

THIAGO SANTANA NOVOTNÝ

**Implementação de Método Rápido e de Baixo Custo no
LACEN/RJ para Avaliação de Organoclorados em Água de
Soluções Alternativas de Abastecimento**

**PPGVS/INCQS
RIO DE JANEIRO
2009**

Implementação de Método Rápido e de Baixo Custo no LACEN/RJ para Avaliação de
Organoclorados em Água de Soluções Alternativas de Abastecimento

Thiago Santana Novonty

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr. Thomas Manfred Krauss
Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga

Rio de Janeiro
2009

Implementação de Método Rápido e de Baixo Custo no LACEN/RJ para Avaliação de Organoclorados em Água de Soluções Alternativas de Abastecimento

Thiago Santana Novotný

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. _____
Prof. Dr. Armi Wanderley da Nóbrega

Profª. Dra. _____
Profª. Dra. Kátia Maria Peiselt da Silva

Prof. Dr. _____
Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas

Orientador: _____
Prof. Dr. Thomas Manfred Krauss

Orientadora: _____
Profª. Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga

Rio de Janeiro

2009

Novotný, Thiago Santana

Implementação de Método Rápido e de Baixo Custo no LACEN/RJ para Avaliação de Organoclorados em Água de Soluções Alternativas de Abastecimento./ Thiago Santana Novotný. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2009.

xvi, 67 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2009. Orientador: Dr. Thomas Manfred Krauss e Dra. Ana Maria Cheble Bahia Braga.

1. Organoclorados. 2. Água para consumo humano. 3. Cromatógrafo à Gás acoplado ao Detector por Captura de Elétrons. 4. Vigilância e Controle da qualidade. I. Título.

**"Existem verdades que só podemos dizer depois
de ter conquistado o direito de dizê-las."
(Jean Cocteau)**

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Kívia, pela força, paciência e incentivo para seguir sempre em frente, aguentando firme mesmo nos momentos em que precisava mais de apoio do que eu;

Aos meus pais, pelas condições de crescer e pelas expectativas depositadas, que me impulsionaram a dar o melhor de mim;

Aos amigos Jorge Rigo e Leonardo Jardim, meus braços esquerdo e direito no LACEN - sem eles talvez eu não tivesse conseguido chegar até aqui;

À Eliane Cardozo, por sempre ter acreditado no meu trabalho e competência, e ter plantado em mim a idéia de tentar este mestrado;

A todos do Laboratório de Resíduos do INCQS, sempre solícitos, e, em especial a Lúcia Helena, generosa e esclarecedora como ninguém;

Ao meu orientador Thomas Krauss, pela confiança e apoio nas decisões dos rumos do meu trabalho, me ensinando a andar sozinho e me mostrando a direção com seus ensinamentos nos momentos em que parecia me perder;

À Penha, da Vigilância de São José do Vale do Rio Preto, que deixou seus afazeres para prontamente me siceronear e ajudar nos trabalhos de campo em sua cidade – sem ela, esse trabalho não estaria completo;

E a todos, que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

A disponibilidade de água potável e segura é um direito e uma condição indispensável para vida, garantidos pela Constituição Federal e pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Em sua tabela 3, a Portaria 518/2004 - MS apresenta o padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde e estabelece os valores máximos permitidos (VMP) em água para consumo humano para uma série de agrotóxicos, em sua maioria substâncias organocloradas. No entanto, somente a água distribuída pela rede geral de abastecimento tem a sua qualidade avaliada através do monitoramento realizado pelas companhias distribuidoras em seus laboratórios. O monitoramento da água das soluções alternativas apresenta uma dificuldade peculiar, pois muitas vezes não há um responsável ao qual possa ser formalmente imputado o controle da qualidade da água fornecida. No sentido de atender a necessidade de monitoramento da água das soluções alternativas, o objetivo principal deste trabalho foi a validação e a implementação de um método para análise de agrotóxicos organoclorados em água potável no Laboratório Central Noel Nutels/Rio de Janeiro visando o menor custo, menor tempo de execução, e menor geração de resíduos.

O método escolhido foi a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD), onde uma mistura de solvente de extração, mais denso e imiscível no meio aquoso, com um solvente de dispersão miscível em ambos, é rapidamente injetada na amostra aquosa por meio de uma seringa. A análise instrumental foi efetuada por cromatografia à gás com detecção por captura de elétrons. O método foi validado para 12 agrotóxicos sendo: 4,4'-DDT, 2,4'-DDT, alfa-endossulfam, beta-endossulfam, alfa-HCH, beta-HCH, gama-HCH, delta-HCH, endrin, hexaclorobenzeno, metoxicloro e trifuralina. Os parâmetros de validação verificados encontraram-se todos dentro das faixas exigidas pelas normas em vigor. O teste com duas misturas de solvente de extração revelou que a mistura tetracloroetileno/acetona apresentou os melhores resultados em comparação com a de clorobenzeno/acetona.

A análise de 10 amostras de água provenientes de soluções alternativas de abastecimento espalhadas pelo município de São José do Vale do Rio Preto/RJ mostrou que não há contaminação pelos agrotóxicos estudados, sendo todos os valores obtidos abaixo do limite de quantificação.

ABSTRACT

The availability of safe drinking water is a right and a prerequisite for life, guaranteed by the Constitution and the Unified Health System. In its table 3, the Ministry of Health ordinance n° 518/2004 presents the drinking water standards for chemicals that pose risk to health and sets the maximum contaminant level in water for human consumption to a number of pesticides, most of them organochlorinated substances. However, only the water distributed by the public supply network has its quality assessed by monitoring conducted in distributing companies' laboratories. Monitoring the water from alternative sources presents a peculiar difficulty, because often there is no controller who could be formally responsible for the quality of the water being supplied. In order to meet the need for monitoring the water from alternative sources, the main objective of this study was to validate and to implement a method for analysis of organochlorine pesticides in drinking water at Noel Nutels Central Laboratory / Rio de Janeiro aiming the lower cost, lower execution time, and less waste generation.

The chosen method was the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), where a mixture of an extraction solvent, more dense and immiscible in water, with a dispersion solvent, miscible in both, is rapidly injected in the aqueous sample through a syringe. The instrumental analysis was performed by gas chromatography with electron-capture detection. The method was validated for 12 pesticides: 4,4'-DDT, 2,4'-DDT, alpha-endosulfan, beta-endosulfan, alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH, endrin, hexachlorobenzene, methoxychlor and trifluralin. The validation parameters were all in the range required by current protocols. The test between two mixtures of extraction solvents showed that the mixture tetrachlorethylene/acetone provided the best results in comparison with chlorobenzene/acetone.

The analysis of 10 water samples from alternative supply sources throughout the municipality of São José do Vale do Rio Preto/RJ showed no contaminations by the pesticides studied, and all obtained values were below the quantification limits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Relevo do Estado do Rio de Janeiro (adaptado de IBGE, 2006)	7
Figura 2 : Estrutura dos agrotóxicos utilizados (PAN, 2009).....	13
Figura 3 : Perfil térmico do forno utilizado no método.....	26
Figura 4 : Sentido preferencial de transferência de massa de analitos entre solventes na extração líquido-líquido (A), microextração em gota única (B), e microextração líquido-líquido dispersiva.....	31
Figura 5 : Fluxograma da metodologia de análise.....	32
Figura 6: Gráfico das culturas com maior rendimento no Estado do Rio de Janeiro nos anos de 2001 a 2003 e 2005 (EMATER/RJ, 2007).	39
Figura 7: Aspecto de alguns dos poços coletados (A, F, H, I); Lavoura de chuchu e tomate predominantes na região (B e C); Extensão das plantações em relação à propriedade (D, G, I); Proximidade das plantações às barragens, córregos e riachos da região (E e G).	42
Figura 8: Posição relativa das amostras coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto.....	43
Figura 9: Folha topográfica da região sobreposta à imagem de satélite com os pontos de coleta georreferenciados. Pode-se observar a proximidade dos pontos de coleta (soluções alternativas de abastecimento) com os corpos d'água que fazem a drenagem da bacia do Rio Preto, principal corpo hídrico da região (IBGE, 1974; Google, 2009).....	44
Figura 10 : Imagem de satélite em alta definição de um dos pontos de coleta georreferenciados mostrando a extensão da área cultivada em relação a propriedade, relevo do terreno (região de serra) e proximidade da mata (Google, 2009).....	45
Figura 11 : Cromatograma de separação dos agrotóxicos estudados	47
Figura 12 : Curvas Analíticas dos Agrotóxicos G1 (4,4' DDT, alfa-Endossulfan, alfa-HCH, beta-HCH, delta-HCH, e Endrin).	50
Figura 13: Curvas Analíticas dos Agrotóxicos G1 (Gama-HCH, Hexaclorobenzeno e Metoxicloro) e G2 (2,4' DDT, beta-Endossulfan e Trifluralina).	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Características Físico-químicas dos Agrotóxicos Utilizados	12
Tabela 2 : Níveis de Precisão recomendáveis para a Validação de Métodos Analíticos (APVMA, 2004).....	19
Tabela 3 : Vidraria, Frascos e Material Volumétrico Utilizados no Desenvolvimento do Método.....	20
Tabela 4 : Equipamentos Utilizados no Desenvolvimento do Método	21
Tabela 5 : Padrões e Solventes Utilizados para o Desenvolvimento do Método	22
Tabela 6 : Esquema de Preparo das Soluções Intermediárias de Fortificação G1 e G2.....	24
Tabela 7 : Condições Cromatográficas de Análise.....	25
Tabela 8 : Os cinco municípios com os maiores rendimento dos seis produtos agrícolas cultivados no Estado e acompanhados ininterruptamente pelo ASPA (EMATER/RJ, 2007)	39
Tabela 9 : Condição de abastecimento por solução alternativa da população total e rural dos municípios fluminenses	40
Tabela 10: Coordenadas das amostras coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto.....	41
Tabela 11 : Parâmetros cromatográficos de separação dos agrotóxicos de G1 e G2	46
Tabela 12 : Comparação entre os TRs das Substâncias de Interesse em n-hexano, Extraídas em Tetracloroetileno e Extraídas em Clorobenzeno.....	48
Tabela 13 : Equações das Curvas Analíticas Obtidas para os Agrotóxicos Estudados.....	49
Tabela 14: Valores de Intervalo de Trabalho para os Agrotóxicos Estudados.....	52
Tabela 15 : Comparação da Eficiência da extração com tetracloroetileno e clorobenzeno com posterior mudança de solvente para n-hexano, e clorobenzeno sem mudança de solvente.....	53
Tabela 16: Fatores de Enriquecimento obtidos na Extração dos Agrotóxicos Estudados...	54
Tabela 17: Valores de Coeficiente de Variação Obtidos nas Extrações dos Agrotóxicos Estudados.....	54
Tabela 18: Limites de LD e LQ para os agrotóxicos estudados em comparação com os VMPs da Port. 518/04 – MS.....	55

Tabela 19: Resultado da Análise das Amostras Coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto 56

SIGLAS E ABREVIATURAS

μg	Micrograma, 10^{-6} g
μL	Micro litro, 10^{-6} L
a	Coefficiente Angular da Reta
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APVMA	Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority
ASPA	Acompanhamento Sistemático da Produção Agrícola
ATP	Adenosina trifosfato
ATSDR	Agency for Toxic Substances & Disease Registry
b	Coefficiente Linear da Reta
BHC	Hexacloro de Benzila
CAS	Chemical Abstracts Service
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Universidade de São Paulo
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CG/DCE	Cromatografia a Gás acoplada ao Detector por Captura de Elétrons
CG/EM	Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas
CIDE	Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CV	Coefficiente de Variação
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DP	Desvio padrão
ELL	Extração Líquido-líquido
EMATER/RJ	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro
EPA	United States Environmental Protection Agency
EURACHEM	Organização Européia voltada ao sistema internacional de rastreadibilidade de medições químicas e à promoção de boas práticas em qualidade

FE	Fator de Enriquecimento
g	Gramas
G1	Solução de agrotóxicos contendo padrões do grupo de substâncias 4,4'DDT, alfa-endossulfam, alfa-HCH, beta-HCH, delta-HCH, endrin, gama-HCH, hexaclorobenzeno e metoxicloro
G2	Solução de agrotóxicos contendo padrões do grupo de substâncias 2,4'DDT, beta-endossulfam e trifluralina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPS	Sistema de Posicionamento Global
ha	Hectare
HCH	Hexaclorociclohexano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCHEM	International Safety Information from Intergovernmental Organizations
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	International Organization for Standardization
k	Fator de Retenção
K_d	Coefficiente de Distribuição
K_{oc}	Coefficiente de partição carbono orgânico-água
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
L	Litro
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEFL	Microextração em Fase Líquida
MEGU	Microextração em Gota Única
MELLD	Microextração Líquido-líquido Dispersiva
mg	Miligramas
min.	Minuto
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de Mercúrio

MS	Ministério da Saúde
n	Espaço Amostral
NEMI	National Environmental Methods Index
ng	Nanograma, 10^{-9} g
Ni ⁶³	Níquel 63
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PA	Para análise
PAN	Pesticide Action Network
PIB	Produto Interno Bruto
Port.	Portaria
r ²	Coefficiente de Correlação Linear
Rs	Resolução
S/Q _i	Razão Sinal/Concentração no iésimo ponto da curva analítica
Sa	Desvios dos Coeficientes Angulares das Retas
Sb	Desvios dos Coeficientes Lineares das Retas
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
S _{y/x}	Desvio da Distribuição dos Pontos y em função de x ao longo da reta
t	Valor Crítico da distribuição t de Student
ton	Tonelada
t _{Rs}	Tempos de Retenção
v/v	Volume por volume
VMP	Valor Máximo Permitido
WHO	World Health Organization
α	Fator de Separação

ÍNDICE

Página de Assinaturas.....	iii
Ficha Catalográfica.....	iv
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Siglas e Abreviaturas.....	xii
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	5
3 O Uso dos Agrotóxicos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro.....	5
4 Seleção dos Objetos de Análise.....	8
4.1 Relevância Histórica e Sanitária.....	9
4.2 Características Físico-químicas e Toxicológicas.....	10
5 Validação de Metodologia Analítica.....	14
5.1 Seletividade.....	15
5.2 Linearidade.....	16
5.3 Intervalo de Trabalho.....	16
5.4 Exatidão.....	17
5.4.1 Recuperação.....	17
5.5 Precisão.....	18
5.6 Limite de Detecção (LD).....	19
5.7 Limite de Quantificação (LQ).....	19
6 Materiais e Método Analítico.....	20
6.1 Vidraria Utilizada.....	20
6.2 Equipamentos Utilizados.....	20
6.3 Limpeza do Material.....	21
6.4 Padrões e Solventes.....	21
6.5 Preparo das Soluções Padrão.....	22

6.5.1 Preparo das Soluções Intermediárias.....	23
6.6 Condições Cromatográficas.....	25
6.7 Método de Análise.....	26
6.7.1 Seleção do Método de Análise	26
6.7.2 Método de Extração.....	31
6.7.2.1 Escolha do Solvente de Extração	32
6.8 Metodologia para Validação.....	33
6.8.1 Estudo da Seletividade	33
6.8.2 Estudo da Linearidade e Intervalo de Trabalho.....	35
6.8.3 Estudo da Exatidão, Recuperação e Incerteza.....	36
6.8.4 Estudo da Precisão.....	37
6.8.5 Estudo dos Limites de Detecção e de Quantificação.....	37
7 Metodologia de Amostragem	37
7.1 Coleta das Amostras	41
7.2 Análise das Amostras	45
8 Resultados e Discussão.....	45
8.1 Especificidade do Método Analítico	45
8.2 Linearidade do Método Analítico.....	48
8.3 Exatidão e Precisão.....	52
8.4 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	55
8.5 Aplicação do Método Desenvolvido – Resultado das Amostras.....	56
9 Conclusões.....	57
10 Referências Bibliográficas.....	59

1 Introdução

A disponibilidade de água é uma condição indispensável para a própria vida e mais que qualquer outro fator, a qualidade da água condiciona a qualidade de vida. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) e seus países membros, “todas as pessoas, em quaisquer estágios de desenvolvimento e condições sócio-econômicas têm o direito de ter acesso a um suprimento adequado de água potável e segura”. “Segura”, neste contexto, refere-se a uma oferta de água que não representa um risco significativo à saúde, que é de quantidade suficiente para atender a todas as necessidades domésticas, que está disponível continuamente e que tenha um custo acessível (OPAS, 2001).

A Constituição Federal de 1988 traz em seu texto princípios fundamentais e necessários para a construção e manutenção de uma sociedade num ambiente em que o homem viva em condições saudáveis e harmoniosas. Para tanto, dispõe em seu artigo 196 que a saúde é um direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos, e coloca em seu artigo 200 o Setor Saúde como ator principal da elaboração e execução destas políticas, criando através da Lei Federal nº 8.080 de 19 de setembro de 1990 o Sistema Único de Saúde (SUS). Dentre as atribuições do SUS estão contempladas ações de saneamento básico, fiscalização e inspeção da água de consumo humano, e colaboração na proteção do meio ambiente. Como desdobramento das políticas de promoção da saúde implementadas desde a criação do SUS, no âmbito da água de consumo humano temos em última instância a promulgação da Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Em sua tabela 3, a Portaria 518/2004 apresenta o padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde e estabelece os valores máximos permitidos (VMP) em água para consumo humano para uma série de agrotóxicos, em sua maioria substâncias organocloradas, incluindo e/ou excluindo vários princípios ativos, com base em informações sobre a comercialização de diversos produtos no Brasil e a permissão de uso pelo Ministério da Saúde. Alguns foram mantidos, apesar de já banidos e de não serem mais comercializados no país, em virtude da sua prolongada persistência no meio

ambiente. Todos os VMP adotados coincidem com os recomendados pela OMS (SVS, 2006).

No entanto, somente a água distribuída pela rede geral de abastecimento tem a sua qualidade avaliada através do monitoramento realizado pelas companhias distribuidoras em seus laboratórios de controle da qualidade. O abastecimento através de soluções alternativas, por ser uma realidade em âmbito nacional, também tem seu monitoramento previsto pela legislação. Tecnicamente, a Portaria 518 define solução alternativa de abastecimento de água para consumo humano como “toda modalidade de abastecimento coletivo de água distinta do sistema de abastecimento de água, incluindo, entre outras, fonte, poço comunitário, distribuição por veículo transportador, instalações condominiais horizontal e vertical”. O monitoramento da qualidade da água das soluções alternativas apresenta uma dificuldade peculiar pois, principalmente nos casos das soluções coletivas, não há um responsável pelo abastecimento ao qual possa ser formalmente imputado o controle da qualidade da água fornecida. Mesmo nos casos das soluções alternativas individuais, o proprietário ou responsável, normalmente não dispõe das condições técnicas ou conhecimentos necessários para o efetivo controle da qualidade da água e para a tomada de ações corretivas quando necessário. Além disto, mesmo que a qualidade da água das soluções alternativas não possa ser assegurada, o acesso à água não pode ser cerceado, pois mais do que um bem, a água é um direito.

Nesse sentido, é primordial a função do poder público na fiscalização das atividades das companhias distribuidoras de água tratada, bem como o cumprimento do seu dever constitucional de assegurar o acesso a água segura e de qualidade através do monitoramento das soluções alternativas de abastecimento.

A Portaria 1.172 de 15 de junho de 2004 do Ministério da Saúde, que regulamenta a Norma Operacional Básica do SUS 01/96, no que se refere às competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal, na área de Vigilância em Saúde preconiza as responsabilidades das três esferas de governo nas ações de monitoramento da qualidade da água para consumo humano, incluindo ações de coleta e provimento dos exames laboratoriais. As análises de resíduos de agrotóxicos são consideradas análises de alta complexidade que ficam a cargo do ente Estadual através dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública, os LACENS. Os LACENS são os Laboratórios de Referência Estaduais que

fazem parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, instituído pela Portaria nº 2.031 de 23 de setembro de 2004 do Ministério da Saúde, prestam serviços de apoio diagnóstico às três modalidades de vigilância que compõem a Vigilância em Saúde (Sanitária, Epidemiológica e Ambiental em Saúde), e promovem uma interface de integração entre as mesmas, uma vez que participam ativamente no desenvolvimento de políticas e ações de vigilância no âmbito estadual. Deste modo, é correto afirmar que os LACENS são unidades integrantes da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Ambiental em Saúde, onde dentre suas atividades principais está incluída a vigilância da qualidade da água para consumo humano.

A exemplo dos compêndios da Agência Americana de Proteção Ambiental, existem vários métodos publicados que são utilizados pelos órgãos reguladores governamentais para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes ambientais. Invariavelmente, esses métodos baseiam-se em técnicas cromatográficas de separação, diferindo uns dos outros basicamente na forma de tratamento dado às amostras durante a etapa de coleta e extração, e quanto ao tipo de detecção utilizada, dependendo das características químicas das amostras e dos analitos, e dos limites de detecção e/ou quantificação que se deseja alcançar (NEMI, 2009).

Especificamente para os organoclorados, sua relevância para o meio ambiente fez com que numerosos trabalhos de pesquisa fossem desenvolvidos a fim de se determinar em nível de traços a contaminação em matrizes ambientais. A toxicidade e ubiquidade dessa classe de substâncias torna sua análise necessária mesmo quando presente em concentrações tão baixas quanto partes por bilhão. Além disso, à medida em que se aumenta o peso molecular, a separação entre as substâncias de interesse e possíveis interferentes torna-se cada vez mais difícil, particularmente quando a estrutura química dos interferentes é similar à dos analitos. Por estas razões e pela necessidade de se levar o procedimento analítico aos menores limites de detecção tecnologicamente disponíveis, a utilização de técnicas sofisticadas se faz necessária. A cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons (CG/DCE) ou acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), associada a etapas de limpeza e pré-concentração analítica, é a técnica que melhor atende a estes requisitos (NOLLET, 2006).

Entretanto, restrições orçamentárias podem comprometer a adequada vigilância da qualidade da água para consumo humano. Estudo realizado por Bastos (2003) estimou que para a realização das análises de todos os parâmetros estabelecidos pela Portaria 518/2004, seriam necessários cerca de R\$ 2.745 por amostra (em valores da época). Sendo de R\$ 830 o custo por amostra da análise apenas para os agrotóxicos. O mesmo estudo estima ainda que para capacitar um laboratório para a execução dessas análises, são necessários investimentos de cerca de R\$ 656.000, apenas em equipamentos e vidraria, sem levar em conta estrutura física, mão-de-obra, padrões e reagentes.

Além disso, deve-se ter em mente que o próprio laboratório é um agente poluidor e gerador de resíduos. O aumento da consciência e da responsabilidade ambiental no mundo, e o advento da química verde, impulsionaram a busca por métodos mais econômicos e ecologicamente corretos, trazendo uma tendência de diminuição dos volumes de produtos químicos utilizados no pré-tratamento e análise das amostras. Segundo os princípios defendidos pela química verde de prevenção da geração de resíduos, utilização de solventes e adjuvantes mais seguros, utilização mais eficiente da energia, e minimização do potencial de acidentes químicos, a miniaturização dos processos de extração tem sido uma resposta dominante para a questão ambiental, pois apresenta uma série de vantagens como maior simplicidade, mais rapidez, menor custo, minimização das etapas de manuseio da amostra, maior precisão e maior sensibilidade. Além disso, requer o uso de menores quantidades de amostra e de reagentes caros e tóxicos (NOLLET, 2006; KOEL, 2006).

Nesse sentido, é mister o desenvolvimento de metodologias analíticas com a sensibilidade adequada e que possam atrelar baixo custo à baixa geração de resíduos e preservação do ambiente, auxiliando o poder público na efetiva realização da vigilância da qualidade da água para consumo humano.

2 Objetivos

Baseando-se nas argumentações anteriormente expostas e devido à relevância social, ambiental e legal da vigilância da qualidade da água para consumo humano no Estado do Rio de Janeiro, este trabalho tem como objetivo:

- 1 – Validar e implementar uma metodologia multirresíduo para análise de agrotóxicos organoclorados em água para consumo humano no Laboratório Central Noel Nutels/Rio de Janeiro, visando o menor custo, menor tempo de execução, e menor geração de resíduos.
- 2 – Realizar uma avaliação preliminar do nível de contaminação por organoclorados em soluções alternativas de abastecimento na zona rural do Estado do Rio de Janeiro.

3 O Uso dos Agrotóxicos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro

É de conhecimento público que o Brasil é um país agro-exportador. Segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Universidade de São Paulo (CEPEA) e da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), em 2007 o agronegócio foi responsável por cerca de 23% do produto interno bruto brasileiro (PIB), superando a marca dos R\$ 611 bilhões. A participação do agronegócio no PIB se mantém acima dos 22% desde 1996. Abordando especificamente a contribuição da agricultura, o valor bruto da produção ultrapassou em 2007 os R\$ 138 bilhões, obtendo, juntamente com os insumos agrícolas, uma participação no PIB de 2007 cerca de 6,8% e 13,9% maiores do que em 2006, respectivamente (CNA, 2008). No desempenho apresentado pelos insumos agrícolas, uma grande parcela deve-se ao consumo de adubos, fertilizantes e agrotóxicos.

Dados fornecidos pela Associação Brasileira da indústria Química (ABIQUIM) apontam que em 2004 o Brasil consumiu US\$ 4,2 bilhões em agrotóxicos. Considerando-se, assim, o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos, o Brasil aparece em 4º lugar no “*ranking*” (ANVISA, 2005; 2007). Em 2007, a indústria do agrotóxico teve um faturamento líquido de US\$ 5,4 bilhões, um incremento

de US\$ 1,2 bilhões em apenas três anos, e que por si só foi responsável por cerca de 0,17% do PIB brasileiro no ano (ABIQUIM, 2008).

A manutenção deste alto consumo e produtividade só é possível graças ao modelo de produção agrícola adotado no Brasil marcadamente a partir da década de 60 e que perdura até os dias de hoje. Conhecido como “Revolução Verde” este modelo preconiza sob a forma de pacotes tecnológicos, a priorização do subsídio de créditos agrícolas para o cultivo em grandes extensões de terra, mecanização da lavoura e, principalmente, a utilização de fertilizantes químicos e de formulações de agrotóxicos, com vistas à agricultura de exportação, à produção de processados para a exportação e à diferenciação do consumo (MOREIRA, 2000).

Os efeitos da Revolução Verde se fez sentir nas principais regiões agrícolas do país. No entanto, no Estado do Rio de Janeiro estes efeitos não foram tão pronunciados. Comparando-se com a produção nacional das principais culturas, a contribuição do Estado do Rio de Janeiro não é significativa. Isto provavelmente se deve às suas características históricas e geográficas. O Estado do Rio de Janeiro é um Estado populoso que abriga 17,32% da população urbana nacional, e uma das duas metrópoles globais do país, além de integrar o sistema urbano centro-sul, que corresponde ao cinturão urbano-industrial do território nacional e seus prolongamentos (como os sistemas urbanos-regionais de São Paulo, Belo Horizonte, Curitiba e Porto Alegre), caracterizados pela concentração da sua população em cidades, e refletindo, portanto, altos índices de urbanização e metropolização (Motta e Ajara, 2001). Porém, a pequena extensão territorial do Estado, correspondente a apenas 0,51% do território nacional, é cortada longitudinalmente pelas formações rochosas da Serra do Mar, sendo a estreita faixa restante de planícies costeiras e fluviais, e os vales formados pela depressão do Rio Paraíba do Sul (Figura 1), divididos entre os aglomerados populacionais e industriais (IBGE, 2006). Por este motivo, uma das áreas de ocupação mais antigas do país, o Estado do Rio de Janeiro teve o desenvolvimento do seu sistema urbano marcadamente litorâneo e estreitamente relacionado com o dinamismo econômico ao longo dos eixos rodoviários em direção à Região do Lagos, a São Paulo e a Santos, que serviram de rota de processamento dos gêneros agrícolas do país e escoamento da produção para exportação através do porto de Santos e do Rio de Janeiro (MOTTA e AJARA, 2001; GALVÃO, 1996).

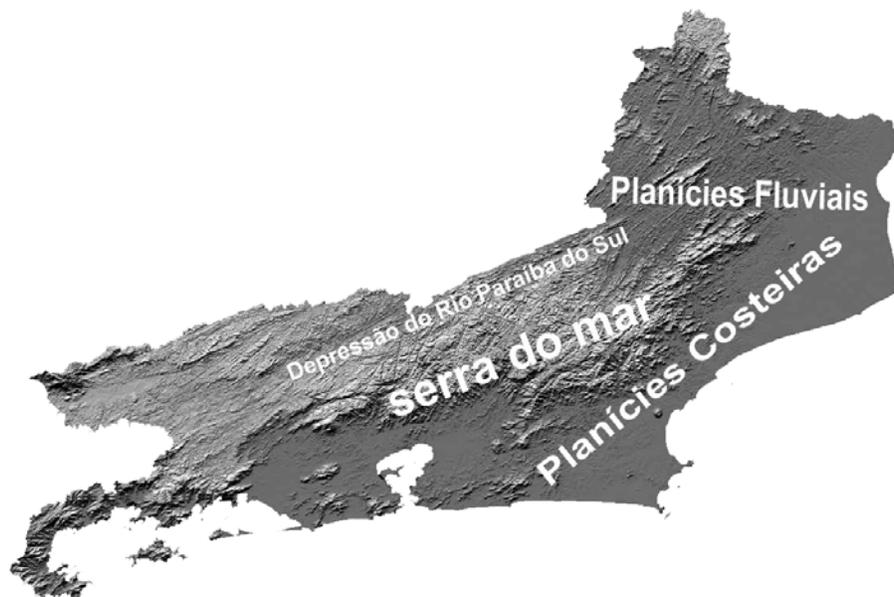


Figura 1 : Relevo do Estado do Rio de Janeiro (adaptado de IBGE, 2006)

Conseqüentemente, a produção agrícola do Estado concentra-se em pequenas propriedades rurais, em sua maioria familiares, próximas às cidades, e com partes importantes do processo produtivo, como a aplicação de agrotóxicos e a colheita, sendo desenvolvidas manualmente. Apesar disto, em 1994 estas propriedades somavam 9,4% do uso do solo do Estado e, em 2002, a produção agropecuária fluminense superou a marca de R\$ 1,5 bilhão (CIDE, 2006), com uma safra de cerca de 7.583.490,5 toneladas em 251.399,85 hectares de área colhida. Já em 2005 a safra atingiu 7.129.995 toneladas em 222.680 hectares de área colhida, cerca de 2 toneladas por hectare a mais do que em 2002 (EMATER/RJ, 2007). Tendo em vista o modelo atual de produção agrícola, há de se especular o uso intensivo de agrotóxicos nesta relativamente pequena extensão de terra, em comparação com as demais regiões agrícolas do país.

O Brasil possui uma legislação de agrotóxicos evoluída, exigente e restritiva, que cuida, além da necessidade de comprovação da eficiência agrônômica, das garantias da minimização dos perigos ao ser humano, seja de caráter ocupacional ou alimentar, e das ameaças ao meio ambiente provenientes desses produtos químicos. Antes a avaliação ambiental restringia-se à classificação da periculosidade de cada agrotóxico, baseada em dados ecotoxicológicos do produto comercial. Hoje é necessária a avaliação dos riscos ambientais de cada produto, considerando, além da ecotoxicidade, a exposição dos organismos nos diferentes compartimentos ambientais, o que demanda um mais amplo e

profundo entendimento de como os agrotóxicos se comportam no ambiente depois de aplicados e de quais efeitos podem causar aos vários organismos (SPADOTTO, 2006).

Um importante aspecto a considerar, sobretudo no Estado do Rio de Janeiro em virtude da sua geografia, é a existência de atividades agrícolas em ambientes ecologicamente frágeis como áreas declivosas, próximas às nascentes, riachos e áreas de recarga de aquíferos, que podem fazer parte de sistemas de drenagem de grandes rios, que, por sua vez, fornecem água para o abastecimento dos centros urbanos. A contaminação de um corpo d'água por agrotóxicos ocorre principalmente de forma difusa, o que evidentemente dificulta a adoção de medidas que impeçam sua chegada aos rios e lagos. A única forma de combate ao problema é por meio de uma racionalização no uso de agrotóxicos, envolvendo campanhas esclarecedoras e utilização de mecanismos institucionais e legais para limitação de seu emprego (SVS, 2006).

4 Seleção dos Objetos de Análise

Dentre o rol de substâncias químicas que representam risco à saúde listadas na Portaria nº 518 de 2004 estão 24 agrotóxicos, matérias-primas e subprodutos pertencentes às classes dos inseticidas organoclorados, herbicidas triazínicos e tiadiazínicos, herbicidas do grupo das nitroanilinas, das amidas substituídas, dos clorofenoxiácidos, das glicinas, e fungicidas fenólicos. Porém, em sua maioria, os agrotóxicos listados pertencem à classe dos inseticidas organoclorados.

Baseando-se na tabela 3 da Portaria 518/2004 e de acordo com a disponibilidade, para a realização deste trabalho foram selecionados 11 agrotóxicos organoclorados e 1 do grupo das nitroanilinas (trifluralina) (figura 2) cujos padrões foram cedidos pelo Laboratório de Resíduos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e pelo Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Embora não seja propriamente um organoclorado, a trifluralina é um agrotóxico halogenado e apresenta boa resposta quando analisada por CG/DCE. Por este motivo ela também foi selecionada.

4.1 Relevância Histórica e Sanitária

O uso dos agrotóxicos organoclorados iniciou-se após a Segunda Guerra Mundial nos anos 40 e 50, quando então surgia um novo conceito de controle de pragas – emergia a era dos compostos sintéticos de altíssima eficácia. O uso extensivo dos pesticidas sintéticos foi inicialmente recebido com grande entusiasmo pelos produtores, pois além de reduzir drasticamente as perdas de produção pelo ataque de pragas, ainda protegia os grãos durante sua estocagem. Contudo, no decorrer de alguns anos, tornou-se evidente que estes agrotóxicos e seus resíduos contaminavam os solos, as águas subterrâneas e superficiais em função da sua persistência e estabilidade no ambiente. Com o tempo, o uso dos agrotóxicos organoclorados foi sendo gradualmente abolido das nações industrializadas, porém alguns agentes continuam em utilização nos países emergentes, sobretudo nos países das regiões tropicais em função do seu baixo custo, eficácia, e relevância para a saúde pública. Banido dos Estados Unidos no início dos anos 70, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), por exemplo, foi amplamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial para o controle da malária e do tifo, e em 1994 ainda era produzido e exportado por este país na ordem de uma tonelada por dia (KLAASSEN, 2001; MANAHAN, 2003). O hexaclorociclohexano (HCH) de grau técnico, banido do Canadá, Estados Unidos, China, União Soviética e Austrália em 1971, 1976, 1983, 1990 e 1994, respectivamente, ainda é utilizado em uma série de países africanos, e na Índia, foi completamente banido apenas em 2006 (KLAASSEN, 2001; NOLLET, 2006). A relação risco-benefício ainda pesa em favor da manutenção destas substâncias no controle de vetores de muitas doenças endêmicas e epidêmicas nessas regiões (KLAASSEN, 2001).

Contudo, a ocorrência em elementos do ambiente como o solo e a água, inclusive em regiões “intocadas” como as regiões Árticas e Antárticas, traz preocupações quanto às questões de saúde. De fato, como consequência do processo de bioacumulação, as substâncias organocloradas são encontradas em vários organismos em concentrações ainda maiores do que nos ambientes de onde originaram-se. Isto é particularmente verdade para espécies predadoras e que estão no topo da cadeia alimentar, como o homem (NOLLET, 2006).

4.2 Características Físico-químicas e Toxicológicas

A popularidade dos agrotóxicos organoclorados, bem como a preocupação por eles causada, se devem a algumas propriedades físico-químicas importantes. Estas substâncias são extremamente estáveis, possuem baixa solubilidade em água, alta solubilidade em solventes orgânicos, alta toxicidade para os insetos e relativa baixa toxicidade aguda para o homem (KLAASSEN, 2001). As características dos agrotóxicos utilizados nesse estudo estão resumidas na tabela 1.

Os agrotóxicos organoclorados possuem massa molecular intermediária e contêm pelo menos um anel, sendo este aromático ou não. Podem ser classificados em quatro classes principais. A primeira consiste nos derivados do cloroetileno, onde o DDT e o metoxicloro são seus principais representantes. A segunda é composta pelos ciclodienos clorados, incluindo o endrin e o endossulfan. Os estereoisômeros do hexacloreto de benzila (BHC) compõem a terceira classe, e o grupo coletivamente conhecido como toxafeno corresponde à quarta classe (MANAHAN, 2003). Entretanto, nenhum membro do grupo dos toxafenos faz parte do rol de substâncias que devem ser monitoradas segundo a Portaria nº 518/04 – MS.

Os inseticidas organoclorados, apesar de sua baixa toxicidade aguda para o homem, possuem seus efeitos tóxicos distribuídos numa ampla faixa com diferentes graus de toxicidade. Muitos dessas substâncias são neurotóxicas e seus efeitos agudos mais proeminentes costumam se manifestar no sistema nervoso através de sintomas como tremores, movimentos irregulares dos olhos, mudanças de personalidade e perda de memória. Acredita-se que sua ação tóxica é exercida pela interferência na troca de cátions através da membrana das células nervosas, causando hiperatividade dos nervos (WILLIAMS, 2000; MANAHAN, 2003).

O DDT de grau técnico consiste numa mistura de 3 dos seus isômeros: 4,4'DDT (85%), 2,4'DDT (15%), e 2,2'DDT (traços). No ambiente, o DDT sofre bioacumulação na cadeia alimentar, sendo os animais do topo da cadeia os mais atingidos. O metoxicloro é, em geral, mais biodegradável e menos tóxico que o DDT, sendo, por isso, utilizado como seu substituto. Os sintomas da intoxicação aguda por DDT são muito similares aos previamente descritos. O mecanismo de ação se dá ao nível da membrana neuronal afetando a permeabilidade do íon potássio e o funcionamento do sistema sódio-potássio-

ATPase, o que reduz a taxa de despolarização da membrana, causando a hipersensibilização dos nervos (KLAASSEN, 2001).

As toxicidades dos inseticidas ciclodieno clorados, como o endrin e o endossulfan, são relativamente altas e similares entre si. Seus efeitos parecem se dar mais no sistema nervoso central do que no periférico, através da liberação de ésteres de betaína que causam dores de cabeça, náuseas, vertigens, vômitos, e convulsões (MANAHAN, 2003). Essa classe de organoclorados também atua no sistema sódio-potássio-ATPase, porém o principal mecanismo para a hiperexcitabilidade neuronal se dá pela interferência no sistema gabaérgico antagonizando a recaptção de íons cloro pelos receptores GABA (KLAASSEN, 2001).

Os hexaclorociclohexanos erroneamente chamados no passado de hexacloretos de benzila (BHC), consistem em vários estereoisômeros com diferentes orientações dos átomos de cloro e hidrogênio. O isômero gama, conhecido comercialmente como *lindano*, é um inseticida potente cujos efeitos tóxicos são similares aos do DDT. O mecanismo de ação tóxica é similar ao dos ciclodienos clorados (KLAASSEN, 2001). Como sintomas já foram relatados degeneração dos túbulos renais, danos hepáticos e anemia histoplástica em indivíduos intoxicados pelo lindano (MANAHAN, 2003).

A trifluralina é uma dinitroanilina, ou melhor, uma fluorodinitrotoluidina. A maioria dos compostos nitroaromáticos são lipossolúveis e insolúveis em água, o que permite com que sejam prontamente absorvidos pela pele e pelos pulmões e cause seus efeitos tóxicos sistêmicos. Os efeitos tóxicos mais pronunciados dos compostos nitroaromáticos são depressão do sistema nervoso central, metaemoglobinemia, câncer urinário, hematúria, cistite, anemia, e irritação cutânea (WILLIAMS, 2000). Entretanto, a trifluralina não é capaz de causar metaemoglobinemia provavelmente em função de sua estrutura molecular, o que lhe confere uma relativa baixa toxicidade (EPA, 1999).

A trifluralina exerce sua ação herbicida atuando como veneno mitótico, interferindo no crescimento celular das raízes, e também afetando outras reações metabólicas como a síntese de lipídeos e a recaptção de cálcio pela mitocôndria vegetal. Por ser bioacumulativa e por possuir semelhança estrutural com a etilfluralina, substância considerada carcinogênica para animais, a trifluralina é classificada como “possível carcinogênico humano” (HEALTH CANADA, 1992; ENVIRONMENT CANADA, 1999).

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas dos agrotóxicos estudados e a Figura 2 suas respectivas estruturas.

TABELA 1 : Características Físico-químicas dos Agrotóxicos Utilizados

<i>Propriedade</i>	<i>Endrin</i>	<i>α-Endossulfan</i>	<i>β-Endossulfan</i>	<i>Trifluralina</i>
CAS	72-20-8	959-98-8	33213-65-9	1582-09-8
Formula Molecular	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃
Peso Molecular	380,9	406,93	406,93	335,3
Ponto de Fusão	235°C	108-110°C	208-210°C	49°C
Ponto de Ebulição	Decompõe a 245°C	Sem Informação	Sem Informação	139-140°C (3,75mmHg)
Log K_{ow}	5,34	3,83	3,52	5,07
Log K_{oc}	4,53	3,55	Sem Informação	Sem Informação
Solubilidade em H₂O	0,2mg/L (25°C)	0,53mg/L (25°C)	0,28mg/L (25°C)	0,2 mg/L (25°C)
Pressão de Vapor (25°C)	2,0x10 ⁻⁷ mmHg	1,0x10 ⁻⁵ mmHg	1,0x10 ⁻⁵ mmHg	1,05x10 ⁻⁴ mmHg
Fonte	ATSDR (1996)	ATSDR (2000)	ATSDR (2000)	Health Canada (1992); INCHEM (1994)

<i>Propriedade</i>	<i>4,4 DDT</i>	<i>2,4 DDT</i>	<i>Hexaclorobenzeno</i>	<i>Metoxicloro</i>
CAS	50-29-3	789-02-6	118-74-1	72-43-5
Formula Molecular	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	C ₆ Cl ₆	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂
Peso Molecular	354,49	354,49	284,78	345,65
Ponto de Fusão	109°C	74,2°C	231°C	89°C
Ponto de Ebulição	Decompõe	Sem Informação	325°C	Sem Informação
Log K_{ow}	6,91	6,79	5,73	4,68-5,08
Log K_{oc}	5,18	5,35	6,08	4,9
Solubilidade em H₂O	0,025mg/L (25°C)	0,085mg/L (25°C)	0,006mg/L (25°C)	0,045mg/L (25°C)
Pressão de Vapor (25°C)	1,60x10 ⁻⁷ mmHg	1,1x10 ⁻⁷ mmHg	1,09x10 ⁻⁵ mmHg	1,4x10 ⁻⁶ mmHg
Fonte	ATSDR (2002)	ATSDR (2002)	ATSDR (2002)	ATSDR (2002)

<i>Propriedade</i>	<i>α-HCH</i>	<i>β-HCH</i>	<i>γ-HCH</i>	<i>δ-HCH</i>
CAS	319-84-6	319-85-7	58-89-9	319-86-8
Formula Molecular	C ₆ H ₆ Cl ₆			
Peso Molecular	290,83	290,83	290,83	290,83
Ponto de Fusão	159-160°C	314-315°C	112,5°C	141-142°C
Ponto de Ebulição	288°C	60°C(0,5mmHg)	323,4°C	60°C (0,36mmHg)
Log K_{ow}	3,8	3,78	3,72	4,14
Log K_{oc}	3,57	3,57	3,0	3,8
Solubilidade em H₂O	10 mg/L	05 mg/L	17 mg/L	10 mg/L
Pressão de Vapor (25°C)	4,5x10 ⁻⁵ mmHg	3,6x10 ⁻⁷ mmHg	4,2x10 ⁻⁵ mmHg	3,5x10 ⁻⁵ mmHg
Fonte	ATSDR (2005)	ATSDR (2005)	ATSDR (2005)	ATSDR (2005)

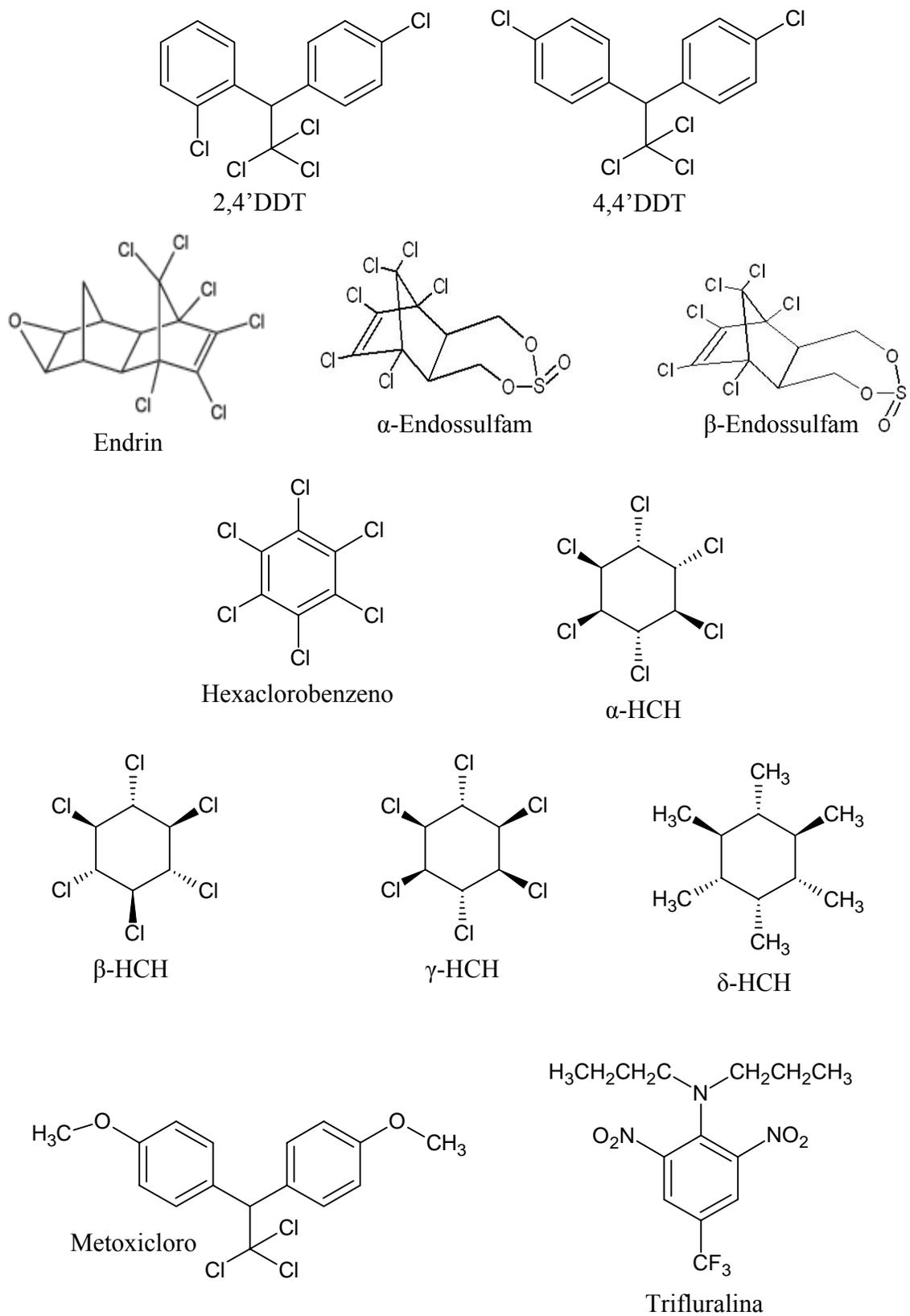


Figura 2 : Estrutura dos agrotóxicos utilizados (PAN, 2009)

5 Validação de Metodologia Analítica

Uma das principais funções de uma determinada análise é prover informações de qualidade para a tomada de decisão na solução de um dado questionamento. Os resultados obtidos por meio de análises químicas são os principais argumentos para o estabelecimento de leis e diretrizes, a exemplo dos regulamentos para a emissão de compostos orgânicos voláteis estabelecidos pela Convenção de Viena e Protocolo de Montreal, e o banimento de poluentes orgânicos persistentes estabelecidos pelo Protocolo de Estocolmo (KOEL, 2006). Nesse intuito, milhares de análises químicas são realizadas diariamente, mundo afora, em diferentes contextos. Porém, a execução de forma sistemática dessas análises demanda custos, e custos adicionais podem ainda ser consequências de decisões norteadas pelos resultados analíticos fornecidos. Portanto, é evidente a necessidade do método analítico em fornecer o resultado correto a um dado questionamento e ainda ser capaz de demonstrar que o seu resultado é o correto. Ou seja, é necessário demonstrar que o método é confiável. Quando um resultado não é considerado confiável, o seu valor é praticamente nulo, quase como que se a análise nunca tivesse sido realizada. Quando um “cliente” requer o serviço analítico de um laboratório, assume-se que o laboratório tenha um grau de expertise que o cliente não tem. Portanto, o cliente espera poder confiar no resultado do laboratório. Assim, o laboratório e a sua equipe têm a clara responsabilidade de justificar a confiança do cliente e fornecer a resposta certa à parte analítica do problema, ou seja, os resultados têm que demonstrar que são adequados ao fim pretendido. A validação de um método analítico, portanto, permite ao laboratório demonstrar que o método escolhido é adequado ao fim pretendido.

Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO) entende-se por validação a “confirmação por meio do fornecimento de evidência clara e objetiva de que um determinado requisito para um uso específico é atendido.” Especificamente para métodos analíticos pode-se dizer que a validação consiste no processo de definir o requisito analítico, e confirmar que o método escolhido possui uma performance consistente com os requisitos do seu propósito. Considera-se que a validação de um método analítico está muito próxima do desenvolvimento de um método analítico. De fato, é muito difícil saber

onde o desenvolvimento acaba e a validação se inicia, pois muitos dos parâmetros avaliados são comuns a ambos os processos (EURACHEM, 1998).

O desenvolvimento de um método analítico pode se dar de diferentes formas. Pode envolver a adaptação de um método já existente através de pequenas alterações para que fique adequado a uma nova aplicação, ou pode partir das idéias, da experiência e da expertise dos analistas de um laboratório. Porém, de um jeito ou de outro, o método desenvolvido requererá validação. Para um método ser adequado ao fim pretendido, a sua performance deve ser validada e a incerteza dos resultados estimada. A maior parte das informações necessárias à estimação da incerteza pode ser obtida durante as etapas de validação do método (EURACHEM, 1998).

As características típicas de validação que devem ser avaliadas para um determinado método ser considerado adequado ao fim pretendido são: seletividade (especificidade), linearidade, intervalo de trabalho, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003; APVMA, 2004).

5.1 Seletividade

A seletividade de um método refere-se à medida em que um dado analito em uma matriz complexa pode ser determinado sem a interferência de outros componentes da mistura. Os termos seletividade e especificidade frequentemente são utilizados como sinônimos, porém são sutilmente distintos. O termo especificidade geralmente se refere ao método capaz de produzir uma resposta a apenas um único analito, enquanto que o termo seletividade se refere ao método que proporciona respostas para um número de espécies químicas que podem ou não ser distinguíveis entre si. Se uma resposta puder ser distinguida de todas as outras, o método é, então, considerado seletivo. Como pouquíssimos métodos são capazes de responder a somente um tipo de analito, o uso do termo seletividade é mais apropriado do que especificidade (APVMA, 2004).

A presença de interferentes pode causar uma série de efeitos na resposta do método analítico. Dependendo do tipo de interferência poderá haver distorção do sinal, inibindo a confirmação da presença do analito, ou poderá haver amplificação ou supressão do sinal, proporcionando uma interpretação errada da concentração do analito na amostra (EURACHEM, 1998). Portanto, a seletividade do método deve ser demonstrada por meio

de dados que comprovem a ausência de respostas oriundas dos interferentes. Para tanto, a seletividade de um método é normalmente investigada pelo estudo da habilidade de se mensurar o analito de interesse em porções onde interferentes específicos tenham sido deliberadamente introduzidos. Quando não há certeza de que interferentes já estejam presentes na amostra, a seletividade pode ser avaliada comparando-se a resposta do analito com outros métodos analíticos independentes (EURACHEM, 1998). Para os métodos cromatográficos, a seletividade pode ser demonstrada pelo estudo da homogeneidade dos picos ou pelo teste da pureza dos picos, onde deve ficar evidenciado que o pico cromatográfico não é atribuível a mais do que um componente (APVMA, 2004).

5.2 Linearidade

A linearidade é a habilidade do procedimento analítico em produzir resultados que sejam proporcionais à concentração dos analitos da amostra dentro de uma dada faixa de concentração, seja diretamente ou por transformações matemáticas definidas. A linearidade deve ser determinada por meio da utilização de padrões em ao menos seis níveis de concentrações que compreendam de 80 a 120% da faixa de concentração esperada (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003).

Estabelece-se a linearidade de um método pela inspeção visual de um gráfico de resposta em função da concentração do analito. Se houver relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos que possam demonstrar uma clara correlação entre as respostas obtidas e a concentração do analito. Para tanto, os estudos de linearidade devem conter a inclinação, coeficiente linear e coeficiente de correlação da reta obtida. Os resultados devem ser capazes de demonstrar que não há um desvio significativo da linearidade, ou seja, que o coeficiente de correlação (r^2) seja superior a 0,99 sobre uma faixa de 80 a 120% da concentração esperada (ANVISA, 2003; APVMA, 2004).

5.3 Intervalo de Trabalho

O intervalo de trabalho normalmente deriva dos estudos de linearidade e é representado pela amplitude entre a concentração mínima e máxima de analito na amostra,

em que tenha sido demonstrado que o método analítico atende a níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (APVMA, 2004).

5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico pode ser definida como o grau em que o valor determinado para um dado analito na amostra corresponde ao valor verdadeiro. O estudo da exatidão baseia-se na comparação dos resultados obtidos para um material de referência onde o valor real dos analitos é conhecido. Para tanto, a média e o desvio padrão para uma série de testes em replicata devem ser determinados e comparados com o valor caracterizado para o material de referência. O material de referência ideal deve ser certificado e o mais parecido possível com as amostras de interesse, porém, dependendo da complexidade da matriz, a disponibilidade desse tipo de material é limitada.

Para fins de validação, materiais de referência podem ser preparados pela adição de padrões certificados ou outros materiais de pureza e estabilidade adequados à matrizes simples, isentas de analito. No entanto, para a validação ser adequada ao fim pretendido a escolha do material de referência deve considerar que o material de referência também seja adequado ao mesmo fim. Para a validação de métodos utilizados em análise regulatória materiais certificados de referência idênticos às matrizes de interesse devem ser utilizados. Porém, para métodos a serem utilizados em curto prazo ou para a realização de trabalhos não críticos, matrizes enriquecidas com padrões preparados são suficientes (EURACHEM, 1998). Portanto, a exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003).

5.4.1 Recuperação

A determinação de analitos em níveis de traços, a exemplo da análise de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais, traz implicitamente uma série de variáveis que interferem no resultado final, pois normalmente baseiam-se na transferência (extração) dos analitos de uma matriz complexa para uma solução mais simples e adequada à determinação instrumental. O processo de transferência invariavelmente resulta na perda de

analito pois uma parte substancial permanece retida na matriz da amostra após a extração, de modo que a transferência torna-se incompleta e as determinações subsequentes fornecerão valores que são menores do que a concentração verdadeira na amostra original. Se nenhum cálculo de compensação for feito, certamente haverá discrepâncias e interferências no estudo da exatidão. Por este motivo, estudos da recuperação do analito após a extração são essenciais para a validação e devem ser levados em conta na determinação da exatidão de um método (IUPAC, 1996).

5.5 Precisão

A precisão de um método analítico representa a concordância (grau de dispersão) entre uma série de resultados obtidos em múltiplas alíquotas de uma mesma amostra homogênea, sob determinadas condições. As medidas mais comuns de precisão são a repetibilidade e a reprodutibilidade. A repetibilidade (menor precisão esperada) fornece uma idéia do tipo de variabilidade presente quando o método é executado por um único analista em um único equipamento em um curto intervalo de tempo, a exemplo de uma amostra analisada em duplicata. No caso de uma amostra ser analisada por diferentes laboratórios para fins comparativos, então torna-se mais adequado mensurar a precisão como reprodutibilidade (maior medida de precisão normalmente encontrada, embora neste caso não seja formalmente excluída a variação em função do tempo). Há casos em que um híbrido entre repetitividade e reprodutibilidade é mais útil, como na determinação da precisão com diferentes analistas, em intervalos de tempo prolongados, em um mesmo laboratório. Este tipo de estudo é conhecido como “precisão intermediária”, e para sua determinação as condições exatas de análise devem ser respeitadas quando das determinações (EURACHEM, 1998).

A precisão de um procedimento analítico normalmente é expressada como a variância, desvio padrão ou coeficiente de variação entre uma série de determinações. Para tanto, um mínimo de 5 replicatas da amostra se faz necessário, e o tratamento estatístico dos resultados deve ser conduzido para a determinação do percentual de desvio padrão relativo. Se necessário, testes apropriados como o de Dixon ou de Grubbs devem ser realizados para a eliminação de valores aberrantes. Para a validação de um método analítico, os níveis de precisão recomendáveis estão descritos na Tabela 2 (APVMA, 2004):

TABELA 2 : Níveis de Precisão recomendáveis para a Validação de Métodos Analíticos (APVMA, 2004)

Componente Mensurado na Amostra	Precisão
$\geq 10,0\%$	$\leq 2\%$
1,0 a 10,0%	$\leq 5\%$
0,1 a 1,0%	$\leq 10\%$
$< 0,1\%$	$\leq 20\%$

5.6 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção de um método corresponde à menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O LD pode ser determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo (menor ponto de calibração) em que o analito possa ser confiavelmente detectado. Para tanto, fortifica-se um branco da amostra ao nível da menor concentração aceitável de analito, determina-se a resposta em 6 a 10 replicatas independentes e calcula-se o desvio padrão (DP) das respostas. Alternativamente, pode-se realizar a determinação em 10 replicatas independentes do branco da amostra e proceder calculando a média e desvio padrão das respostas. No entanto, este método só é útil se as replicatas do branco da amostra proporcionarem um desvio padrão diferente de zero. No caso da fortificação do branco da amostra o LD será estabelecido pela relação $LD = 0 + 3DP$ e para o branco da amostra sem fortificação pela relação $LD = X + 3DP$, onde X igual a média das respostas do branco da amostra (EURACHEM, 1998; APVMA, 2004).

5.7 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com uma precisão definida e sob determinadas condições. O LQ pode ser determinado pela análise de 10 replicatas do branco da amostra e calculando-se a média e o desvio padrão das respostas. Alternativamente, o LQ pode ser determinado preparando-se soluções de padrões com concentrações próximas ao LD. A média e o desvio padrão das respostas devem ser calculados, e o desvio padrão (DP) deve ser inferior a 20%. Caso o DP exceda os 20%, uma

nova solução de maior concentração deve ser preparada e o procedimento descrito repetido. No caso da fortificação do branco da amostra o LQ será estabelecido pela relação $LD = 0 + 10DP$ e para o branco da amostra sem fortificação pela relação $LD = X + 10DP$, onde X igual a média das respostas do branco da amostra (EURACHEM, 1998; APVMA, 2004).

6 Materiais e Método Analítico

6.1 Vidraria Utilizada

Para o preparo das soluções utilizadas no desenvolvimento deste trabalho e para a coleta e extração das amostras foram utilizados a vidraria e o material volumétrico listados na Tabela 3:

TABELA 3 : Vidraria, Frascos e Material Volumétrico Utilizados no Desenvolvimento do Método

Material	Incerteza
Micropipeta de 10 µL	± 0,075 µL
Micropipeta de 200 µL	± 0,8 µL
Micropipeta de 1000 µL	± 4,0 µL
Pipeta Volumétrica de 5,00 mL	± 0,015 mL
Balão Volumétrico de 25,00 mL	± 0,0055 mL
Balão Volumétrico de 50,00 mL	± 0,011 mL
Balão Volumétrico de 200,00 mL	± 0,05 mL
Microseringa de 1 µL	-----
Microseringa de 2 µL	-----
Microseringa de 10 µL	-----
Microseringa de 50 µL	-----
Seringa de Vidro de 1 mL	-----
Insert de Vidro de 100 µL	-----
Tubo de Centrífuga de 15 mL	-----
Frascos Ambar de 1 L	-----

6.2 Equipamentos Utilizados

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na Tabela 4.

TABELA 4 : Equipamentos Utilizados no Desenvolvimento do Método

Equipamento	Marca/Modelo
Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons (sistema de injeção manual)	Perkin Elmer/Clarus 500
Estação de Trabalho Total Chrom	Perkin Elmer
Centrífuga Refrigerada	IEC/Centra MP4R
Deionizador	Quimis

6.3 Limpeza do Material

Para garantir a confiabilidade analítica dos resultados e minimizar a possibilidade de contaminação do material, toda a vidraria utilizada foi limpa de acordo com a descrição abaixo:

- a) Rinsagem com acetona PA;
- b) Imersão em solução de detergente alcalino – Extran 10% (v/v) – por um período mínimo de 12 horas;
- c) Lavagem com água corrente;
- d) Rinsagem com água deionizada;
- e) Rinsagem com acetona PA
- f) Secagem a temperatura ambiente.

6.4 Padrões e Solventes

Para o desenvolvimento deste trabalho foi necessária a utilização de solventes de alto grau de pureza e padrões certificados dos analitos de interesse. Os padrões utilizados nesta metodologia foram preparados em isoctano ou acetato de etila, e fornecidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e pelo Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) nas concentrações listadas na Tabela 5. Os demais solventes utilizados também estão listados.

TABELA 5 : Padrões e Solventes Utilizados para o Desenvolvimento do Método

<i>Padrão/Solvente</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Marca</i>
2,4'DDT	95	Dr.Ehrenstorfer
4,4'DDT	103,3	Dr.Ehrenstorfer
Alfa Endossulfam	117,47	Dr.Ehrenstorfer
Alfa-HCH	120,49	Dr.Ehrenstorfer
Beta Endossulfam	104,6	Dr.Ehrenstorfer
Beta-HCH	109,59	Dr.Ehrenstorfer
Delta-HCH	104,26	Dr.Ehrenstorfer
Endrin	114,5	Dr.Ehrenstorfer
Gama-HCH	141,29	Dr.Ehrenstorfer
Hexaclorobenzeno	106,56	Dr.Ehrenstorfer
Metoxicloro	29,075	AccuStandard
Trifluralina	113,8	Dr.Ehrenstorfer
Água Deionizada	-	-
n-Hexano Grau Cromatográfico	-	Tedia
Acetona PA	-	Merck
Clorobenzeno PA	-	Proquímios
Tetracloroetileno Espectroscópico	-	Proquímios

6.5 Preparo das Soluções Padrão

Alguns dos analitos de interesse são produtos de degradação de outros analitos também de interesse, ou então são isômeros estruturais uns dos outros. Por este motivo acabam estando presentes como “impurezas” de algumas das soluções estoque. Como a metodologia proposta trata-se de uma técnica multirresíduo para a determinação de traços de agrotóxicos, a presença dessas “impurezas” pode interferir no estudo da exatidão do método quando da fortificação dos brancos de amostra com os padrões. Para minimizar este problema, verificou-se quais as soluções estoque apresentavam picos de impureza correspondentes aos seus isômeros ou produtos de degradação, e optou-se por trabalhar o método com dois grupos de analitos distintos, onde isômeros e produtos de degradação estariam colocados separadamente de seus congêneres e precursores.

Desta maneira, o 4,4'DDT, Alfa-Endossulfam, Alfa-HCH, Beta-HCH, Delta-HCH, Endrin, Gama-HCH, Hexaclorobenzeno e Metoxicloro foram agrupados no grupo que foi denominado G1, e o 2,4'DDT, Beta-Endossulfam e Trifluralina foram agrupados no grupo que foi denominado G2.

6.5.1 Preparo das Soluções Intermediárias

Dois tipos de soluções intermediárias de cada grupo foram preparadas: uma para a construção da curva de calibração e outra para a fortificação das amostras. A lógica seguida foi a de que para a construção da curva de calibração, diluições seriadas da mistura de agrotóxicos deveriam ser feitas com todos os analitos sempre no mesmo nível de concentração e no solvente adequado para injeção.

A legislação brasileira determina valores máximos permitidos (VMP) em diferentes níveis de concentração para os diferentes agrotóxicos em água, sendo que uns chegam a ter concentrações permitidas cerca de 600 vezes maiores do que outros. Portanto, a mesma lógica de se trabalhar com uma mistura de agrotóxicos sendo todos na mesma concentração não se aplicaria para a fortificação de amostras, pois ao fortificar-se as amostras ao nível dos agrotóxicos com menores VMP correria-se o risco de estar trabalhando em uma faixa de concentração abaixo dos LQ para os agrotóxicos com maiores VMP. Para contornar esse problema optou-se por preparar soluções intermediárias de fortificação em unidades de VMP para cada agrotóxico na mistura e no solvente adequado para a fortificação.

I) Preparo da Solução Intermediária de Calibração G1 (100 µg/L):

Retirou-se 0,100 mL de cada solução estoque de agrotóxico e avolumou-se a 100,00 mL com n-hexano grau cromatográfico. A única exceção foi para o padrão de metoxicloro que estava em uma concentração inferior a dos demais agrotóxicos, sendo necessária a adição de 0,344 mL da solução estoque para que se pudesse preparar os 100,00 mL da solução intermediária a 100 µg/L.

Desta solução foram preparadas as soluções utilizadas na construção da curva de calibração para G1.

II) Preparo da Solução Intermediária de Calibração G2 (100 µg/L):

Retirou-se 0,100 mL de cada solução estoque de agrotóxico e avolumou-se a 100,00 mL com n-hexano grau cromatográfico.

Desta solução foram preparadas as soluções utilizadas na construção da curva de calibração para G2.

III) Preparo das Soluções Intermediárias de Fortificação G1 e G2 (50 VMP):

A Tabela 6 esquematiza o modo de preparo das soluções intermediárias de fortificação G1 e G2.

TABELA 6 : Esquema de Preparo das Soluções Intermediárias de Fortificação G1 e G2

	Padrões	VMP (µg/L)	50 VMP (µg/L)	Volume de Solução Estoque (µL) para o Preparo de 100 mL da Solução 50 VMP	Concentração Real da Solução 50 VMP (µg/L) Preparada
G1	4,4'DDT	2	100	100	103,30
	Alfa Endossulfam	20	1000	1000	1174,70
	Alfa-HCH	2	100	100	120,49
	Beta-HCH	2	100	100	109,59
	Delta-HCH	2	100	100	104,26
	Endrin	0,6	30	30	34,35
	Gama-HCH	2	100	100	141,29
	Hexaclorobenzeno	1	50	50	53,28
	Metoxicloro	20	1000	3500	1017,63
G2	2,4'DDT	2	100	100	95,00
	Beta Endossulfam	20	1000	1000	1046,00
	Trifluralina	20	1000	1000	1138,00

Para o preparo de ambas as soluções intermediárias, utilizou-se acetona PA como diluente, pois além de solubilizar os analitos também é solúvel em água, facilitando a incorporação dos agrotóxicos na matriz. Entretanto, antes de se avolumar o balão com acetona, os volumes de solução estoque previamente adicionados devem ser evaporados à secura em capela de exaustão de gases, a temperatura ambiente, com ou sem auxílio de corrente de nitrogênio. Este procedimento é necessário para eliminar o solvente das soluções estoque que, embora sejam solúveis na acetona, ao serem adicionados à matriz aquosa, estes se separariam em duas fases e extrairiam os analitos para a camada orgânica sobrenadante, impossibilitando a fortificação da amostra.

6.6 Condições Cromatográficas

Para a realização deste trabalho foram reproduzidas as condições cromatográficas utilizadas para análise de agrotóxicos organoclorados no Laboratório de Resíduos do INCQS, segundo o procedimento operacional padronizado (POP) n° 65.3120.081. A Tabela 7 apresenta as condições cromatográficas gerais utilizadas e a Figura 3 o perfil térmico do forno.

TABELA 7 : Condições Cromatográficas de Análise

Parâmetro		Condição
Temperatura do Injetor		210°C
Temperatura do Detector		300°C
Volume Injetado	(no modo “splitless”)	2 µL
Coluna Cromatográfica	Coluna capilar de sílica fundida revestida com fase estacionária de 5% difenil - 95% dimetil polisiloxano Elite-5 Perkin Elmer (30m x 0,25mm x 0,25 µm)	
Programação do Forno	Temperatura Inicial	80°C
	Taxa de Aquecimento 1	30°C/min até 180°C (pausa por 8 min.)
	Taxa de Aquecimento 2	2°C/min até 200°C (pausa por 5 min.)
	Taxa de Aquecimento 3	6°C/min até 280°C (pausa por 1 min.)
	Temperatura Final	280°C
Gás de Arraste	Nitrogênio	20 mL/min.
Detector	Captura de Elétrons (ECD – Ni ⁶³)	
Fluxo de Gás do Detector (makeup)		60 mL/min.
Tempo Total		40,67 min.
Solvente de Lavagem da Seringa (Solvente 1)		Acetona PA
Solvente de Lavagem da Seringa (Solvente 2)		n-Hexano PA
Número de Lavagens da Seringa com o Solvente 1		Mínimo de 5
Número de Lavagens da Seringa com o Solvente 2		Mínimo de 5

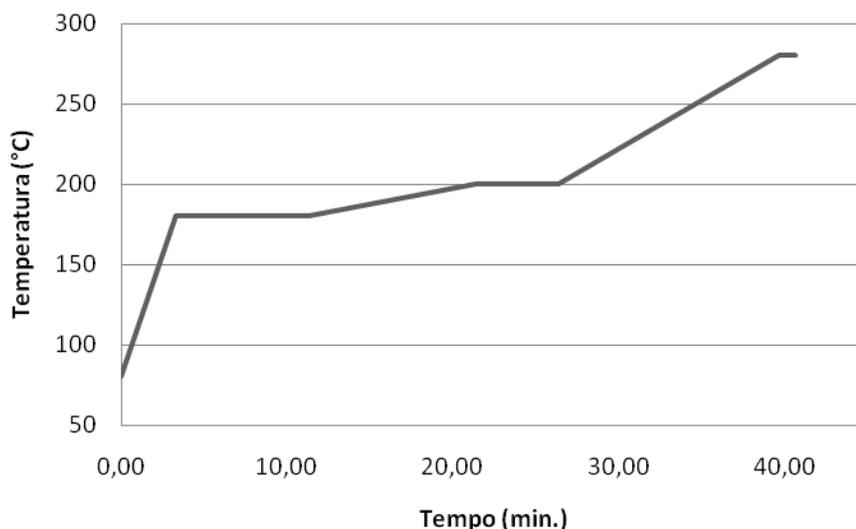


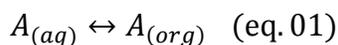
Figura 3 : Perfil térmico do forno utilizado no método

6.7 Método de Análise

6.7.1 Seleção do Método de Análise

Apesar dos avanços no desenvolvimento de novas técnicas de separação e quantificação, a extração líquido-líquido tradicional (ELL) é reconhecida como um dos métodos de extração mais utilizados nos testes de triagem de agrotóxicos em amostras líquidas, não apenas por ser simples, robusta, eficiente e requerer pouca especialização técnica do analista, mas também por ser aceita em muitos compêndios oficiais de métodos padronizados (NOLLET, 2006; LAMBROPOULOU, 2007; XU, 2007).

A ELL baseia-se na distribuição do analito entre dois solventes imiscíveis que pode ser descrita através dos termos: coeficiente de distribuição e razão de distribuição. O coeficiente de distribuição corresponde à constante de equilíbrio que descreve a distribuição do analito “A” entre os dois solventes imiscíveis - fase aquosa (amostra de água) e fase orgânica (solvente de extração), por exemplo. Este equilíbrio pode ser representado pela seguinte equação:



onde (aq) e (org) representam a fase aquosa e a fase orgânica, respectivamente. A razão das atividades de “A” nos dois solventes também é constante e pode ser representada pela equação:

$$K_d = \frac{\alpha A_{(org)}}{\alpha A_{(aq)}} \quad (\text{eq. 02})$$

onde K_d é o coeficiente de distribuição, $\alpha A_{(org)}$ a atividade de “A” na fase orgânica e $\alpha A_{(aq)}$ a atividade de “A” na fase aquosa. Enquanto que o valor numérico de K_d , a uma dada temperatura, fornece um dado constante e útil de quanto o analito se distribui entre as duas fases quando colocadas em contato, os coeficientes de atividade normalmente não são conhecidos e não são facilmente mensuráveis. Para contornar esse problema, na ELL lança-se mão de outra expressão mais útil para se determinar a fração percentual (E) de analito que é extraída, conforme se segue:

$$E = \frac{C_o V_o}{(C_o V_o + C_{aq} V_{aq})} \quad (\text{eq. 03})$$

ou

$$E = \frac{K_d V}{1 + K_d V} \quad (\text{eq. 04})$$

onde C_o e C_{aq} são as concentrações do analito na fase orgânica e na fase aquosa, respectivamente, V_o e V_{aq} são, respectivamente, os volumes da fase orgânica e da fase aquosa, e V é a razão entre as fases (V_o/V_{aq}). Para uma extração líquido-líquido ser eficiente em apenas uma única etapa de extração, o valor de K_d deve ser alto, sendo necessário um valor maior que 10 para se obter recuperações quantitativas acima de 99% do analito em uma das fases. Isto é consequência da razão (V) entre as fases, que para fins práticos deve ter os seus valores mantidos na faixa de $0,1 < V < 10$. Normalmente são necessárias duas ou três extrações sucessivas com porções novas de solventes orgânicos para se obter recuperações quantitativas. A quantidade de analito extraída após múltiplas extrações sucessivas pode ser então calculada a partir da equação:

$$E = 1 - \left[\frac{1}{(1 + K_d V)} \right]^n \quad (\text{eq. 05})$$

onde n é o número de extrações. A título de ilustração temos que, de acordo com a equação 05, para uma razão $V = 1$ entre os volumes das fases e um $K_d = 3$ para o analito, seriam necessárias 4 extrações ($n=4$) para se obter uma recuperação quantitativa acima de 99%.

Pode ainda haver situações onde as formas químicas reais do analito na fase aquosa e na fase orgânica sejam desconhecidas (como no efeito da variação do pH sobre ácidos e bases fracas, por exemplo). Nestes casos, a razão de distribuição D do analito ficaria sob a forma:

$$D = \frac{\text{Concentração de A sob todas as formas químicas na fase orgânica}}{\text{Concentração de A sob todas as formas químicas na fase aquosa}} \quad (\text{eq. 06})$$

Nos sistemas simples onde não ocorre dissociação química, a razão de distribuição será idêntica ao coeficiente de distribuição (DEAN, 2003).

Apesar de consagrada, a técnica de ELL apresenta desvantagens como longo período de execução, pequena razão entre o volume da amostra e do solvente, e a utilização de grandes volumes de solvente com alto grau de pureza para se obter recuperações quantitativas significativas, o que gera um maior volume de resíduos tóxicos. Embora a utilização de processos automatizados de ELL tenha superado alguns desses inconvenientes, o número de etapas necessárias à sua realização e o problema de formação de emulsões durante o processo ainda não conseguiram ser solucionados (LAMBROPOULOU 2007; XU, 2007). Por esses motivos a técnica de ELL tem sido modificada para novas configurações.

Em anos recentes, a técnica de microextração em fase líquida (MEFL), uma implementação miniaturizada da extração líquido-líquido convencional, tem se popularizado como técnica de pré-tratamento de amostras em função do seu baixo custo, fácil operação, mínimo consumo de solvente, e por combinar em um único passo as etapas de extração e pré-concentração.

Uma das possibilidades de MEFL, conhecida como microextração em gota única (MEGU) consiste na extração do analito em fase aquosa sob agitação controlada (fase doadora), para uma micro-gota de solvente orgânico (fase aceptora) com volume de 1 – 3 μL , suspensa na ponta de uma microseringa imersa na fase doadora (JEANNOT e

CANTWELL, 1996). O processo de extração ocorre de acordo com o mesmo equilíbrio descrito pela equação 01. No equilíbrio, a razão de distribuição do analito entre as duas fases é estabelecida pela relação:

$$K = \frac{C_{o(eq)}}{C_{aq(eq)}} \quad (\text{eq. 07})$$

onde $C_{o(eq)}$ é a concentração no equilíbrio do analito na fase orgânica, e $C_{aq(eq)}$ é a concentração no equilíbrio do analito na fase aquosa. De acordo com a relação estabelecida pelo balanço de massas, a equação 07 pode ser reescrita como:

$$C_t V_a = C_{o(eq)} V_o + C_{aq(eq)} V_a \quad (\text{eq. 08})$$

onde C_t é a concentração original do analito na amostra, V_o o volume do solvente orgânico, e V_a o volume da fase aquosa. Como visto anteriormente, a razão entre os volumes das fases afeta diretamente a distribuição do analito entre as mesmas. A utilização de uma micro-gota de solvente na MEGU torna o processo extremamente eficiente para o pré-enriquecimento do analito, pois aumenta drasticamente a razão entre os volumes da fase doadora e da fase acceptora. Desta forma, o fator de enriquecimento (FE) pode ser definido como a razão entre a concentração do analito na fase orgânica no equilíbrio ($C_{o(eq)}$) e a concentração original do analito na amostra (C_t). Das equações 07 e 08 podemos calcular FE como:

$$FE = \frac{1}{\frac{V_o}{V_a} + \frac{1}{K}} \quad (\text{eq. 09})$$

A equação 09 demonstra que para se obter um alto fator de enriquecimento é necessário um valor baixo na razão V_o/V_a e um alto coeficiente de distribuição (LAMBROPOULOU 2007).

A MEGU pode ser utilizada para a extração de analitos apolares, analitos de polaridade média, e para aqueles cuja polaridade possa ser reduzida previamente à extração. O principal requerimento para uma boa performance da técnica é a imiscibilidade do solvente ou mistura de extração escolhida (fase acceptora) no meio aquoso da amostra. Essas

características fazem da MEGU uma das técnicas de extração mais adequadas para análises por cromatografia a gás (LAMBROPOULOU, 2007).

Estudos realizados por Jeannot e Cantwell (1997) demonstraram que na MEGU, o mecanismo de transferência de massa do analito da fase doadora para a fase aceptora se dá através do processo conhecido como “teoria do filme”. Essa teoria primeiramente proposta por Nernst assume que, à distância de uma molécula, não há movimentação da solução imediatamente adjacente à interface formada entre a gota suspensa e a amostra, e que o movimento da solução aumenta gradualmente com as correntes de convecção à medida em que se afasta da interface. Desta maneira, forma-se uma mistura convectiva uniforme, completa e instantânea no volume da solução a uma certa distância δ da interface líquido-líquido. A camada de líquido que ocupa essa espessura δ , chamada de filme de difusão de Nernst, não sofre efeitos de convecção e permanece estagnada, de forma que as moléculas da amostra a atravessam apenas por difusão simples. No equilíbrio estático, a transferência de massa na fase aquosa é dada por:

$$\beta_{aq} = \frac{D_{aq}}{\delta_{aq}} \quad (\text{eq. 10})$$

onde β_{aq} é o coeficiente de transferência de massa, D_{aq} é o coeficiente de difusão na fase aquosa, e δ_{aq} a espessura da camada. Em soluções que sofreram agitações o β_{aq} aumenta e δ_{aq} diminui, pois de acordo com a equação 10 há uma proporcionalidade direta entre β_{aq} e D_{aq} , e a agitação forçada causa um distúrbio no filme diminuindo sua espessura. Dessa maneira, o tempo necessário para se atingir o equilíbrio e a agitação da solução influenciam diretamente o processo de extração por MEGU. Esses dois fatores *per si* trazem algumas desvantagens à MEGU: agitações rápidas demais podem desprender ou romper a microgota suspensa na seringa; pode haver a formação de bolhas de ar que interferem no processo; e pode não ter sido dado tempo suficiente para que se alcansace o equilíbrio, diminuindo a eficiência da extração.

Rezaee *et al* (2006) propuseram uma técnica alternativa à MEGU que elimina essas desvantagens, conhecida como microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD). A MELLD baseia-se na formação de um sistema de extração ternário, onde uma mistura de

solvente de extração, mais denso e imiscível na amostra, com um solvente de dispersão miscível em ambos, é rapidamente injetada na amostra aquosa por meio de uma seringa, formando uma solução turva semelhante à uma emulsão. Os diminutos volumes das gotículas do solvente de extração que ficam em suspensão na fase aquosa diminuem drasticamente a razão V_o/V_{aq} , o que aumenta significativamente o fator de enriquecimento. Além disso, a formação das gotículas torna a área de superfície entre o solvente e a amostra infinitamente maior do que na MEGU. Desta maneira, a transferência de massa dos analitos da amostra para o solvente de extração ocorre rapidamente, e o estado de equilíbrio é atingido quase que instantaneamente. Com isso, o tempo total de extração é extremamente curto, tornando esta a principal vantagem da técnica (REZAEI *et al*, 2006). A Figura 4 esquematiza o sentido preferencial do equilíbrio de transferência de massas de analitos entre solventes nos métodos de extração descritos acima.

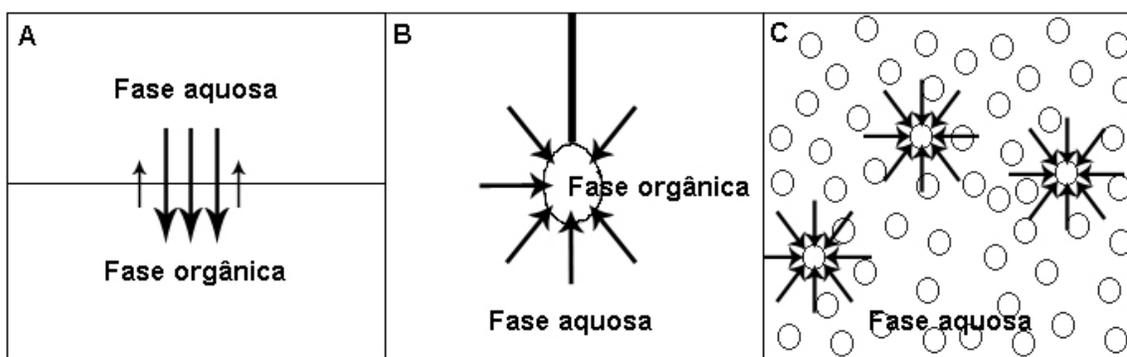


Figura 4 : Sentido preferencial de transferência de massa de analitos entre solventes na extração líquido-líquido (A), microextração em gota única (B), e microextração líquido-líquido dispersiva.

Dadas as condições instrumentais analíticas existentes no LACEN/RJ, a preocupação em seguir os princípios da química verde, e as características das amostras de água provenientes da rede de abastecimento e das soluções alternativas de abastecimento de água, sobretudo na zona rural do Estado do Rio de Janeiro, para a realização deste trabalho optou-se por desenvolver uma proposta de validação de metodologia analítica fundamentada em adaptações do método de extração descrito por Rezaei (REZAEI *et al*, 2006).

6.7.2 Método de Extração

Foco principal do método proposto, a Figura 5 esquematiza as etapas de extração desenvolvidas neste trabalho.

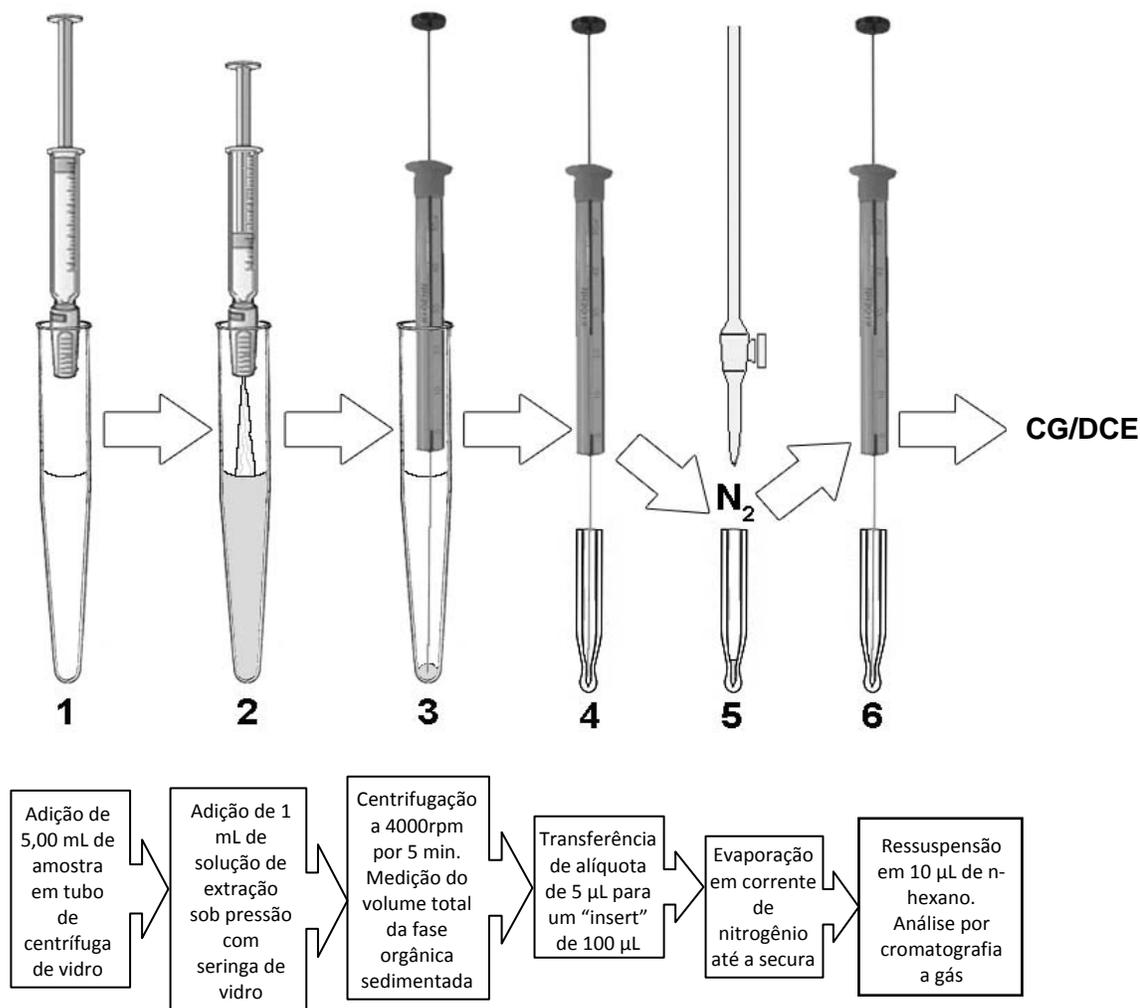


Figura 5 : Fluxograma da metodologia de análise

6.7.2.1 Escolha do Solvente de Extração

A eficiência da extração está intimamente relacionada com as características do solvente utilizado, portanto, alguns critérios devem ser seguidos quando da escolha do solvente adequado para o método de extração proposto: ser mais denso do que água, ser insolúvel ou praticamente insolúvel em água, ter boa capacidade de extração dos analitos de interesse, e ter bom comportamento cromatográfico. Infelizmente, esses critérios limitam bastante o leque de opções que se poderia lançar mão para a realização deste trabalho. De

um modo geral, os solventes que se adequam a estes critérios são os solventes orgânicos halogenados. Contudo estes compostos respondem com muita intensidade e proporcionam picos com caudas muito altas e pronunciadas quando detectador por captura de elétrons (DCE), podendo *per si* interferirem na análise.

Nos seus estudos para determinação de substâncias orgânicas e clorofenóis em água por CG/DCE, Rezaee *et al* (2006; 2007) testaram a eficiência de uma série de solventes de extração, sendo que os mais eficientes foram o clorobenzeno e o tetracloroetileno. No método proposto pela equipe de Rezaee, o solvente na fase orgânica sedimentada após a centrifugação foi diretamente injetado no cromatógrafo, pois fora justificado que a resposta do clorobenzeno ao DCE era muito menor do que a dos analitos. Baseando-se nestes resultados, optou-se por utilizar o tetracloroetileno e o clorobenzeno para a realização deste trabalho. Entretanto, optou-se por realizar uma etapa a mais de substituição do solvente de extração por n-hexano previamente à análise cromatográfica, a fim de se evitar qualquer interferência originada do solvente halogenado. Também foram realizados testes sem substituição do solvente com injeção direta do extrato em clorobenzeno para fins de comparação.

Assim, as soluções de extração utilizadas neste trabalho foram de tetracloroetileno em acetona e clorobenzeno em acetona, preparadas na proporção de 25 µL/mL.

6.8 Metodologia para Validação

Os critérios para a validação do método proposto neste trabalho basearam-se nas diretrizes da Resolução N° 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no Guia para Qualidade em Química Analítica (ANVISA, 2005) e no Guia para Validação de Métodos da Eurachem (EURACHEM, 1998).

6.8.1 Estudo da Seletividade

Para o estudo da seletividade foram preparadas, a partir das soluções estoque, soluções individuais de cada agrotóxico na concentração de 100 µg/L em n-hexano para a identificação dos tempos de retenção (t_R). Em seguida, foram avaliados os parâmetros cromatográficos de fator de retenção (k), resolução (R_s), e fator de separação (α) para se

verificar a eficiência da separação cromatográfica das soluções intermediárias de calibração dos compostos de interesse G1 e G2, conforme descrito em 6.5.

O fator de retenção (k) diz respeito à retenção do soluto pela fase estacionária e é estabelecido pela razão entre os tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas pela fase estacionária e são carregadas ao longo da coluna pela fase móvel. O valor de k é calculado pela expressão:

$$k = \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = \frac{t_R'}{t_m} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde:

t_R = tempo de retenção do soluto;

t_m = tempo que a fase móvel leva para atingir o detector desde a injeção;

t_R' = tempo de retenção ajustado;

Quando o valor de k é menor do que 1, a eluição é tão rápida que torna-se difícil determinar o tempo de retenção de um analito de forma acurada. Por outro lado, valores de k maiores que 20 significam que a eluição demanda muito tempo. O valor ideal de k para um analito está entre 1 e 5. Para uma análise de até dois componentes os valores devem estar entre 1 e 20, e para uma análise de múltiplos componentes, valores de k entre 0,5 e 20 são aceitos (MILLER, 1998).

O grau de separação entre dois componentes (picos adjacentes no cromatograma) é chamado de resolução, e é estabelecido por (Miller, 1998):

$$RS = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{Wb_1 + Wb_2} \right) = \frac{2d}{Wb_1 + Wb_2} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde:

t_{R2} e t_{R1} = Tempos de retenção dos picos adjacentes;

Wb_1 e Wb_2 = Largura dos picos na base, em unidades de tempo;

d = Distância entre os ápices dos dois picos adjacentes, em unidades de tempo.

Quanto maior o valor da resolução, melhor a separação. Para uma separação completa até a linha de base é necessário um valor de resolução igual a 1,5 (MILLER, 1998).

O grau em que dois componentes são separados é função da razão entre seus tempos de retenção. A razão entre os tempos de retenção ajustados de dois componentes é chamada de fator de separação, ou fator de seletividade, α . Este fator mede a separação dos centros de massa de dois picos adjacentes e é expresso por:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} \quad (\text{Eq. 13})$$

Quando dois solutos coeluem, então $k_2 = k_1$ e $\alpha = 1,0$. Por convenção, α nunca é menor do que 1,0 e por isso, o mais retido, k_2 , sempre é utilizado no numerador. Obviamente esta razão de separação corresponde simplesmente à razão entre os coeficientes de distribuição dos dois solutos na coluna, que, por sua vez, dependem da temperatura e da natureza da fase móvel e da fase estacionária. Porém, o mais importante é que independem do fluxo da fase móvel e da razão de fase da coluna. Isto significa que se as condições cromatográficas de temperatura e fase móvel forem mantidas, a mesma separação será sempre obtida entre os dois solutos (MILLER, 1998; CASES, 2002).

Após a avaliação dos parâmetros cromatográficos, foram então comparados os desvios dos t_{RS} determinados com as soluções G1 e G2 de agrotóxicos em n-hexano, na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$, com os t_{RS} obtidos na extração dos agrotóxicos com tetracloretileno e posterior troca de solvente para n-hexano, e com os t_{RS} obtidos pela injeção direta dos extratos de agrotóxicos em clorobenzeno.

6.8.2 Estudo da Linearidade e Intervalo

A determinação da linearidade do método foi feita por meio da avaliação das áreas dos picos cromatográficos obtidos em 11 pontos utilizados para a construção das curvas analíticas, preparados a partir das soluções intermediárias de calibração G1 e G2 de agrotóxicos. Apesar do recomendado ser a construção de curvas analíticas que abranjam de 80 a 120% da faixa de concentração esperada (ANVISA, 2003), os fatores de enriquecimento de cada agrotóxico pós-extração ainda não eram conhecidos e, por isso, optou-se por construir curvas cujas concentrações variavam de 0,1 a 100 $\mu\text{g/L}$, na expectativa de que as concentrações de agrotóxicos obtidas após as extrações estivessem compreendidas neste intervalo. Cada ponto da curva foi analisado em triplicata para avaliação da dispersão da resposta do detector em cada nível de concentração.

O intervalo de trabalho do método foi determinado através do teste da razão entre o sinal (área) e a concentração, definida por:

$$\frac{S}{Q_i} = \frac{S_i - b}{Q_i} \quad (\text{Eq. 14})$$

onde a razão sinal/concentração para o *i*ésimo ponto da curva analítica, S/Q_i , é calculada a partir do correspondente sinal medido, S_i , da concentração Q_i correspondente e do coeficiente linear da curva analítica. Deste modo, foram considerados para o intervalo linear os pontos com valores de S/Q_i , que não diferiram mais do que 5% do coeficiente angular da reta.

As sequências de pontos que proporcionaram coeficientes de correlação linear (r^2) maiores do que 0,99 foram, então, consideradas para a determinação dos intervalos de concentração onde se atende a níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade.

6.8.3 Estudo da Exatidão, Recuperação e Incerteza

Para a avaliação da exatidão e recuperação do método, uma amostra de água deionizada obtida no laboratório foi processada segundo o método descrito em 6.7.2 e analisada por CG/DCE para se verificar a existência de quaisquer interferentes. Em seguida, fortificaram-se ao nível de concentração de metade do valor máximo permitido para cada agrotóxico (0,5VMP), replicatas de amostras de água deionizada com as soluções intermediárias de fortificação G1 e G2, preparadas com padrões de agrotóxicos certificados conforme descrito em 6.5.1. As amostras foram então processadas segundo o método descrito em 6.7.2, comparando-se os resultados das recuperações obtidas pelas extrações com tetracloroetileno e clorobenzeno com troca de solvente, e extrações com clorobenzeno sem troca de solvente.

As incertezas das recuperações foram determinadas levando-se em conta os erros aleatórios e resíduos advindos das regressões das curvas de calibração e as concentrações calculadas por meio das curvas de calibração. Para tanto, foram calculados os desvios (S_a e S_b) dos coeficientes angulares (a) e lineares (b) das curvas e ajustados com valores de t da distribuição de Student para (n-2) para um nível de confiança de 95% , ficando, portanto, a $\pm tS_a$ e $b \pm tS_b$.

6.8.4 Estudo da Precisão

A precisão do método foi avaliada como precisão intermediária, com ensaios realizados em dias diferentes e por técnicos diferentes, porém com amostras idênticas processadas sob as mesmas condições segundo o método descrito em 6.7.2. Foi feita a comparação dos coeficientes de variação obtidos com as replicatas das amostras, sendo $n = 7$ para G1 e $n = 6$ para G2, ambos extraídos com tetracloroetileno e posterior troca de solvente para n-hexano; $n = 5$ para G1 e G2 extraídos com clorobenzeno e posterior troca de solvente para n-hexano; e $n = 2$ para G1 e G2 extraídos com clorobenzeno e injetados diretamente no cromatógrafo. Foi feito o teste de Grubbs para se verificar a presença de valores aberrantes.

6.8.5 Estudo dos Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram determinados considerando-se $LD = 0 + 3S_b$ e $LQ = 0 + 10S_b$, onde S_b corresponde ao desvio padrão do branco (EURACHEM, 1998). Para o cálculo de S_b utilizaram-se as curvas de calibração considerando-se que cada ponto da representação gráfica (incluindo o que representa o branco ou ruído de fundo) tem uma variação distribuída normalmente na direção do eixo y, com um desvio padrão estimado por $S_{y/x}$. Portanto, é apropriado o uso de $S_{y/x}$ em substituição a S_b para se estimar os limites de detecção e de quantificação.

O desvio $S_{y/x}$ pode ser facilmente calculado a partir dos dados da curva de calibração. Somando-se $3S_{y/x}$ ao valor de b na equação de regressão da curva de calibração determina-se o valor de y correspondente à concentração no limite de detecção, e somando-se $10S_{y/x}$ ao valor de b na equação de regressão da curva de calibração determina-se o valor de y correspondente à concentração no limite de quantificação (MILLER, 1988).

7 Metodologia de Amostragem

Para definição dos pontos de coleta de amostra, primeiramente foi necessário selecionar uma região do Estado que contemplasse prerequisites de produção agrícola significativa e grande parcela da população abastecida por soluções alternativas.

Para o primeiro prerequisite, lançou-se mão dos dados do Acompanhamento Sistemático da Produção Agrícola - ASPA - elaborado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro (EMATER/RJ), construindo-se uma série histórica de rendimento (razão da produção em toneladas pela área colhida em hectares – ton/ha) dos principais produtos cultivados no Estado de 2001 a 2005. A utilização do rendimento foi um indicador útil neste caso, pois além de facilitar a comparação entre municípios com grandes safras e zonas agrícolas extensas com municípios com zonas e safras menores, permitiu uma rápida visualização de onde há uma grande produção agrícola em áreas relativamente pequenas, possibilitando a especulação do uso intensivo de agrotóxicos na área em estudo.

A Figura 6 mostra os seis produtos agrícolas cultivados no Estado, acompanhados ininterruptamente de 2001 a 2005 e que apresentaram os maiores rendimentos nos anos de 2001 a 2003, e 2005. O ano de 2004 não está representado, pois os dados do ASPA divulgados pela EMATER/RJ estavam incompletos. Baseando-se nos dados do ASPA para o ano de 2005, calculou-se os rendimentos da produção dos municípios fluminenses para as culturas apresentados na Figura 6. Os cinco municípios com maior rendimento foram classificados na Tabela 8.

Dentre os municípios fluminenses, os municípios de Paty do Alferes, São José do Vale do Rio Preto e Teresópolis, repetem-se entre os cinco com maior rendimento no Estado para cinco das seis culturas escolhidas. Em função disso, especula-se uma maior probabilidade da utilização intensiva de agrotóxicos nesses municípios.

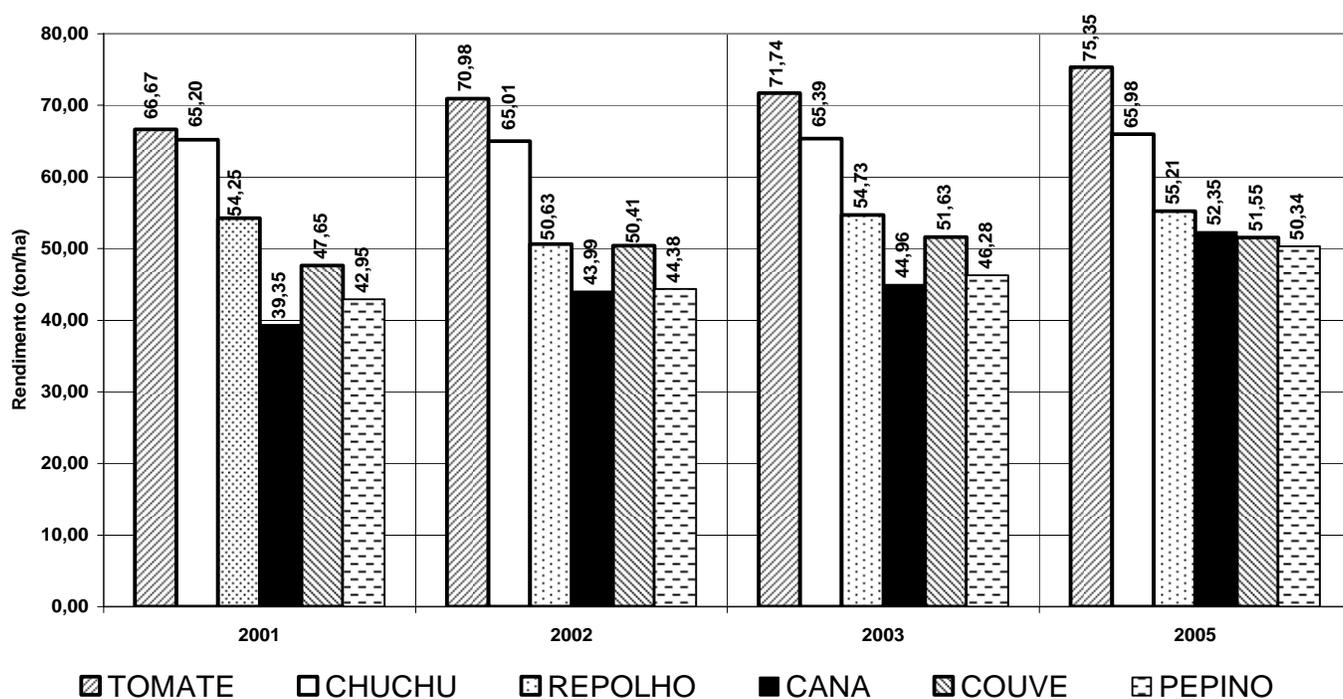


Figura 6: Gráfico das culturas com maior rendimento no Estado do Rio de Janeiro nos anos de 2001 a 2003 e 2005 (EMATER/RJ, 2007).

TABELA 8 : Os cinco municípios com os maiores rendimento dos seis produtos agrícolas cultivados no Estado e acompanhados ininterruptamente pelo ASPA (EMATER/RJ, 2007)

Cultura	Município (Rendimento em ton/ha)					Estado
	1º	2º	3º	4º	5º	
Tomate	STO. ANTÔNIO DE PÁDUA (113)	LAJE DO MURIAÉ (100)	SÃO JOSÉ DO VALE DO RIO PRETO (100)	MIGUEL PEREIRA (88,8)	PATY DO ALFERES (88,8)	75,35
Chuchu	SÃO JOSÉ DO VALE DO RIO PRETO (80)	BOM JARDIM (75)	PARAÍBA DO SUL (62,7)	RIO DE JANEIRO (60)	TERESÓPOLIS (60)	65,98
Repolho	TERESÓPOLIS (70)	MIGUEL PEREIRA (69,4)	PATY DO ALFERES (69)	SAPUCAIA (58)	SÃO JOSÉ DO VALE DO RIO PRETO (57,4)	55,21
Cana	BARRA MANSA (71,67)	ITAOCARA (70)	SÃO FCO DO ITABAPOANA (69,9)	BOM JESUS DO ITABAPOANA (69,5)	BARRA DO PIRAI (68,4)	52,35
Couve	TERESÓPOLIS (62)	PINHEIRA L (51,7)	SUMIDOURO (50,8)	RIO CLARO (50)	VOLTA REDONDA (44,4)	51,55
Pepino	PATY DO ALFERES (72)	SAPUCAIA (72)	BOM JARDIM (70)	SÃO JOSÉ DO VALE DO RIO PRETO (70)	SÃO SEBASTIÃO DO ALTO (60)	50,34

Para o segundo requisito, compilou-se os dados referentes à condição de abastecimento de água da zona rural dos municípios fluminenses, de acordo com informações do DATASUS para o ano 2000. Os 15 municípios com maior população total abastecida por soluções alternativas foram ranqueados e construiu-se uma tabela comparativa (Tabela 9). Nesta classificação aparecem novamente os municípios de Paty do Alferes, São José do Vale do Rio Preto e Teresópolis.

Segundo os dados fornecidos para a época, dentre os três municípios preselecionados, São José do Vale do Rio Preto foi o que apresentou maior percentual de sua população total sendo abastecida por soluções alternativas de abastecimento, sendo, por isso, selecionado para a coleta de amostras.

TABELA 9 : Condição de abastecimento por solução alternativa da população total e rural dos municípios fluminenses

Abastecimento de água - Rio de Janeiro							
Moradores por Município e Abastecimento Água							
Abastecimento Água por Solução Alternativa: Poço ou nascente (Água Não Tratada)							
Situação: Rural							
Período:2000							
Fonte: DATASUS							
Município	Pop. Total s/ água tratada	Pop.Rural Total	Pop. Total do Município	% Pop.Rural s/ Água Tratada	% em relação a Pop. Total	% em relação a Pop. Total do Estado	
1 Campos dos Goytacazes	34.950	42812	406989	81,64	8,59	0,24	
2 São Francisco de Itabapoana	21.271	21917	41145	97,05	51,70	0,15	
3 Teresópolis	20.241	22.883	138.081	88,45	14,66	0,14	
4 Nova Friburgo	15.623	21567	173418	72,44	9,01	0,11	
5 Rio Bonito	13.275	17241	49691	77,00	26,72	0,09	
6 Cabo Frio	12.740	20591	126828	61,87	10,05	0,09	
7 Maricá	12.553	13338	76737	94,11	16,36	0,09	
8 Sumidouro	10.433	11842	14176	88,10	73,60	0,07	
9 Bom Jardim	9.326	11334	22651	82,28	41,17	0,06	
10 São José do Vale do Rio Preto	8.455	10.271	19.278	82,32	43,86	0,06	
11 Parati	8.331	15478	29544	53,82	28,20	0,06	
12 São Fidélis	8.057	10276	36789	78,41	21,90	0,06	
13 Itaperuna	7.981	9342	86720	85,43	9,20	0,06	
14 Petrópolis	7.870	15866	286537	49,60	2,75	0,05	
15 Paty do Alferes	7.483	8.175	24.931	91,54	30,01	0,05	
Estado	411.553	569.816	14.391.282	72,23	2,86	2,86	

7.1 Coleta das Amostras

Foi feito contato com o setor responsável pelo monitoramento da qualidade da água para consumo humano na Secretaria Municipal de Saúde de São José do Vale do Rio Preto, que prontamente concordou em participar do estudo. Os pontos de coleta foram escolhidos pelos técnicos municipais dentre os já pré-estabelecidos pelo programa municipal de vigilância da qualidade da água e que situavam-se próximos às lavouras, sendo que todos correspondiam a poços freáticos de profundidades variadas e abasteciam aos moradores das propriedades. Os pontos foram georreferenciados utilizando-se um GPS de navegação da marca Garmim modelo 12XL, e as coletas realizadas com o acompanhamento dos técnicos municipais, mediante autorização dos moradores. A Tabela 10 apresenta as coordenadas dos pontos amostrados. Em cada ponto foi coletado 1 litro de amostra em frasco de vidro âmbar, que foi acondicionado e transportado em caixa de isopor.

TABELA 10: Coordenadas das amostras coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto

Amostra	Local	Endereço	Coordenadas
01	Residência	Rua Seis de Setembro – Pouso Alegre	S22°07'49.4" W42°54'07.2"
02	Residência	Rua Nossa Senhora Aparecida – Pouso Alegre	S22°07'46,2" W42°54'09.6"
03	Residência	Rua Nossa Senhora Aparecida – Pouso Alegre	S22°07'46.8" W42°54'08.4"
04	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'19.3" W42°55'20.3"
05	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'14.0" W42°55'25.9"
06	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'04.1" W42°55'40.9"
07	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'04.3" W42°55'40.8"
08	Residência	Estrada Afonso Bitencourt - Roçadinho	S22°10'57.5" W42°56'16.1"
09	Escola	Escola Municipal Antônio Ribeiro Pereira - Glória	S22°10'10.0" W42°55'22.7"
10	Residência	Rua Albano Pereira Ribeiro - Glória	S22°10'07.3" W42°55'21,4"

A Figura 7 ilustra o aspecto da região e de alguns dos poços amostrados. A Figura 8 demonstra a localização dos pontos de coleta georreferenciados em relação a área do município de São José do Vale do Rio Preto. A Figura 9 mostra, em maior escala, o relevo da região e a localização dos pontos de coleta no trecho da bacia do Rio Preto que corta o município de São José do Vale do Rio Preto. Pode-se observar a proximidade dos poços amostrados em relação aos corpos hídricos que fazem a drenagem da bacia até o Rio Preto, principal manancial da região.



Figura 7: Aspecto de alguns dos poços coletados (A, F, H, I); Lavoura de chuchu e tomate predominantes na região (B e C); Extensão das plantações em relação à propriedade (D, G, I); Proximidade das plantações às barragens, córregos e riachos da região (E e G).

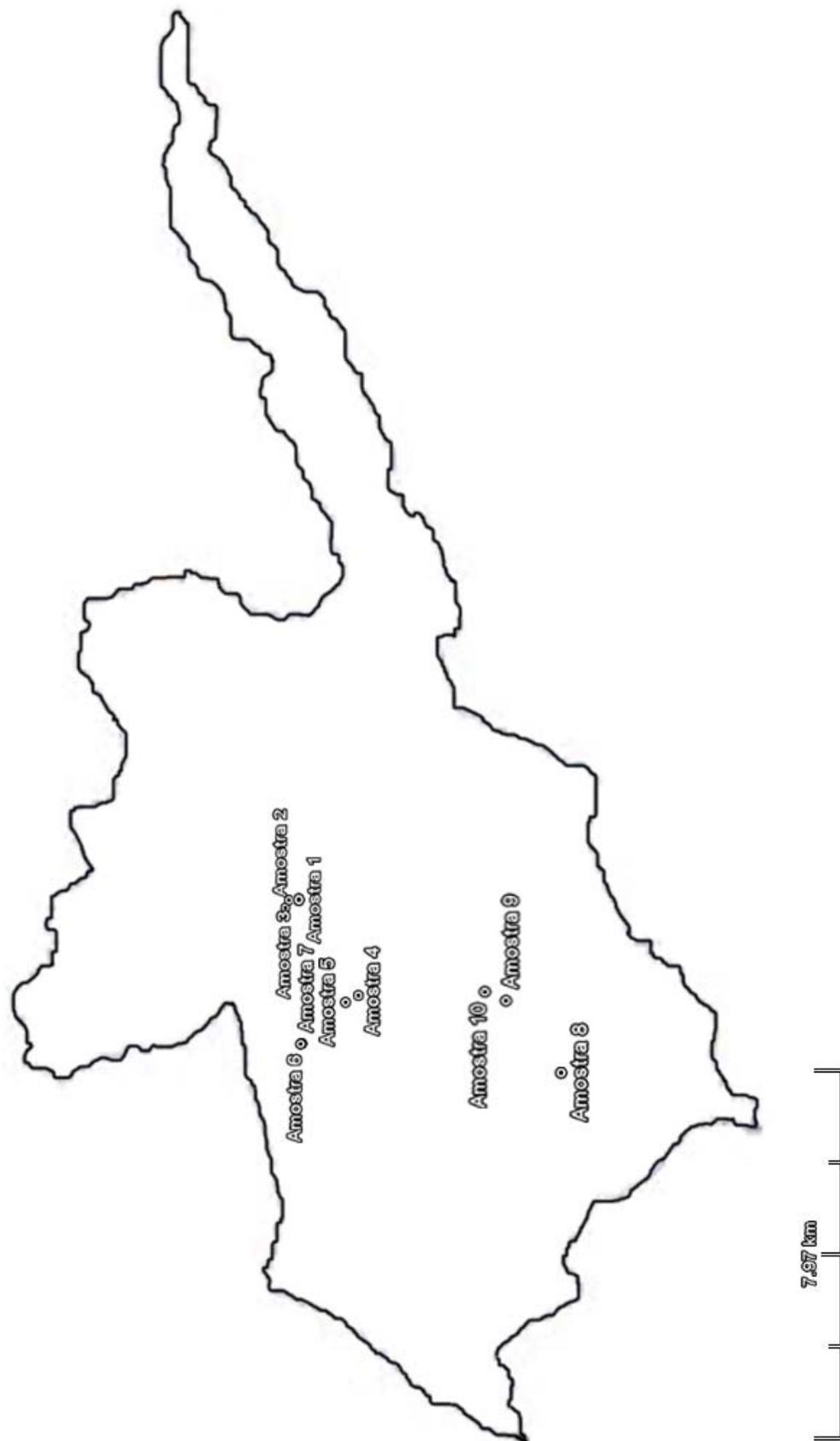


Figura 8: Posição relativa das amostras coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto

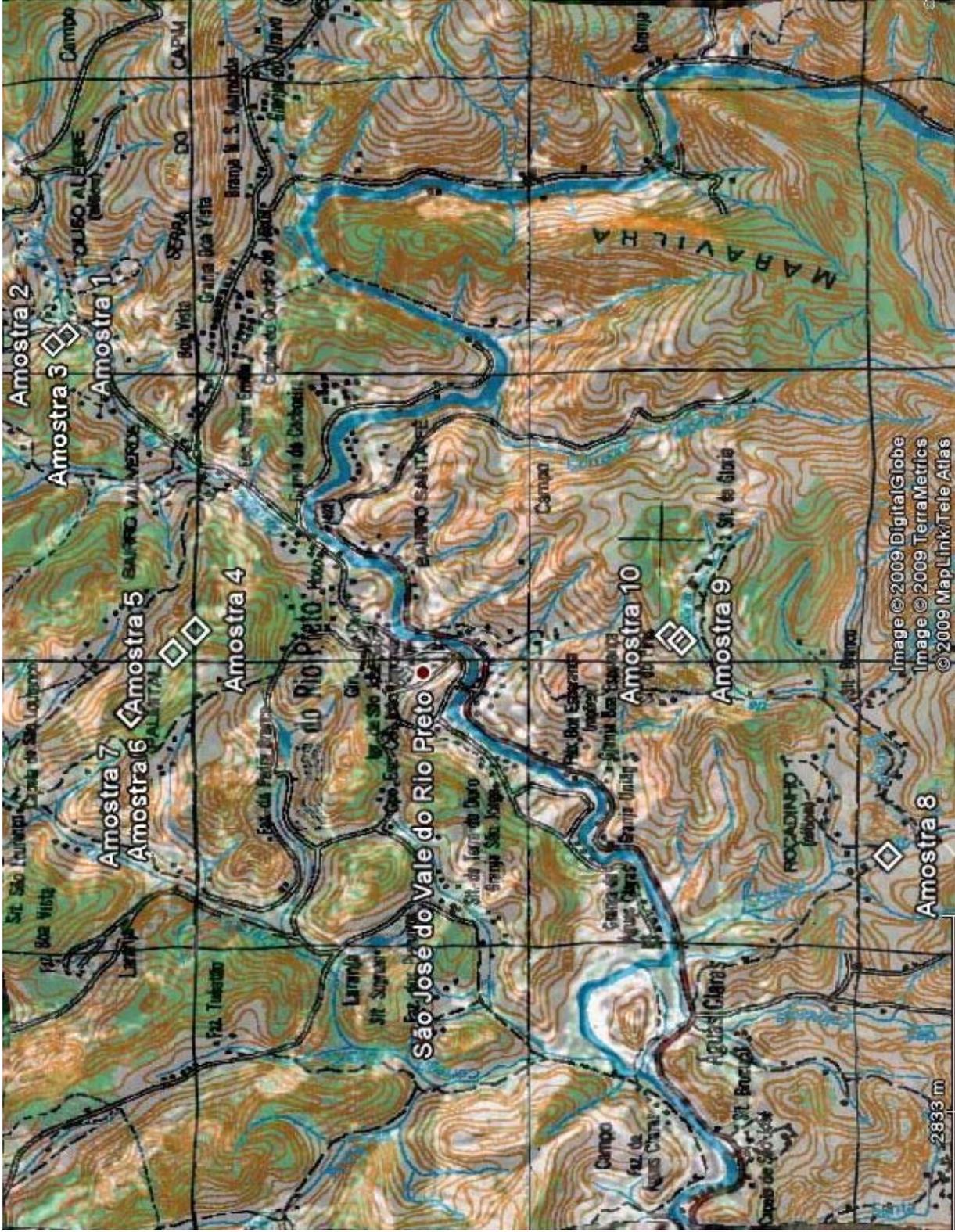


Figura 9: Folha topográfica da região sobreposta à imagem de satélite com os pontos de coleta georreferenciados. Pode-se observar a proximidade dos pontos de coleta (soluções alternativas de abastecimento) com os corpos d'água que fazem a drenagem da bacia do Rio Preto, principal corpo hídrico da região (IBGE, 1974; Google, 2009)

A Figura 10 mostra uma imagem de satélite em alta definição de um dos pontos de amostragem. Pode-se observar a extensão da área cultivada em relação a propriedade, o relevo acidentado da região, e a proximidade do plantio em relação a floresta, pertencente ao bioma Mata Atlântica que cerca toda a região.

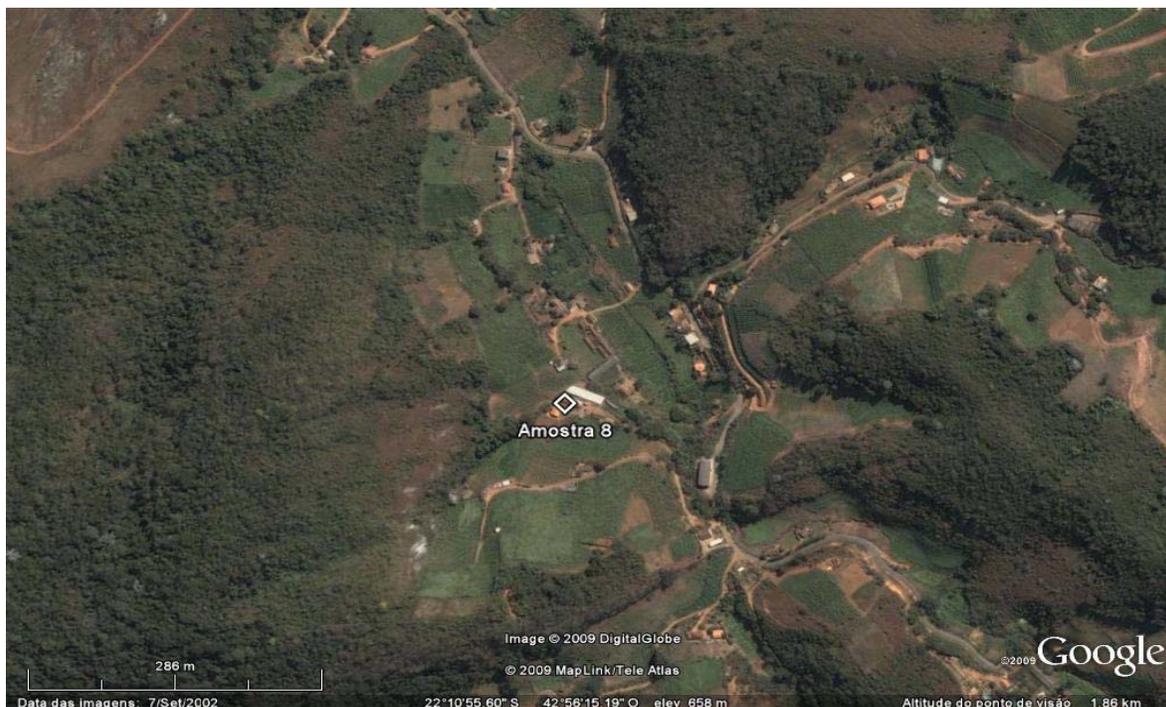


Figura 10 : Imagem de satélite em alta definição de um dos pontos de coleta georreferenciados mostrando a extensão da área cultivada em relação a propriedade, relevo do terreno (região de serra) e proximidade da mata (Google, 2009)

7.2 Análise das Amostras

Cada amostra foi processada e analisada conforme a metodologia descrita em 6.7.2. Cada alíquota foi injetada no cromatógrafo em duplicata. Os parâmetros cromatográficos utilizados são os mesmos descritos em 6.6.

8 Resultados e Discussão

8.1 Especificidade do Método Analítico

A especificidade do método é fundamental para que se tenha confiança quando da identificação de analitos em amostras desconhecidas. Nos métodos baseados em separação cromatográfica, os analitos são identificados através dos seus tempos de retenção (t_R) na

coluna cromatográfica. Entretanto, os analitos interagem de diferentes formas entre si e com os demais componentes da matriz. Essas interações proporcionam comportamentos diferenciados em relação à fase móvel e à fase estacionária, gerando diferentes perfis de separação que devem ser avaliados caso a caso. Portanto, para a determinação do parâmetro de especificidade, é importante que os analitos estejam submetidos às mesmas condições esperadas em amostras reais. Para tanto, procedeu-se como descrito em 6.8.1, obtendo-se os t_{R_s} em soluções contendo as substâncias de interesse e avaliou-se a eficiência da separação cromatográfica.

Conforme explanado em 6.5, trabalhou-se com dois grupos de analitos (G1 e G2). Na Figura 11 tem-se o cromatograma de separação dos agrotóxicos estudados onde foram determinados seus t_R . Na Tabela 11 estão mostrados os resultados para a eficiência da separação cromatográfica dos analitos, ordenados por ordem crescente de t_R .

TABELA 11 : Parâmetros cromatográficos de separação dos agrotóxicos de G1 e G2 em n-hexano

<i>Agrotóxico</i>	t_R^*	K^*	R_s	α
Trifluralina*	9,65	2,79	-	-
Alfa-HCH*/Trifluralina	10,89	3,27	5,0	1,17
Hexaclorobenzeno*/Alfa-HCH	11,28	3,42	1,0	1,05
Beta-HCH*/Hexaclorobenzeno	12,34	3,84	3,0	1,12
Gama-HCH*/Beta-HCH	12,66	3,96	1,3	1,03
Delta-HCH*/Gama-HCH	14,15	4,55	5,0	1,15
Alfa-Endossulfam*/Delta-HCH	26,44	9,37	30,7	2,06
Endrin*/Alfa-Endossulfam	30,51	10,96	10,2	1,17
Beta-Endossulfam*/Endrin	31,29	11,27	2,6	1,03
2,4'DDT*/Beta-Endossulfam	32,11	11,59	3,3	1,03
4,4'DDT*/2,4'DDT	34,08	12,36	9,8	1,07
Metoxicloro*/4,4'DDT	37,04	13,53	14,8	1,09

t_R = Tempo de Retenção; k = Fator de Retenção; R_s = Resolução; α = Fator de Separação. Observações: Os valores de t_R e K correspondem às substâncias marcadas com (*) e os valores de R_s e α correspondem à separação agrotóxico/agrotóxico.

De acordo com a Tabela 11 verifica-se que apenas as separações entre o hexaclorobenzeno e o alfa-HCH e entre o beta-HCH e o gama-HCH não obtiveram os valores esperados de R_s (igual ou superior a 1,5). Entretanto, os valores de R_s obtidos significam que as substâncias foram separadas em cerca de 98 e 99,5%, para o primeiro e

segundo par, respectivamente, o que não proporciona interferências significativas nos cálculos de integração das áreas dos picos e na obtenção dos tempos de retenção, como pode ser observado no cromatograma de separação (Figura 11). As demais substâncias obtiveram os valores esperados de k , R_s e α , significando eficiência na separação e obtenção dos tempos de retenção dentro de níveis aceitáveis de exatidão.

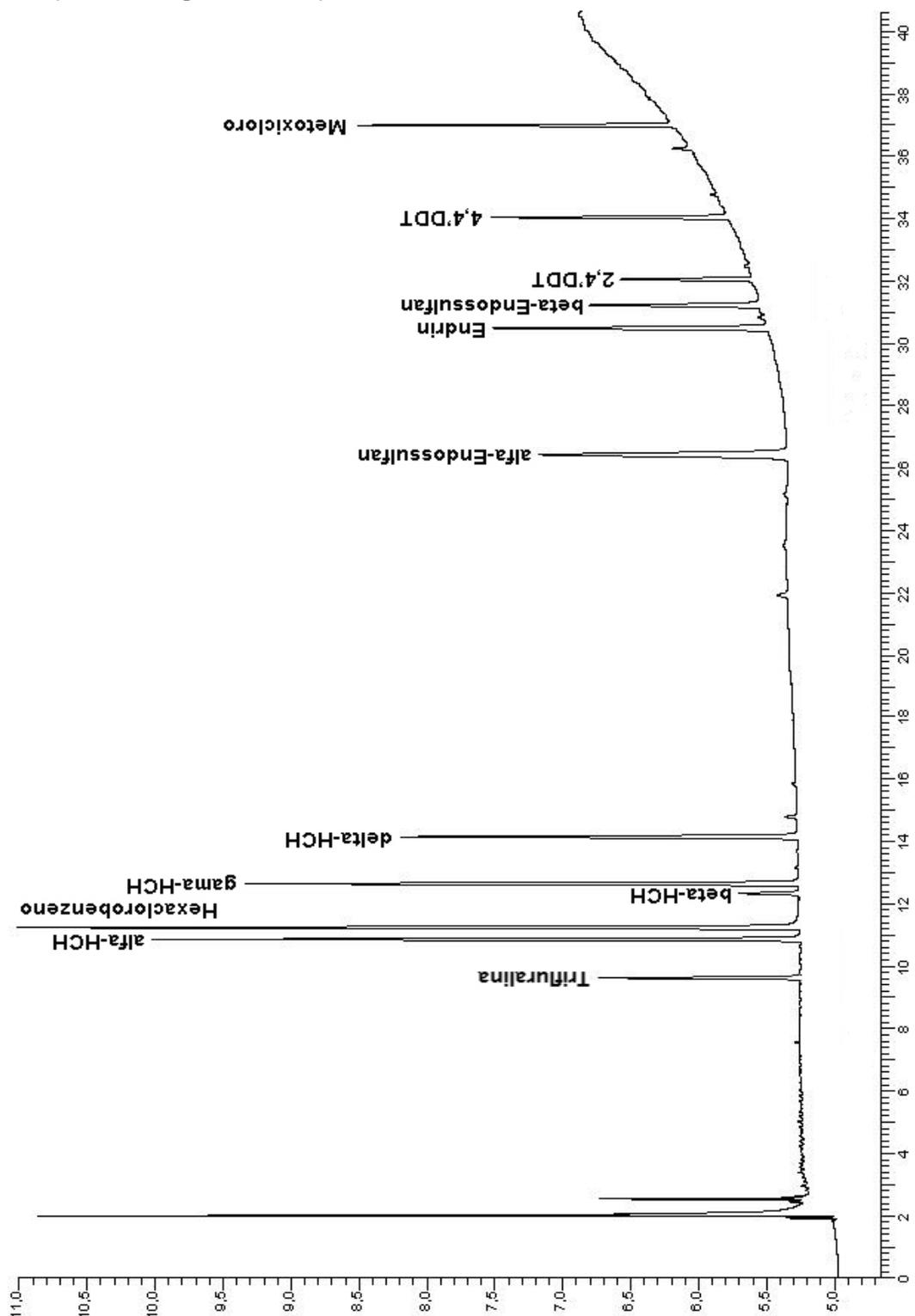


Figura 11 : Cromatograma de separação dos agrotóxicos estudados

Diante dos t_{RS} determinados em n-hexano, comparou-se a média dos t_{RS} obtidos nas extrações com tetracloroetileno com posterior troca de solvente, e nas extrações com injeção direta de clorobenzeno, cujos resultados estão mostrados na Tabela 12.

TABELA 12 : Comparação entre os t_{RS} das Substâncias de Interesse em n-hexano, Extraídas em Tetracloroetileno e Extraídas em Clorobenzeno

<i>Agrotóxico</i>	<i>t_R médio, n-hexano (n=6)¹</i>	<i>t_R médio Tetracloroetileno, (n=5)²</i>	<i>t_R médio, Clorobenzeno (n=2)³</i>	<i>Desvio dos t_{RS}⁴</i>	<i>CV(%)⁵</i>
Trifluralina	9,657	9,652	9,650	0,003668	0,037998
Alfa-HCH	10,957	10,892	10,893	0,037577	0,344300
Hexaclorobenzeno	11,321	11,285	11,285	0,021093	0,186718
Beta-HCH	12,460	12,352	12,352	0,062566	0,505055
Gama-HCH	12,751	12,672	12,671	0,046050	0,362659
Delta-HCH	14,277	14,158	14,158	0,068570	0,482973
Alfa Endossulfam	26,577	26,456	26,454	0,070524	0,266169
Endrin	30,606	30,518	30,515	0,051558	0,168789
Beta Endossulfam	31,431	31,231	31,227	0,117065	0,374056
2,4'DDT	32,088	32,088	32,083	0,002715	0,008463
4,4'DDT	34,145	34,088	34,084	0,034141	0,100105
Metoxicloro	37,102	37,047	37,046	0,032047	0,086461

1 - média dos tempos de retenção da mistura de agrotóxicos em n-hexano; 2 - média dos tempos de retenção da mistura de agrotóxicos extraídos em tetracloroetileno; 3 - média dos tempos de retenção da mistura de agrotóxicos em clorobenzeno; 4 - desvio-padrão dos tempos de retenção obtidos em 1, 2 e 3; 5 - Coeficiente de variação dos tempos de retenção obtidos em 1,2, e 3.

Pode-se perceber que o método apresenta grande especificidade, onde o maior desvio padrão obtido foi para a substância beta-endossulfam e, apesar disso, não houve sobreposição de nenhum dos intervalos de tempos de retenção. A análise do coeficiente de variação também demonstra que houve grande grau de concordância entre os resultados.

8.2 Linearidade do Método Analítico

A Tabela 13 apresenta os resultados das equações das curvas analíticas obtidas para as substâncias de interesse. Analisando as equações das retas obtidas conclui-se que o modelo linear é adequado já que o coeficiente de correlação foi maior do que 0,99. A análise residual (soma residual dos quadrados mínimos) em relação ao coeficiente de

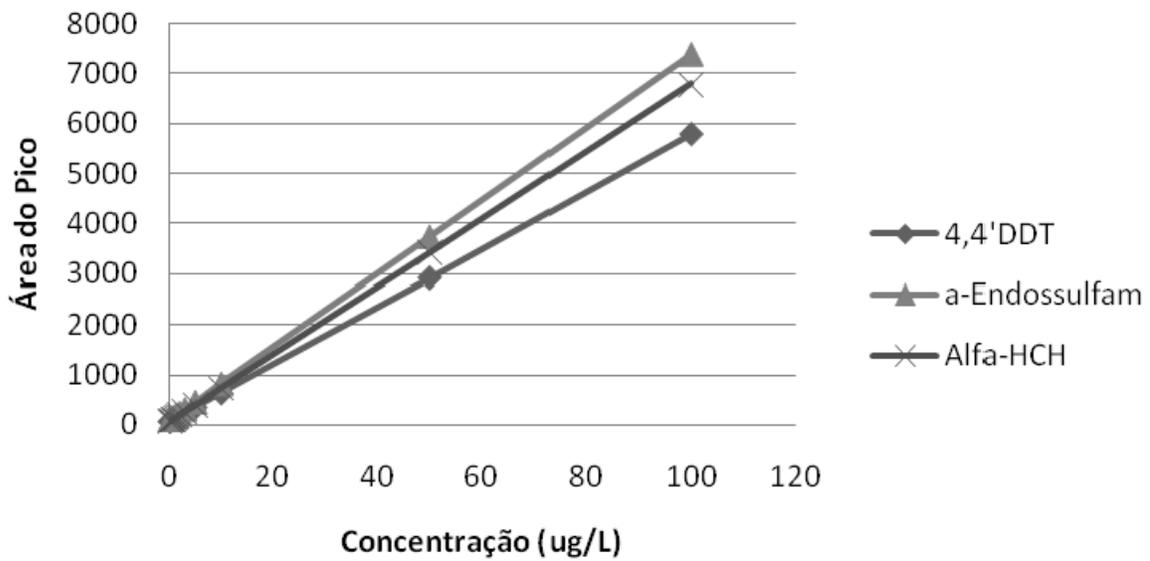
determinação da regressão linear obteve valores muito próximos para r^2 , confirmando a adequação do modelo de regressão. Os intervalos de trabalho com linearidade satisfatória encontrados para as substâncias de interesse estão apresentados na Tabela 14.

Através das curvas analíticas obtidas pôde-se construir os gráficos apresentados nas Figuras 12 e 13 e avaliar a sensibilidade cromatográfica para cada agrotóxico, já que quanto maior a inclinação da reta mais sensível é o método. Nota-se que o método é pouco sensível para β -HCH, porém apresenta boa sensibilidade para os demais agrotóxicos, com valores semelhantes. Dentre todas as substâncias de interesse, a maior sensibilidade foi obtida com o Metoxicloro.

TABELA 13 : Equações das Curvas Analíticas Obtidas para os Agrotóxicos Estudados com seus Respectivos Intervalos de Confiança e Coeficiente de Correlação Linear (r^2)

<i>Padrões</i>	<i>Coeficiente Angular</i>		<i>Coeficiente Linear</i>		r^2
4,4'DDT	57,357	± 11,020	54,289	± 59,739	0,9946
Alfa Endossulfam	72,999	± 8,447	79,063	± 47,705	0,9965
Alfa-HCH	67,313	± 8,677	60,190	± 54,779	0,9975
Beta-HCH	9,054	± 1,248	9,041	± 6,931	0,9972
Delta-HCH	59,906	± 11,257	71,775	± 61,493	0,9948
Endrin	60,913	± 8,206	-15,848	± 3,152	0,9973
Gama-HCH	67,809	± 10,861	172,663	± 74,134	0,9962
Hexaclorobenzeno	117,468	± 12,489	111,450	± 69,726	0,9983
Metoxicloro	175,495	± 39,455	237,257	± 188,139	0,9926
2,4'DDT	42,428	± 2,020	0,268	± 8,865	0,9997
Beta Endossulfam	64,583	± 2,861	-21,145	± 13,876	0,9997
Trifluralina	41,647	± 2,017	-11,599	± 10,716	0,9997

Curvas Analíticas de Agrotóxicos G1



Curvas Analíticas de Agrotóxicos G1

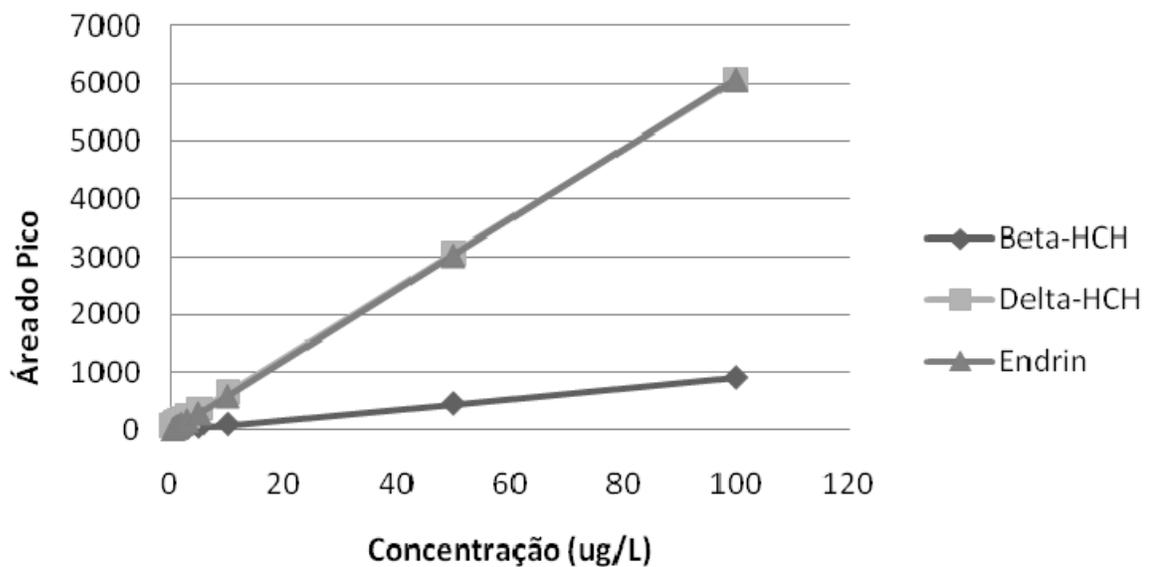
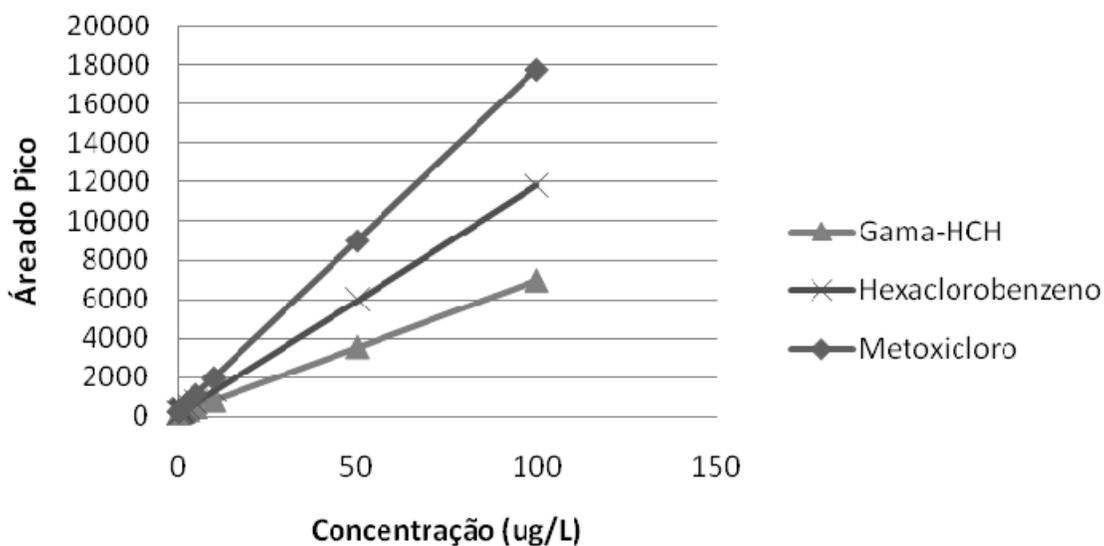


Figura 12 : Curvas Analíticas dos Agrotóxicos G1 (4,4'DDT, alfa-Endossulfam, alfa-HCH, beta-HCH, delta-HCH, e Endrin).

Curvas Analíticas de Agrotóxicos G1



Curvas Analíticas de Agrotóxicos G2

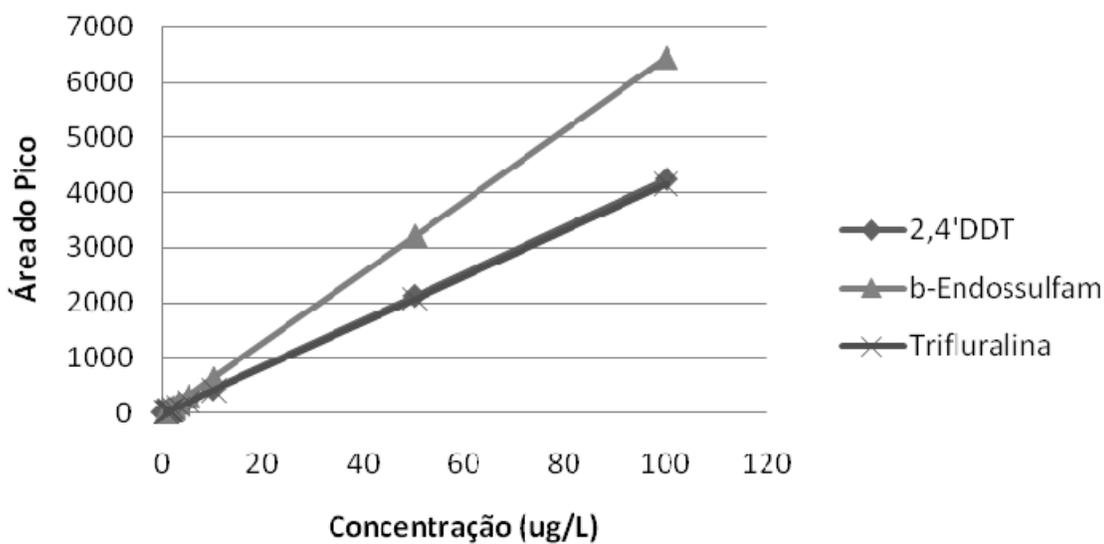


Figura 13: Curvas Analíticas dos Agrotóxicos G1 (Gama-HCH, Hexaclorobenzeno e Metoxicloro) e G2 (2,4'DDT, beta-Endossulfam e Trifluralina).

TABELA 14: Valores de Intervalo de Trabalho para os Agrotóxicos Estudados

<i>Padrões</i>	<i>Intervalo de trabalho ($\mu\text{g/L}$)</i>
4,4'DDT	1,24 - 98,33
Alfa Endossulfam	1,17 - 101,75
Alfa-HCH	1,20 - 102,05
Beta-HCH	0,55 - 100,96
Delta-HCH	1,04 - 100,43
Endrin	0,86 - 101,45
Gama-HCH	1,70 - 104,13
Hexaclorobenzeno	1,07 - 100,66
Metoxicloro	1,00 - 103,00
2,4'DDT	0,48 - 95,50
Beta Endossulfam	0,52 - 100,46
Trifluralina	0,57 - 110,38

8.3 Exatidão e Precisão

A exatidão e precisão do método foram determinados em amostras fortificadas ao nível de 0,5VMP para cada agrotóxico. Os resultados obtidos através da extração com tetracloroetileno com posterior mudança de solvente (tetracloroetileno/n-hexano), clorobenzeno com posterior mudança de solvente (clorobenzeno/n-hexano), e clorobenzeno sem mudança de solvente (clorobenzeno direto) foram submetidos ao teste de Grubbs para a localização de valores aberrantes que foram descartados. Os resultados finais foram agrupados e estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 : Comparação da Eficiência da extração com tetracloroetileno e clorobenzeno com posterior mudança de solvente para n-hexano, e clorobenzeno sem mudança de solvente

Agrotóxicos	Recuperação (%) ± Incerteza									
	Concentração (0,5 VMP)	Tetracloroetileno			Clorobenzeno			Clorobenzeno Direto		
4,4'DDT		75,0	±	15,7	22,5	±	5,2	44,0	±	9,1
Alfa Endossulfam		90,9	±	10,7	19,1	±	2,3	45,6	±	5,4
Alfa-HCH		109,4	±	14,8	18,3	±	2,9	104,7	±	14,0
Beta-HCH		93,3	±	13,6	27,2	±	4,3	76,7	±	11,0
Delta-HCH		127,7	±	25,6	36,9	±	7,9	108,4	±	21,5
Endrin		95,3	±	13,2	21,7	±	3,1	44,9	±	6,2
Gama-HCH		87,5	±	15,0	18,5	±	3,6	78,9	±	13,3
Hexaclorobenzeno		58,1	±	7,1	9,3	±	1,8	50,2	±	5,8
Metoxicloro		70,1	±	16,7	21,0	±	5,1	35,0	±	8,3
2,4'DDT		92,3	±	4,4	18,5	±	0,9	45,4	±	2,2
Beta Endossulfam		103,0	±	4,5	22,5	±	1,0	60,5	±	2,7
Trifluralina		71,8	±	3,5	15,5	±	0,7	52,5	±	2,5

Pode-se observar que as melhores recuperações foram obtidas nas extrações com tetracloroetileno/n-hexano. A injeção direta de clorobenzeno, que envolve um procedimento a menos (troca de solvente), e por isso estaria menos sujeita a perdas ou contaminações cruzadas, foi capaz de proporcionar recuperações próximas às obtidos com o tetracloroetileno para o Alfa-HCH e Hexaclorobenzeno, porém, os resultados foram inferiores para os demais analitos. A maior eficiência da extração com tetracloroetileno fica evidenciada com os valores de fator de enriquecimento (concentração de analito obtida no extrato orgânico dividida pela concentração real de analito na amostra aquosa fortificada) obtidos com cada solvente, conforme apresentado na Tabela 16. Apesar da incerteza elevada, de um modo geral, os resultados obtidos com tetracloroetileno/n-hexano ficaram dentro da faixa aceitável para resíduos de agrotóxicos (70 – 120%). A única exceção foi para o hexaclorobenzeno que obteve recuperação de 58,1% na extração com tetracloroetileno/n-hexano.

TABELA 16: Fatores de Enriquecimento obtidos na Extração dos Agrotóxicos Estudados

Agrotóxicos	Fator de Enriquecimento		
	Concentração (0,5 VMP)	Tetracloroetileno	Clorobenzeno Direto
4,4'DDT	208	63	122
Alfa Endossulfam	253	53	127
Alfa-HCH	304	51	291
Beta-HCH	259	76	213
Delta-HCH	355	102	301
Endrin	265	60	125
Gama-HCH	243	51	219
Hexaclorobenzeno	161	26	140
Metoxicloro	195	58	97
2,4'DDT	256	51	126
Beta Endossulfam	286	62	168
Trifluralina	199	43	146

Os melhores níveis de precisão também foram obtidos através da extração tetracloroetileno/n-hexano que, de um modo geral, ficaram dentro dos limites recomendáveis de até 20% de coeficiente de variação (CV) (APVMA, 2004). Os resultados estão apresentados na tabela 17.

TABELA 17: Valores de Coeficiente de Variação Obtidos nas Extrações dos Agrotóxicos Estudados

Agrotóxicos	CV (%)		
	Concentração (0,5 VMP)	Tetracloroetileno (n=7), *(n=6)	Clorobenzeno (n=5) Direto (n=2)
4,4'DDT	14	19	21
Alfa Endossulfam	11	19	11
Alfa-HCH	18	14	14
Beta-HCH	20	66	18
Delta-HCH	20	60	22
Endrin	11	16	14
Gama-HCH	18	85	17
Hexaclorobenzeno	14	48	23
Metoxicloro	10	19	7
2,4'DDT*	11	37	11

Beta Endossulfan*	18	64	5
Trifluralina*	13	33	4

8.4 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da faixa linear das curvas analíticas. Os limites do equipamento foram obtidos diretamente das curvas propriamente ditas. Os limites do método levaram em conta os fatores de enriquecimento obtidos nas extrações de amostras fortificadas ao nível de 0,5 VMP. A Tabela 18 apresenta os resultados dos limites de detecção e quantificação obtidos nas extrações com tetracloroetileno/n-hexano, clorobenzeno/n-hexano e clorobenzeno direto comparados com os valores máximos permitidos para cada agrotóxico na Portaria 518/04 – MS.

TABELA 18: Limites de LD e LQ para os agrotóxicos estudados em comparação com os VMPs da Port. 518/04 – MS

Agrotóxicos	Limites		Do Método (leva em conta os fatores de enriquecimento do processo de extração – préconcentração analítica)						VMP (Port. 518/04-MS)
	Do Equipamento		Limite de Detecção (µg/L) (LD do equipamento/FE)			Limite de Quantificação (µg/L) (LQ do equipamento/FE)			(µg/L)
	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Tetra. ¹	Clorob. ²	Clorob. Dir. ³	Tetra. ¹	Clorob. ²	Clorob. Dir. ³	
Concentração 0,5 VMP									
4,4'DDT	1,35	4,50	0,0065	0,0216	0,0110	0,0216	0,0719	0,0368	2
Alfa Endossulfam	1,14	3,80	0,0045	0,0214	0,0090	0,0150	0,0715	0,0300	20
Alfa-HCH	1,07	3,56	0,0035	0,0210	0,0037	0,0117	0,0700	0,0122	2
Beta-HCH	1,14	3,79	0,0044	0,0150	0,0053	0,0146	0,0501	0,0178	2
Delta-HCH	1,35	4,49	0,0038	0,0131	0,0045	0,0127	0,0438	0,0149	2
Endrin	1,09	3,64	0,0041	0,0181	0,0088	0,0138	0,0604	0,0292	0,6
Gama-HCH	1,57	5,23	0,0065	0,0306	0,0072	0,0215	0,1019	0,0238	2
Hexaclorobenzeno	0,78	2,60	0,0048	0,0302	0,0056	0,0161	0,1007	0,0186	1
Metoxicloro	1,61	5,38	0,0083	0,0276	0,0166	0,0276	0,0921	0,0553	20
2,4'DDT	0,34	1,13	0,0013	0,0066	0,0027	0,0044	0,0220	0,0090	2
Beta Endossulfam	0,35	1,15	0,0012	0,0055	0,0021	0,0040	0,0184	0,0068	20
Trifluralina	0,41	1,37	0,0021	0,0096	0,0028	0,0069	0,0319	0,0094	2

1 – Extração com tetracloroetileno/n-hexano; 2 – extração com clorobenzeno/n-hexano; 3 – extração com clorobenzeno direto.

Avaliando a Tabela 18, pode-se verificar que os menores limites de detecção e quantificação foram alcançados com as extrações realizadas com tetracloroetileno/n-hexano.

8.5 Aplicação do Método Desenvolvido – Resultado das Amostras

Após avaliação de todos os parâmetros de validação estudados, verificou-se que as melhores performances foram obtidas nas extrações realizadas com tetracloroetileno/n-hexano e, por este motivo, o tetracloroetileno foi o solvente de escolha para o processamento das amostras coletadas em São José do Vale do Rio Preto.

Todas as amostras coletadas foram processadas em duplicata conforme o método descrito em 6.7.2. Algumas das amostras apresentaram pequenos picos em seus cromatogramas, provavelmente oriundos de componentes da matriz que produzem alguma resposta ao detector por captura de elétrons. No entanto, nenhuma das amostras analisadas apresentou picos com tempos de retenção coincidentes aos tempos de retenção determinados para os agrotóxicos estudados. Tendo em vista os limites de detecção obtidos com o método, pode-se afirmar que não foram detectados nenhum dos agrotóxicos de interesse nas amostras analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 19.

TABELA 19: Resultado da Análise das Amostras Coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto

Amostra	Local	Endereço	Coordenadas	Resultado
01	Residência	Rua Seis de Setembro – Pouso Alegre	S22°07'49.4" W42°54'07.2"	< LQ
02	Residência	Rua Nossa Senhora Aparecida – Pouso Alegre	S22°07'46,2" W42°54'09.6"	< LQ
03	Residência	Rua Nossa Senhora Aparecida – Pouso Alegre	S22°07'46.8" W42°54'08.4"	< LQ
04	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'19.3" W42°55'20.3"	< LQ
05	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'14.0" W42°55'25.9"	< LQ
06	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'04.1" W42°55'40.9"	< LQ
07	Residência	Estrada Saturnino Teixeira da Silva - Palmital	S22°08'04.3" W42°55'40.8"	< LQ
08	Residência	Estrada Afonso Bitencourt - Roçadinho	S22°10'57.5" W42°56'16.1"	< LQ
09	Escola	Escola Municipal Antônio Ribeiro Pereira - Glória	S22°10'10.0"	< LQ

10	Residência	Rua Albano Pereira Ribeiro - Glória	W42°55'22.7" S22°10'07.3" W42°55'21,4"	< LQ
----	------------	-------------------------------------	--	------

9 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que se conseguiu desenvolver um método rápido, simples, eficiente, e de baixo custo, utilizando CG/DCE para a análise simultânea de multirresíduos dos agrotóxicos 4,4'DDT, Alfa-Endossulfam, Alfa-HCH, Beta-HCH, Delta-HCH, Endrin, Gama-HCH, Hexaclorobenzeno, Metoxicloro, 2,4'DDT, Beta-Endossulfam e Trifluralina em matrizes de água para consumo humano provenientes de soluções alternativas de abastecimento.

As condições de extração foram otimizadas através do estudo do melhor solvente de extração, levando-se em conta sua possibilidade de interferência no sistema de detecção. A extração com solução de tetracloroetileno:acetona (25µL/mL) com posterior substituição do solvente por n-hexano antes da injeção no cromatógrafo foi a que permitiu os maiores fatores de enriquecimento (pré-concentração) e melhores taxas de recuperação dos analitos.

As curvas analíticas obtidas mostraram bons coeficientes de correlação, sendo todos com $r^2 > 0,99$.

A linearidade das curvas foi adequada, estendendo-se até três ordens de grandeza e atendendo aos limites de 80 a 120% da concentração esperada, mesmo levando-se em consideração o pior resultado de pré-concentração obtido, que foi de 161 vezes para o hexaclorobenzeno no solvente de extração escolhido.

As recuperações médias obtidas estavam dentro dos valores aceitáveis para resíduos de agrotóxicos (70 a 120%), à exceção do hexaclorobenzeno, apesar dos intervalos de confiança apresentarem amplitudes relativamente grandes. Devido a ausência de injetor automático no cromatógrafo utilizado para a realização desse trabalho, o erro do operador certamente refletiu-se nas incertezas calculadas para as curvas analíticas. Como o erro relativo das recuperações foi calculado em função do erro das curvas de calibração, é

possível que o erro do operador tenha sido indiretamente responsável pelo aumento da amplitude nos intervalos de confiança para as recuperações.

A precisão obtida para todos os agrotóxicos ficou dentro da faixa recomendada de até 20% de variação. Também para este caso, a utilização de injeções automatizadas poderia contribuir para a melhoria das taxas de variação.

A sensibilidade do método (LD e LQ) em relação aos agrotóxicos estudados foi na ordem de dezenas de ng/L para a maioria dos agrotóxicos analisados, após a etapa de extração e pré-concentração, limites perfeitamente adequados para se cumprir as exigências da Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde.

Tendo em vista o pequeno volume de amostra e o diminuto volume de solvente de extração utilizados, pode-se dizer que o método proposto é mais econômico, menos agressivo ao meio ambiente por gerar menos resíduos, e menos trabalhoso do que os tradicionais métodos de extração líquido-líquido (ELL). Além disso, a praticidade do método dispensa a necessidade de aparatos adicionais para o processo de extração, facilitando sobremaneira sua implantação laboratorial.

O tempo total de extração por amostra (cerca de 10 minutos se levado em conta o tempo de evaporação para troca do solvente) também é uma vantagem adicional em relação aos métodos de ELL, pois permite que se trabalhe com amostras em batelada e se possa fazer um número maior de replicatas por amostra em um mesmo dia.

Apesar do tetracloroetileno e do clorobenzeno não serem considerados solventes “verdes” as quantidades utilizadas para a execução do método são mínimas, o que diminui consideravelmente a geração de resíduos pelo laboratório.

Uma análise preliminar de dez amostras de água para consumo humano provenientes de soluções alternativas de abastecimento espalhadas pelo município de São José do Vale do Rio Preto, município com produção agrícola relevante na zona rural do Estado do Rio de Janeiro, realizada por meio do método validado neste trabalho, não revelou contaminação pelos agrotóxicos organoclorados estudados ($< LQ$).

10 Referências Bibliográficas

A INDÚSTRIA Química Brasileira em 2007 *in* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). **Publicações**. 2008. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/conteudo.asp?princ=pub>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2008.

ABASTECIMENTO de Água – Rio de Janeiro. Moradores por Abastecimento de Água e Situação. 2000. In: DATASUS. **Informações de Saúde**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?ibge/cnv/aagrj.def>>. Acesso em 21 de maio de 2007

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para Qualidade em Química Analítica**. Uma Assistência à Habilitação. In: Séries Temáticas. Laboratório. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>>. Acesso em 11 de junho de 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. **Relatório**. Controlando Agrotóxicos nos Alimentos: O Trabalho Desenvolvido pela ANVISA com as Vigilâncias Sanitárias dos Estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a Fiocruz/INCQS e os Laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de Atividades 2001 – 2004. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 31 de março de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. **Relatório**. Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos: Trabalho Desenvolvido pela ANVISA, com as Vigilâncias Sanitárias dos Estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED E LACEN/PR. Relatório de Atividades 2001 – 2006. Brasília, DF, 2007. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001_2006.pdf>. Acesso em 02 de setembro de 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**; 02 de maio de 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Endrin**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 1996. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp89.pdf>> Acesso em: 04 de maio de 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Endossulfan**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 2000. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>> Acesso em: 04 de maio de 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for DDT**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35-p.pdf>> Acesso em: 04 de maio de 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Hexachlorobenzene**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp90-p.pdf>> Acesso em: 04 de maio de 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-Hexachlorocyclohexane**. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, 2005. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43-p.pdf>> Acesso em 04 de julho de 2009.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATDSR). **Toxicological Profile for Methoxychlor**. U.S. Department of health and human services,

Public Health Service, 1993. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp47.pdf>> Acesso em: 04 de maio de 2008.

AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY (APVMA). **Guidelines for the Validations of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products.** The National Independent Regulator of Pesticides and Veterinary Medicines. Australian Government. 2004. Disponível em: <http://www.apvma.gov.au/guidelines/downloads/gl69_analytical_methods.pdf >. Acesso em: 23 de junho de 2009.

BASTOS, R.K.X. *et al.* Implementando a Portaria 1469. Uma breve análise de Custos de Programas de Controle de Qualidade da Água. In: 33ª CONFERÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E ESGOTOS - ASSEMAE. Santo André, SP, 2003. [**Trabalhos Apresentados**]. Disponível em: <http://www.semasa.sp.gov.br/Documentos/ASSEMAE/Trab_13.pdf>. Acesso em 12 de novembro de 2007.

BRASIL. Constituição (1988). **Casa Civil:** Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em: 25 de Julho de 2009.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Casa Civil:** Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: < <http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/LEIS/18080.htm> >. Acesso em: 25 de julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 26 de março de 2004.

BRASIL. Portaria nº 1.172 de 15 de junho de 2004. Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal, na área de Vigilância em Saúde, e define a sistemática de financiamento e dá outras providências. **Saúde Legis.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2004/prt1172_15_06_2004.html>. Acesso em 23 de julho de 2009.

BRASIL. Portaria nº 2.031 de 23 de setembro de 2004. Dispões sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Saúde Legis.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2004/prt2031_23_09_2004.html>. Acesso em 23 de julho de 2009.

CANADIAN Drinking Water Guidelines. In: HEALTH CANADA. **Environmental and Workplace Health.** 1992. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/water-eau/drink-potab/guide/index-eng.php>>. Acesso em: 04 de julho de 2009.

CANADIAN Water Quality Guidelines for the Protection fo Agricultural Water Uses. In: ENVIRONMENT CANADA. **Canadian Water Quality Guidelines.** 1999. Disponível em: <<http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/English/Ceqg/Water/default.cfm>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2008.

CASES, J; SCOTT, R.P.W; **Chromatography Theory**, Marcel Dekker, Inc, New York 2002.

CENTRO DE INFORMAÇÕES E DADOS DO RIO DE JANEIRO - FUNDAÇÃO CIDE. **O Rio de Janeiro em Dados - 2006.** Disponível em: <http://www.cide.rj.gov.br/cide/resumo_socio_eco.php>. Acesso em: 24 de setembro de 2006.

DEAN, J. R. **Methods for Environmental Trace Analysis.** John Wiley & Sons, Inc. West Sussex, England, 2003. p 286.

DOMINGUEZ, L. A. **Determinação de focos secundários de contaminação por hexaclorociclo-hexano no solo da Cidade dos Meninos, Duque de Caxias (RJ)**. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz. 2001. Disponível em: <<http://teses.iciet.fiocruz.br/pdf/dominguelaem.pdf>>. Acesso em: 08 de agosto de 2009.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (EMATER/RJ). **Dados Estatísticos da Produção Agrícola do Estado do Rio de Janeiro**. Acompanhamento Sistemático da Produção Agrícola – ASPA. 2007. Disponível em: <<http://www.emater.rj.gov.br>>. Acesso em: 30 de abril de 2008.

EURACHEM WORKING GROUP. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>> Acesso em 11 de junho de 2009.

GALVÃO, O. J. A. Desenvolvimento dos Transportes e Integração Regional no Brasil – Uma Perspectiva Histórica. In: **Planejamento e Políticas Públicas** n° 13 – junho, 1996. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br/pub/ppp/ppp13/galvao.pdf>> Acesso em: 23 de agosto de 2008.

GOOGLE Earth 5.0.1. Software. Google. 2009

INDICADORES Rurais ano 2007. In: CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Indicadores**. 2008. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/indicadores>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2008.

INDICADORES Rurais ano 2008. In: CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Indicadores**. 2008. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/indicadores>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapa de Unidades de Relevo do Brasil**. 2ª edição. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/fis.php>. Acesso em: 28 de maio de 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapeamento Cartográfico:** Cartas Topográficas Restituídas. Carta topográfica ANTA., 1974. Escala 1:50.000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm#TOPO>. Acesso em: 16 de junho de 2009.

INTERNATIONAL Programme on Chemical Safety. In: CHEMICAL SAFETY INFORMATION FROM INTERGOVERNMENTAL ORGANIZATIONS (INCHEM). **Trifluralin ICSC.** 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0205.htm>>. Acesso em: 04 de julho de 2009.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Harmonised Guidelines for The Use of Recovery Information In Analytical Measurement. In: Symposium on Harmonisation of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories, Orlando, USA, 1996. **Technical Report.** Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/recovery.pdf>> Acesso em 22 de julho de 2009

JEANNOT, M. A; CANTWELL, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. In: **Anal. Chem.** 69, 1997. p. 235-239.

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

KLAASSEN, C. D; WATKINS, J. B. **Casarett and Doull's toxicology:** the basic science of poisons. 6th ed. New York; McGraw-Hill; 2001. 1236 p.

KOEL, M; KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. In: **Pure Appl. Chem.**, Vol. 78, No. 11, pp. 1993–2002, 2006. Disponível em: <<http://old.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7811x1993.pdf>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2009.

LAMBROPOULOU, D.A; ALBANIS, T.A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. In: **J. Biochem. Biophys. Methods** 70, 2007. p. 195–228

MANAHAN, S.E.; **Toxicological Chemistry and Biochemistry**, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

MILLER, J. C; MILLER J. N. **Estadística para Química Analítica**, segunda Edição, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A: Wilmington, E.U.A, 1988. p. 42.

MILLER, J.M; MCNAIR, H.M; **Basic Gas Chromatography**, John Wiley & Sons, Inc. United States, 1998.

MOREIRA, R. J; Críticas Ambientalistas à Revolução Verde *in* **Estudos Sociedade e Agricultura**, n° 15, p. 39-52, outubro, 2000. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/leptrans/5.pdf>>. Acesso em 02 de janeiro de 2009.

MOTTA, D. M; AJARA, C. Configuração da Rede Urbana do Brasil. In: **R. paran. Desenv.**, Curitiba, n. 100, p. 7-25, jan./jun. 2001. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/pdf/revista_PR/100/diana.pdf>. Acesso em 23 de agosto de 2008.

NATIONAL ENVIRONMENTAL METHODS INDEX (NEMI). Methods Databank. Disponível em: <<http://www.nemi.gov>>. Acesso em 30 de julho de 2009.

NOLLET, L. **Chromatographic analysis of the environment**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1271p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Água e Saúde. **Saúde e Ambiente**. Brasil, 2001. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/ambiente/UploadArq/agua.pdf>>. Acesso em: 15 de novembro 2006.

PERCENTUAL das áreas, por tipo de uso do solo, segundo os municípios - Estado do Rio de Janeiro - 1994. In: CENTRO DE INFORMAÇÕES E DADOS DO RIO DE JANEIRO -

FUNDAÇÃO CIDE. **Banco de Dados Municipais**. Disponível em <<http://200.156.34.70/tabelas/CoberturaVegetal.htm>> Acesso em: 24 de setembro de 2006.

PESTICIDE Products. In: Pesticide Action Network (PAN) Database. **Search by Name**. 2009. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/Search_Products.jsp>. Acesso em: 28 de dezembro de 2008.

PIB do Agronegócio: Dados de 1994 a 2008. In: CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **Pib do Agronegócio**. 2009. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 06 de agosto de 2009.

REZAE, M. *et al.* Determination of Chlorophenols in Water Samples Using Simultaneous Dispersive Liquid-liquid Microextraction and Derivatization Followed by Gas Chromatography-Electron-Capture Detection *in Journal of Chromatography A*. 1157, 2007. p. 23-29.

REZAE, M. *et al.* Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction *in Journal of Chromatography A*. 1116, 2006. p.1-9.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. **Textos Básicos de Saúde. Série B**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf>. Acesso em: 04 de julho de 2009.

SPADOTTO, C.A; Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos *in Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*, São Manuel, Faculdade Marechal Rondon, maio, 2006. Disponível em: <http://www.fmr.edu.br/npi_2.php>. Acesso em: 28 de dezembro de 2008.

WILLIAMS, R. C. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. United States, 2000.

XU, L; BASHEER, C; LEE, H. K. Developments in Single-Drop Microextraction *in Journal of Chromatography A*. 1152, 2007. p.184-192