVISA, 2022d), um cultivar muito produzido na região do Paraguai onde foram realizadas as campanhas amostrais, este fato justifica a presença de AMT que no Paraguai, já que há um maior uso desse pesticida do que no Brasil.

Diferentemente do Brasil, na amostragem realizada em março/22, na margem paraguaia, nota-se a presença de ATZ em 11 pontos amostrais dos 12 avaliados. No entanto, não foi observada a relação da presença dos produtos de degradação na mesma amostragem.

TABELA 2.20 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DA MARGEM DIREITA (PARAGUAI) DURANTE AS 6 CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Analitos	PY02	PY03	PY04	PY05	PY06	PY07	PY08	PY10	PY11	PY15	PY16	PY17
DIA	jan/22	nd	nd	1,090	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mai/22	0,119	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DEA	jan/22	nd	nd	0,151	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mar/22	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd
	mai/22	0,620	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AMT	nov/21	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	<LOQ
	jan/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,270	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ
	mar/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	nd	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd
	mai/22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	nd
	jul/22	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	set/22	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	nd
	jan/22	nd	nd	2,946	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SMZ	mai/22	0,232	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZD	mai/22	0,031	nd	nd	0,032	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PMT	jan/22	nd	nd	0,173	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ATZ	jan/22	nd	nd	0,360	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd
	mar/22	0,257	0,250	0,084	0,246	1,476	0,229	0,441	0,527	<LOQ	0,055	nd
	mai/22	0,080	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PPZ	jan/22	nd	nd	0,071	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TBZ	mai/22	<LOQ	nd	Nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	mai/22	<LOQ	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Notas: nd: Não detectado; <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

Além da ATZ, também foram quantificados em alguns pontos amostrais concentrações de DIA, DEA, AMT, SMZ, TBZD, PMT e PPZ. Dos pontos amostrais avaliados, o PY-05 foi o que teve maior número de ocorrência da presença de agrotóxicos (ATZ, DIA, DEA, AMT, SMZ, PMT e PPZ), condizendo com a sua classificação como ponto amostral altamente impactado pela agricultura. Relatos da presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas já existem há algum tempo, conforme relatado por Sereshti et al., (2022) que encontraram três agrotóxicos (bromopropilato, β -endossulfan e fenpropatrina), em água, na faixa de 0,36 e 1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$, pertencentes a classe dos acaricidas e inseticidas.

Com relação aos agrotóxicos da classe dos herbicidas, especificamente, os herbicidas triazínicos, há relatos da presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais. Della-Flora et al., (2019), ao estudarem a presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais do oeste do Paraná obtiveram concentrações máximas de 2,89, 1,22 e 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DIA e DEA, respectivamente, para análise após os eventos de chuva. O valor detectado para ATZ foi ligeiramente superior ao valor aceitável pela legislação brasileira (2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Sem a ocorrência de eventos de chuva, os autores encontraram concentrações máximas de 0,19 e 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e DEA, não sendo detectadas concentrações de DIA.

Com relação aos agrotóxicos da classe dos herbicidas, especificamente, os herbicidas triazínicos, há relatos da presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais. Della-Flora et al., (2019), ao estudarem a presença de ATZ, DIA e DEA em águas superficiais do oeste do Paraná obtiveram concentrações máximas de 2,89, 1,22 e 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DIA e DEA, respectivamente, para análise após os eventos de chuva. O valor detectado para ATZ foi ligeiramente superior ao valor aceitável pela legislação brasileira (2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Sem a ocorrência de eventos de chuva, os autores encontraram concentrações máximas de 0,19 e 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e DEA, não sendo detectadas concentrações de DIA.

2.4. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver um método para a determinação de agrotóxicos triazínicos em águas naturais por LC-MS/MS, recorrendo-se à técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

O efeito das variáveis de relevância na eficiência da extração, como força iônica, volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor, foi avaliado por sistemas de planejamento fatorial de experimentos, para os compostos triazínicos e alguns produtos de degradação avaliados. Dessas variáveis, as que apresentaram relevância no processo de extração foram a força iônica utilizada e o volume do solvente extrator.

O método desenvolvido (DLLME-LC-MS/MS) foi validado de acordo com as orientações sobre validação de métodos analíticos do INMETRO, mostrando-se linear, na faixa de concentração avaliada, seletivo, com precisão e exatidão adequadas para a maioria dos analitos e com limites de detecção ($0,0125-0,10 \mu\text{g L}^{-1}$) e quantificação ($0,025-0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) adequados para a aplicação do método em amostras ambientais. Para os quais a legislação permite $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ ou SMZ, os demais analitos não são contemplados na legislação (BRASIL, 2021, 2005).

O método validado foi aplicado em amostras de águas naturais coletadas bimestralmente no período de novembro/21 a setembro/22, compreendendo 24 pontos amostrais (12 na margem brasileira e 12 na margem paraguaia). Na maioria dos pontos amostrais o método não indicou a presença dos agrotóxicos avaliados, com exceção na coleta de março/22, na qual foi identificada a presença de ATZ em 11 dos 12 pontos amostrais da margem brasileira, com concentrações de $0,038 - 0,621 \mu\text{g L}^{-1}$. Nessa mesma coleta, também foi notada a presença dos produtos de degradação DIA ($0,023-0,151 \mu\text{g L}^{-1}$) e DEA ($0,140-0,429 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo o primeiro mais recorrente nas amostras do que o segundo.

Na margem paraguaia, o método indicou a presença de AMT em todos os pontos amostrais e em todas as coletas, no entanto, não foi possível quantificar na maioria dos casos. A exceção ocorreu no PY-05 que apresentou $0,270 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMT. Cabe ressaltar que a elevada incidência na detecção de AMT na margem paraguaia está associada ao cultivo de mandioca no país. Além da presença de ATZ, DIA e DEA, no Paraguai foram quantificados outros 5 agrotóxicos (AMT, SMZ, PMT, PPZ e TBZD), com concentrações na faixa de $0,031-2,946 \mu\text{g L}^{-1}$. Sendo que o ponto amostral com maior frequência de agrotóxicos foi o PY-05, o qual é classificado como altamente impactado pela agricultura.

CAPÍTULO 3 – GLIFOSATO

3.1. INTRODUÇÃO

De acordo com as informações sobre o uso agrícola do solo da região avaliada, os principais cultivos da região são soja, milho e trigo, culturas para as quais o uso do glifosato é liberado (ANVISA, 2022b). Por motivos como este, o glifosato é o herbicida mais consumido no Brasil, com milhões de toneladas comercializadas anualmente (IBAMA, 2021).

Em função disto, a segunda parte do trabalho foi dedicada ao estabelecimento de um método de extração de glifosato, AMPA e glufosinato, utilizando resina de troca iônica, para a determinação em águas naturais empregando LC-FLD.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes e insumos

Os solventes acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) e ácido fosfórico foram de grau cromatográficos de pureza, sendo adquiridos da Sigma-Aldrich®. A água ultrapura, com resistividade de 18,2 MΩ cm, foi obtida através de sistema de purificação Merck - Synergy®UV. A resina de troca iônica utilizada, Amberlite® IRA-900, com tamanho de partícula de 640 a 800 µm, foi adquirida de ChemCruz®.

Os padrões analíticos de glifosato (GLY), ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glufosinato (GLU) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (pureza >99%). Soluções estoque de glifosato, AMPA e glufosinato foram preparadas na concentração de 200 mg L⁻¹, pesando-se 10,00 mg e diluindo-os em 50 mL de água ultrapura. Esses padrões foram armazenados ao abrigo da luz e mantidos refrigerados a 4°C. Já para a solução de trabalho, foi preparada uma mistura dos analitos diluindo as soluções estoque a fim de se obter a concentração de 0,25 mg L⁻¹ em um balão volumétrico de 10 e posteriormente, a solução era utilizada imediatamente.

Os frascos de amostragem e as vidrarias utilizadas nas análises foram lavados conforme descrito no capítulo anterior.

3.2.2. Amostragem de águas naturais

Os locais de amostragem correspondem aos descritos no item 2.2.2, enquanto o método de amostragem foi realizado conforme descrito no item 2.2.3.

3.2.3. Método cromatográfico

3.2.3.1. *Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de fluorescência – LC-FLD*

As determinações de glifosato, AMPA e glufosinato foram realizadas em um cromatógrafo Thermo Fisher Scientific – modelo Dionex Ultimate 3000 series, com bomba (LGP-3400SD), injetor (WSP-3000), com detector de fluorescência, coluna de fase reversa ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5 μ m), coluna de guarda de mesma fase e com auxílio do Software Chromeleon®.

A separação foi realizada em modo eluição gradiente, utilizando como fase móvel solução de ácido fosfórico 0,05% (pH 2,9) (fase A) e ACN (fase B) (MENDONÇA et al., 2020).

Foram realizados diversos testes alterando a proporção do gradiente. Ao fim dos ensaios, foi definido como o melhor método de separação a seguinte programação: iniciando com 20% de B por 5 min; chegando a 45% de B em 15 min, sendo mantido por 10 min nesta condição; entre 25 e 30 min retorna-se à condição inicial (20% de B), mantendo durante 5 min para estabilização da coluna, totalizando 35 min de corrida cromatográfica, com vazão de 1,0 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 20 μ L e a detecção dos padrões derivatizados foi realizada nos comprimentos de onda (λ) de 260 nm (excitação) e 317 nm (emissão) e com temperatura da coluna de 30 °C.

3.2.3.2. *Curva de calibração, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão – parâmetros instrumentais*

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação, das curvas de calibração preparadas em água ultrapura, foram utilizados os dados da regressão linear, como recomendado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e

Tecnologia (INMETRO, 2020). Sendo assim, para a determinação do LOD foi utilizada a razão da estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva, multiplicando por 3,3, enquanto para o cálculo do LOQ foi utilizada a mesma razão do LOD, porém multiplicada por 10.

Também foram avaliados os parâmetros de precisão e exatidão para a curva de calibração. Sendo a precisão expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) e a exatidão expressa em termos de recuperação relativa.

3.2.4. Técnica de extração

3.2.4.1. *Método de extração para determinação de glifosato, AMPA e glufosinato utilizando resina de troca iônica*

A etapa de extração foi realizada em resina de troca iônica Amberlite® IRA-900, a qual foi selecionada com base em antecedentes da literatura (CORBERA; HIDALGO; SALVADÓ, 2006; HIDALGO et al., 2004; MALLAT; BARCELÓ, 1998).

A resina foi hidratada sob agitação durante 2 h, sendo que a cada 30 min a água foi renovada e, posteriormente, a resina foi armazenada em frasco de vidro com água para posterior utilização.

A extração foi realizada em colunas montadas em seringas de 6 mL, contendo 3 cm de altura de resina e sistema de controle de vazão (FIGURA 3.1).

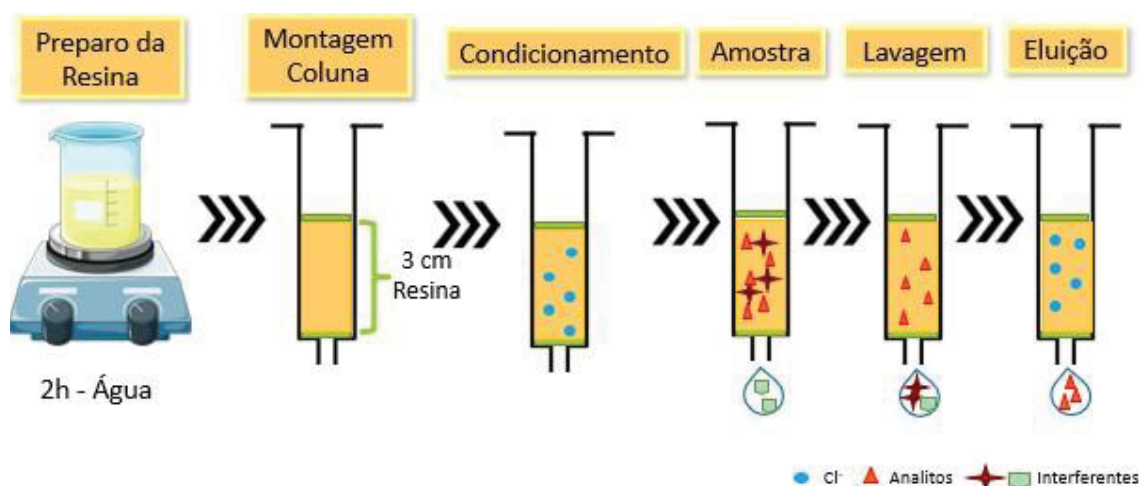
FIGURA 3.1 – COLUNA MONTADA COM RESINA IRA-900 PARA A EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO.



Uma solução de glifosato e AMPA (250 mL, pH neutro) foi passada por este sistema, controlando o gotejamento na saída da coluna ($2,5 \text{ mL min}^{-1}$). Posteriormente, o sistema foi lavado com 10,0 mL de água ultrapura com a finalidade

de remover possíveis interferentes que possam ter ficado no sistema. Na sequência, os analitos foram eluídos com 10,0 mL de solução de NaCl 1 mol L⁻¹ (FIGURA 3.2), sendo obtido um EF de 25 vezes. Uma alíquota de 2,0 mL do eluato foi coletada e submetida ao processo de derivatização.

FIGURA 3.2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO, UTILIZANDO RESINA DE TROCA IÔNICA.



Fonte: Autoria própria (2022)

3.2.4.2. Método de derivatização para a determinação de glifosato, AMPA e glufosinato

O processo de derivatização testado baseou-se no trabalho de Báez et al., (2014), no entanto buscou-se reduzir proporcionalmente as quantidades dos reagentes utilizados no processo.

Foi preparada uma mistura dos padrões analíticos de glifosato, AMPA e glufosinato, os quais foram submetidos ao processo de derivatização através da reação com FMOC-Cl (160 mg L⁻¹) e acetonitrila, em meio tamponado com solução de tampão borato (pH 9 - 0,040 mol L⁻¹).

Sendo assim, para 2,0 mL de amostra, foram adicionados 250 µL de tampão borato, 500 µL de ACN, e 500 µL de FMOC-Cl. A mistura foi submetida à agitação durante 30 segundos e posteriormente, permaneceu em repouso durante 30 min, em temperatura ambiente, para a completa reação. Após esse período, 3,0 mL de diclorometano foram adicionados, seguido de agitação por 10 s em vórtex, para remoção do excesso de FMOC-Cl e, em seguida, uma alíquota da fase aquosa foi

coletada para análise em LC-FLD. Cabe ressaltar que na etapa de remoção do excesso de FMOC-Cl há uma pequena perda dos analitos, porém esta é uma etapa importante para evitar a saturação do detector de fluorescência.

3.2.5. Validação do método resina de troca iônica-LC-FLD

O método foi validado de acordo com os critérios recomendados pelo INMETRO (DQO-CGCRE-008, 2020) (INMETRO, 2020). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A seletividade foi avaliada por comparação dos tempos de retenção dos analitos. Além disso, como parte do estudo de seletividade, foi avaliado o efeito matriz. Foram preparadas curvas analíticas com no mínimo 5 níveis de concentração em triplicata ($n=3$), em água ultrapura e na matriz. Para se ter uma matriz mais representativa, foi preparado um *pool* de amostra, com uma alíquota de todos os pontos, para cada margem do reservatório analisada. Também foi realizado um teste F entre a variância da solução padrão em dois níveis de concentração (1,2 e 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) a qual foi comparada com a variância dessas mesmas concentrações na matriz.

A linearidade foi estudada na faixa de 0,1 a 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) para a construção da curva analítica na matriz. Quando havia a presença dos analitos no *pool* de amostra, as áreas obtidas a partir da fortificação das amostras foram descontadas do valor médio da prova em branco. As curvas analíticas foram construídas com pelo menos 5 níveis de concentração. O ajuste linear para cada analito foi expresso pela equação da reta e pelo coeficiente de determinação (R^2), calculado pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), e análise de resíduos para avaliar a aleatoriedade, homoscedasticidade e independência.

Os limites de detecção e quantificação, para as curvas analíticas preparadas na matriz, foram avaliados pelo método de percepção visual, sendo o LOQ a menor concentração possível de detectar com precisão (30%) e exatidão (40 – 120%) (INMETRO, 2020).

A precisão foi estudada através da precisão intermediária, em três níveis de fortificação, sendo expressa pelo desvio padrão relativo (RSD), conforme Eq.2.1 (vide item 2.2.6). Para a matriz brasileira foram avaliadas as concentrações 0,8, 1,2 e 4,0

$\mu\text{g L}^{-1}$ e para a matriz paraguaia as concentrações de 0,8, 1,6 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo os ensaios de precisão intermediária realizados em dias diferentes.

A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa de amostras fortificadas nos mesmos níveis de concentração do ensaio de precisão intermediária e é expressa de acordo com a equação 2.2 (vide item 2.2.6).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Determinação Cromatográfica

3.3.1.1. *Determinação de Glifosato, AMPA e Glufosinato por cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência (LC-FLD)*

As determinações de glifosato, AMPA e glufosinato foram realizadas em um cromatógrafo Thermo Fisher Scientific, modelo Dionex Ultimate 3000 series, utilizando-se coluna ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5 μm) e eluição por gradiente envolvendo os solventes ácido fosfórico 0,05% (A) e ACN (B), conforme descrito no item 3.2.3.1.

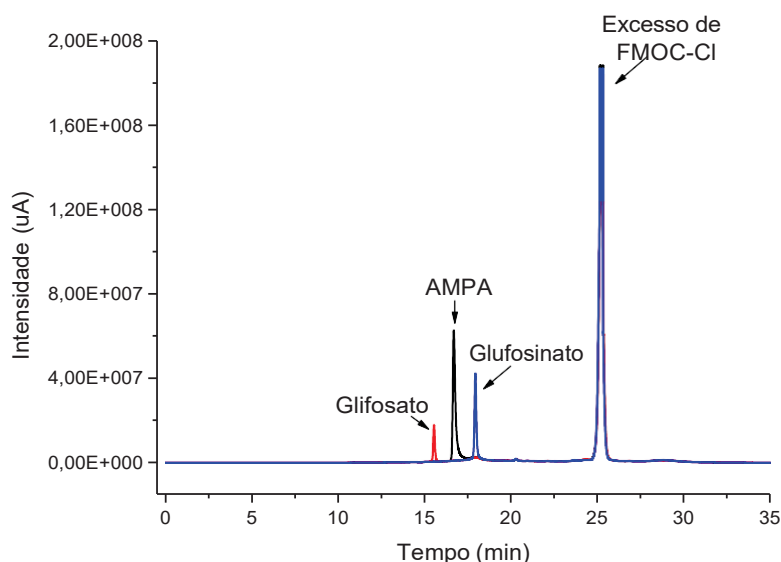
A inexistência de grupos fluoróforos faz com que a determinação de glifosato, AMPA e glufosinato, deva ser precedida de uma reação de derivatização, usualmente utilizando-se um éster cloroformiato (FMOC-Cl), que é capaz de inserir um grupo fluorenilmetiloxicarbonil nas moléculas em estudo.

A reação de derivatização se processa em meio alcalino e na presença de um grande excesso de FMOC-Cl, em função do derivatizante poder reagir com qualquer amina e, inclusive, com água, formando FMOC-OH (BÁEZ et al., 2014). A reação entre o derivatizante e o AMPA acaba ocorrendo de modo preferencial, em razão deste composto corresponder à uma amina primária. Reações envolvendo aminas secundárias são mais desfavorecidas, devido a estereoquímica da molécula, o que dificulta um pouco a reação com glifosato e glufosinato.

A reação de derivatização tem sido objeto de muitos estudos, o que tem propiciado uma grande diversidade de métodos, envolvendo também uma grande variedade de condições experimentais. Desta forma, muitos testes preliminares foram realizados para definir parâmetros relevantes, como a quantidade de FMOC-Cl, o tempo de reação e o método utilizado para remoção do excesso de FMOC-Cl. Nas

condições otimizadas (ver item 3.2.4.2), os derivatizados Glifosato-FMOC, AMPA-FMOC e Glufosinato-FMOC apresentaram os tempos de retenção de 15,54 min, 16,67 min e 17,93 min, respectivamente (FIGURA 3.3).

FIGURA 3.3 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES INDIVIDUAIS DE GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO DERIVATIZADOS COM FMOC-Cl ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).



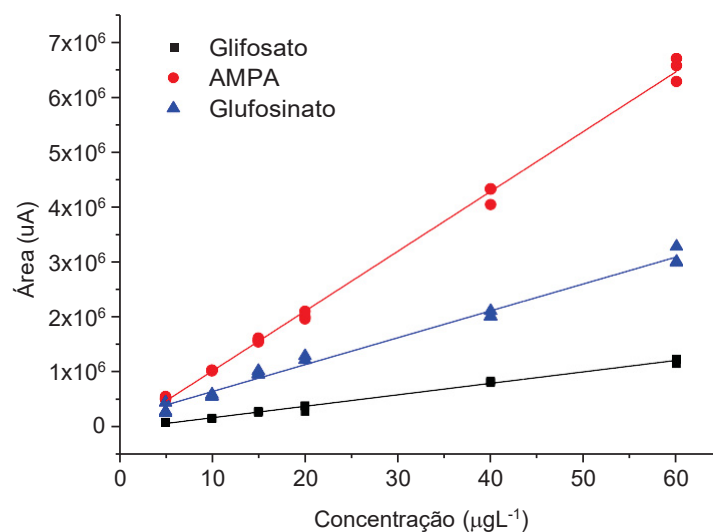
A seguir, curvas de calibração foram elaboradas em água ultrapura, em triplicata, cobrindo-se a faixa compreendida entre $2,5$ e $60 \mu\text{g L}^{-1}$. A partir dos dados de regressão foi possível avaliar a linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do equipamento, bem como o desvio dos coeficientes lineares e angulares para as espécies de interesse (TABELA 3.1). De acordo com estes resultados, o método apresentou boa linearidade ($R^2 > 0,99$) para todos os analitos, na faixa de concentração avaliada, e demonstrou limites de quantificação instrumental em torno de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

TABELA 3.1 – PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO EM ÁGUA ULTRAPURA.

	Equação de Regressão	Desvio coef. Linear	Desvio coef. Angular	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
GLY	$A_p = 20852_{CGLY} - 32882$	13344,32	423,75	0,9979	2,11	6,40
AMPA	$A_p = 108850_{CAMP} - 66045$	44107,04	1400,64	0,9994	1,34	4,05
GLU	$A_p = 48914_{CGLU} + 161586$	42930,67	1363,28	0,9932	2,89	8,78

Com relação à sensibilidade do método cromatográfico para as espécies de interesse, na FIGURA 3.4 pode ser observado que o AMPA apresentou a maior sensibilidade, seguido de glufosinato e glifosato.

FIGURA 3.4 – REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CADA ANALITO DERIVATIZADO PARA COMPARAR A SENSIBILIDADE ENTRE ELES PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-FLD.



Também foi avaliado a precisão e exatidão da curva de calibração. Para isso, foram selecionados três níveis de concentração, contemplando pontos de baixa, média e alta concentração, e estes foram avaliados em triplicata. Os resultados são apresentados na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE DAS ESPÉCIES DE INTERESSE POR LC-FLD (n=3)

	Concentração adicionada (µg L ⁻¹)	Concentração média obtida (µg L ⁻¹) ± DP	Precisão (%)	Exatidão (%)
GLY	10	9,4±0,3	4,0	94,0
	20	18,7±2,9	17,0	93,3
	60	59,6±2,2	3,8	99,4
AMPA	10	10,1±0,1	0,7	101,1
	20	19,2±0,7	3,6	96,2
	60	60,5±2,0	3,3	100,8
GLU	10	8,5±0,4	3,7	85,3
	20	22,3±0,9	3,4	111,4
	60	60,0±3,4	5,3	100,0

Nota: DP=desvio padrão

Para a faixa de concentração avaliada o INMETRO aceita valores de precisão de até 21% e para exatidão são aceitos valores na faixa de 60 a 115%, (INMETRO, 2020). Desta forma, avaliando os resultados da TABELA 3.2, pode-se observar que o método cromatográfico foi preciso e exato para as espécies de interesse avaliadas.

3.3.2. Validação do método resina de troca iônica-LC-FLD

A seletividade de um método está relacionada com a capacidade do método quantificar a espécie de interesse na presença de outros analitos ou interferentes da matriz (INMETRO, 2020).

A seletividade pode ser avaliada através do estudo do efeito matriz, uma vez que a matriz da amostra pode conter substâncias que possam interferir no sinal analítico. O efeito matriz é estimado através da comparação da inclinação das curvas analíticas, sendo uma preparada na matriz de análise e a outra preparada em água ultrapura (matriz similar à de análise na ausência de interferentes). Os coeficientes das curvas analíticas, bem como o efeito matriz calculado são apresentados na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 – COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E PORCENTAGEM DO EFEITO MATRIZ NAS MATRIZES AVALIADAS.

		GLY	AMPA	GLU
Solvente	FLT (μgL^{-1})	0,4-4,8	0,4-3,2	0,8-3,2
	Coef.angular	3264264	4665647	3371140
	Coef.linear	689769	-767229	-264192
	R ²	0,9611	0,9819	0,9879
Matriz BR	FLT (μgL^{-1})	0,4-4,8	0,8-4,0	0,4-4,8
	Coef.angular	4297225	2503421	1973626
	Coef.linear	-215557	-830301	-63514
	R ²	0,9959	0,9836	0,9953
	%Efeito matriz	31,6	-46,3	-41,5
Matriz PY	FLT (μgL^{-1})	0,2-4,0	0,2-4,8	0,2-4,8
	Coef.angular	4616986	3835771	3256440
	Coef.linear	-169751	-348910	197418
	R ²	0,9966	0,9970	0,9915
	%Efeito matriz	32,8	-16,6	-3,6

Nota: FLT: faixa linear de trabalho.

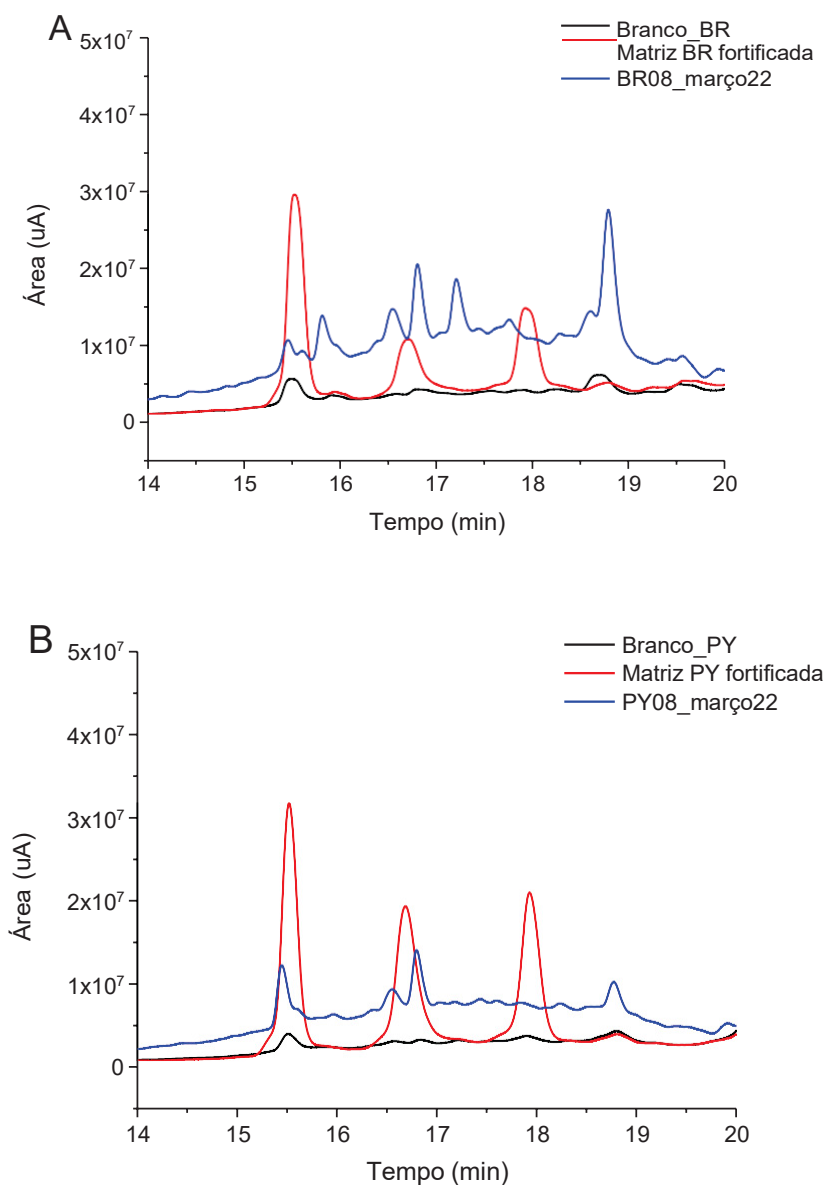
Como pode ser observado, o efeito matriz está presente em ambas as margens do reservatório. Nota-se que para o GLY o efeito é praticamente o mesmo

tanto na matriz brasileira, como na paraguaia. Já AMPA e GLU interagem de forma diferente em cada matriz, sendo que na matriz brasileira o efeito sobre AMPA e GLU é muito próximo. Diferentemente do que ocorre na matriz paraguaia, onde o efeito é mais pronunciado para AMPA do que para o GLU. A comparação entre as curvas analíticas, na matriz e em água ultrapura, para GLY, AMPA e GLU estão no APÊNDICE D.

Sendo confirmada a presença do efeito matriz e buscando reduzir a influência da matriz sobre a análise, as curvas analíticas foram elaboradas em um *pool* de amostras para cada margem do reservatório avaliada, buscando com isso obter uma representatividade do conjunto amostral.

Também foi realizada a comparação da prova em branco da amostra e de um ponto amostral para investigar a seletividade (FIGURA 3.5). Como a prova em branco da amostra era constituído da mistura de uma alíquota de todos os pontos amostrais, sugere-se que nele houvesse a presença das espécies de interesse.

FIGURA 3.5 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA A PROVA EM BRANCO DA MATRIZ, PARA A MATRIZ FORTIFICADA ($1,2 \mu\text{g L}^{-1}$) E PARA UMA AMOSTRA DA COLETA DE MARÇO/22 PARA A MARGEM BRASILEIRA (A) E MARGEM PARAGUAIA (B), APÓS A EXTRAÇÃO UTILIZANDO A RESINA DE TROCA IÔNICA.



Como pode ser observado, na prova em branco da matriz brasileira e paraguaia ocorreu a presença de glifosato. Como era inviável ter uma curva analítica para cada ponto amostral em cada coleta, para a avaliação dos resultados foi descontado o valor de área médio obtido de GLY nas provas em branco.

O teste F (TABELA 3.4) entre as variâncias obtidas, em triplicata, para as soluções padrão e para a matriz fortificada, indicou que o método pode ser considerado seletivo, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{crítico}} = 19,0$ ($gl=2$), para 95% de confiança) para todos os analitos em ambas as matrizes avaliadas.

TABELA 3.4 – RESULTADO DO TESTE F PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD (n=3).

			GLY	AMPA	GLU
1,2 µg L ⁻¹	Padrão	RSD	14,54	10,48	12,13
		Variância	0,042	0,019	0,027
	BR	RSD	10,67	15,43	7,44
		Variância	0,020	0,037	0,010
		Fcal	2,08	1,95	2,74
	PY	RSD	7,75	8,76	4,40
		Variância	0,009	0,028	0,008
		Fcal	4,59	1,46	3,30
2,4 µg L ⁻¹	Padrão	RSD	26,75	12,01	23,58
		Variância	0,339	0,067	0,318
	BR	RSD	15,73	37,44	19,86
		Variância	0,148	0,655	0,223
		Fcal	2,28	9,69	1,43
	PY	RSD	14,03	10,94	15,55
		Variância	0,116	0,182	0,368
		Fcal	2,93	2,70	1,16

Nota: RSD: Desvio padrão relativo

A linearidade foi avaliada pela construção da curva analítica, sendo estudadas as concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,4, 3,2 4,0 e 4,8 µg L⁻¹, em triplicata. Para que uma regressão linear seja válida, além de existir a relação linear expressa pelo coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ser independentes entre si, homocedásticos e devem apresentar distribuição aleatória. Tais parâmetros foram avaliados através da análise das curvas preparadas na matriz de análise para cada margem do reservatório de ITAIPU, sendo os resultados apresentados na TABELA 3.5.

A distribuição aleatória foi avaliada visualmente através do gráfico de distribuição de resíduos, através da análise das variâncias das respostas instrumentais através do teste F foi avaliada a homoscedasticidade e a independência dos resíduos foi calculada pelo teste de Durbin-Watson.

TABELA 3.5 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DADOS DA REGRESSÃO LINEAR PARA AS ESPÉCIES DE INTERESSE – CURVA MATRIZ BRASIL E PARAGUAI.

Analitos FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão	Desvio coef. Linear	Desvio coef. Angular	R ²	Teste F* F _{cal}	Teste D-W** d _{cal}
GLY 0,4-4,8	$A_p=4297225_{\text{GLY}} - 215557$	489415,45	183859,41	0,9959	F _{1,2} =6,75; F _{2,3} =8,12; F _{3,4} =5,94; F _{4,5} =1,25; F _{5,6} =1,72; F _{6,7} =4,47	2,49
BR AMPA 0,8-4,0	$A_p=2503421_{\text{CAMPA}} - 830301$	463906,87	186671,13	0,9836	F _{1,2} = 361,43 ; F _{2,3} =2,68; F _{3,4} =5,39; F _{4,5} =2,65	2,55
GLU 0,4-4,8	$A_p=1973626_{\text{CGLU}} - 63514$	265390,80	99699,74	0,9953	F _{1,2} =2,75; F _{2,3} =1,27; F _{3,4} =5,55; F _{4,5} =3,99; F _{5,6} =1,36; F _{6,7} =1,59	2,14
GLY 0,2-4,0	$A_p=4616986_{\text{CGLY}} - 169751$	324462,16	153982,93	0,9966	F _{1,2} =2,41; F _{2,3} =3,19; F _{3,4} =2,29; F _{4,5} =2,91; F _{5,6} =1,42; F _{6,7} =4,15;	1,88
PY AMPA 0,2-4,8	$A_p=3835771_{\text{CAMPA}} - 348910$	314922,66	122091,17	0,9970	F _{1,2} =5,66; F _{2,3} =3,07; F _{3,4} =4,23; F _{4,5} =2,36; F _{5,6} =12,54; F _{6,7} =2,86; F _{7,8} =9,70; F _{8,9} =9,10	2,20
GLU 0,2-4,8	$A_p=3256440_{\text{CGLU}} + 197418$	292716,16	112541,52	0,9915	F _{1,2} =3,91; F _{2,3} =20,03; F _{3,4} =3,92; F _{4,5} =24,59; F _{5,6} =1,28; F _{6,7} =3,15; F _{7,8} =4,68	1,50

Notas: Valor crítico: F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal).

**Teste D-W: teste Durbin-Watson; BR- GLY e GLU d_{crítico}: d_L=1,22; d_U=1,42; AMPA: d_L=1,08; d_U=1,36 ; PY- GLI: d_L=1,22 d_U=1,42; AMPA: d_L=1,32; d_U=1,47 e GLU: d_L=1,27; d_U=1,45.

Os coeficientes de determinação obtidos foram satisfatórios para a faixa de concentração avaliada (R²>0,9836). Houve um caso em que os resíduos não foram considerados homocedásticos (valor destacado), porém por ser um ponto isolado e a independência dos resíduos ter sido assegurada pelo teste de Durbin-Watson, foi optado por manter esse nível de concentração. Com relação a análise da aleatoriedade dos gráficos de resíduos, não foi identificada nenhuma tendência nos resultados, garantindo assim a sua distribuição aleatória. Com isso, pode-se dizer que a linearidade foi atendida para as espécies de interesse tanto na matriz brasileira, como na matriz paraguaia.

LOD e LOQ, para as curvas preparadas na matriz, foram calculados pelo método visual e os valores obtidos para o método resina de troca iônica LC-FLD são apresentados na TABELA 3.6.

TABELA 3.6 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO EMPREGANDO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD ($\mu\text{g L}^{-1}$).

	BR		PY	
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$).	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$).	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$).	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$).
GLI	0,2	0,4	0,1	0,2
AMPA	0,4	0,8	0,1	0,2
GLU	0,2	0,4	0,1	0,2

Os menores valores de LOQ, obtidos com precisão e exatidão, pelo método visual, foram obtidos para a matriz paraguaia, com LOQ de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Quando se compara com dados da literatura, verifica-se que os valores obtidos foram muito próximos aos relatados (TABELA 3.7).

TABELA 3.7 – COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO OBTIDOS NA LITERATURA.

Analito	Matriz	Derivatizante	Método cromatográfico	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
GLY AMPA GLU	Água superficial e subterrânea	FMOC-Cl	LC-MS/MS	0,6 0,2 0,1	Demonte et al., (2018)
GLY* AMPA GLU*	Água superficial e subterrânea	Ftalaldeído e 2-mercaptoetanol	LC-FLD	0,2 0,5 0,3	Pires et al., (2020)
GLY AMPA	Água superficial e subterrânea	FMOC-Cl	LC-FLD	0,2 1,0	Alonso et al., (2022)
GLY AMPA GLU	Água do mar	FMOC-Cl	LC-FLD	0,5 0,25 0,5	Shu et al., (2022)

Nota: * analitos que passaram por liofilização e obtiveram um EF de 10 vezes.

O método proposto neste trabalho atingiu LOQ muito próximo ao obtido por Demonte et al., (2018) e utilizando uma técnica com menor sensibilidade. Ao comparar com os resultados obtidos por Pires et al., (2020) o LOQ obtido neste trabalho foi muito semelhante e, além disso, proporcionou a análise simultânea dos analitos com uma mesma técnica, sem a necessidade de preparos distintos de amostra. Resultados parecidos também foram obtidos por Alonso et al., (2022) e Shu et al., (2022), com isso, pode-se concluir que o método atende as necessidades ambientais, bem como está de acordo com trabalhos relatados na literatura.

A precisão é uma forma de avaliar a dispersão dos dados, e esta pode ser expressa em termos de precisão intermediária pela análise do desvio padrão relativo. Neste estudo, ela foi avaliada através da comparação dos resultados de amostras fortificadas nas concentrações de 0,8, 1,2 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a matriz brasileira e 0,8, 1,6 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a matriz paraguaia, com preparo em dias diferentes, em triplicata.

Foram observados valores inferiores a 20% para a precisão intermediária, desta forma os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação do INMETRO para a faixa de concentração avaliada. Os resultados de precisão intermediária são apresentados na FIGURA 3.6.

Observa-se que, de modo geral, os desvios foram menores para a matriz brasileira. A exceção para o GLU, na concentração de 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde o RSD foi praticamente o mesmo para ambas as matrizes 13,9 (BR) e 12,8 (PY).

Pelo fato de a matriz paraguaia ter apresentado um menor efeito matriz, esperava-se que no estudo da precisão os desvios também fossem inferiores aos da matriz brasileira. No entanto, os resultados nos mostram que o comportamento foi diferente.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação relativa, sendo realizado em triplicata nos mesmos níveis de concentração avaliados para o ensaio de precisão intermediária. Os resultados são apresentados na TABELA 3.8.

FIGURA 3.6 –ENSAIOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA EXPRESSOS PELO DESVIO PADRÃO RELATIVO (RSD %) PARA OS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO PARA A MATRIZ BRASILEIRA ($0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ E $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$) E PARA A MATRIZ PARAGUAIA ($0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ E $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$) (n=3).

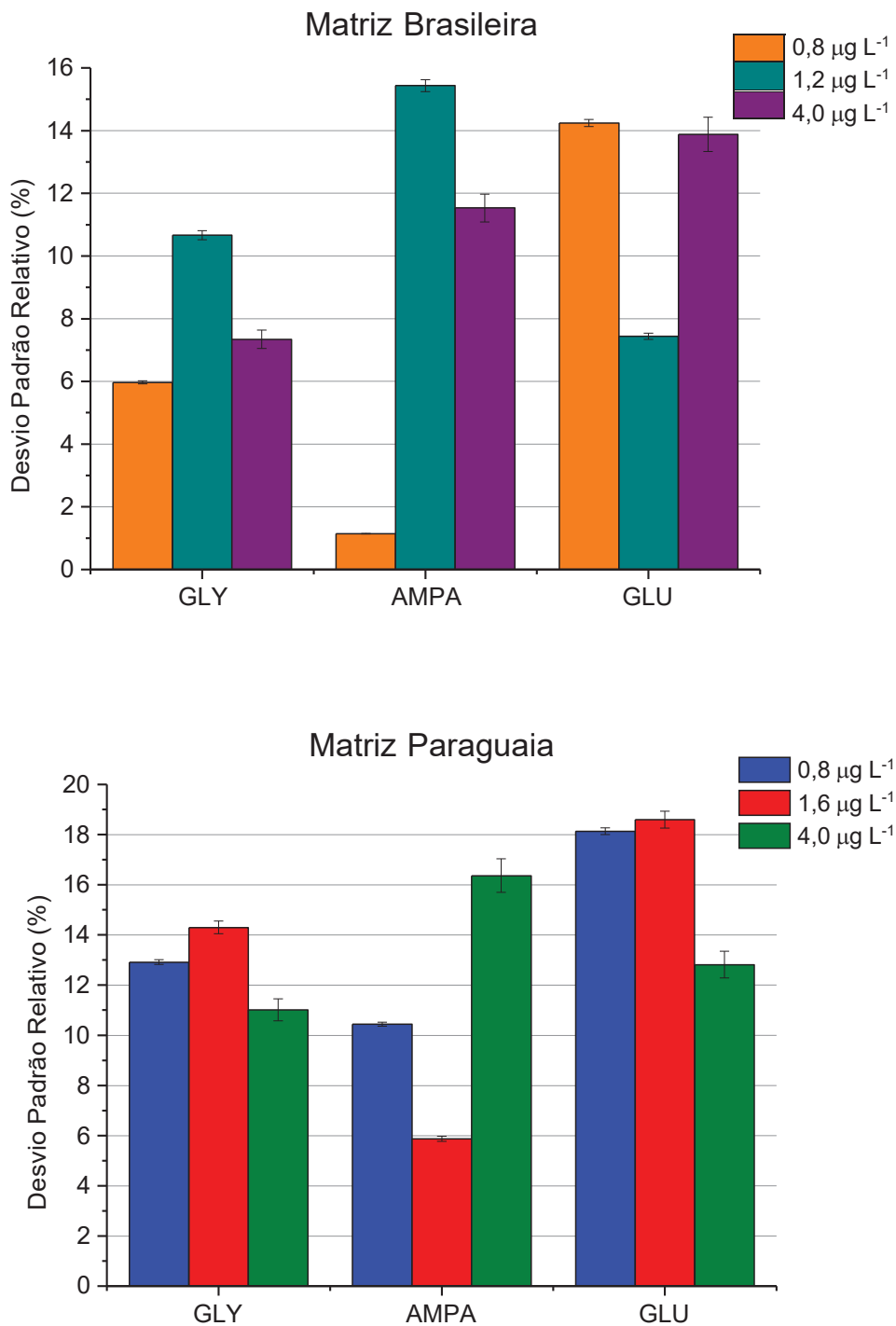


TABELA 3.8 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO (%) DOS ANALITOS UTILIZANDO O MÉTODO EMPREGANDO RESINA DE TROCA IÔNICA LC-FLD NAS MATRIZES BRASILEIRA E PARAGUAIA

	BR			PY		
	0,8 µg L ⁻¹	1,2 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹	0,8 µg L ⁻¹	1,6 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹
GLY	104,0±0,05	110,5±0,14	100,2±0,29	95,0±0,10	110,7±0,25	98,4±0,43
AMPA	110,8±0,01	103,7±0,19	97,3±0,45	91,7±0,08	109,1±0,10	102,2±0,67
GLU	99,2±0,11	112,3±0,10	99,0±0,55	92,8±0,13	113,3±0,34	103,3±0,53

De acordo com os critérios de aceitação do INMETRO para a faixa de concentração avaliada, são aceitáveis os valores de recuperação na faixa de 60 a 115%. Desta forma, todos os analitos nas duas matrizes avaliadas apresentaram recuperações dentro da faixa aceitável.

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que o método apresentou linearidade, precisão e exatidão aceitáveis para as espécies de interesse analisadas e nas concentrações estudadas.

3.3.3. Análise das amostras

Para análise de glifosato, AMPA e glufosinato, as amostras foram coletadas bimestralmente no período de janeiro/22 a setembro/22, sendo analisadas de acordo com o método de resina de troca iônica LC-FLD desenvolvido e validado para a determinação em águas superficiais.

Para a análise dos resultados foram utilizadas curvas analíticas preparadas na matriz. Na quantificação das amostras foi subtraído o valor da área média da prova em branco da matriz, a fim de não superestimar as concentrações dos analitos presentes no *pool*.

Na maioria das amostras, o método de resina de troca iônica não identificou a presença de GLY, AMPA ou GLU. Na margem brasileira, o GLY foi detectado apenas na coleta de setembro/22, no ponto BR04 e BR16. Já o AMPA foi detectado nas coletas de janeiro, julho e setembro/22, nos pontos BR02 e BR16, sendo quantificado no BR16 em janeiro (0,847 µg L⁻¹) e setembro (0,832 µg L⁻¹).

Já na margem paraguaia, apenas o GLY foi detectado nas coletas de julho/22 (PY08) e setembro/22 (PY15), no entanto, não foi possível a sua quantificação. Não houve indícios da presença de AMPA e GLU no Paraguai.

Na literatura há relatos da presença de GLY, AMPA e GLU em águas superficiais e subterrâneas. Pires et al., (2020), ao estudarem a presença de GLY,

AMPA e GLU em águas superficiais e subterrâneas no município de Santarém, Pará, obtiveram concentrações de GLY na faixa de 1,5 a 9,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,65 a 1,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA.

Demonte et al., (2018) avaliaram águas superficiais e subterrâneas de uma fazenda leiteira na Argentina e obtiveram concentrações de GLY e AMPA em ambas as matrizes e de GLU, apenas na água superficial. Para a água subterrânea relataram a presença de GLY nas amostras avaliadas com concentrações de até 11,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e AMPA com concentração máxima de 6,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já quando avaliaram em águas superficiais os valores passaram a ser de 21,2 e 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLY e AMPA, respectivamente. Enquanto para o GLU, a maioria das amostras apresentou concentrações inferiores à 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Castro Berman et al., (2018) avaliaram a presença de GLY e AMPA em diferentes compartimentos ambientais (água superficial, sedimento e material particulado suspenso (MPS)) do pampa argentino. Obtiveram a presença de GLY em 30,8% das amostras coletadas, enquanto o AMPA estava presente em 13,5%. Além disso, notaram que entre os compartimentos, o que apresentava a maior concentração dos analitos era o sedimento, seguido da água superficial. Para o sedimento, obtiveram concentrações máximas de 20,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GLY) e 32,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (AMPA), enquanto para a água superficial as concentrações foram de 4,52 e 0,90 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLY e AMPA, respectivamente. Ressaltaram ainda, que raramente os analitos eram encontrados juntos no mesmo compartimento ambiental.

Uma maior frequência de detecção dos analitos nas últimas coletas, pode estar relacionada com o tempo de armazenamento. As amostras de setembro/22 foram analisadas imediatamente, enquanto as amostras de julho/22 foram congeladas apenas por 2 meses. Já as demais foram congeladas por um período superior, chegando a 9 meses a -20°C , até a análise. Fato este, que pode ter levado à degradação dos analitos durante o período de armazenamento, mesmo havendo relatos na literatura de que o GLY é estável em amostras congeladas por até 18 meses (PIRES et al., 2020; USEPA, 1990).

Outra possibilidade que pode ter ocorrido, com relação à não detecção dos analitos na maioria das amostras, pode estar relacionada ao fato de que estes podem estar em outro compartimento ambiental (solo e sedimento), como foi o caso de Castro Berman e colaboradores que notaram uma maior incidência dos analitos no sedimento. Ou ainda, os analitos estão presentes na matriz, porém em valores

inferiores ao LOD do método. Desta forma, são necessários estudos complementares avaliando a presença de GLY, AMPA e GLU em solo e sedimento, juntamente com amostras de águas naturais.

3.4. CONCLUSÕES

O método desenvolvido, extração com resina de troca iônica-LC-FLD, foi validado de acordo com as orientações do INMETRO, sendo linear, seletivo, e com precisão e exatidão adequadas, para a faixa de concentração avaliada (0,2 - 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$). Apresentando também limites de detecção e quantificação superiores a 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que indica que o método pode ser aplicado em amostras ambientais.

O método validado foi aplicado em amostras coletadas bimestralmente no período de janeiro/22 a setembro/22, compreendendo 24 pontos amostrais (12 na margem brasileira e 12 na margem paraguaia). De modo geral, não foram encontradas concentrações de GLY, AMPA e GLU nas amostras analisadas. Durante todo o período de análise, o GLY foi detectado 4 vezes, sendo duas vezes em cada margem, no entanto sem quantificação. Já o AMPA, também foi detectado 4 vezes, no entanto, somente na margem brasileira. E dessas detecções, foi possível quantificar o AMPA em duas amostras, sendo encontradas concentrações de 0,832 e 0,847 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Desta forma, sugere-se que, para a determinação de GLY, AMPA e GLU em águas naturais, seja realizada conjuntamente a avaliação da presença desses analitos em solo ou sedimento.

4. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados da triagem preliminar realizada por LC-QTOF-MS, sob a coordenação da Prof^a. Dra. Carla Sirtori (UFRGS), foram selecionados como agrotóxicos de interesse, além de glifosato e seus produtos de degradação, um conjunto de 10 triazinas que também são empregadas na região de abrangência do estudo.

Das técnicas avaliadas para a determinação de compostos triazínicos em águas superficiais, a HF-LPME nas condições avaliadas não foi satisfatória para o estabelecimento de uma rotina laboratorial. No entanto, sugere-se que as condições do método avaliadas nesse estudo possam ser empregadas como um *screening* para a detecção das triazinas avaliadas, uma vez que, nas condições testadas só não foi possível a quantificação das espécies.

Para a DLLME, foi possível estabelecer uma rotina de extração/pré-concentração/clean-up para a determinação cromatográfica do conjunto de triazinas por DLLME-LC-MS. O método desenvolvido foi validado e aplicado em amostras de água superficial da região transfronteiriça do reservatório de ITAIPU. Com o método foi possível detectar e quantificar a presença de ATZ (0,038-0,621 $\mu\text{g L}^{-1}$), DIA (0,023-0,151 $\mu\text{g L}^{-1}$) e DEA (0,140-0,429 $\mu\text{g L}^{-1}$) na margem brasileira.

Na margem paraguaia, o método identificou a presença de 8 compostos triazínicos, dentre eles a AMT, a qual foi recorrente em todos os pontos e em todas as campanhas de amostragem. Também foi determinado e quantificado a presença de ATZ (0,084-1,476 $\mu\text{g L}^{-1}$), DIA (0,119-1,090 $\mu\text{g L}^{-1}$), DEA (0,151 $\mu\text{g L}^{-1}$), SMZ (0,232-2,946 $\mu\text{g L}^{-1}$), TBZD (0,031-0,032 $\mu\text{g L}^{-1}$), PMT (0,173 $\mu\text{g L}^{-1}$) e PPZ (0,071 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Além disso, foi possível estabelecer um método para a determinação de GLY, AMPA e GLU utilizando a resina de troca iônica como método de extração e para a determinação foi utilizado LC-FLD.

O método resina de troca iônica-LC-FLD foi validado e aplicado em amostras de água superficial. Para a maioria das amostras, não foi detectada a presença das espécies de interesse. GLY foi detectado em ambas as margens, no entanto não foi possível a sua quantificação. Já o AMPA foi detectado apenas na margem brasileira em 4 ocasiões, sendo possível a sua quantificação em apenas duas, com concentrações de 0,832 e 0,847 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Sugere-se que, em estudos futuros, seja realizada a avaliação das espécies de interesse em mais um compartimento ambiental conjuntamente com a análise de amostras hídricas.

Os métodos desenvolvidos nesse trabalho para a determinação de compostos triazínicos, glifosato, AMPA e glufosinato, apresentaram limites de quantificação inferiores a $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, atendendo a demanda de análises de amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

ACAYABA, R. D. A. et al. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 9824–9835, 2021.

AERU, A. & E. R. U. **Pesticide Properties DataBase**. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz_herb.htm>. Acesso em: 14 fev. 2022.

AGUILAR-ARTEAGA, K. et al. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction coupled with magnetic dispersive microsolid phase extraction for determination of triazines in wastewater samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 5, p. 1203–1213, 2020.

ALONSO, B. et al. Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography - fluorescence detection and tandem mass spectrometry. **MethodsX**, v. 9, p. 101730, 2022.

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: A review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378–391, 2017.

AMADORI, M. F. et al. Behavior of Atrazine and Its Degradation Products Deethylatrazine and Deisopropylatrazine in Oxisol Samples. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 10, p. 1–13, 2016.

AMARANTE JUNIOR, O. P. DE;; SANTOS, T. C. R. Glifosato:Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

ANDRADES, T. O. DE; GANIMI, R. N. REVOLUÇÃO VERDE E A APROPRIAÇÃO. **Revista Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora**, p. 43–56, 2007.

ANDRUCH, V. et al. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1–19, 2013.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Índice monográfico - Atrazina**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1/view>>. Acesso em: 20 dez. 2022a.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Índice monográfico - Glifosato**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h>>.

i/4378json-file-1/view>. Acesso em: 21 dez. 2022b.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Índice monográfico - Glufosinato**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4380json-file-1>>. Acesso em: 21 dez. 2022c.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Índice monográfico - Ametrina**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4139json-file-1/view>>. Acesso em: 20 dez. 2022d.

ATSDR, A. FOR T. S. AND D. R. **Element 2: Environmental Fate and Transport**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/pha-guidance/conducting_scientific_evaluations/exposure_pathways/environmental_fate_and_transport.html#fateandtransport>. Acesso em: 16 nov. 2022.

BACHETTI, R. A. et al. Monitoring of Atrazine Pollution and its Spatial-Seasonal Variation on Surface Water Sources of an Agricultural River Basin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 106, n. 6, p. 929–935, 2021.

BÁEZ, M. E. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 21, p. 3125–3132, 2014.

BARIZON, R. R. M. et al. Pesticides in the surface waters of the Camanducaia River watershed, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, part B**, v. 55, n. 3, p. 283–292, 2020.

BECKER, R. W. et al. Pesticides in surface water from Brazil and Paraguay cross-border region: Screening using LC-QTOF MS and correlation with land use and occupation through multivariate analysis. **Microchemical Journal**, v. 168, n. March, 2021.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BLANCHOU, H. et al. Rapid SPE – LC MS/MS analysis for atrazine, its by-products, simazine and S metolachlor in groundwater samples. **MethodsX**, v. 7, p. 100824, 2020.

BOLZAN, C. M. et al. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Preconcentration of Multiple Classes of Pesticides in Water. **Analytical Letters**, v. 48, n. 17, p. 2754–2772, 2015.

BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 886, n.

1–2, p. 207–216, 2000.

BRASIL. **Lei n 7.802, de 11 de julho de 1989.** Brasil, 1989.

BRASIL, M. DA S. **Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021**, 2021. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html>

BRASIL, M. DO M. A. **Resolução CONAMA nº 357, 17 de Março de 2005**. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2022.

BRASIL, M. DO M. A. **Ministry of the Environment. Pesticides**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

BRESSÁN, I. G. et al. Optimization and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of glyphosate in human urine after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1171, n. January, 2021.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CALDAS, S. S. et al. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676–688, 2016.

CAMICCIA, M. et al. Determination of glyphosate in breast milk of lactating women in a rural area from Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, p. 1–7, 2022.

CANADA, H. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality**. Disponível em: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt_formats/pdf/pubs/water-eau/sum_guide-res_recom/summary-tables-sept-2022-eng.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2022.

CARVALHO, L. B. DE. **Herbicidas**. 1ª ed. Lages/SC: [s.n.].

CASTILHOS, N. D. B. et al. Physical-chemical characteristics and potential use of a novel alginate/zein hydrogel as the sorption phase for polar organic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 507–516, 2017.

CASTRO BERMAN, M. et al. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. **Chemosphere**, v. 200, p. 513–522, 2018.

CATRINCK, T. C. P. G. et al. A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194–1199, 2014.

CLAUDE, B. et al. Preliminary recovery study of a commercial molecularly imprinted polymer for the extraction of glyphosate and AMPA in different environmental waters using MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 13, p. 12293–12300, 2017.

CORBERA, M. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 1, p. 3–7, 2005.

CORBERA, M.; HIDALGO, M.; SALVADÓ, V. Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. **Microchimica Acta**, v. 153, n. 3–4, p. 203–209, 2006.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Metallic complexes with glyphosate: A review. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038–1045, 2005.

DA SILVA, A. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. A multiclass analytical method for pesticides determination in water using DLLME and GC-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 550–562, 2017.

DE BAIRROS, A. V. et al. Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 975, p. 24–33, 2015.

DELLA-FLORA, A. et al. Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**, v. 10, n. 45, p. 5447–5452, 2018.

DELLA-FLORA, A. et al. Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography-mass spectrometry quantitative analysis. **Science of the Total Environment**, v. 669, p. 248–257, 2019.

DEMONTE, L. D. et al. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 34–43, 2018.

DONATO, F. F. et al. Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1516, p. 54–63, 2017.

EL-DEEN, A. K.; SHIMIZU, K. Deep eutectic solvent as a novel disperser in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet (DLLME-SFOD) for preconcentration of steroids in water samples: Assessment of the method deleterious impact on the e. **Microchemical Journal**, v. 149, n. February, p. 103988, 2019.

ESTEVIÃO, P. L. S.; PERALTA-ZAMORA, P.; NAGATA, N. Binary solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of pesticides in natural water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2104–2116, 2018.

FAO, F. AND A. O. OF THE U. N. **Pesticides use , pesticides trade and pesticides indicators Global , regional and country trends , 1990 – 2020**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cc0918en/cc0918en.pdf>>.

FARHADI, K.; MATIN, A. A.; HASHEMI, P. LC determination of trace amounts of phenoxyacetic acid herbicides in water after dispersive liquid-liquid microextraction. **Chromatographia**, v. 69, n. 1–2, p. 45–49, 2009.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, n. 5, p. 497–526, 2005.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3–4, p. 271–294, 2012.

GURE, A. et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary HPLC for the selective determination of six sulfonylurea herbicides in environmental waters. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 20, p. 3395–3401, 2013.

HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Performance tuning of derivatization, enrichment and detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 6, p. 2265–2276, 2008.

HIDALGO, C. et al. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 153–157, 2004.

HORTA, R. P. et al. Evaluation of a hollow-fiber liquid-phase microextraction technique for the simultaneous determination of PPI drugs in human plasma by LC-DAD. **Journal of**

Chromatographic Science, v. 56, n. 6, p. 564–573, 2018.

HU, X. LIN et al. Hollow fiber membrane supported thin liquid film extraction for determination of trace phenoxy acid herbicides and phenols in environmental water samples. **Microchimica Acta**, v. 168, n. 1–2, p. 23–29, 2010.

IBAMA, I. B. DO MEIO A. E DOS R. N. R. **Painéis de informações de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>. Acesso em: 22 dez. 2022.

IBÁÑEZ, M. et al. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 145–155, 2005.

INMETRO, I. N. D. M. N. E. Q. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Inmetro, 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numero_racao=00774&num_documento=008>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, I. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 1 out. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, I. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>.

IPARDES, I. P. DE D. E. E S. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável por bacias hidrográficas do estado do Paraná**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.ipardes.pr.gov.br/sites/ipardes/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/Revista Indicadores de Desenvolvimento Sustentável.pdf](http://www.ipardes.pr.gov.br/sites/ipardes/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/Revista%20Indicadores%20de%20Desenvolvimento%20Sustentavel.pdf)>.

LETSEKA, T.; GEORGE, M. J. Hollow-fibre-supported dispersive liquid-liquid microextraction for determination of atrazine and triclosan in aqueous samples. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, 2017.

LIU, Y. W. et al. Rapid on-line microextraction method for the analysis of glyphosate in soy and pepper based on fiber-spray/mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 430, p. 104–109, 2018.

LOPES, D. et al. Determination of emerging contaminants in aqueous matrices with hollow fiber-

supported dispersive liquid-liquid microextraction (HF-LPMJE) and separation/detection by liquid chromatography - Diode array detection. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 371–376, 2017.

MAGALHÃES, I. R. DOS S.; BONATO, P. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, p. 11–17, 2009.

MAHÍA, J.; MARTÍN, A.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Extractable atrazine and its metabolites in agricultural soils from the temperate humid zone. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 30, n. 2, p. 147–152, 2008.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 129–136, 1998.

MARTINS, M. L. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.

MARUBE, L. C. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 9–10, p. 1765–1774, 2015.

MENDONÇA, C. F. R. et al. Glyphosate and AMPA occurrence in agricultural watershed: the case of Paraná Basin 3, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 55, n. 10, p. 909–920, 2020.

MENEZES, H. C. et al. A simple and quick method for determination of pesticides in environmental water by HF-LPME-GC / MS. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363–372, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, M. **Agropecuária puxa economia brasileira**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-economia-brasileira>>. Acesso em: 1 out. 2018.

MOJIRI, A. et al. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, v. 253, 2020.

MONTAGNER, C. C. et al. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants

in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 614–632, 2019.

MOREIRA, B. J.; MICHICO, J.; YOKOYA, C. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos , inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014.

NAGARAJU, D.; HUANG, S. DA. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, p. 89–97, 2007.

OLIVEIRA, A. R. M. DE et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

ONU, O. DAS N. U. **População mundial atinge 8 bilhões de pessoas**. Disponível em: <[https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342#:~:text=ONU ressalta que número de, a 9 bilhões em 2037.>](https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342#:~:text=ONU%20ressalta%20que%20n%C3%BAmero%20de,9%20bilh%C3%B5es%20em%202037.>). Acesso em: 17 nov. 2022.

PAN, S. et al. Nonderivatization method for determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their main metabolites in environmental waters based on magnetic metal-organic framework pretreatment. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 5, p. 1045–1050, 2019.

PANTHI, S. et al. Pharmaceuticals, herbicides, and disinfectants in agricultural water sources. **Environmental Research**, v. 174, n. April, p. 1–8, 2019.

PASTOR-BELDA, M. et al. Combination of solvent extractants for dispersive liquid-liquid microextraction of fungicides from water and fruit samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 233, p. 69–76, 2017.

PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU, A.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 932, n. 1–2, p. 83–90, 2001.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

PENG, J. et al. Determination of atrazine, desethyl atrazine and desisopropyl atrazine in environmental water samples using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. **Microchimica Acta**, v. 158, n. 1–2, p. 181–186, 2007.

PERIN, M. et al. Pharmaceuticals, pesticides and metals/metalloids in Lake Guaíba in Southern Brazil: Spatial and temporal evaluation and a chemometrics approach. **Science of the Total Environment**, v. 793, p. 148561, 2021.

PINTO, E.; SOARES, A. G.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by: In situ derivatization-dispersive liquid-liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 554–561, 2018.

PINTO, M. I. et al. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 225–237, 2010.

PIRES, N. L. et al. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau, Brazilian Amazon. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 55, n. 9, p. 794–802, 2020.

PRIMEL, E. G. et al. An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 14, p. 1–18, 2017.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565–574, 2003.

PUZIO, K. et al. Molecularly imprinted polymer dedicated to the extraction of glyphosate in natural waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p. 1–8, 2014.

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

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006.

RIBEIRO, M. L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36–53, 2007.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, N. et al. An environmentally friendly method for the determination of Triazine herbicides in estuarine seawater samples by dispersive liquid–liquid

microextraction. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 618–626, 2015.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, N. et al. Reliable methods for determination of triazine herbicides and their degradation products in seawater and marine sediments using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7764–7775, 2017.

SALVATIERRA-STAMP, V. et al. Hollow fiber liquid phase microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants in water samples. **Microchemical Journal**, v. 140, n. March, p. 87–95, 2018.

SANCHÍS, J. et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2335–2345, 2012.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. **Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques**. [s.l.: s.n.]. v. 406

SERESHTI, H. et al. Development of a sustainable dispersive liquid–liquid microextraction based on novel hydrophobic and hydrophilic natural deep eutectic solvents for the analysis of multiclass pesticides in water. **Microchemical Journal**, v. 175, n. January, p. 107226, 2022.

SHARIFI, V.; ABBASI, A.; NOSRATI, A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 2, p. 264–276, 2016.

SHEN, G.; HIAN, K. L. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 648–654, 2002.

SHIPITALO, M. J.; OWENS, L. B. Atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in surface runoff from conservation tilled watersheds. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 944–950, 2003.

SHU, H. et al. Effects of salt matrices on the determination of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and 2-aminoethylphosphonic acid using reversed-phase liquid chromatography after fluorescence derivatization. **Microchemical Journal**, v. 179, n. June, p. 107659, 2022.

SIMÃO, V. **HF-DLLME: UMA NOVA COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS E AGROTÓXICOS EM SUCOS**. [s.l.] UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

SIMÃO, V. et al. Novel analytical procedure using a combination of hollow fiber supported liquid membrane and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins in soybean juice by high performance liquid chromatography - Fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 196, p. 292–300, 2016.

SPIETELUN, A. et al. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, v. 119, p. 34–45, 2014.

TAKANO, H. K. et al. Reactive oxygen species trigger the fast action of glufosinate. **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1837–1849, 2019.

TUCCI, C. E. M. **Hidrologia: Ciência e aplicação**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS-Faculdade de Agronomia, 2002.

UE, U. E. **Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008 , relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/C**Journal Oficial da União Europeia, 2008.

UE, U. E. **Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano**, 2020. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2020:435:FULL&from=PT>>

URSELER, N. et al. Atrazine pollution in groundwater and raw bovine milk: Water quality, bioaccumulation and human risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 852, n. August, 2022.

USEPA, U. S. E. P. A. **Method 547 Determination of Glyphosate in Drinking Water By Direct-Aqueous-Injection Hplc, Post-Column Derivatization, and Fluorescence Detection**. [s.l: s.n.].

USEPA, U. S. E. P. A. **Interim Reregistration Eligibility Decision - Atrazine**Washington, DCU.S. Government Printing Office, , 2003. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/ired_PC-080803_1-Jan-03.pdf>

USEPA, U. S. E. P. A. **Draft Human Health Risk Assessment**Washington, DCU.S. Government Printing Office, , 2018. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2013-0266-1159>>

USEPA, U. S. E. P. A. **National Aquatic Resource Surveys**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-atrazine>>. Acesso em: 20 dez. 2022a.

USEPA, U. S. E. P. A. **National Primary Drinking Water Regulations**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>>. Acesso em: 22 dez. 2022b.

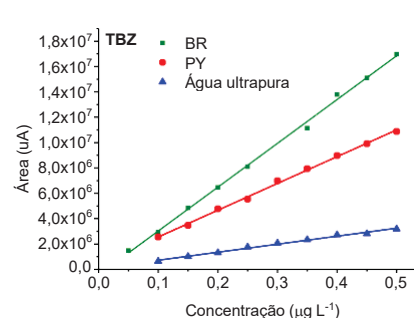
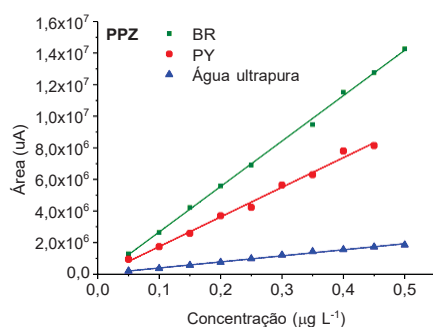
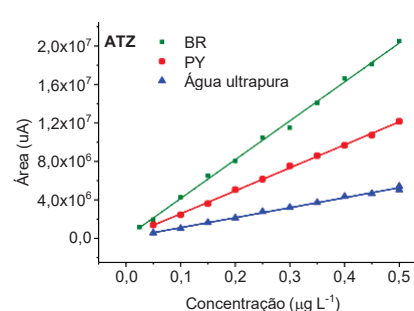
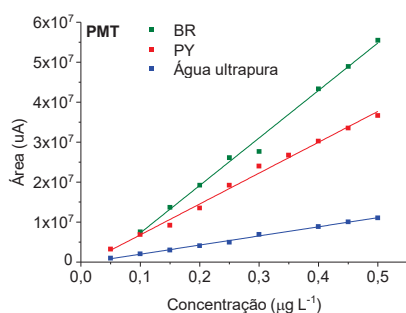
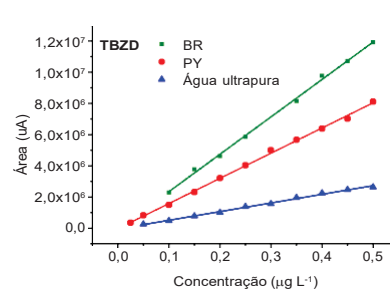
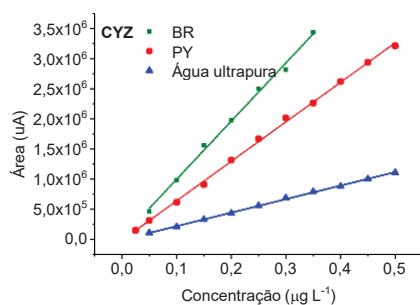
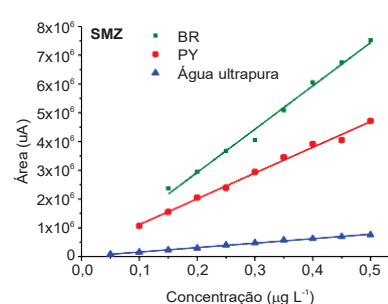
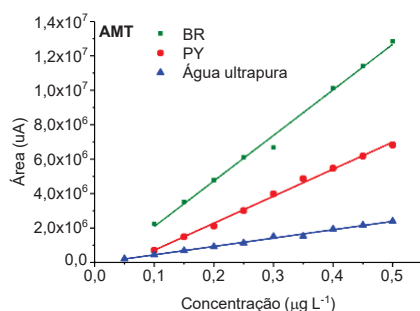
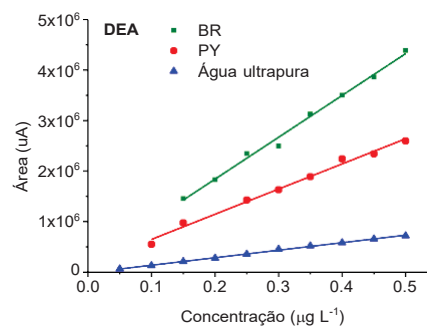
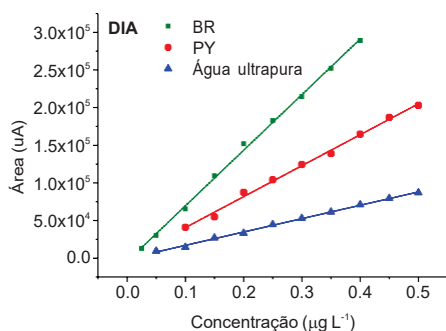
VIEIRA, M. G. et al. Avaliação da Contaminação por Agrotóxicos em Mananciais de Municípios da Região Sudoeste do Paraná. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, p. 1800–1812, 2017.

WIRTH, M. A.; SCHULZ-BULL, D. E.; KANWISCHER, M. The challenge of detecting the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in seawater – Method development and application in the Baltic Sea. **Chemosphere**, v. 262, p. 128327, 2021.

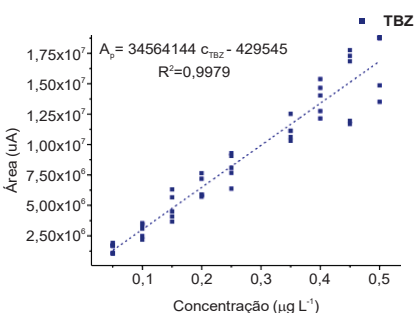
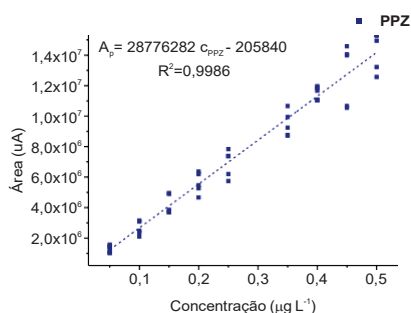
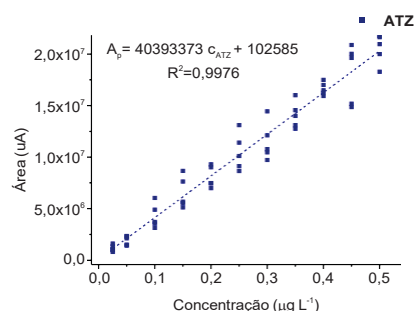
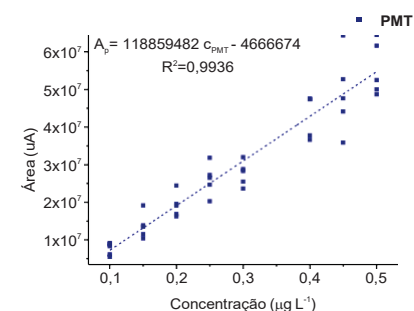
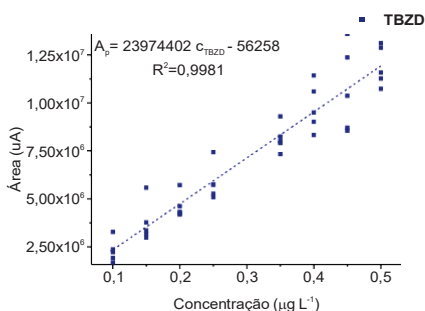
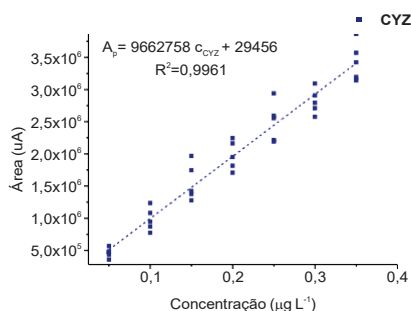
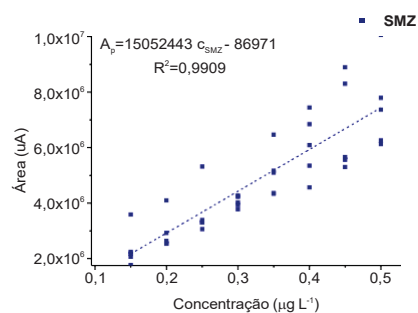
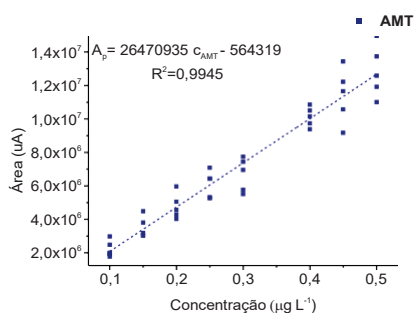
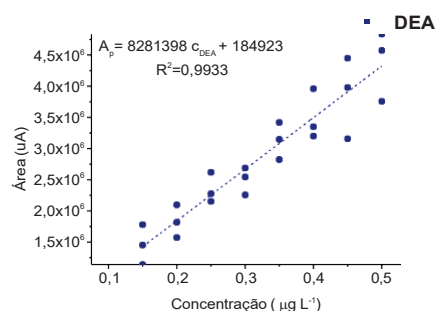
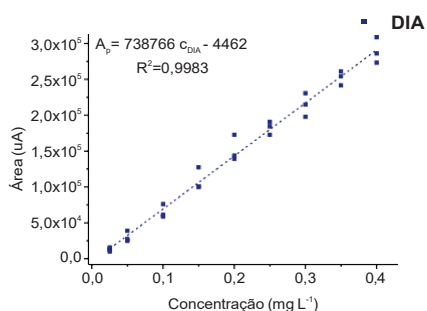
YANG, Q. et al. Sensitive determination of seven triazine herbicide in honey, tomato and environmental water samples by hollow fiber based liquid-liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography. **Talanta**, v. 186, n. April, p. 88–96, 2018.

YANG, X. et al. Non-targeted screening and analysis of volatile organic compounds in drinking water by DLLME with GC–MS. **Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133494, 2019.

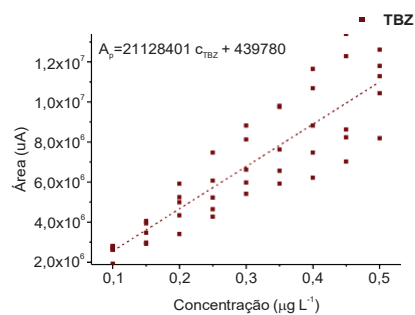
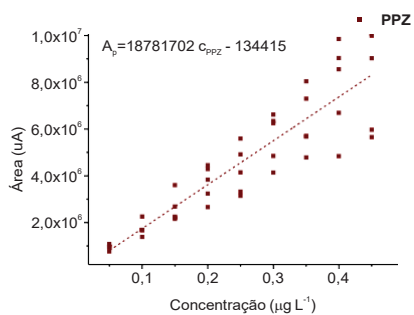
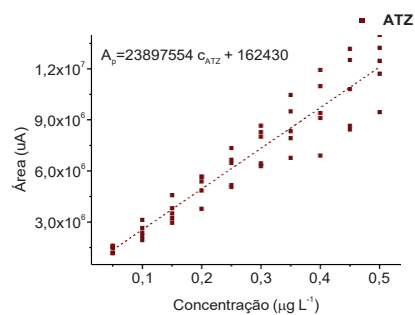
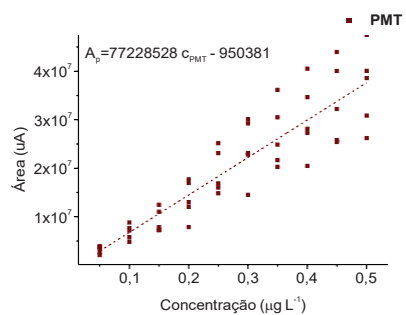
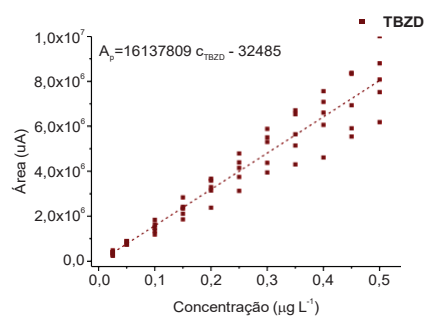
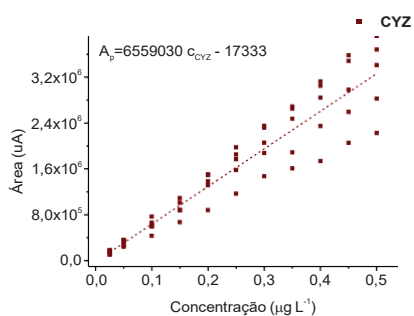
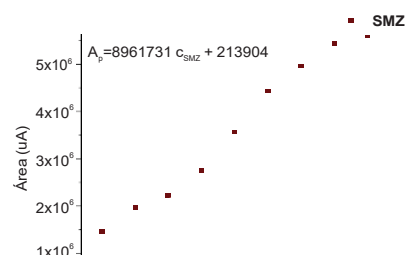
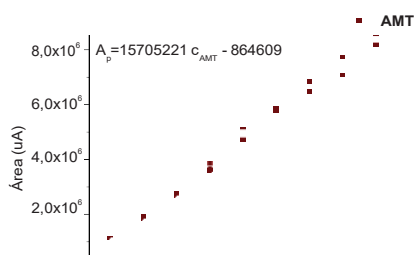
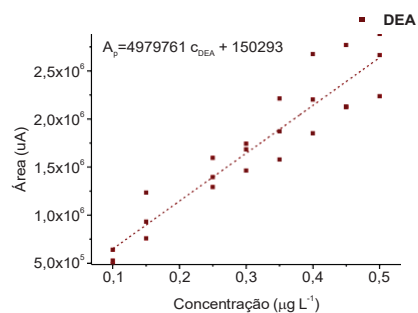
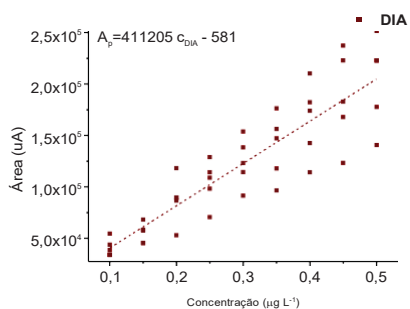
APÊNDICE A - COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS TRIAZÍNICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO PARA REPRESENTAÇÃO DO EFEITO MATRIZ CALCULADO



APÊNDICE B – CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS TRIÁZINICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONSTRUÍDAS NA MATRIZ BRASILEIRA UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS.



APÊNDICE C – CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS TRIAZÍNICOS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONSTRUÍDAS NA MATRIZ PARAGUAIA UTILIZANDO O MÉTODO DLLME-LC-MS/MS



APÊNDICE D - COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA REPRESENTAÇÃO DO EFEITO MATRIZ CALCULADO PARA GLY, AMPA E GLU.

