

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTO POR
CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E
BIDIMENSIONAL ABRANGENTE COM MICRO DETECTOR POR
CAPTURA DE ELÉTRONS**

JULIANA MACEDO DA SILVA

Porto Alegre, novembro/2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA MACEDO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTO POR
CROMATOGRÁFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E BIDIMENSIONAL
ABRANGENTE COM MICRO DETECTOR POR CAPTURA DE
ELÉTRONS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química.

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão
Orientadora

Porto Alegre, novembro/2009.

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto/2007 e novembro/2009, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Elina Bastos Caramão.

Juliana Macedo da Silva.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção de título de Mestre em Química e aprovada na sua forma final, pela orientadora e pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Elina Bastos Caramão

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal (DQ – UFMG/Belo Horizonte)

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos (IQ – UFRGS/Porto Alegre)

Profa. Dra. Ana Maria Geller (IQ – UFRGS/Porto Alegre)

Prof. Dr. Osvaldo de Lázaro Casagrande Jr.
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus.

À profa Elina Caramão pela orientação e confiança.

À profa Cláudia Zini, pela grande ajuda e participação neste trabalho.

À Laiza Krause e Maria Regina Rodriguez por todo o incentivo.

À Ewelín Canizares e Karen Leal, químicas da FEPAM, por toda colaboração e auxílio prestado e por proporcionarem os meus primeiros aprendizados na área da cromatografia.

Ao João Caramão pela ajuda na coleta das amostras.

À Flaviana Damasceno, Janaína Bortoluzzi, Luiza Luz, Maria Elizabete e Silvana Aranda por toda ajuda na área técnica, incentivo e por todos os momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica – LAAO.

À Júlia Ávila por todo apoio e amizade.

À Joyce Borowski pela colaboração em parte deste trabalho.

Aos meus pais e irmão por todo apoio e compreensão.

Ao Marcos por todo amor, amizade, incentivo e confiança.

À família Jaeger pela grandiosa ajuda.

MUITO OBRIGADA A TODOS.

SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
SIGLAS, EXPRESSÕES E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. OS AGROTÓXICOS ESTUDADOS	5
2.1.1. Triclorfom	6
2.1.2. Propanil	6
2.1.3. Fipronil	7
2.1.4. Propiconazol	8
2.1.5. Trifloxistrobina	9
2.1.6. Permetrina	9
2.1.7. Difenconazol	10
2.1.8. Azoxistrobina	10
2.2. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DOS AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS	11
2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS E O RISCO DE CONTAMINAÇÃO DO SOLO E SEDIMENTO	13
2.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS	16
2.4.1. Soxhlet	16
2.4.2. Ultra-som	17
2.4.3. Outras Técnicas	18
2.5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS	19
2.5.1. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente – GC × GC	20
2.5.1.1. Princípios e Operação	20
2.5.1.2. Interpretação dos Dados Gerados na GC × GC	23
2.5.1.3. Detecção	27
2.5.1.4. Aplicação da GC × GC na Determinação de Agrotóxicos	29
2.6. PARÂMETROS DE MÉRITO	32
Seletividade e Especificidade	32
2.6.2. Linearidade e Curva de Calibração	32
2.6.3. Precisão	33
Exatidão	34
Limite de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)	35
3. PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1. MATERIAIS EMPREGADOS	37
3.2. EQUIPAMENTOS	37
3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	38

	Pág.
3.4. AMOSTRAGEM DOS SEDIMENTOS	38
3.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS	39
3.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	40
3.6.1. Cromatografia Gasosa Monodimensional (1D-GC)	41
3.6.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC × GC)	41
3.7. PARÂMETROS DE MÉRITO	42
3.7.1. Linearidade e Curva de Calibração	42
3.7.2. Precisão	42
3.7.3. Exatidão	42
3.7.4. Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL (1D-GC)	45
4.1.1. Fase Estacionária Polidimetilsiloxano com 50% de Grupos Fenila (HP-50+)	45
4.1.2. Fase Estacionária 5% Difenil – dimetilpolisiloxano (DB-5)	47
4.1.3. Fase Estacionária Polietilenoglicol (DB-WAXetr)	49
4.1.4. Comparação Entre as Fases Estacionárias	49
4.1.5. Parâmetros de Mérito	51
4.1.5.1. Linearidade e Curva de Calibração	51
4.1.5.2. Precisão	54
4.1.5.3. Exatidão	55
4.1.5.4. Limites de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e do Método (MDL)	57
4.2. CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (GC × GC)	58
4.2.1. Conjunto de Colunas nº1 (DB-5/DB-17ms)	58
4.2.2. Conjunto de Colunas nº2 (HP-50+/DB-1ms)	61
4.2.3. Comparação entre os jogos de colunas DB-5/DB-17ms e HP-50+/DB-1ms	63
4.2.4. Parâmetros de Mérito	64
4.2.4.1. Linearidade e Curva de Calibração	64
4.2.4.2. Precisão	65
4.2.4.3. Exatidão	66
4.2.4.4. Limites de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)	69
4.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS	70
5. RESUMO DOS RESULTADOS	74
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS	79
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA	87
8.1. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	87
8.2. TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	87
8.3. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	87
8.4. OUTRAS PUBLICAÇÕES	88
ANEXO 1. TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	90
ANEXO 2. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	114

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos estudados.	15
Tabela II. Aplicações da GC × GC para determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes.	31
Tabela III. Localização geográfica dos sedimentos analisados.	38
Tabela IV. Características físico-químicas dos sedimentos analisados por 1D-GC e GC × GC.	40
Tabela V. Colunas utilizadas nas otimizações dos parâmetros cromatográficos para 1D-GC e GC × GC.	41
Tabela VI. Condições cromatográficas obtidas para 1D-GC.	45
Tabela VII. Tempo de retenção (t_R), fator de assimetria (A_s) e desvio padrão (DP) para os picos cromatográficos com a utilização das colunas HP-50+ e DB-5.	51
Tabela VIII. Parâmetros da curva de calibração para os compostos estudados por 1D-GC.	52
Tabela IX. Avaliação da precisão analítica da 1D-GC expressa através do coeficiente de variação (CV %) para repetitividade e precisão intermediária (n = 8).	54
Tabela X. Níveis de recuperação em base seca e coeficiente de variação (CV %) para os valores obtidos em sedimento (amostra controle) por 1D-GC.	55
Tabela XI. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais e limite de detecção do método (MDL) obtidos para os compostos estudados por 1D-GC.	57
Tabela XII. Condições cromatográficas obtidas para GC × GC.	58
Tabela XIII. Fator de assimetria (2A_s) e desvio padrão para os picos na 2D com a utilização de diferentes durações de jato quente.	60
Tabela XIV. Parâmetros da curva de calibração para os compostos estudados por GC × GC.	64
Tabela XV. Avaliação da precisão analítica da GC × GC expressa através do coeficiente de variação (CV %) para repetitividade e precisão intermediária (n = 8).	65
Tabela XVI. Níveis de recuperação em base seca e coeficiente de variação (CV %) para os compostos estudados em sedimento.	66
Tabela XVII. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) instrumentais e o MDL para os compostos estudados por GC × GC.	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fórmula estrutural do triclorfom.	6
Figura 2. Fórmula estrutural do propanil.	7
Figura 3. Fórmula estrutural do fipronil.	8
Figura 4. Fórmula estrutural do propiconazol.	8
Figura 5. Fórmula estrutural da trifloxistrobina.	9
Figura 6. Fórmula estrutural da permetrina.	10
Figura 7. Fórmula estrutural do difenoconazol.	10
Figura 8. Fórmula estrutural da azoxistrobina.	11
Figura 9. Diagrama dos constituintes da GC × GC.	20
Figura 10. Representação do processo de modulação.	21
Figura 11. Geração e visualização do sinal cromatográfico por GC × GC.	24
Figura 12. Representação de um pico cromatográfico genérico, ilustrando os parâmetros empregados para cálculo do fator de assimetria.	26
Figura 13. Esquema do μ ECD.	29
Figura 14. Cromatograma obtido para a mistura de padrões em uma coluna HP-50+.	47
Figura 15. Comparação das médias das alturas dos picos cromatográficos (n = 3) para diferentes temperaturas de injeção.	48
Figura 16. Cromatograma obtido para a mistura de padrões em uma coluna DB-5.	48
Figura 17. Cromatograma obtido para a mistura de padrões em uma coluna DB-WAXetr.	49
Figura 18. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos na primeira faixa de concentração por 1D-GC.	53
Figura 19. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos na segunda faixa de concentração por 1D-GC.	53
Figura 20. Diagrama de cores obtido para a mistura de padrões no jogo de colunas n°1 (DB-5/DB-17ms).	61
Figura 21. Diagrama de cores obtido para a mistura de padrões no jogo de colunas n°2 (HP-50+/DB-1ms).	62
Figura 22. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos por GC × GC.	65
Figura 23. Cromatogramas da amostra de sedimento fortificada a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A) monodimensional – não fortificada; (B) diagrama de cores do branco da amostra; (C) diagrama de cores da amostra fortificada.	68
Figura 24. Diagrama em terceira dimensão (3D) com reconstrução dos cromatogramas da ^1D e ^2D : (A) dos padrões na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) da amostra fortificada a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$.	69
Figura 25. Cromatogramas do extrato da amostra de sedimento (A) monodimensional; (B) diagrama de cores de uma amostra de sedimento fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de mistura dos padrões.	71

SIGLAS, EXPRESSÕES E ABREVIATURAS

μ ECD: Micro detector por captura de elétrons (do inglês “Micro Electron-Capture Detector”)

1D: Monodimensional

¹D: Primeira dimensão

¹t_R: Tempo de retenção na primeira dimensão

2D: Bidimensional

²D: Segunda dimensão

²t_R: Tempo de retenção na segunda dimensão

ANVISA: Associação Nacional de Vigilância Sanitária

A_s: Assimetria de pico

ASE: Extração Acelerada com Solvente (do inglês “Accelerated Solvent Extraction”)

C₁₈: Fase sólida composta por octadecil silano

Clean up: Refere-se à etapa de tratamento de amostra, onde se objetiva eliminar interferentes do processo analítico.

CV: Coeficiente de variação

DAD: Detector de Arranjo de Diodos (do inglês “Diode-Array Detector”)

DB-17ms: Fase estacionária polidimetilsiloxano com 50 % de grupos fenila

DB-1ms: Fase estacionária 100% dimetilpolisiloxano

DB-5: Fase estacionária 5% difenil – dimetilpolisiloxano

DB-WAX: Fase estacionária com 100% etilenoglicol

DT₅₀: Tempo de meia-vida (do inglês “Disappearance Time”)

ECD: Detector por Captura de Elétrons (do inglês “Electron-Capture Detector”)

EPA: Agência Americana de Proteção Ambiental (do inglês “Environmental Protection Agency”)

Fast-GC: Cromatografia Gasosa rápida, com a utilização de colunas capilares de comprimento, diâmetro de filme e espessura menores que as convencionais

FEPAM: Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler

FID: Detector por ionização em chama (do inglês “Flame Ionization Detector”)

Florisil: Fase sólida constituída de silicato de magnésio

GARP: Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

Gás de *make up*: Gás cuja finalidade é manter um fluxo estável desde a saída da coluna cromatográfica até o detector.

GC × GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (do inglês “Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography”)

GC: Cromatografia gasosa (do inglês “Gas Chromatography”)

GC-GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional de Frações Parciais ou de *heartcut* (do inglês “Two-dimensional Gas Chromatography”)

GUS: Índice de GUS (do inglês “Groundwater Ubiquity Score”)

HP-50+: Fase estacionária polidimetilsiloxano com 50 % de grupos fenila

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “High Performance Liquid Chromatography”)

HPLC-GC: Cromatografia Líquida acoplada à Cromatografia Gasosa (do inglês “High-Performance Liquid Chromatography coupled to Gas Chromatography”)

HRMS: Espectrometria de Massas de Alta resolução (do inglês “High Resolution Mass Spectrometry”)

ICH: Conferência Internacional em Harmonização (do inglês “International Conference on Harmonization”)

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”)

K_H : Constante da lei de Henry

K_{oc} : Coeficiente de adsorção da matéria orgânica no solo

K_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água

LMR: Limites Máximos de Resíduos

LOD: Limite de Detecção

LOQ: Limite de Quantificação

MAE: Extração Assistida por Microondas (do inglês “Microwave Assisted Extraction”)

MDL: Limite de Detecção do Método (do inglês “Method Detection Limit”)

MRC: Material de Referência Certificado

MSD: Detector de Espectrometria de Massas (do inglês “Mass Spectrometer Detector”)

NBR: Norma Brasileira

NPD: Detector de Nitrogênio e Fósforo (do inglês “Nitrogen-Phosphorus Detector”)

PBO: Butóxido de Piperonila (do inglês “Piperonyl Butoxide”)

pH: Potencial hidrogeniônico

PI: Padrão Interno

pK_a: Constante de dissociação ácida

pK_b: Constante de dissociação básica

P_M: Período de modulação

P_V: Pressão de vapor

R_s: Resolução cromatográfica

RSD: Desvio Padrão Relativo (do inglês “Relative Standard Deviation”)

SFC-GC: Cromatografia de Fluido Supercrítico acoplada à Cromatografia Gasosa (do inglês “Supercritical Fluid Chromatography coupled to Gas Chromatography”)

SFE: Extração com Fluido Supercrítico (do inglês “Supercritical Fluid Extraction”)

SIM: Modo de Monitoramento de Íon Seleccionado (do inglês “Selective Ion Monitoring”)

TOF: Analisador por Tempo de Voo (do inglês “Time of Flight”)

UV: Ultravioleta

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias de análise por GC- μ ECD e GC \times GC- μ ECD para determinação de agrotóxicos em sedimentos de regiões sob influência da cultura orizícola do estado do Rio Grande do Sul. Os agrotóxicos estudados foram triclorfom, propanil, fipronil, propiconazol, trifloxistrobina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina, sendo o triclorfom posteriormente excluído do estudo por eluir muito próximo ao solvente. Os dois métodos foram validados levando-se em consideração parâmetros como linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação. Para 1D-GC foram testadas três colunas cromatográficas (DB-5, HP-50+ e DB-WAXetr), sendo que a coluna DB-5 proporcionou melhores resultados. No processo de validação, a repetitividade e precisão intermediária das áreas e alturas dos picos cromatográficos, para os sete compostos, foram inferiores a 5%. Os LOD e LOQ instrumentais situaram-se na faixa de 0,60 a 2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,83 a 5,62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; enquanto os limites de detecção do método variaram de 1,43 a 5,78 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As taxas de recuperação para permetrina e azoxistrobina situaram-se entre 60 e 72%, para os níveis de fortificação de 15 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No desenvolvimento do método por GC \times GC foram testados dois conjuntos de colunas (DB-5/DB-17ms e HP-50+/DB-1ms), sendo que os melhores resultados foram obtidos com o conjunto de colunas DB-5/DB-17ms. A repetitividade e precisão intermediária das áreas e alturas dos picos cromatográficos foram inferiores a 4%. Os percentuais de recuperação para os compostos investigados ficaram entre 52 e 115%, para os níveis de fortificação de 15, 30 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os LOD e LOQ instrumentais situaram-se na faixa de 0,08 a 1,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,25 a 3,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção do método variaram de 1,92 a 4,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Durante a verificação da aplicabilidade do método foram encontrados resíduos de trifloxistrobina em concentrações de 21,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na 1D-GC e 3,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GC \times GC (base seca) em um sedimento coletado em local próximo a plantação de arroz.

ABSTRACT

A GC- μ ECD and a GC \times GC- μ ECD method were developed for the analysis of pesticides in sediments, which are under the influence of nearby rice plantation in the state of Rio Grande do Sul. The pesticides investigated were trichlorfon, propanil, fipronil, propiconazole, trifloxystrobin, permethrin, difenoconazole and azoxystrobin, although trichlorfon had to be excluded afterwards, as it eluted too close to the solvent peak. Both methods were validated taking into account parameters such as linearity, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy and limits of detection and quantification. Three chromatographic columns (DB-5, HP-50+ and DB-WAXetr) were tested for 1D-GC and DB-5 column provided the best results. In the process of method validation, repeatability and intermediate precision of the areas and heights of chromatographic peaks for the seven compounds were less than 5%. Recoveries for permethrin and azoxystrobin were between 60 and 72% for fortification levels of 15 and 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Instrumental LOD and LOQ were found in the range from 0.60 to 2.31 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1.83 to 5.62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The detection limits of the method ranged from 1.43 to 5.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For GC \times GC method development two sets of columns were tested (DB-5/DB-17ms, and HP-50+/DB-1ms), and the best results were obtained with the set of columns DB-5/DB-17ms. Repeatability and intermediate precision of the areas and heights of the chromatographic peaks were less than 4%. Recoveries ranged from 52 to 115% for all compounds studied, for fortification levels of 15, 30 and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Instrumental LOD and LOQ were found in the range from 0.08 to 1.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.25 to 3.23 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Detection limits of the method varied between 1.92 to 4.43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Concentrations of 21.18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ through 1D-GC method and 3.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for GC \times GC (on dry basis) for trifloxystrobin were found in a sediment sample which was collected close to an area of rice plantation.

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos nas produções agrícolas vem obtendo cada vez mais destaque no cenário mundial. O Brasil, que até 2007 era o quarto colocado no ranking mundial em consumo desses compostos, em 2008 passa para segundo lugar, considerando o consumo de dez países que contribuem com 70% do consumo mundial.¹

Existem diferentes definições para agrotóxicos, mas de acordo com a Agência Americana de Proteção Ambiental – EPA (*Environmental Protect Agency*), são qualquer substância ou mistura de substâncias que possuem capacidade de atenuar, prevenir, destruir ou repelir qualquer tipo de praga.² Eles podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (grupo funcional) e com o tipo de pragas alvo (algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas, moluscidas, nematocidas, ovicidas, entre outros). Estas diferentes estruturas contrastam segundo a forma de ação, absorção, biotransformação e eliminação.^{3,4}

De acordo com o decreto nº 98.816, publicado no Diário Oficial da União em 11 de janeiro de 1990, o termo “pesticida” deixa de ser utilizado e é substituído por “agrotóxico”. Esse mesmo decreto define resíduo de agrotóxico como sendo uma substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimentos ou no meio ambiente, decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como, produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas tóxicas e ambientalmente importantes.⁵

O controle de pragas, através do uso de diferentes princípios ativos, reduziu o índice de doenças para os homens e animais e proporcionou aumento na produção agrícola. Contudo, resíduos desses compostos podem permanecer no ambiente por longos períodos e causar impactos nocivos a diferentes ecossistemas. Nesse contexto, o monitoramento desses compostos em diferentes matrizes como ar, água, solo e alimentos se torna de extrema importância para que problemas de saúde pública sejam minimizados e/ou evitados.⁶

O estudo da ocorrência de agrotóxicos em sedimentos fornece informação a respeito da contaminação do corpo hídrico receptor. Dependendo da sua constituição

físico-química, o sedimento se comporta como fonte de acumulação de poluentes (compostos orgânicos em geral e metais, por exemplo). Essa característica confere ao sedimento grande importância no que tange à investigação de processos físicos, geoquímicos e biológicos no ambiente.

Desta forma, o estudo teve por objetivo a avaliação do potencial da GC- μ ECD e GC \times GC- μ ECD para a determinação de oito agrotóxicos de diferentes classes químicas (triclorfom, propanil, fipronil, propiconazol, trifloxistrobina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina) em sedimentos de rio proveniente de regiões sob influência da cultura orizícola no estado do Rio Grande do Sul (Rio Santa Maria e Rio Gravataí), uma vez que o estado é responsável por 61% da produção de arroz do país.¹ Na região da bacia do Rio Santa Maria predomina a agricultura, mais especificamente a orizicultura, e é praticamente inexistente a presença de impactos de origem industrial, descaracterizando a ação de fontes pontuais que afetem a qualidade dos corpos hídricos, com exceção dos resíduos de esgotos. A região do Rio Gravataí, além da influência da agricultura também apresenta impactos de origem industrial.⁷ A validação dos métodos foi realizada através da avaliação de parâmetros como curva de calibração e linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (teste de recuperação) e limites de detecção e quantificação instrumentais e do método.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os agrotóxicos pertencem à classe dos poluentes ambientais mais estudados atualmente. A determinação desses compostos em diferentes matrizes torna-se cada vez mais necessária devido à relação direta entre saúde e qualidade ambiental. Com isso, a otimização de técnicas de separação, identificação e quantificação desses compostos ganha grande destaque para que seja possível sua determinação nas mais variadas matrizes e para que os limites de detecção e quantificação de tais métodos sejam cada vez menores e contemplem os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelos órgãos competentes.

2.1. OS AGROTÓXICOS ESTUDADOS

Os compostos estudados foram triclorfom, propanil, fipronil, propiconazol, trifloxistrobina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina. Estes agrotóxicos são largamente empregados na agricultura, mais especificamente na cultura do arroz da região do rio Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul.^{7,8} A química Ewelín Canizares, da FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler), realizou pesquisa com os agricultores e com os trabalhadores que fazem a aplicação desses compostos na lavoura, bem como com a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) para embasar a escolha dos agrotóxicos.

De um modo geral, as características estruturais moleculares dos agrotóxicos determinam o grau de interação dos mesmos com o ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre pode tornar os compostos orgânicos mais reativos quimicamente e biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis, quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. Entretanto, a presença de halogênios na molécula contribui com a diminuição da solubilidade em água, volatilidade e reatividade, tornando-os mais estáveis ambientalmente.⁹ Algumas características referentes aos analitos investigados neste estudo estão descritas a seguir.

2.1.1. Triclorfom

O triclorfom é um inseticida pertencente à classe dos organofosforados. Organofosforado é uma designação genérica que compreende todos os inseticidas que apresentam na sua estrutura química um átomo central de fósforo pentavalente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre, através de uma dupla ligação. São ésteres do ácido fosfórico ou do ácido fosforotióico, podendo ser subdivididos em diferentes classes, tais como fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos e fosforoamidatos. A **Figura 1** apresenta a estrutura química do triclorfom.¹⁰⁻¹³

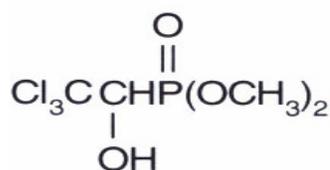


Figura 1. Fórmula estrutural do triclorfom.

Os agrotóxicos desta classe sofrem rápida degradação no ambiente (meia vida nas plantas de 2 a 10 dias), apresentam baixa ação residual e acumulação limitada em organismos vivos, uma vez que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h de contato. Possuem um poder de toxicidade agudo relativamente alto na maioria dos casos. Em geral, são bastante voláteis em comparação com outros grupos de agrotóxicos.^{10,11,14}

A ação inseticida dos organofosforados inibe a enzima acetilcolinesterase nos sistemas nervosos dos vertebrados e invertebrados. Outra característica desses compostos é a capacidade de serem espontaneamente hidrolisados, principalmente em pH alto e de sofrerem degradação por hidrolases.¹⁴

2.1.2. Propanil

O propanil é um herbicida seletivo de contato e pós-emergente (aplicado após a brotação das plantas daninhas) derivado das cloroanilidas. É um dos herbicidas mais intensivamente utilizados no Brasil, na cultura do arroz, para o controle de plantas daninhas de folha larga e estreita. Em meio fortemente ácido e alcalino sofre clivagem hidrolítica originando 3,4- dicloroanilida (3,4-DCA) e ácido propiônico. As cloroanilidas são absorvidas às substâncias húmicas do solo, podendo permanecer ligadas durante

anos após sua aplicação. Também estão sujeitas à dimerização e polimerização, formando compostos azo, altamente estáveis e resistentes à mineralização.^{15,16} O principal efeito tóxico do propanil é a ocorrência da metemoglobinemia (doença que incapacita o transporte de oxigênio pelo ferro no sangue) e anemia hemolítica (destruição prematura dos glóbulos vermelhos).¹⁷

As moléculas dos herbicidas apresentam cargas elétricas e, portanto, são atraídas pela matéria orgânica e argila do solo. O teor de matéria orgânica e argila influencia diretamente a atividade dos herbicidas e afeta sua eficiência e persistência. Solos com baixo teor de matéria orgânica e argila favorecem o processo de lixiviação dos herbicidas.¹⁸ A **Figura 2** apresenta a fórmula estrutural do herbicida propanil.¹³

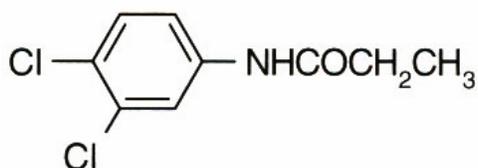


Figura 2. Fórmula estrutural do propanil.

2.1.3. Fipronil

O fipronil é um inseticida pertencente à classe dos pirazóis. Foi descoberto em 1987 por Rhone-Poulenc Agro, mas somente foi registrado como agrotóxico em 1996.¹⁹ O inseticida apresenta afinidade pela matéria orgânica do solo e da água. Na superfície do solo é propenso à fotodegradação, entretanto, abaixo da superfície, ocorre quebra gradativa das moléculas por ação microbiana, sendo que os produtos de degradação (desulfenil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona) são mais tóxicos aos organismos aquáticos do que o próprio agrotóxico.²⁰

Em relação à característica inseticida do fipronil, o principal modo de ação está relacionado ao bloqueio do ácido γ -amino-butírico (GABA) regulador dos canais de íons cloreto na membrana celular, resultando em uma perturbação do funcionamento normal do sistema nervoso central.^{19,21} A **Figura 3** apresenta a fórmula estrutural do inseticida fipronil.¹³

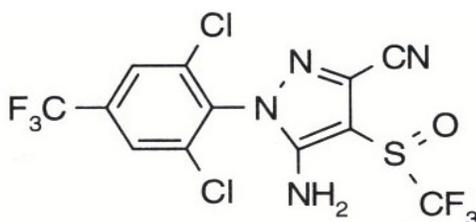


Figura 3. Fórmula estrutural do fipronil.

2.1.4. Propiconazol

O propiconazol é um fungicida pertencente à classe dos triazóis e foi registrado pela primeira vez em 1981 por Ciba Geigy.¹⁷ Os triazóis são uma das classes mais importantes de fungicidas devido a sua grande abrangência no combate a diferentes doenças e culturas.²²

Este agrotóxico atua inibindo uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol, que é de grande importância para a formação das paredes celulares nos fungos e, assim, atenua ou faz cessar o crescimento dos fungos. É usado em uma série de culturas agrícolas, frutos, plantas ornamentais e relva; também atua como agente de preservação de madeira e como um conservante antimicrobiano em produtos adesivos, tintas, revestimentos de couro, papel, têxteis e produtos industriais.¹⁷ A **Figura 4** apresenta a fórmula estrutural do fungicida propiconazol.¹³

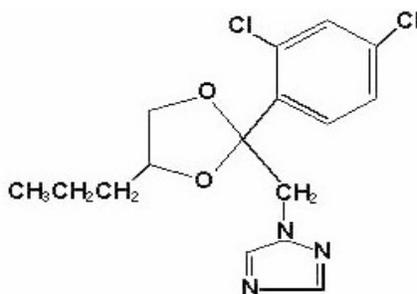


Figura 4. Fórmula estrutural do propiconazol.

2.1.5. Trifloxistrobina

Trifloxistrobina é um fungicida pertencente à classe das estrobilurinas (beta-metoxiacril éster). O sítio de ação das estrobilurinas está localizado na respiração mitocondrial. Como resultado, trifloxistrobina é um potente inibidor da germinação dos esporos e crescimento micelial de fungos.¹⁷

Estudos laboratoriais indicam que a mobilidade da trifloxistrobina no solo é baixa ou mesmo não móvel. Não se espera lixiviação da trifloxistrobina no solo abaixo de 30 cm de altura, portanto, o agrotóxico não tem característica de contaminante de águas subterrâneas. Contudo, o produto de degradação (CGA-321113) apresenta persistência no solo, com mobilidade moderada a alta.²³ A **Figura 5** apresenta a fórmula estrutural do fungicida trifloxistrobina.¹³

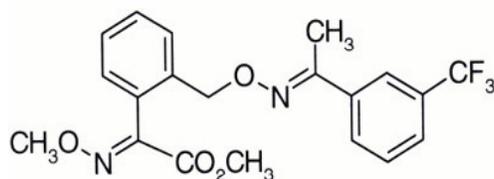


Figura 5. Fórmula estrutural da trifloxistrobina.

2.1.6. Permetrina

A permetrina é um inseticida pertencente à classe dos piretróides. Os piretróides são derivados sintéticos das piretrinas, ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico com os álcoois piretrolona, cinerolona e jasmolona. São isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas.^{24,25}

A permetrina é uma mistura racêmica dos isômeros *cis* e *trans* que foi sintetizada em 1973 por Elliott, sendo o primeiro piretróide desenvolvido com estabilidade adequada para uso na agricultura. É um composto fotoestável, com fotoestabilidade cerca de 10 a 100 vezes maior do que a dos piretróides não halogenados.^{17,24} A **Figura 6** apresenta a fórmula estrutural da permetrina.¹³

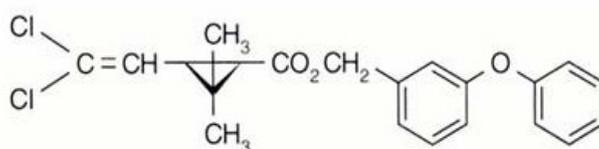


Figura 6. Fórmula estrutural da permetrina.

Os piretróides, ao atingir águas naturais, são prontamente adsorvidos pelo sedimento e matéria orgânica em suspensão. Não são susceptíveis à dispersão no ambiente, pois apresentam baixa pressão de vapor e forte adsorção pela matéria orgânica do solo.²⁴ No controle de pragas, agem no sistema nervoso central dos insetos, tendo como alvo os canais de sódio da membrana celular.¹⁴

2.1.7. Difenonazol

O difenoconazol é um fungicida pertencente à classe química dos triazóis, assim como o propiconazol. A estrutura química dos fungicidas triazólicos apresenta o anel 1,2,4 – triazol que é um anel heterociclo aromático contendo três átomos de nitrogênio dispostos nas posições 1, 2 e 4 de um anel de cinco membros, conectado ao restante hidrofóbico da molécula pela posição 1.²⁶ A **Figura 7** apresenta a fórmula estrutural do difenoconazol.¹³



Figura 7. Fórmula estrutural do difenoconazol.

2.1.8. Azoxistrobina

A azoxistrobina é um fungicida sistêmico da classe das estrobilurinas, assim como a trifloxistrobina. O fungicida foi comercializado pela primeira vez em 1998 e foi descoberto durante estudo com cogumelos (*Oudemansiella mucida* e *Strobilurus tenacellus*) comumente encontrados em florestas da República Checa. Os cogumelos

atraíram a atenção de cientistas devido à sua capacidade de defesa, que se baseia na secreção de duas substâncias, a estrobilurina A e oudemansina A. Estas substâncias permitiam aos cogumelos manter seus agressores à distância e até mesmo destruí-los.^{27,28} A **Figura 8** apresenta a fórmula estrutural da azoxistrobina.¹³

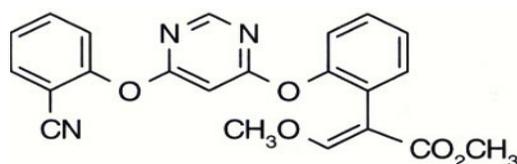


Figura 8. Fórmula estrutural da azoxistrobina.

2.2. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DOS AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS

De acordo com Golterman e colaboradores,²⁹ sedimento é um termo geral que serve para descrever tanto material em suspensão, como depositado, sendo que todas as águas naturais contêm quantidades variáveis de sedimento em suspensão. O sedimento contempla todo material particulado que é carregado para dentro de um sistema aquático, ou que é formado no corpo hídrico.

Os compostos orgânicos tendem a acumular-se nos sedimentos, visto que estes, de forma geral, apresentam caráter lipofílico. Essa característica confere ao sedimento grande importância no que tange a investigação de processos físicos, geoquímicos e biológicos no ambiente.³⁰

De acordo com Gao e colaboradores,³¹ os contaminantes no ambiente aquático podem ser dispersos em três diferentes fases: na solução aquosa, no carbono orgânico dissolvido ou na fração coloidal e no sedimento. Essa distribuição dos agrotóxicos no ambiente é dependente das propriedades físico-químicas dos mesmos.³²

A persistência dos agrotóxicos no solo e sedimento é dependente da eficiência de processos físicos de transformação no ambiente, tais como evaporação, lixiviação, erosão e absorção pelas raízes de diferentes culturas. Outros fatores ambientais

também contribuem com a taxa de degradação desses compostos. A temperatura, conteúdo de matéria orgânica, acidez, umidade e tipo de solo influenciam neste processo. Os solos argilosos, com alto teor de matéria orgânica, providenciam maior retenção desses resíduos.⁶ Mesmo quando esses compostos são aplicados diretamente sobre as plantas, cerca de 50% da dose total pode vir a contaminar o solo, independente da forma de aplicação e, lá chegando, essas substâncias podem ser transportadas por processos de volatilização, lixiviação e escoamento superficial. A lixiviação tem sido apontada como sendo a principal forma de contaminação dos lençóis freáticos e corresponde ao transporte vertical dos contaminantes no solo pela água da chuva ou de irrigação. O escoamento superficial é devido ao transporte dos contaminantes através da água de enxurrada pela superfície do solo, que pode ter como destino final os rios e lagos. A volatilização favorece o carreamento desses compostos pela atmosfera, os quais podem ser depositados nas águas superficiais. As informações sobre o movimento de agrotóxicos são úteis para se fazer uma previsão da sua eficácia química, sendo que os processos de decomposição desempenham importante função para a dissipação de muitos agrotóxicos no solo e o seu desaparecimento pode se dar por vários processos químicos, inclusive foto decomposição, entre outras reações químicas.^{33,34}

Para avaliar o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas são utilizados estudos através de modelos matemáticos e de varredura (*screening*), que permitem uma avaliação preliminar do risco de contaminação desses ambientes. Estes estudos podem ser realizados analisando-se diretamente a água e/ou o solo, uma vez que o potencial de contaminação da água subterrânea por agrotóxicos depende da mobilidade dos mesmos no solo ou sedimento. Os parâmetros mais utilizados nesta avaliação são o de *screening* da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, “United States Environmental Protection Agency”, USEPA), a medida do índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (índice de GUS, do inglês “Groundwater Ubiquity Score”) e a aplicação do Método de Goss. Esses parâmetros consideram algumas propriedades físico-químicas para avaliação de risco, tais como solubilidade em água, K_{oc} (coeficiente de adsorção à matéria orgânica no solo), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), K_H (constante da lei de Henry), constante de

ionização ácida ou básica (pK_a ou pK_b), meia vida no solo e água (DT_{50} , do inglês “Disappearance Time”), porosidade do solo, potencial de lixiviação (referente ao índice de GUS), entre outras.^{9,35,36}

2.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS E O RISCO DE CONTAMINAÇÃO DO SOLO E SEDIMENTO

O comportamento dos agrotóxicos no solo pode ser influenciado por alguns fatores como: adsorção, movimento e decomposição. O processo de adsorção tem influência direta nos efeitos de biodegradabilidade, bioacumulação, entre outros, e consiste na interação do soluto da fase líquida com a superfície das partículas da fase sólida do solo, a qual é constituída majoritariamente por argila, minerais, matéria orgânica, sílica, óxidos e hidróxidos de alumínio e de ferro.³³

Na prática, pode-se avaliar o processo de adsorção através das características do solo, calculando-se a constante de adsorção (K_{oc}), a qual está baseada na quantidade de carbono orgânico contida no solo. Moléculas altamente solúveis tendem a apresentar valores de K_{oc} relativamente baixos (menores que $150 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), podendo ser mais rapidamente biodegradados no solo e na água.³³

A adsorção dos agrotóxicos ao sedimento também é influenciada por alguns fatores como acidez ou alcalinidade, indicada pelo pK_a ou pK_b do composto, polaridade e polarizabilidade (polarização transiente de moléculas ou radicais estruturalmente apolares). Outros fatores como intensidade de uso, época de aplicação, forma de aplicação e características do meio físico também influenciam a ocorrência da adsorção de agrotóxicos em sedimento.³⁷

A adsorção também pode ser influenciada pelos grupos funcionais que caracterizam e determinam a carga de uma molécula. Através da constante de dissociação ácida (pK_a) e do pH do solo é possível prever a forma ionizável ou molecular predominante de um agrotóxico ácido, sendo que o mesmo raciocínio pode ser feito com a constante pK_b para agrotóxicos alcalinos.^{9,37,38}

Outra propriedade importante é a solubilidade em água, pois influencia no comportamento, transporte e destino desses compostos no ambiente. Esse parâmetro indica a tendência do agrotóxico ao carreamento superficial no solo, fazendo com que o

mesmo possa atingir águas superficiais. A constante da Lei de Henry (K_H), também conhecida como coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (P_V) mostra a tendência do agrotóxico a volatilização ou permanência na fase aquosa.⁹

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) indica a tendência dos compostos em se distribuir em regiões ambientalmente hidrofóbicas. É definido como sendo a razão entre as concentrações de um determinado composto distribuído entre duas fases imiscíveis em equilíbrio. Essa propriedade demonstra a tendência dos agrotóxicos à bioconcentração e traz indicativos sobre a capacidade de transporte na cadeia alimentar. O tempo de meia vida também é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos.^{9,38}

A **Tabela I** apresenta algumas propriedades físico-químicas importantes dos agrotóxicos estudados.

Tabela I. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos estudados.³⁹

Agrotóxico	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água a 25 °C (mg L ⁻¹)	Log Kow a pH 7 e 20 °C	K _H a 25 °C (Pa m ³ mol ⁻¹)	DT ₅₀ no solo (dias)	DT ₅₀ água/sedimento (dias)	Índice de GUS	K _{oc} (mL g ⁻¹)
Triclorfom	257,40	120000 - alta	0,43 - baixa	4,50 X 10 ⁻⁰⁷ – não volátil	18 – não persistente	-	3,77 – alta lixiviação	10 – mobilidade muito alta
Propanil	218,08	225 - moderada	2,29 - baixa	1,74 X 10 ⁻⁰⁴ – não volátil	2 – não persistente	-	0,42 – baixa lixiviação	400 – mobilidade moderada
Fipronil	437,15	3,78 - baixa	3,75 - alta	2,31 X 10 ⁻⁰⁴ – não volátil	142 – persistente	68 – moderadamente rápida	2,67 – estado de transição	577 – ligeiramente móvel
Propiconazol	342,22	150 - moderada	3,72 - alta	9,20 X 10 ⁻⁰⁵ – não volátil	214 – persistente	636 - estável	2,25 – estado de transição	1086 – ligeiramente móvel
Trifloxistrobina	408,37	0,61 - baixa	4,5 – alta	2,30 X 10 ⁻⁰³ – não volátil	7 – não persistente	2,4 - rápida	0,53 – baixa lixiviação	2377 – ligeiramente móvel
Permetrina	391,30	0,2 – baixa	6,1 – alta	1,89 X 10 ⁻⁰¹ – moderadamente volátil	13 – não persistente	40 – moderadamente rápido	1,11 – baixa lixiviação	10000 – não móvel
Difenoconazol	406,26	15 – baixa	4,2 – alta	1,50 X 10 ⁻⁰⁶ – não volátil	120 - persistente	1053 – estável	0,88 – baixa lixiviação	3760 – ligeiramente móvel
Azoxistrobina	403,40	6,7 – baixa	2,5 – baixa	7,30 X 10 ⁻⁰⁹ – não volátil	70 – moderadamente persistente	232 – lento	2,53 – estado de transição	423 – mobilidade moderada

Os compostos cujo coeficiente de partição octanol/água é alto e cuja solubidade em água é baixa (natureza hidrofóbica) podem sofrer forte adsorção no solo ou sedimento e, também, bioacumular-se em organismos aquáticos.

Os agrotóxicos que apresentam índice de GUS menor que 1,8 não apresentam tendência à lixiviação. Valores entre 1,8 e 2,8 estão na faixa de transição. Já os compostos com valores maiores que 2,8 estão sujeitos à lixiviação.

2.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos podem influenciar tanto no transporte e destino desses compostos no ambiente quanto no comportamento dos mesmos durante as etapas de extração, *clean up* e análise instrumental. A interação existente entre os agrotóxicos e o sedimento pode ser bastante forte, resultando em resíduos quimicamente ligados. Nesse contexto, esforço significativo vem sendo realizado para o desenvolvimento de métodos eficientes que possibilitem a análise multirresíduo de agrotóxicos, minimizando etapas de extração e de *clean up* das amostras. Na sequência deste texto serão apresentados alguns dos métodos de extração empregados para determinação desses compostos em sedimentos.^{32,40}

2.4.1. Soxhlet

O processo de extração por Soxhlet foi inventado em 1879 por Franz von Soxhlet e é o mais utilizado para amostras sólidas. Apesar de ser um método moroso (18 a 24 horas) e de utilizar grandes quantidades de solvente, é relativamente simples, eficaz, barato e apresenta bons resultados de recuperação de analitos em diferentes amostras.⁴¹ No processo de extração a amostra é colocada em um cartucho poroso e imersa em solvente. A extração compreende uma série de etapas que envolvem processos de destilação e condensação do solvente com preenchimento periódico do mesmo dentro e fora da câmara de extração, fazendo com que ocorra uma mistura íntima da amostra com o solvente.⁴²

Woudneh e Oros⁴³ desenvolveram método analítico para a determinação de agrotóxicos das classes das piretrinas, piretróides e butóxido de piperonila (PBO, do inglês “piperonyl butoxide”) por GC/HRMS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas de Alta resolução, do inglês “Gas Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry”). A extração foi realizada com diclorometano por 16 horas, seguida de *clean up* com Florisil e extração em fase sólida com cartuchos de fase aminopropil – sílica para remoção de ácidos húmicos e fúlvicos, ácidos graxos e fenóis. O estudo de recuperação foi realizado através de extração com amostra fortificada nas concentrações de 10 e 5 ng g⁻¹, variando de analito para analito, com resultados na faixa de 89,7 a 135% de recuperação. A aplicabilidade do método foi

verificada através da análise de seis amostras de sedimentos, onde foi observada a presença de piretróides e PBO. Esta técnica também foi utilizada por Darko e colaboradores⁴⁴ na determinação de organoclorados em amostras de peixe, água e sedimentos. Os solventes extratores utilizados foram acetona e hexano na proporção 20:80 v/v, por 4 horas a 50 °C. O *clean up* foi realizado com coluna de C₁₈ e a análise por GC-ECD (Cromatografia Gasosa com detecção por Captura de Elétrons, do inglês “Electron- Capture Detection”). Para o estudo de recuperação, as amostras foram fortificadas com mistura dos padrões na concentração de 1 ng g⁻¹, sendo que as amostras de sedimento apresentaram recuperações de 76 a 95% com desvio padrão relativo de 4 a 12%.

Covaci e colaboradores⁴⁵ utilizaram a extração por Soxhlet na determinação de agrotóxicos organoclorados, bifenilas policloradas e éteres difenílicos polibromados. O tempo de extração utilizado foi de duas horas em função da pequena quantidade de amostra (4 g) e os solventes extratores foram hexano e acetona (3:1, v/v). A etapa de *clean up* foi obtida com o auxílio de sílica acidificada e a análise dos compostos realizada por GC- μ ECD (μ ECD, do inglês “micro electron-capture detector”).

Extração em Soxhlet com diclorometano e *clean up* com duas fases sólidas como sílica e alumina também é um processo comumente utilizado.⁴⁶⁻⁴⁸

2.4.2. Ultra-som

A produção de ultra-som é um fenômeno físico associado ao processo de cavitação. Durante este processo há criação, aumento e implosão de cavidades de vapor e gases em um líquido, proporcionando um contato mais efetivo entre a matriz e o solvente. Quando a pressão do sistema é positiva ocorre a compressão das bolhas de vapor e, quando a pressão é negativa, resultando em “vácuo”, ocorre a expansão. Esse ciclo de compressão-expansão é responsável pela geração das cavidades.⁴⁹

Em um líquido com partículas sólidas dispersas, os gases são adsorvidos nos poros das partículas. Quando ocorre a compressão, os gases ou vapores, no interior das cavidades, são comprimidos para o interior da partícula; já na etapa de expansão são direcionados para fora da mesma. Devido a essas atividades, há aumento no

tamanho das cavidades, que se direcionam para o interior do líquido e separam-se da partícula.⁴⁹

Vagi e colaboradores⁴⁰ desenvolveram método de extração e análise para 17 agrotóxicos da classe dos organoclorados em sedimento marinho, com auxílio de banho de ultra-som e análise por GC-ECD. Parâmetros como tipo e quantidade de solvente e tempo de sonicação foram otimizados. Os solventes utilizados foram acetona, metanol, hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo que os melhores resultados de recuperação foram obtidos com extração em duas etapas de 20 minutos com diclorometano.

A otimização do processo de extração para cinco piretróides, um organofosforado e vinte organoclorados também foi descrita por You e colaboradores.⁵⁰ Diferentes solventes foram utilizados para verificação da capacidade extratora (hexano, diclorometano e mistura de diclorometano e acetona), sendo que os melhores resultados foram alcançados com a utilização de mistura 50:50 v/v de acetona e diclorometano, com recuperação dos analitos na faixa de 84 a 111 %. Para a etapa de *clean up*, os autores utilizaram Florisil em dois estados: somente ativado por aquecimento e ativado/desativado com água destilada (6% m/v), sendo que o último apresentou melhores resultados de recuperação para todos os compostos estudados.

Xue e colaboradores⁵¹ determinaram compostos organoclorados em amostras de sedimento através da extração por banho de ultra-som com metanol e acetonitrila (50:50 v/v) por duas vezes a 30 minutos e análise por GC- μ ECD. Para verificação da recuperação do método, as amostras foram fortificadas com concentrações de 0,5; 5 e 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ dos padrões dos analitos. A recuperação ficou entre 71 e 103% com desvio padrão relativo de ± 4 a 8%.

2.4.3. Outras Técnicas

A extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês “Supercritical Fluid Extraction”)⁵²⁻⁵⁴, extração acelerada com solvente (ASE, do inglês “Accelerated Solvent Extraction”)⁵⁵⁻⁵⁷ e extração assistida por microondas (MAE, do inglês “Microwave Assisted Extraction”)⁵⁸⁻⁶⁰ são outras técnicas bastante utilizadas na determinação de agrotóxicos em sedimentos.

2.5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS

Atualmente, a Cromatografia Gasosa é a técnica mais utilizada para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes. Uma limitação dessa técnica é que ela demanda que a amostra seja volatilizável e termicamente estável. Compostos não voláteis ou instáveis podem ser derivatizados a fim de se obter resposta por GC. A técnica possui alto poder de resolução e detecta compostos em escala de nano a picogramas.⁴ A cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS) no modo monitoramento de íon selecionado (SIM – “Selective Ion Monitoring”) é uma das técnicas mais empregadas para separação e análise quantitativa de agrotóxicos em sedimentos. Neste caso, mesmo no modo SIM, é possível que ocorram coeluições com interferentes que apresentam em sua estrutura os íons escolhidos para o monitoramento dos analitos. Além disso, apesar do GC/MS ser altamente específico e eficiente, em alguns casos, pode ocorrer degradação e/ou isomerização dos agrotóxicos na câmara de ionização, dificultando a identificação desses compostos.⁶¹ Em estudo realizado por Smalling e colaboradores,⁶² para determinação de agrotóxicos em sedimento, foram verificados os limites de detecção instrumentais para oitenta e cinco agrotóxicos, por GC- μ ECD e GC/MS. Os resultados obtidos mostraram a grande sensibilidade da GC- μ ECD, pois os limites de detecção foram mais baixos para essa técnica (0,5 a 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GC- μ ECD e 1 a 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GC/MS).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”) é outra opção para este tipo de análise e, neste caso, compostos não voláteis e termicamente instáveis podem ser alvo desta técnica.⁴ Entre os detectores mais utilizados para determinação de agrotóxicos por cromatografia líquida encontram-se o detector de ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD, do inglês “Diode-Array Detector”) e espectrômetro de massas.⁶³

A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC \times GC) é uma técnica relativamente recente, desenvolvida em 1991 por Liu e Phillips⁶⁴ e que apresenta grande poder de separação. Para amostras complexas, contendo de 150 a 250 compostos de interesse, por exemplo, a separação obtida por GC com uma única coluna não é suficiente para separação de todos os compostos. Outras técnicas

multidimensionais como GC-GC (Cromatografia Gasosa Bidimensional de Frações Parciais ou de *heartcut*), HPLC-GC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Cromatografia Gasosa) e SFC-GC (Cromatografia de Fluido Supercrítico acoplada à Cromatografia Gasosa) também não providenciam uma separação efetiva de todos os analitos.^{65,66} Neste texto será dado destaque à GC × GC em virtude de ter sido utilizada no desenvolvimento desse trabalho.

2.5.1. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente – GC × GC

2.5.1.1. Princípios e Operação

Na GC × GC duas colunas cromatográficas de diferentes mecanismos de retenção são acopladas em série, sendo a coluna da primeira dimensão (¹D) comumente de 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 a 0,32 mm. A coluna da segunda dimensão (²D) deve ser mais curta, do tipo *fast-GC*, para que o perfil de separação obtido na ¹D seja mantido.⁶⁷ A **Figura 9** apresenta um diagrama representativo de um sistema cromatográfico da GC × GC.

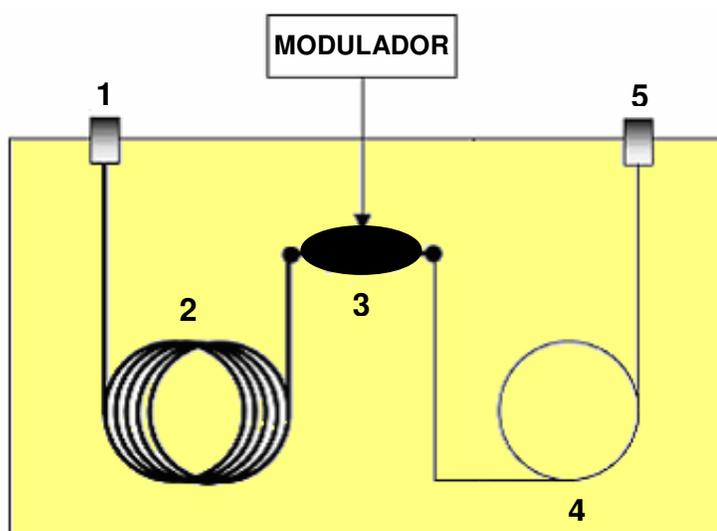


Figura 9. Diagrama dos constituintes da GC × GC. (1) injetor, (2) primeira coluna, (3) modulador, (4) segunda coluna e (5) detector.

O modulador é considerado o “coração” da técnica e é acoplado entre as duas colunas, sendo que sua função é de amostrar e focalizar as estreitas frações eluídas da

primeira coluna e, em seguida, liberar essa porção, rapidamente, para a segunda coluna.⁶⁸ O modulador, ao focalizar o efluente proveniente da primeira coluna e introduzir o mesmo na segunda dimensão, deve fazê-lo em uma frequência correta de amostragem para que a resolução cromatográfica encontrada na primeira separação seja mantida. Uma amostragem de 3 a 4 fatias por pico proveniente da primeira dimensão é ideal para manter o perfil de separação obtido na primeira coluna. O período de amostragem corresponde ao período de modulação (P_M), que é a duração de um ciclo completo de modulação, e ao tempo de separação na coluna da segunda dimensão. Devido ao tempo de separação da segunda dimensão ser muito curto, geralmente de 2 a 10 segundos, a separação na segunda coluna é essencialmente isotérmica.⁶⁹ A **Figura 10** apresenta o processo de modulação gerado pelo modulador térmico de dois estágios.

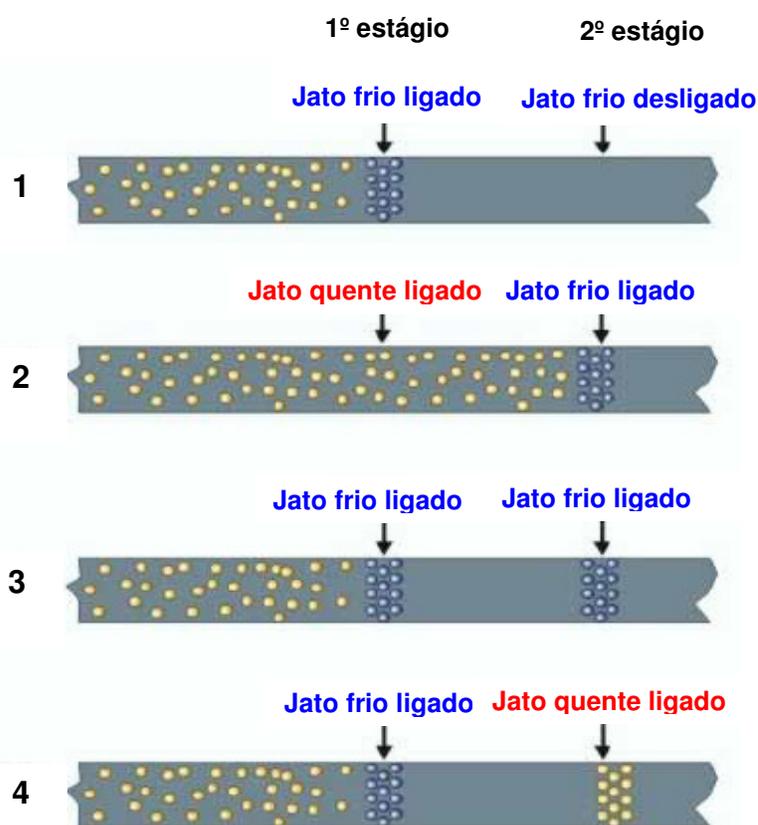


Figura 10. Representação do processo de modulação. Adaptado da referência 69.

O primeiro e o segundo estágios são observados quando ocorre a concentração e a reconcentração da banda cromatográfica, respectivamente, proveniente da primeira

coluna. Um único período de modulação é composto por quatro passos distintos, como mostra a figura acima: (1) no 1º estágio há o aprisionamento da banda cromatográfica proveniente da primeira coluna pela ação de um jato frio; (2) liberação do efluente para o 2º estágio, através de um jato quente; (3) no 1º e 2º estágios ocorre novamente o aprisionamento da banda e (4) no 2º estágio ocorre a liberação do efluente amostrado, através do jato quente, com a liberação para a coluna da segunda dimensão. Cada modulação produz o fatiamento do pico, sendo que o número de fatias amostradas dependerá do período de modulação e da largura do pico proveniente da primeira dimensão.⁷⁰

O termo “abrangente” é utilizado para designar que todo o efluente da primeira dimensão, ou uma parte representativa do mesmo seja introduzido na segunda dimensão, sem perda das características da separação na 1ªD. Na separação abrangente, três fatores devem ser verificados: (1) todos os constituintes da amostra estão sujeitos a duas separações de mecanismos distintos; (2) os constituintes da amostra separados na 1ªD seguirão separados na 2ªD; (3) o perfil de eluição de ambas as colunas é mantido.⁷¹⁻⁷⁴

A ortogonalidade de um sistema multidimensional é verificada quando os mecanismos de separação das duas colunas são completamente independentes. Geralmente, a fase estacionária da 1ªD é apolar, ou de baixa polaridade, onde o processo de separação ocorre por diferenças no ponto de ebulição dos analitos; já a coluna da 2ªD possui fase estacionária polar, ou de média polaridade (separação por polaridade). Esse fator é de grande importância, pois determina a magnitude da separação no espaço bidimensional, sem obrigatoriamente promover ótima resolução cromatográfica. A eficiência da separação depende do tipo de amostra e do conjunto de colunas empregado na primeira e segunda dimensão e não, necessariamente, da ortogonalidade do sistema. Na prática, existe uma relação direta entre ortogonalidade e aumento na capacidade de pico, que representa o número máximo de compostos que podem ser colocados lado a lado em um espaço de separação com uma dada resolução e em um determinado intervalo de tempo.^{71,75,76}

Mondello e colaboradores⁷⁷ descrevem a GC × GC como sendo uma das inovações mais revolucionárias na cromatografia gasosa. Os autores também afirmam

que, provavelmente, a diferença do poder de separação entre a GC × GC e a 1D-GC seja ainda maior do que a diferença existente entre as colunas capilares e as empacotadas.

Em geral, a GC × GC apresenta quatro vantagens sobre a 1D-GC: (1) aumento de resolução, (2) aumento de sensibilidade devido à reconcentração da banda do soluto na ²D, favorecendo a detecção de componentes em nível de traços, (3) construção de cromatograma 2D (bidimensional) com estruturação por compostos quimicamente similares e (4) aumento da capacidade de pico, pois a retenção nas duas colunas através de diferentes mecanismos de interação analito – fase estacionária, faz com que a capacidade teórica de pico na GC × GC se aproxime do produto das capacidades de pico das duas dimensões.^{66,77}

2.5.1.2. Interpretação dos Dados Gerados na GC × GC

Do mesmo modo como ocorre na 1D-GC, a GC × GC também proporciona informações qualitativas e quantitativas a respeito de uma amostra cromatografada. Contudo, a representação gráfica dos resultados é diferenciada. Através de *softwares* específicos, são gerados gráficos tridimensionais, onde o eixo x é representado pela separação na ¹D, o eixo y a separação na ²D e um terceiro eixo, z, representa a intensidade do sinal gerado pelo detector. A **Figura 11** apresenta a construção da representação gráfica gerada por um sistema cromatográfico bidimensional abrangente.

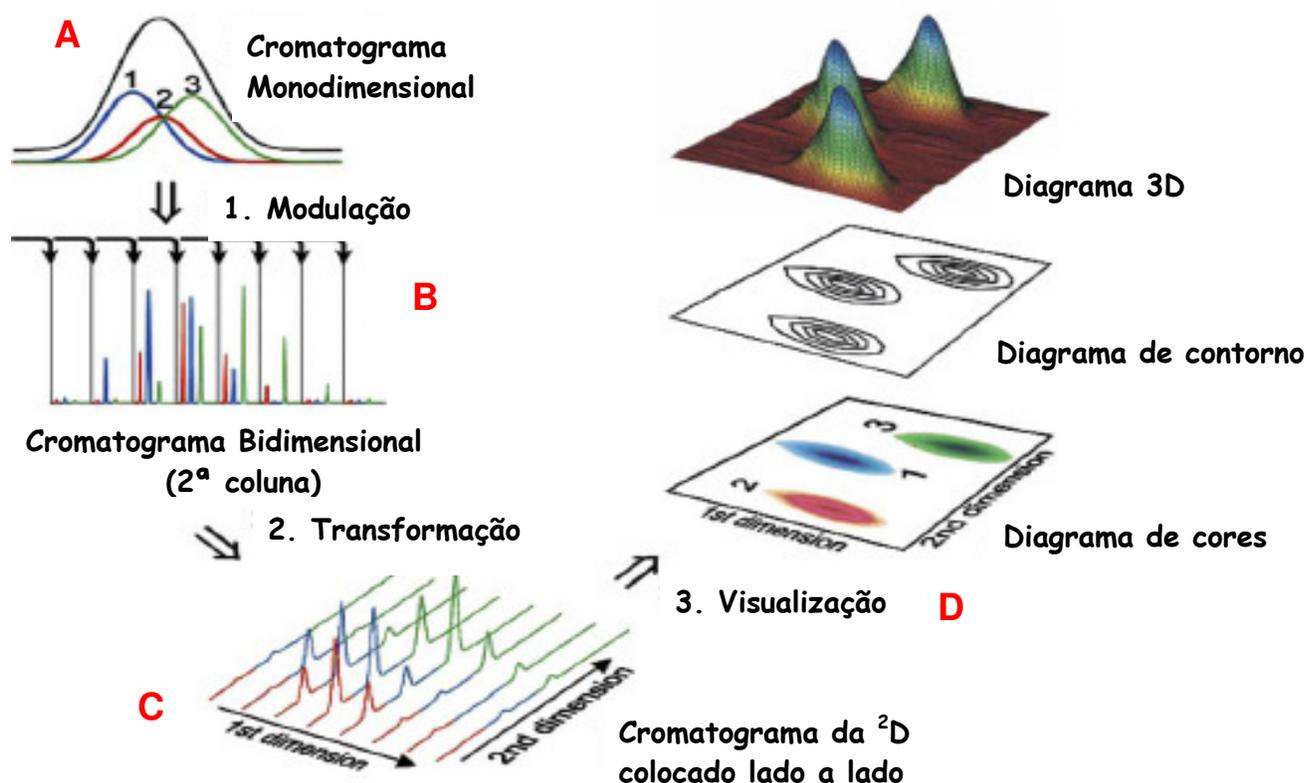


Figura 11. Geração e visualização do sinal cromatográfico por GC × GC. Adaptado da referência 74.

A **Figura 11** apresenta uma banda cromatográfica composta por três analitos que não foram separados na 1^{D} (A). Essa banda é amostrada e injetada na segunda coluna na forma de pulsos estreitos e periódicos pelo modulador. Conforme já mencionado, cada pico eluído da primeira coluna é fatiado de três a quatro vezes num sistema cromatográfico adequado,⁶⁸ o que resulta na formação de, no mínimo, três cromatogramas consecutivos da separação ocorrida na 2^{D} (B), gerando o cromatograma bruto da 2^{D} . Através do uso de softwares específicos cada cromatograma individual da 2^{D} é fatiado e disposto lado a lado (C), mas desta forma, a interpretação dos dados se torna bastante dificultada. Para facilitar a interpretação, os cromatogramas são convertidos em diagramas tridimensionais (D), onde a altura dos picos é representada por linhas de contornos ou por uma escala de cores. O *software*

utiliza o período de modulação e o tempo em que ocorrem os pulsos de injeção para a segunda coluna para fatiar o cromatograma original e gerar o cromatograma da segunda dimensão.⁶⁷

Os picos gerados por um sistema GC × GC apresentam dois tempos de retenção, na primeira e segunda dimensão (1t_R e 2t_R , respectivamente). Essa característica proporciona grande vantagem analítica, pois se refere a dois mecanismos de separação, podendo ser utilizada com o propósito de identificação de compostos, uma vez que a técnica é equiparada a espectrometria de massas.⁷⁸

Diferentemente da 1D-GC, na GC × GC mais de dois picos podem ser considerados como vizinhos de um determinado analito e este novo conceito de vizinhança foi introduzido por Schure,⁷⁹ que foi o primeiro autor a propor a abordagem relacionada a teoria da razão vale-pico para a avaliação da resolução entre picos gerados por cromatografia bidimensional. Para tanto, utiliza-se a distância entre os máximos de dois picos, o ponto de menor intensidade na reta entre estes dois picos e os valores de intensidade nesses três pontos. Contudo, essa abordagem é válida apenas para picos gaussianos. Peters e colaboradores⁸⁰ propuseram uma abordagem para cálculo de resolução baseada na teoria da razão vale-pico (monodimensional), a qual pode ser aplicada tanto para picos gaussianos, quanto não gaussianos. Por outro lado, Adam e colaboradores^{81,82} calcularam a resolução em GC × GC como sendo a média euclidiana das resoluções em cada uma das duas dimensões. Neste trabalho, as resoluções foram calculadas de acordo com esta última abordagem. Para a 1D-GC a resolução entre dois picos genéricos A e B pode ser calculada de acordo com a **Equação 1**.

$$R_s = \sqrt{\frac{4 (\delta_{ir})^2}{(\omega_A + \omega_B)^2}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

δ_{ir} : diferença entre os tempos de retenção de dois picos A e B genéricos;

ω : largura do pico na base.

A **Equação 2** apresenta a fórmula utilizada para o cálculo da resolução na GC × GC.^{81,82}

$$R_{S\ 2D} = \sqrt{\left(\frac{2\delta x}{\omega A, x + \omega B, x}\right)^2 + \left(\frac{2\delta y}{\omega A, y + \omega B, y}\right)^2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

δ_x e δ_y : diferença entre os tempos de retenção de dois picos na ¹D e ²D, respectivamente;

ω_x e ω_y : largura do pico na base na ¹D e ²D, respectivamente. ω_x corresponde ao produto entre número de modulações por pico e o período de modulação. ω_y é referente ao pico modulado mais intenso.

O fator de assimetria (A_s) de um pico está diretamente relacionado à eficiência e resolução cromatográfica. Fatores de assimetria entre 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios, com pouca ou nenhuma influência de cauda nos picos cromatográficos.⁸³ Esse fator é calculado utilizando-se a razão entre as larguras B e A a 10% da altura do pico, conforme **Figura 12**. Na GC × GC a assimetria de pico é avaliada levando-se em consideração o pico modulado mais intenso.

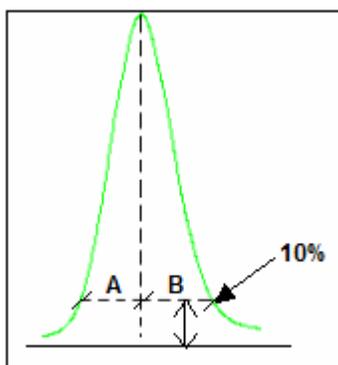


Figura 12. Representação de um pico cromatográfico genérico, ilustrando os parâmetros empregados para cálculo do fator de assimetria.

Quando um composto apresenta $^2t_{R}$ maior do que um período de modulação ocorre o fenômeno chamado “wraparound” ou pico fora de ciclo. Um pico fora de ciclo poderá representar um problema na interpretação dos dados, devido a sua eluição tardia, no próximo ciclo de modulação, juntamente com outros compostos que são

introduzidos na ²D. Esse fenômeno pode ocasionar a coeluição com compostos de interesse, prejudicando o processo de separação e quantificação.⁶⁸

A separação espacial por classes químicas é uma outra característica da GC × GC. O efeito “telhado” é observado para amostras complexas que contenham séries homólogas como constituintes. Neste caso, o perfil de agrupamentos de picos dentro de uma classe química é repetido para cada número de carbonos. Cada “telha” corresponde a um grupo de compostos pertencentes a uma classe química que apresenta um determinado número de carbonos. Esta distribuição espacial de “telhas” em seqüência facilita a identificação dos compostos, principalmente em amostras complexas.⁸⁴

2.5.1.3. Detecção

O detector exerce função de grande importância em um sistema cromatográfico. Os detectores utilizados na GC × GC devem apresentar rapidez na velocidade de aquisição, sendo que esta velocidade está relacionada à rapidez no processo físico-químico que irá produzir o sinal e também à rapidez no processamento eletrônico deste sinal. Assim, o volume do detector deve ser pequeno e a taxa de aquisição de sinal deve ser de pelo menos 50 Hz (50 – 200 Hz), evitando-se alargamento de pico por volume extra coluna e reconstrução incorreta do pico, respectivamente.^{85,86} Alguns detectores vêm sendo empregados na determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes, e dentre eles estão o detector por ionização em chama (FID), de espectrometria de massas (MS), de nitrogênio e fósforo (NPD) e de captura de elétrons (ECD).

O detector por ionização em chama (FID) é muito empregado em GC × GC, pois trabalha com velocidade de aquisição de sinal de até 200 Hz e com praticamente nenhum volume extra coluna. Outro detector amplamente utilizado para diferentes matrizes e analitos é o de espectrometria de massas com analisador por tempo de voo (TOFMS), visto que ele possui frequência de aquisição de dados de 50 a 500 Hz e possibilita acesso a informações estruturais dos analitos, maior sensibilidade, deconvolução espectral, tendo como desvantagem seu alto custo. O detector de

nitrogênio e fósforo (NPD) também é utilizado para determinação de agrotóxicos, uma vez que trabalha com frequência de aquisição de sinal de até 200 Hz.⁸⁶

O detector por captura de elétrons (ECD) apresenta taxa de aquisição de dados de até 50 Hz e volume interno de 1,5 mL, o que implica em alargamento do pico cromatográfico. A miniaturização do ECD, o micro-ECD (μ ECD), com 150 μ L de volume de célula, possibilitou a diminuição do efeito de cauda nos picos cromatográficos, mas ainda apresenta picos cerca de duas vezes mais largos que os obtidos no FID.⁸⁵⁻⁸⁷

O μ ECD, detector utilizado no desenvolvimento desse trabalho, contém uma fonte de ionização de partículas β , de baixa energia, que colidem com as moléculas do gás de arraste gerando elétrons livres de baixa energia. Quando algum constituinte da amostra apresenta grupos de alta afinidade eletrônica, como por exemplo halogenados, fosforados e grupos nitro, os elétrons livres gerados são capturados por esses componentes da amostra, com formação de íons carregados negativamente. O sinal gerado pelo detector é emitido devido à diminuição na corrente elétrica provocada pela captura dos elétrons livres. O ECD é um detector seletivo, extremamente sensível para quantificação de compostos organohalogenados, sendo que a principal fonte radioativa utilizada é o ^{63}Ni , que apresenta um tempo de vida média de aproximadamente 100 anos.^{88,89} Essas importantes características de detecção quando aliadas ao potencial de separação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente propiciam ótimos resultados de separação e detecção. O esquema referente ao μ ECD pode ser observado na **Figura 13**.

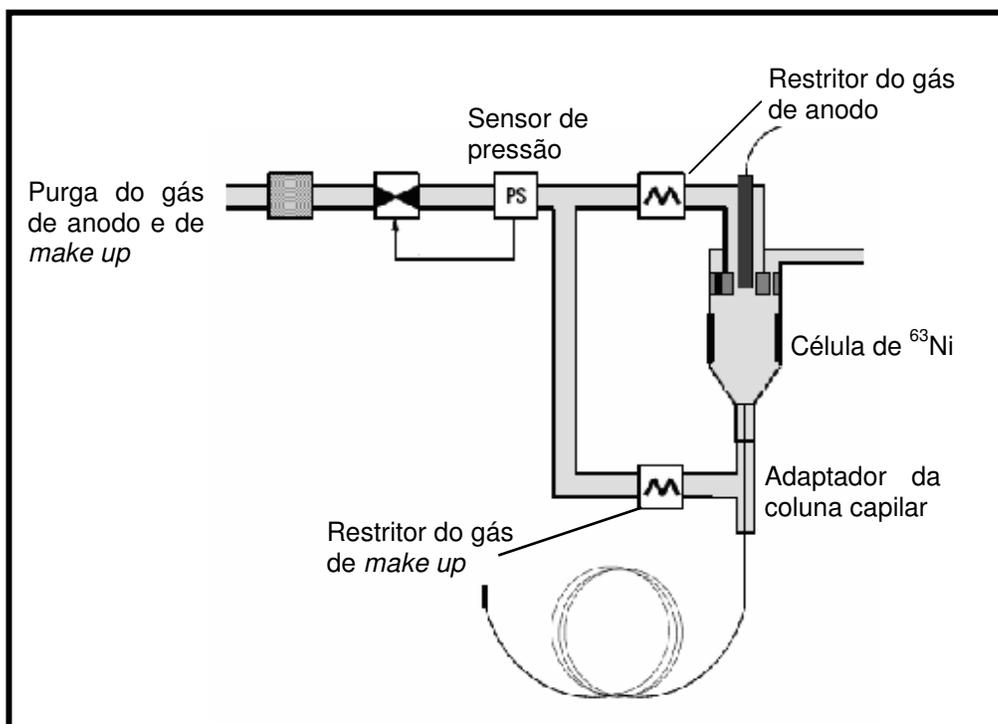


Figura 13. Esquema do μ ECD. Adaptado da referência 88.

2.5.1.4. Aplicação da GC \times GC na Determinação de Agrotóxicos

O número de publicações científicas relacionado à determinação de agrotóxicos por GC \times GC ainda é relativamente pequeno, mas suficiente para demonstrar as potenciais vantagens da técnica em relação a 1D-GC.

Uma consequência importante da utilização dos agrotóxicos na agricultura é a possível presença de resíduos desses compostos e de seus metabólitos em alimentos. Investigação sobre o poder de separação da GC \times GC/TOFMS para determinação de 58 compostos da classe dos organofosforados e nitrogenados em amostras alimentícias foi realizado por Dallüge e colaboradores.⁹⁰ Os autores observaram que a determinação de alguns compostos por GC/TOFMS seria prejudicada em função da coeluição com interferentes da matriz, já que o espectro de massas obtido pela deconvolução espectral ou pela subtração da linha de base não é claro o suficiente para proporcionar a identificação dos analitos. Em outro estudo de otimização de metodologia para determinação de 51 agrotóxicos em uva, Banerjee e colaboradores⁹¹ verificaram que a sensibilidade da análise por GC \times GC /TOFMS foi consideravelmente aumentada quando comparada a GC/TOFMS. A GC \times GC ainda proporcionou a

separação cromatográfica de alguns compostos que coeluem quando analisados por GC/MS, embora estes tenham sido identificados por deconvolução espectral na cromatografia monodimensional. Além disso, a GC × GC possibilita a obtenção de espectros de massas mais nítidos, evitando assim a possível confirmação de falsos positivos. O aumento de sensibilidade analítica da GC × GC-NPD quando comparada a GC-NPD, para análise de vegetais, foi verificado por Khummueng e colaboradores,⁸³ visto que a soma das alturas dos picos cromatográficos obtidos pela técnica bidimensional abrangente foi cerca de 20 vezes maior do que aquela obtida na monodimensional.

O potencial da GC × GC- μ ECD foi também verificado por Bordajandi e colaboradores⁹³ através de desenvolvimento de método para determinação de poluentes quirais como toxafeno em óleo de peixe. O método descrito para determinação de cinco congêneros do toxafeno, com coluna enantiosseletiva na ¹D e coluna de média polaridade na ²D, providenciou completa separação dos isômeros, enquanto que para a 1D-GC, com a mesma coluna enantiosseletiva, ocorreu sobreposição de dois compostos. Além disso, a GC × GC possibilitou excelente separação entre os compostos estudados e os interferentes da matriz complexa.

A **Tabela II** apresenta alguns trabalhos científicos que utilizam a GC × GC como ferramenta analítica para determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes.

Tabela II. Aplicações da GC × GC para determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes.

Analitos	Tipo de amostra	Deteccão	Ref.
20 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Maçã e pêssego	TOFMS	73
Nove fungicidas	Vegetais	μECD	92
Cinco enantiômeros do toxafeno	Óleo de peixe	μECD	93
Seis compostos da classe dos piretróides	Uva	μECD	94
Agrotóxicos organoclorados (OCPs) e toxafeno	Carne de porco, ovos e leite materno	μECD	95
Agrotóxicos organoclorados (OCPs) e toxafeno	Sedimento e poeira	μECD	96
Toxafeno	Misturas técnicas	μECD	97
Agrotóxicos organoclorados (OCPs)	Leite e soro humano	TOFMS	98
36 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Chás de frutas, verde e preto	TOFMS	99
Agrotóxicos organoclorados	Mistura de padrões	FID	100
15 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Soro humano	FID	101
32 compostos pertencentes à classe dos organoclorados e organofosforados	Fumo	TOFMS	102
106 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Cereal	TOFMS	103

2.6. PARÂMETROS DE MÉRITO

O processo de validação possibilita uma avaliação da eficiência de um processo analítico, quando do seu desenvolvimento, adaptação ou implementação. A validação garante que um método analítico ofereça informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra.¹⁰⁴ O conceito de validação de metodologia é amplamente diversificado na literatura. Pesquisadores¹⁰⁵ e órgãos reguladores, tanto nacionais^{106,107} quanto internacionais¹⁰⁸⁻¹¹⁰ discutem como e quais parâmetros devem ser levados em consideração num processo de validação.

Geralmente, os parâmetros avaliados num processo de validação são: especificidade e seletividade, linearidade e curva de calibração, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão (teste de recuperação).

2.6.1. Seletividade e Especificidade

Tanto a seletividade, quanto a especificidade estão relacionadas com o processo de detecção do método.¹⁰⁷ A seletividade é a capacidade de distinção entre um analito e outro, ou interferentes da matriz, quando um método gera resposta para vários compostos. A especificidade é verificada quando um método gera resposta para apenas um analito.¹⁰⁷ Com o intuito de evitar confusão em relação a esses dois conceitos, a União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (do inglês "International Union of Pure and Applied Chemistry") recomenda que seja utilizado o termo seletividade, já que existem poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas um único analito. Se a seletividade do método não for constatada, parâmetros como exatidão, linearidade e precisão estarão seriamente comprometidos.¹⁰⁴ A seletividade é um parâmetro avaliado qualitativamente.

2.6.2. Linearidade e Curva de Calibração

O conceito de linearidade está relacionado à capacidade de um método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração de um analito em um determinado intervalo de concentração.^{104,107} Com isso, torna-se necessário o uso de soluções padrão para a verificação da relação entre a concentração e a resposta analítica, pois na prática a linearidade é verificada através da curva de calibração.¹⁰⁵

Por meio da curva de calibração é gerado um gráfico, com no mínimo cinco pontos, representado por uma reta, que relaciona a resposta do equipamento com as várias concentrações dos analitos em estudo. Assim, a resposta instrumental é linearmente relacionada com a concentração das soluções padrão ou da matriz fortificada. Essa resposta pode ser verificada matematicamente através da regressão linear, descrita pela equação $y = ax + b$, onde y corresponde a variável dependente (sinal analítico obtido para as diferentes concentrações); a é o coeficiente angular da reta (inclinação da curva); x é a variável independente (relaciona-se as várias concentrações das soluções padrão) e b representa o coeficiente linear da reta de calibração.^{104,105,111}

Outro parâmetro importante é o coeficiente de correlação (r) que é utilizado com o intuito de verificar a adequação da reta como modelo matemático. Um coeficiente de correlação igual a 1 indica uma correlação perfeita.¹¹¹ De acordo com a Associação Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO, valores de r iguais a 0,99 e 0,90, respectivamente, são considerados satisfatórios. O coeficiente de determinação (r^2) é outro parâmetro utilizado para verificar a linearidade de uma curva analítica, sendo que valores de r^2 acima de 0,98 são considerados satisfatórios.¹¹²

2.6.3. Precisão

A precisão indica a concordância entre vários resultados obtidos para uma mesma amostra, ou seja, através da avaliação da precisão analítica consegue-se perceber a dispersão entre os diversos resultados gerados para ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções padrão.^{105,107} Tanto a precisão quanto a exatidão de um processo analítico são considerados parâmetros de grande importância no processo de validação, pois permitem estimar os erros e variações associados a um determinado método.¹¹³ Normalmente, a precisão é numericamente estimada através do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) – **Equação 3**, sendo que, para análise de agrotóxicos e outros compostos em nível de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%.^{104,111}

$$\text{RSD \%} = \frac{S}{M} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

S é o desvio padrão de uma amostra;

M é a média das determinações.

A repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade são três diferentes expressões da precisão analítica. A repetitividade é o estudo da precisão realizado em um mesmo laboratório, em pequeno intervalo de tempo (mesmo dia, analista e equipamento). A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. A reprodutibilidade refere-se aos resultados obtidos através da colaboração entre laboratórios, com mudança de operador, local, equipamentos, entre outros. A reprodutibilidade é considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em agências regulamentadoras, como métodos oficiais de análise.^{104,113}

Em estudos cromatográficos, a precisão é determinada através de injeções de no mínimo cinco replicatas de solução padrão.^{105,113}

2.6.4. Exatidão

A exatidão de um processo analítico representa o quanto os resultados individuais, de um determinado ensaio, concordam com um valor de referência aceito como verdadeiro. Esse parâmetro mede o desvio do valor obtido em relação ao valor adotado como real.^{104,105} São quatro os métodos utilizados para a verificação da exatidão analítica: uso de material de referência certificado (MRC), comparação de método proposto com método de referência, testes de recuperação com matriz fortificada e estudos colaborativos entre vários laboratórios. Geralmente, em análise de resíduos de agrotóxicos, são utilizados os testes de recuperação, em que são adicionadas quantidades conhecidas de padrão de agrotóxicos à amostra em estudo ou à amostra controle.¹⁰⁴

Para determinação de agrotóxicos são aceitos diferentes intervalos de recuperação, variando de 70 a 120%, 80 a 110% e 70 a 130%, com precisão de até 20%.^{104,113} Para amostras complexas, a literatura considera satisfatória recuperações entre 50 e 120%, com precisão de 15%.¹⁰⁴ A **Equação 4** descreve a porcentagem de recuperação de uma amostra fortificada.³⁷

$$R \% = \frac{m}{m_{AD}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

R %: Recuperação percentual dos agrotóxicos;

m: massa determinada na amostra fortificada (μg);

m_{AD} : massa de agrotóxico adicionada à amostra (μg).

2.6.5. Limite de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)

O limite de detecção pode ser definido como sendo a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou seja, é a menor concentração de um analito que pode ser diferenciada do ruído gerado por equipamentos que produzem linhas de base.¹⁰⁵ O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.¹⁰⁷

A determinação do LOD e LOQ pode ser realizada de diferentes maneiras. Não existe um consenso para a efetivação de um único método para a determinação desses dois parâmetros. As metodologias aceitas para avaliação do LOD e LOQ são a do método visual, método relação sinal-ruído e métodos baseados em parâmetros da curva analítica. Tanto o LOD quanto o LOQ são medidos em unidades de concentração.¹⁰⁴

O limite de detecção do método, MDL (do inglês, “Method Detection Limit”) é a mínima concentração de uma determinada substância que pode ser medida e reportada com 99% de confiança de que a concentração seja maior do que zero. O MDL é determinado através da análise de uma amostra fortificada e é, geralmente, maior do que o LOD. O MDL de procedimento analítico deve variar em função das características da matriz. Este descreve a precisão da quantificação, enquanto que o LOD descreve o quão segura é a detecção instrumental.^{32,114}

A metodologia utilizada neste trabalho para a determinação do LOD e LOQ está descrita no item 3.7.4.

PARTE EXPERIMENTAL



3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS EMPREGADOS

Os solventes utilizados no processo de extração foram de grau analítico e bidestilados (acetona, hexano, diclorometano e éter etílico, da Nuclear - Diadema, São Paulo, Brasil). Para o preparo das soluções padrão foi utilizado acetato de etila grau HPLC (Mallinckrodt, Phillipsburg, Nova Jersey, EUA). Os padrões dos agrotóxicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha), com grau de pureza acima de 97%, sendo que o padrão do agrotóxico permetrina constitui-se de mistura dos isômeros *cis* e *trans* e o padrão do composto propiconazol de mistura dos estereoisômeros. 3,4,5-tricloroguaiacol (Ultra Scientific, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) com pureza acima de 95% foi utilizado como padrão interno. O sulfato de sódio anidro (Quimex, São Paulo, Brasil) utilizado para retirar a umidade residual dos sedimentos foi previamente seco em estufa a 400 °C por 4 horas e armazenado em dessecador. Os papéis filtro utilizados foram de grau quantitativo (Quanty, Alemanha). As colunas cromatográficas foram todas adquiridas da Agilent Technologies - J&W Scientific (Palo Alto, CA, EUA).

3.2. EQUIPAMENTOS

As análises por 1D-GC e GC × GC foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com micro detector por captura de elétrons, equipado com amostrador automático Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça). O cromatógrafo ainda apresenta um forno secundário (LECO, St. Joseph, MI, EUA) e um modulador térmico com quatro jatos de N₂ (*quad jet*), sendo dois jatos quentes que são aquecidos pelo próprio bloco do modulador e dois jatos frios, resfriados por N₂ líquido, gerando duas armadilhas criogênicas em série. Para a extração dos sedimentos foi utilizado um banho de ultra-som Maxiclean (Unique, Indaiatuba, Brasil) com potência de 120 Watts. Para pesagem dos padrões dos agrotóxicos, sedimentos e sulfato de sódio foi utilizada balança analítica de precisão (Shimadzu, AY220, Kioto, Japão).

3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão estoque foram preparadas pesando-se os agrotóxicos em frascos individuais e dissolvendo-os em acetato de etila grau HPLC em balões volumétricos de 5 mL, previamente silanizados. As diluições posteriores foram também feitas em balões volumétricos de 5 mL, utilizando-se micropipeta (Brand, Wertheim, Alemanha) para coleta das alíquotas. Todas as soluções foram guardadas no freezer à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, em frascos de vidro âmbar silanizados.

3.4. AMOSTRAGEM DOS SEDIMENTOS

As coletas foram realizadas por técnicos da FEPAM na região da Bacia do Rio Santa Maria e na região do Rio Gravataí. Foi coletado em média 1 kg de sedimento, com retirada de qualquer vegetação presente, próximo à margem, em locais de deposição de partículas finas (preferencialmente), e pouca profundidade. Não foi adicionado nenhum componente para preservação das amostras. Os sedimentos foram coletados em frascos de vidro e transportadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o laboratório, onde foram congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer, antes do processo de extração. A **Tabela III** apresenta a localização geográfica dos locais de coleta dos sedimentos estudados.

Tabela III. Localização geográfica dos sedimentos analisados.

Amostra	Localização Geográfica
SD ₁	31° 8' 11" – latitude sul / 54° 22' 42" – longitude oeste Rio Santa Maria
SD ₂	30° 16' 49" – latitude sul / 54° 54' 10" – longitude oeste Rio Santa Maria
Amostra controle	29° 56' 10" – latitude sul / 50° 36' 05" – longitude oeste Rio Gravataí

3.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

O processo de extração empregado para as amostras de sedimentos foi baseado no método reportado por You e colaboradores,⁵⁰ EPA 3550C¹¹⁵ e NBR (Norma Brasileira) 13408/95.¹¹⁶

A água residual presente no sedimento foi retirada e o mesmo foi homogeneizado. Em seguida, foi parcialmente seco ao ar, à temperatura ambiente, em vidros de relógio e cobertos com papel alumínio. Para a etapa de extração, foram pesados 20 g de sedimento e 1 g para determinação do percentual de peso seco. Para esta determinação, o sedimento foi deixado em estufa a 90 °C por 12 h e colocado em dessecador antes da pesagem.¹¹⁶ O cálculo da porcentagem de peso seco (sólidos secos) é feito de acordo com a **Equação 5**.

$$\frac{\text{Material Seco (g)}}{\text{Amostra (g)}} \times 100 = \% \text{ Sólidos Secos} \quad \text{Equação 5}$$

Dez gramas de sulfato de sódio anidro foram adicionados a 20 g de sedimento, procedendo-se à homogeneização do material. Uma alíquota de 50 mL de mistura 50:50 v/v de acetona:diclorometano foi adicionada à amostra, submetendo-se a mesma à extração por 15 min no banho de ultra-som. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes, empregando-se o mesmo período de tempo e mesma quantidade de solvente em cada extração. Os extratos obtidos foram decantados e filtrados em papel filtro sobre 2 g de sulfato de sódio. A seguir, os extratos foram combinados, evaporados até a secura e ressuspensos com 1,5 mL de acetato de etila.

As características físico-químicas dos sedimentos analisados neste trabalho foram cedidas pela FEPAM. A **Tabela IV** apresenta algumas características físico-químicas desses sedimentos.

Tabela IV. Características físico-químicas dos sedimentos analisados por 1D-GC e GC × GC.

Amostras	Carbono Orgânico	Cascalho	%		
			Areia	Silte	Argila
SD ₁	2,53	3,20	70,97	19,49	6,33
SD ₂	0,99	0	83,11	10,20	6,69
Amostra controle	1,98	24,90	66,20	5,08	3,77

3.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Para a determinação das melhores condições de programação de temperatura do forno e verificação dos tempos de retenção dos analitos, foram realizadas injeções de solução padrão contendo os nove compostos (oito agrotóxicos e um padrão interno - 3,4,5-tricloroguaiacol), na concentração de 100 µg L⁻¹. As injeções foram realizadas com volume de 1 µL, no modo *splitless* com pulso de pressão de 60 psi. Durante todas as análises, a temperatura do detector foi mantida entre 20-25°C acima da temperatura mais alta do forno, a fim de evitar e/ou diminuir o efeito de cauda nos picos e manter a célula do detector limpa.⁷⁹ A confirmação da identidade de cada analito foi obtida com injeção individual dos agrotóxicos e do padrão interno na concentração de 1 mg L⁻¹. A **Tabela V** apresenta a relação de colunas cromatográficas utilizadas nos experimentos, bem como a característica das fases estacionárias das mesmas.

Tabela V. Colunas utilizadas nas otimizações dos parâmetros cromatográficos para 1D- GC e GC × GC.

Conjunto de Colunas	1D-GC* e Primeira Dimensão (1D)		Segunda Dimensão (2D)		
	Nome	Fase	Nome	Fase	Dimensões
(1)	DB-5	5% difenil-95% dimetilpolisiloxano	DB-17ms	50% fenil-50% metilpolisiloxano	1,70 m x 0,18 mm x 0,18 µm
(2)	HP-50+	50% fenil - 50% metilpolisiloxano	DB-1ms	100% metilpolisiloxano	1,70 m x 0,10 mm x 0,10 µm

*As dimensões das colunas empregadas em 1D-GC ou na 1D foram sempre 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

3.6.1. Cromatografia Gasosa Monodimensional (1D-GC)

Os parâmetros experimentais que influenciam na análise dos compostos estudados, tais como programação de temperatura do forno, temperatura do injetor, fluxo de gás de *make up* (N₂, 99,999%, Linde Gás, Canoas, RS, Brasil) e coluna cromatográfica foram otimizados para a análise por GC-µECD. O fluxo de gás de arraste (H₂, 99,999%, Linde Gás Canoas, RS, Brasil) utilizado nos experimentos foi de 2 mL min⁻¹.

Devido à maior resistência térmica da coluna DB-5, foi verificada a influência de três diferentes temperaturas do injetor (250, 280 e 300 °C) na eficiência processo cromatográfico.

3.6.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC × GC)

A partir dos melhores resultados obtidos para a 1D-GC, como temperatura de injeção e programação de temperatura do forno, parâmetros como período de modulação, diferença de temperatura entre forno primário e secundário e duração do jato quente foram otimizados para as análises por GC × GC-µECD, utilizando-se diferentes jogos de colunas.

3.7. PARÂMETROS DE MÉRITO

O processo de validação foi realizado para as duas técnicas de análise (mono e bidimensional). Os parâmetros validados foram: seletividade, linearidade e curva de calibração, limites de detecção e quantificação instrumentais, limite de detecção do método, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (teste de recuperação).

3.7.1. Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade do método foi verificada através de injeções de solução padrão para obtenção da curva de calibração. A curva foi construída através de injeções de soluções padrão preparadas em acetato de etila, em quintuplicata, na faixa de 5 a 415 $\mu\text{g L}^{-1}$, contendo o padrão interno na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. As injeções foram realizadas em ordem crescente de concentração, sendo que o método da padronização interna foi escolhido a fim de compensar as flutuações nas respostas geradas pelo μECD .

3.7.2. Precisão

A repetitividade do método foi avaliada através do coeficiente de variação das áreas e alturas dos picos cromatográficos. Foram realizadas oito injeções sucessivas de solução padrão contendo os agrotóxicos estudados e o padrão interno (3,4,5-tricloroguaiacol), na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão intermediária também foi avaliada através do coeficiente de variação das áreas e alturas dos picos cromatográficos gerados através de injeções realizadas em dois dias diferentes, num total de oito injeções (quatro injeções a cada dia).

3.7.3. Exatidão

A exatidão foi verificada através dos testes de recuperação em três níveis de concentração (15, 30 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Foi realizada uma média aritmética dos LOQ para 1D-GC e, então, escolhidos os valores de fortificação como sendo 1 x LOQ, 2 x LOQ e 10 x LOQ.¹⁰⁴

Os testes foram realizados com amostra de sedimento isenta dos agrotóxicos estudados. À amostra foram adicionadas quantidades de 300, 60 e 30 μL de uma solução a 10 mg L^{-1} contendo os analitos estudados, para obtenção da fortificação a 150, 30 e 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram deixadas em contato com

a solução padrão contendo os agrotóxicos durante 24 horas, após homogeneização e evaporação do solvente.

3.7.4. Limites de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)

A determinação dos limites de detecção e quantificação instrumentais foram realizadas de acordo com o que preconiza a Conferência Internacional em Harmonização – ICH (do inglês “International Conference on Harmonization”).¹⁰⁸ Os cálculos foram baseados no desvio padrão, s , da intersecção da curva analítica e no coeficiente angular, S , da curva conforme **Equações 6 e 7**.

Para o limite de detecção:

$$\text{LOD} = 3,3(s/S) \quad \text{Equação 6}$$

Para o limite de quantificação:

$$\text{LOQ} = 10(s/S) \quad \text{Equação 7}$$

O limite de detecção do método (MDL) foi avaliado através da extração de sete replicatas de sedimento fortificado a $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$. O nível de fortificação foi escolhido de acordo com a descrição do “Analytical Detection Limit Guidance”, que determina que a fortificação fique entre 1 a 5 vezes o limite de detecção instrumental.¹¹⁴ O MDL é expresso conforme **Equação 8**:

$$\text{MDL} = st(0,99; n-1) \quad \text{Equação 8}$$

Na equação acima, s é o desvio padrão das replicatas e t é o valor da distribuição t de *Student*, com 99% de confiança e $n-1$ graus de liberdade.^{32,114}

RESULTADOS E DISCUSSÃO



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL (1D-GC)

A **Tabela VI** apresenta os parâmetros experimentais otimizados para cada coluna cromatográfica.

Tabela VI. Condições cromatográficas obtidas para 1D-GC.

Condições	Colunas Cromatográficas		
	HP-50+	DB-5	DB-WAXetr
Programação de Temperatura do Forno	50°C (1,5 min)-30°C min ⁻¹ /190°C-5°C min ⁻¹ /220°C-7°C min ⁻¹ /255°C (44 min)	60°C (2,53 min)-35°C min ⁻¹ /180°C-4°C min ⁻¹ /240°C-12°C min ⁻¹ /300°C (2 min)	40°C (1,5)-12°C min ⁻¹ /100°C-30°C min ⁻¹ /235°C (44 min)
Temp. Injetor (°C)	280	280	260
Temp. Detector (°C)	280	325	260
Pulso de Pressão (s)	36,6	29,4	36,6

4.1.1. Fase Estacionária Polidimetilsiloxano com 50 % de Grupos Fenila (HP-50+)

A temperatura máxima de trabalho para a HP-50+, em condições isotérmicas, é de 280 °C, mas os compostos de elevada K_H e massa molecular como difenoconazol e azoxistrobina (406,2 g mol⁻¹ e 403,4 g mol⁻¹, respectivamente) eluem em temperaturas mais elevadas. Com isso, um tempo maior de análise ao final da mesma foi necessário para que todos os compostos fossem eluídos. Ao final da análise, intervalos de 30 a 60 minutos foram testados a 255 °C, sendo que 44 minutos foram suficientes para a completa eluição dos analitos. Esta programação de temperatura representa a melhor condição encontrada depois de diversos testes com várias rampas de temperatura.

O manual do equipamento⁸⁸ recomenda o emprego de diferentes fluxos de gás de *make up* para operação em 1D-GC e em GC × GC. No caso de 1D-GC, o fluxo mínimo de gás de *make up* a ser empregado é de 10 mL min⁻¹, enquanto o máximo é de 150 mL min⁻¹. Entretanto, o intervalo típico para fluxos de gás de *make up* situa-se entre 30 e 60 mL min⁻¹. Desta forma foram testados estes dois fluxos recomendados pelo fabricante. A condição de 30 mL min⁻¹ foi considerada a mais

apropriada devido à obtenção das melhores intensidades de sinal para os agrotóxicos em estudo e, por esta razão, nos experimentos posteriores, essa condição foi mantida. A diminuição de fluxo de gás de *make up* faz com que o efeito de diluição dos compostos no detector seja minimizado, com conseqüente diminuição na largura da base dos picos, proporcionando melhor desempenho no processo cromatográfico.

A partir dessa condição foram realizadas injeções sem divisão de fluxo com pulso de pressão de 60 psi com diferentes períodos de duração, a fim de se obter uma transferência mais rápida da banda cromatográfica para o interior da coluna, bem como conseqüente estreitamento e aumento de intensidade da mesma.¹¹⁷ A literatura reporta algumas vantagens da utilização da injeção com pulso de pressão, tais como o aumento da velocidade de transferência de analitos com elevado ponto de ebulição e de compostos que possam ser adsorvidos no injetor; redução do tempo de residência da amostra no injetor e aumento da capacidade do mesmo, em função do volume de vapor ser inversamente proporcional a pressão.¹¹⁸ Entretanto, verificou-se que a eluição do triclorfom durante o pulso de pressão faz com que a intensidade de sinal deste pico aumente desproporcionalmente em relação aos demais analitos, podendo também ocorrer coeluição do triclorfom com o pico cromatográfico do solvente. A escolha de um pulso de pressão cuja duração seja apropriada (36,6 s para HP-50+ e DB-WAXetr; 29,4 s para DB-5) resulta em um gerenciamento adequado destes fenômenos, proporcionando uma condição cromatográfica satisfatória. As três colunas utilizadas para os experimentos apresentam dimensões idênticas, mas fases estacionárias diferenciadas, o que implica em tempos de retenção distintos para os analitos e solvente em cada fase e, com isso, durações de pulso de pressão diferenciadas.

A **Figura 14** apresenta um cromatograma típico dos nove analitos em coluna capilar HP-50+.

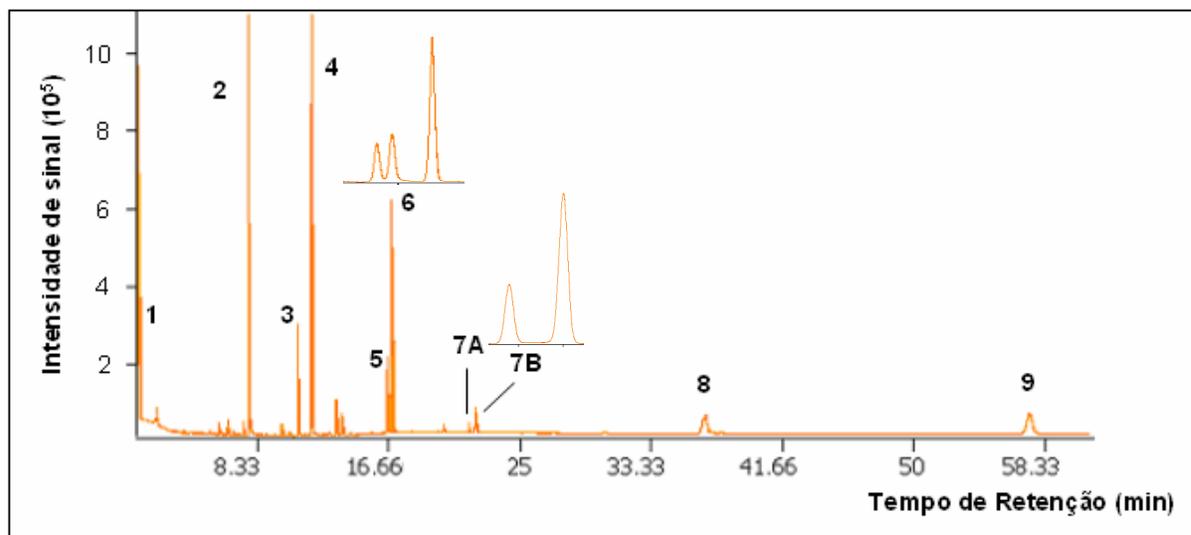


Figura 14. Cromatograma obtido para a mistura de padrões na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma coluna HP-50+. Condições cromatográficas descritas na **Tabela VI**. 1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7A) Permetrina *cis*, 7B) Permetrina *trans*, 8) Difenconazol I e II e 9) Azoxistrobina.

4.1.2. Fase Estacionária 5% difenil – dimetilpolisiloxano (DB-5)

Inicialmente foram testadas várias rampas de programação de temperatura, sendo que a condição ótima escolhida está registrada na **Tabela VI**.

Sabendo-se que a DB-5 apresenta maior resistência a temperaturas elevadas do que a HP-50+ (325 e 280 °C em condição isotérmica, respectivamente), foram realizados testes com três diferentes temperaturas de injeção – 250, 280 e 300 °C, a fim de verificar a influência deste parâmetro na determinação dos compostos. O aumento da temperatura do injetor pode minimizar efeitos de discriminação, aumentando o sinal cromatográfico para analitos mais suscetíveis a estes efeitos. Neste caso, o aumento da resposta se relaciona a uma melhor performance cromatográfica, que é consequência de maior eficiência na transferência da banda cromatográfica durante a injeção. De acordo com a **Figura 15**, de forma geral, não há diferença significativa nas alturas relativas dos picos nas diferentes temperaturas. Contudo, a temperatura de 280 °C foi escolhida por ter propiciado maior intensidade do sinal cromatográfico do componente fipronil. Zhang e colaboradores¹¹⁹ também verificaram que ocorre uma melhora do sinal cromatográfico para vários analitos, quando da utilização de temperaturas mais elevadas no injetor.

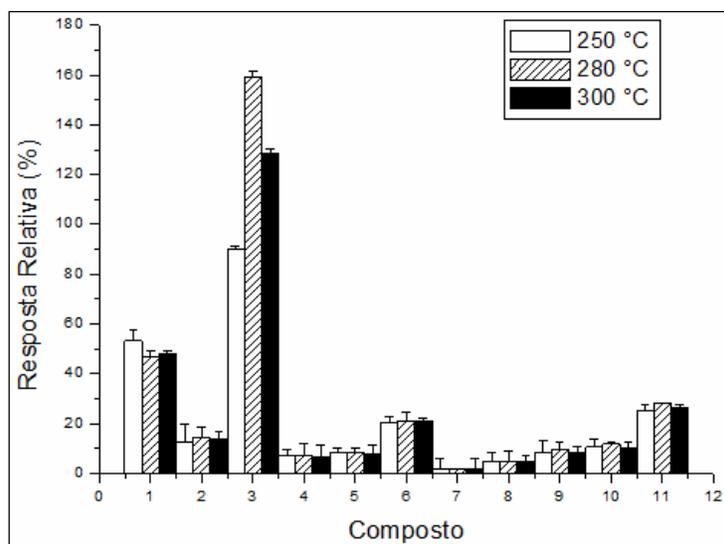


Figura 15. Comparação das médias das alturas dos picos cromatográficos ($n = 3$) para diferentes temperaturas de injeção.

1) Triclorfom, 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I, 5) Propiconazol II, 6) Trifloxistrobina, 7) Permetrina *cis*, 8) Permetrina *trans*, 9) Difenconazol I, 10) Difenconazol II e 11) Azoxistrobina.

Para esta fase estacionária, também foi testada a duração do pulso de pressão durante a injeção cromatográfica, de forma semelhante ao que foi feito para a HP-50+, objetivando-se o melhor comportamento cromatográfico para o triclorfom. A **Figura 16** apresenta um cromatograma típico dos nove analitos em coluna capilar DB-5.

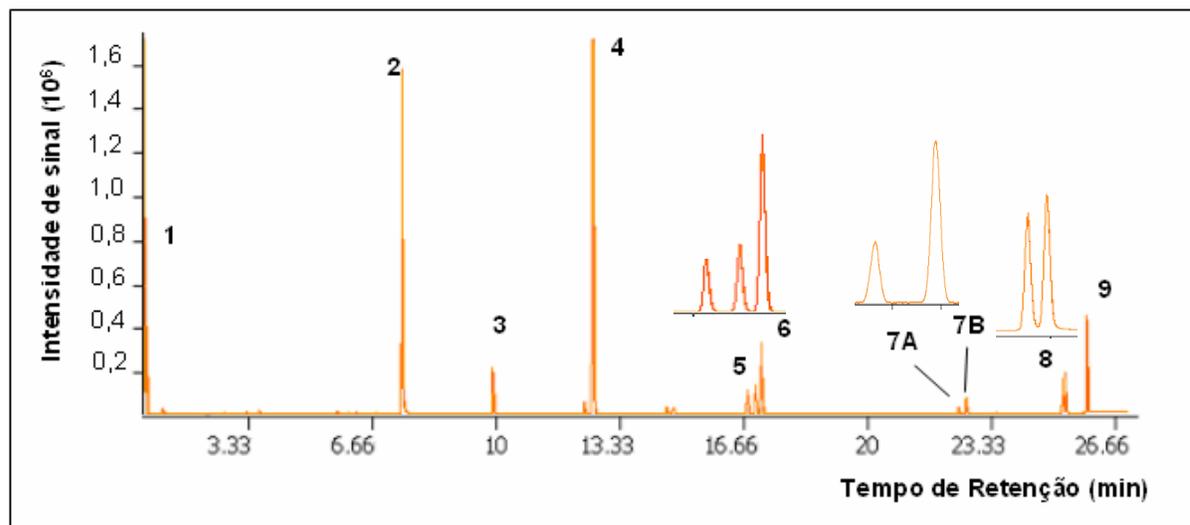


Figura 16. Cromatograma obtido para a mistura de padrões na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma coluna DB-5. Condições cromatográficas descritas na **Tabela VI**.

1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7A) Permetrina *cis*, 7B) Permetrina *trans*, 8) Difenconazol I e II e 9) Azoxistrobina.

4.1.3. Fase Estacionária Polietilenoglicol (DB-WAXetr)

A temperatura máxima de trabalho em condição isotérmica para a DB-WAXetr é de 235 °C. Nas análises realizadas, observou-se que, mesmo após 180 min a 235 °C, não se verificou a eluição de dois dos compostos: difenoconazol e azoxistrobina. Além da dificuldade de eluição destes analitos, constatou-se que a DB-WAXetr possivelmente provocou sorção parcial dos compostos devido a sua alta polaridade. Isto pode ser observado através da baixa intensidade dos sinais cromatográficos, quando comparados àqueles obtidos em análises feitas com as mesmas soluções em outras fases estacionárias. A **Figura 17** apresenta um cromatograma típico da melhor condição de análise utilizando-se esta fase estacionária.

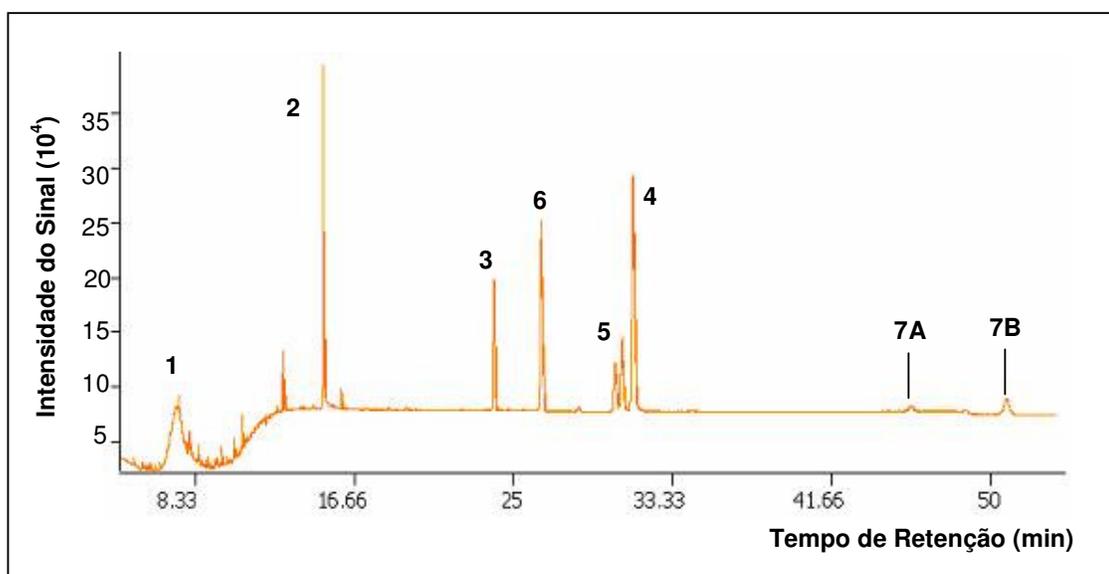


Figura 17. Cromatograma obtido para a mistura de padrões na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em uma coluna DB-WAXetr. Condições cromatográficas descritas na **Tabela VI**. 1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7A) Permetrina *cis* e 7B) Permetrina *trans*.

4.1.4. Comparação Entre as Fases Estacionárias

O uso da fase estacionária DB-WAXetr mostrou-se inviável, visto que dois dos analitos não eluíram após 180 min de análise. A comparação entre os resultados obtidos com as colunas HP-50+ e DB-5 mostra uma maior vantagem analítica para a segunda coluna cromatográfica. Além de apresentar menor tempo de análise na separação dos nove compostos (27, 9 min – DB-5 e 61,1 min – HP-50+), a DB-5 ainda oferece melhor resolução na separação dos picos cromatográficos, com

exceção do propiconazol II (5) e do trifloxistrobina (6) que apresentam resolução de 1,26 e 2,04 para DB-5 e HP-50+, respectivamente.

A resolução obtida para os picos dos isômeros da permetrina e propiconazol, na coluna HP-50+, foi de 1,76 e 0,84, respectivamente. Para a DB-5, a resolução obtida para esses isômeros foi de 2,23 e 1,64, respectivamente. Utilizando-se a coluna DB-5, observou-se a separação dos dois isômeros do difenoconazol (8) com resolução de 0,89, enquanto que na HP-50+ estes dois isômeros coeluem. Isto se deve às diferenças nas interações entre analito e fase estacionária e também ao fato de a DB-5 permitir o emprego de uma temperatura máxima maior (300 °C) na análise cromatográfica do que a temperatura máxima da HP-50+ (255 °C).

Tanto a HP-50+ quanto a DB-5 apresentaram, em geral, valores satisfatórios de assimetria. A **Tabela VII** apresenta os tempos de retenção, fatores de assimetria e o desvio padrão para os picos cromatográficos obtidos com as duas colunas citadas.

Tabela VII. Tempo de retenção (t_R), fator de assimetria (A_s) e desvio padrão (DP) para os picos cromatográficos com a utilização das colunas HP-50+ e DB-5.

Analito	HP-50+		DB-5	
	t_R (min)	A_s (DP)	t_R (min)	A_s (DP)
Triclorfom	0,77	1,4 (0,07)	0,59	2,0 (0,87)
3,4,5-Tricloroguaiacol (PI)	7,74	1,5 (0,29)	7,46	1,0 (0,24)
Propanil	10,93	1,0 (0,00)	9,90	1,5 (0,29)
Fipronil	11,77	0,8 (0,14)	12,59	1,0 (0,19)
Propiconazol I	16,54	1,0 (0,19)	16,75	1,0 (0,00)
Propiconazol II	16,63	1,3 (0,34)	16,98	1,3 (0,33)
Trifloxistrobina	16,87	1,0 (0,14)	17,14	1,1 (0,23)
*Permetrina <i>cis</i>	21,79	0,9 (0,08)	22,43	1,0 (0,14)
*Permetrina <i>trans</i>	22,19	1,0 (0,07)	22,65	1,0 (0,19)
**Difenoconazol I	36,80	-	25,24	1,5 (0,00)
**Difenoconazol II	-	-	25,31	1,0 (0,24)
Azoxistrobina	57,35	1,1 (0,07)	25,89	0,7 (0,19)

*A identificação dos isômeros *cis* e *trans* foi baseada no certificado de análise do padrão do agrotóxico. **O fator de assimetria para o difenoconazol, com a utilização da coluna HP-50+, não foi calculado em função da coeluição parcial entre os isômeros.

À luz dos resultados obtidos para os vários testes realizados com as três colunas cromatográficas, a DB-5 foi escolhida por sua melhor performance.

4.1.5. Parâmetros de Mérito

4.1.5.1. Linearidade e Curva de Calibração

Em função da ampla faixa de concentração estudada, não foi possível obter linearidade com apenas uma única curva analítica para 1D-GC. Com isso, foi necessária a divisão da curva, com obtenção de dois intervalos de concentração, como está representado na **Tabela VIII**. Rhoden¹²⁰ apresenta trabalho de validação de método de determinação de nove agrotóxicos em frutas (dentre eles, a azoxistrobina), utilizando GC- μ ECD, onde também foi necessária a divisão da curva de calibração, tendo em vista o comportamento diferente dos analitos em duas

faixas de concentração distintas. Explicação para a ausência de dados para o triclorfom será apresentada no item 4.1.5.2.

Tabela VIII. Parâmetros da curva de calibração para os compostos estudados por 1D-GC.

Compostos	Equação da Reta	r ²	Linearidade (µg L ⁻¹)
Propanil	y = 0,0023x + 0,0387	0,9778	15 - 150
	y = 0,0036x - 0,3308	0,9765	175 - 415
Fipronil	y = 0,0114x + 0,0526	0,9984	5 - 150
	y = 0,016x - 1,6674	0,9934	175 - 415
Propiconazol ^a	y = 0,0064x - 0,0248	0,9931	5 - 95
	y = 0,0069x - 0,4449	0,9799	150 - 355
Trifloxistrobina	y = 0,0048x + 0,0229	0,9945	5 - 115
	y = 0,0045x - 0,1565	0,9961	175 - 415
Permetrina ^b	y = 0,0019x + 0,0052	0,9988	5 - 95
	y = 0,0013x + 0,0233	0,9904	115 - 415
Difenoconazol ^c	y = 0,0018x - 0,0044	0,9960	15 - 175
	y = 0,0028x - 0,2981	0,9557	150 - 355
Azoxistrobina	y = 0,0042x + 0,0217	0,9917	5 - 150
	y = 0,0055x - 0,4425	0,9931	175 - 415

^{a, c} Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

Através das equações obtidas para as curvas analíticas pode-se observar que o método proposto apresentou boa linearidade, com coeficientes de determinação (r²) acima de 0,98, com exceção de alguns analitos, tais como o propanil que apresentou r² de 0,9778 e 0,9765 para ambas as faixas de concentração, propiconazol com r² de 0,9799 na faixa de concentração de 150 a 355 µg L⁻¹ e difenoconazol que não apresentou linearidade na faixa de 150 a 355 µg L⁻¹, resultando em um coeficiente de determinação de 0,9557.

As curvas obtidas para cada segmento, primeira e segunda faixa de concentração, estão apresentadas nas **Figuras 18 e 19**.

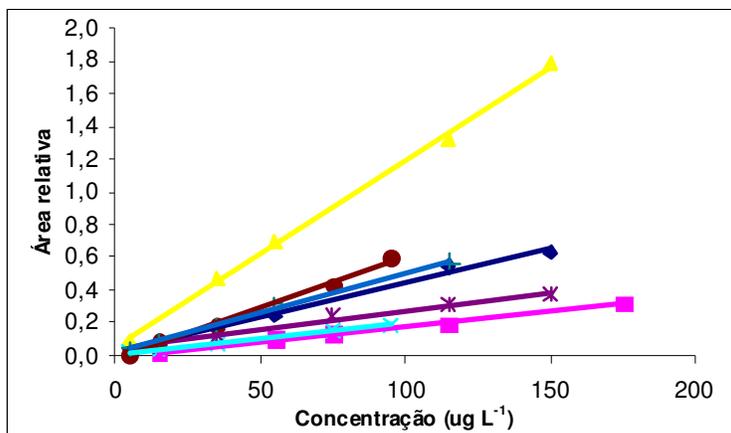


Figura 18. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos na primeira faixa de concentração (faixa descrita na Tabela VII) por 1D-GC.

Legenda: ◆ Azoxistrobina, ■ Difenconazol, ▲ Fipronil, x Permetrina, * Propanil, ◆ Propiconazol, + Trifloxistrobina. Área relativa = Apadrão/API

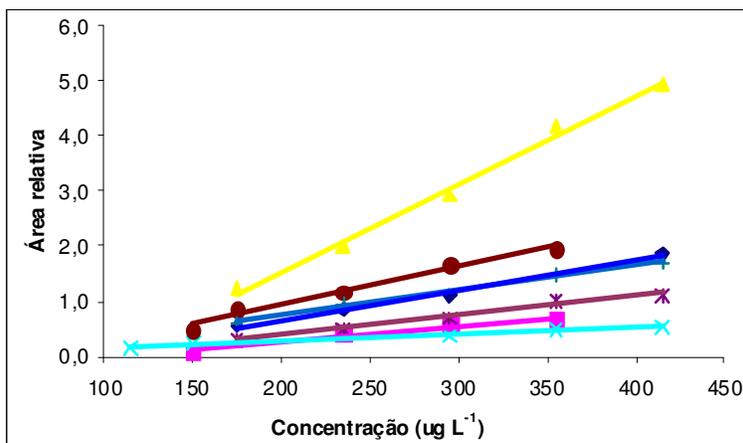


Figura 19. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos na segunda faixa de concentração (faixa descrita na Tabela VII) por 1D-GC.

Legenda: ◆ Azoxistrobina, ■ Difenconazol, ▲ Fipronil, x Permetrina, * Propanil, ◆ Propiconazol, + Trifloxistrobina. Área relativa = Apadrão/API

A Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes Orgânicos (GARP) recomenda que as injeções das soluções da curva de calibração apresentem desvio padrão relativo inferior a 5%.¹⁰⁴ Neste trabalho, os resultados obtidos obedeceram a este critério, à exceção das soluções de 5 e 150 µg L⁻¹, onde foram verificados desvios entre 5 e 12% para o propiconazol e difenoconazol.

4.1.5.2. Precisão

Durante os estudos de precisão, em que foram realizadas injeções sucessivas de uma mistura dos padrões a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, constatou-se a grande variabilidade do tempo de retenção do triclorfom, devido a sua eluição muito próxima ao solvente. Com isso, optou-se pela exclusão deste analito nos procedimentos de validação, já que a identificação do mesmo ficou bastante dificultada. A **Tabela IX** apresenta os valores obtidos para o coeficiente de variação (CV %) para o estudo da precisão analítica.

Tabela IX. Avaliação da precisão analítica da 1D-GC expressa através do coeficiente de variação (CV %) para repetitividade e precisão intermediária (n = 8).

Compostos	Repetitividade		Precisão Intermediária	
	Área	Altura	Área	Altura
Propanil	1,58	2,57	1,11	1,67
Fipronil	1,85	1,75	1,72	1,18
Propiconazol I	2,71	3,63	1,52	2,95
Propiconazol II	3,85	2,86	2,50	3,46
Trifloxistrobina	2,43	1,96	1,38	2,45
Permetrina <i>cis</i>	2,89	2,75	0,90	1,26
Permetrina <i>trans</i>	3,88	3,00	1,50	1,37
Difenoconazol I	2,58	3,54	3,89	3,56
Difenoconazol II	4,17	3,53	2,87	2,42
Azoxistrobina	3,29	4,38	1,62	1,98

Para a repetitividade, as áreas dos picos cromatográficos, para os sete compostos, apresentaram valores de coeficiente de variação de 1,58 a 4,17%. Para as alturas dos picos, os valores situaram-se entre 1,75 e 4,38%. Os coeficientes de variação relativos aos tempos de retenção variaram de 0,003 a 0,015%.

Para a precisão intermediária, o coeficiente de variação para a área dos compostos situou-se entre 0,90 e 3,89% e para as alturas 1,18 e 3,56%. Os

coeficientes de variação relativos aos tempos de retenção variaram de 0,009 a 0,047%.

Para análise de constituintes em nível de traços, recomenda-se que o coeficiente de variação para a precisão analítica deve ser de no máximo 20%, dependendo da complexidade da amostra.¹⁰⁴ Portanto, o método cromatográfico proposto para a determinação dos sete compostos pode ser considerado preciso.

4.1.5.3. Exatidão

A **Tabela X** apresenta os valores encontrados para os testes de recuperação com três níveis de fortificação.

Tabela X. Níveis de recuperação em base seca e coeficiente de variação (CV %) para os valores obtidos em sedimento (amostra controle) por 1D-GC.

Nível de Fortificação	15 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		30 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		150 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Analito						
Propanil	43	13	47	3	70	22
Fipronil	46	16	46	9	52	28
Propiconazol ^a	34	13	35	13	64	39
Trifloxistrobina	47	15	44	12	41	33
Permetrina ^b	68	19	72	13	262	42
Difenoconazol ^c	155	13	135	21	100	55
Azoxistrobina	72	16	60	20	122	57

^{a, c} Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

O método se mostrou eficiente para os compostos permetrina e azoxistrobina, pois tanto a exatidão quanto a precisão do método para esses compostos foi satisfatória para os níveis de 15 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar da baixa recuperação obtida para os compostos propanil, fipronil, propiconazol e trifloxistrobina o método foi considerado aplicável a estes analitos, pois o coeficiente de variação foi menor do que 20%, o que indica que o método foi repetitivo, com excelente precisão analítica.

O difenoconazol apresentou recuperação elevada (> 120%) o que inviabiliza a utilização do método para determinação desse composto, uma vez que altas

recuperações podem favorecer a confirmação de falsos positivos. Coeluições com interferentes da matriz, provavelmente, favoreceram esses resultados.

As recuperações obtidas com o nível de fortificação de 150 µg kg⁻¹ apresentaram baixa precisão analítica para todos os compostos, com coeficientes de variação maiores que 20%.

A resposta relativa obtida para alguns compostos no ECD, como os hidrocarbonetos, é de 0,01 (tendo como base o clorobenzeno com resposta igual a 1).¹²¹ Caso ocorra coeluição dos agrotóxicos estudados com esses compostos, por exemplo, pode ocorrer uma contribuição negativa na resposta analítica, com diminuição de intensidade de sinal. No banho de ultra-som o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultra-sonora é transmitida através da água.¹²² Com isso, há muita dispersão de energia e, conseqüentemente, maior probabilidade de geração de pontos de maior e menor intensidade de extração. O sinergismo causado pelo efeito negativo no sinal (sinal diminuído por coeluições com compostos de baixa resposta relativa no ECD) e pela alta variabilidade no processo de extração no ultra-som pode ter contribuído para que os resultados de recuperação obtidos na 1D-GC fossem insatisfatórios.

A análise de sedimentos pode apresentar vários interferentes devido aos altos teores de matéria orgânica. Os resultados obtidos poderiam ser melhorados através da utilização de etapa de limpeza do extrato da amostra. No trabalho descrito por You e colaboradores⁵⁰ foi utilizada uma etapa de *clean up* com 10 g de Florisil ativado e posteriormente, parcialmente desativado com 6 % m/v de água destilada. Os autores obtiveram bons resultados de recuperação. Entretanto, testes realizados com Florisil (fase sólida mais utilizada na preparação de amostras para determinação de agrotóxicos) durante este trabalho, mostraram que, para os oito agrotóxicos em estudo, houve adsorção irreversível dos analitos na coluna de Florisil, o que inviabilizou a utilização desta etapa de limpeza. Além disso, os compostos estudados apresentam características físico-químicas diferenciadas, o que implicaria na utilização de diferentes eluentes, fazendo com que o processo se tornasse trabalhoso e de alto custo. Como o objetivo principal deste trabalho é a avaliação do potencial da 1D-GC e GC × GC para separação destes analitos em extrato de sedimento e a otimização de método de extração não faz parte do escopo desse trabalho, optou-se em utilizar este método empregado por You e colaboradores,⁵⁰ apesar da baixa recuperação obtida para alguns analitos. Esses

pesquisadores utilizaram os níveis de fortificação de 1, 5, 20 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entre os analitos investigados por eles, apenas um agrotóxico, a permetrina, é comum aos dois métodos multirresíduos. A recuperação encontrada por You e colaboradores variou de 87,1 a 101,3%, com coeficientes de variação menores que 10%. A excelente recuperação encontrada pode ter sido influenciada pela utilização de sonda ultra-sônica, que é mais eficiente que o banho de ultra-som (utilizado nesse trabalho), pois a sonda encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, em contato direto com o sistema, enquanto que no banho há maior dispersão de energia, pois o transdutor é preso diretamente no fundo da cuba.¹²²

4.1.5.4. Limites de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)

A **Tabela XI** apresenta os limites instrumentais de detecção e quantificação e o limite de detecção do método para os agrotóxicos em estudo.

Tabela XI. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais e limite de detecção do método (MDL) obtidos para os compostos estudados por 1D-GC.

Compostos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MDL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Propanil	2,31	3,99	2,17
Fipronil	0,66	2,00	1,51
Propiconazol ^a	0,64	1,94	2,62
Trifloxistrobina	0,60	1,83	1,59
Permetrina ^b	0,86	2,60	1,43
Difenoconazol ^c	1,85	5,62	5,78
Azoxistrobina	0,63	1,92	2,82

^{a, c} Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

Os limites de detecção e quantificação instrumentais variaram de 0,60 a 2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,83 a 5,62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites do método variaram de 1,43 a 5,78 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Não existe legislação vigente que estipule LMR (limite máximo de resíduo) para os agrotóxicos estudados. Contudo, para fins de ilustração, os LMR

dos analitos para a matriz arroz variam de 0,01 a 2 mg kg⁻¹,¹³ evidenciando que os limites encontrados foram considerados satisfatórios.

4.2. CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (GC × GC)

De acordo com Kristenson e colaboradores,⁸⁹ quanto maior o fluxo do gás de *make up* na determinação de compostos por GC × GC-μECD, menor é o efeito de cauda observado nos picos cromatográficos. Contudo, o efeito de diluição dos compostos no detector é maior. Tendo por base os resultados destes pesquisadores e também de outros,^{93,95} o fluxo de nitrogênio utilizado para todos os experimentos foi de 150 mL min⁻¹, que é o fluxo máximo permitido pelo equipamento.

A **Tabela XII** apresenta as condições otimizadas encontradas para os jogos de colunas testados.

Tabela XII. Condições cromatográficas obtidas para GC × GC.

Conj. Colunas	Temperaturas (°C)				Tempo (s)	
	Programação do Forno	Injetor	Detector	ΔT entre os Fornos	Modulação	Jato Quente
(1)	60°C (2,53 min)-35°C min ⁻¹ /180°C-4°C min ⁻¹ /240°C-10°C min ⁻¹ /295°C (3 min)	280	320	5	7	2,1
(2)	50°C (1,5 min)-50°C min ⁻¹ /190°C-5°C min ⁻¹ /220°C-5°C min ⁻¹ /280°C (12 min)	280	335	5	4	0,8

* A temperatura do modulador foi mantida a 20 °C acima da temperatura do forno primário.

4.2.1. Conjunto de Colunas nº1 (DB-5/DB-17ms)

Inicialmente, foram testados diferentes períodos de modulação (P_M): 2, 4, 6, 7 e 8 s. Destes, foi escolhido 7s, pois neste P_M foi observada a melhor distribuição de picos no diagrama de cores. O objetivo em empregar diferentes períodos de modulação reside na verificação da melhor distribuição dos analitos, bem como dos interferentes, no espaço de separação bidimensional, visto que o método desenvolvido pretende determinar a concentração dos analitos em uma matriz complexa utilizando um detector seletivo. Um melhor aproveitamento desse espaço diminui a probabilidade de coeluição dos analitos com os constituintes da matriz.

A duração do jato quente é um fator importante na análise, pois pode influenciar no formato e intensidade dos picos.⁷⁰ Com isso, foram testadas diferentes

durações do jato, tais como 0,6 s (valor padrão de operação do equipamento); 1,4; 1,75 e 2,1 segundos, sendo que o valor máximo corresponde a 30% do período de modulação. Para uma duração de 0,6 segundos do jato quente os formatos dos picos foram bastante distorcidos. De acordo com o manual do equipamento,⁶⁹ a utilização de um jato quente de 0,6 s é, geralmente, considerada satisfatória. Outra regra de operação mencionada no mesmo manual é o emprego de 20 a 25% do período de modulação para o jato quente, sendo que este tempo deve ser obrigatoriamente menor do que 50% do P_M . Um maior ou menor tempo de duração deste jato pode implicar na retenção de analitos e conseqüente aparecimento de caudas, por isso a otimização para cada tipo de composto em estudo deve ser realizada. Além disso, o tempo de duração do jato frio é automaticamente determinado pela escolha do tempo de duração do jato quente. Desta forma, para analitos mais voláteis, é importante ajustar estes tempos de forma que o jato frio seja suficientemente longo para amostrar e concentrar a banda cromatográfica deste tipo de composto. Neste contexto, poucos artigos científicos reportam o uso de diferentes jatos quentes para otimização da condição cromatográfica.⁹¹

A **Tabela XIII** apresenta os valores encontrados para os fatores de assimetria de acordo com a duração de jato quente utilizada, desvio padrão e tempos de retenção na ¹D e ²D para o conjunto de colunas n°1 e n°2.

Tabela XIII. Fator de assimetria (2A_s) e desvio padrão para os picos na 2D com a utilização de diferentes durações de jato quente.

			DB-5/DB-17ms			HP-50+/DB-1ms				
Analito	$^1t_R(\text{min})^2t_R(\text{s})$		Duração dos jatos quentes (s)						$^1t_R(\text{min})^2t_R(\text{s})$	
			1,4	1,75	2,1	0,8	1,0	1,2		
			Assimetria /Desvio Padrão							
Triclorfom	2,80	2,06	1,2/0,08	1,1/0,00	1,8/0,14	1,9/0,46	1,7/0,46	1,4/0,00	2,20	1,58
3,4,5-Tricloroguaiacol (PI)	7,93	3,16	1,8/0,11	2,1/0,38	1,4/0,21	2,7/0,87	3,4/0,87	2,9/0,62	7,60	1,80
Propanil	10,61	5,94	1,5/0,03	1,6/0,03	1,1/0,31	3,6/0,29	3,9/0,29	3,6/0,48	10,80	2,12
Fipronil	13,41	4,94	1,3/0,07	1,3/0,07	1,3/0,03	1,5/0,00	1,5/0,00	2,0/0,28	11,66	2,76
Propiconazol I	17,85	1,36	1,3/0,11	1,4/0,07	1,2/0,12	1,9/0,36	1,9/0,36	2,0/0,12	16,60	2,40
Propiconazol II	18,08	1,30	1,3/0,10	1,4/0,03	1,2/0,06	-	-	-	-	-
Trifloxistrobina	18,2	0,90	1,1/0,07	1,1/0,11	1,2/0,10	2,1/0,36	2,0/0,36	1,8/0,21	16,86	2,16
Permetrina <i>cis</i>	23,33	6,00	1,3/0,03	1,3/0,10	1,2/0,09	1,8/0,18	1,9/0,18	1,9/0,16	20,53	2,26
Permetrina <i>trans</i>	23,56	5,84	1,1/0,03	1,2/0,03	1,2/0,08	2,4/0,00	2,4/0,00	1,9/0,13	20,73	2,24
Difenoconazol	26,36	5,94	1,3/0,03	1,5/0,08	1,3/0,04	2,1/0,17	1,9/0,17	2,2/0,26	26,80	3,22
Azoxistrobina	27,18	1,40	1,3/0,12	1,3/0,06	1,2/0,11	2,2/0,23	2,3/0,36	2,2/0,20	34,06	3,44

Utilizando-se um jato quente de 2,1 segundos, a simetria dos picos, em geral, apresentou melhores resultados em relação aos demais períodos. Cabe acrescentar que as diferentes durações de jato quente testadas não contribuíram com aumento de sinal analítico dos compostos.

A diferença de temperatura utilizada entre o forno primário e secundário foi mantida em 5 °C, visto que, devido aos máximos de temperatura permitidos para cada coluna, não foi possível variar este parâmetro.

A **Figura 20** apresenta o diagrama de cores obtido para os analitos com o jogo de colunas nº1– DB-5/DB-17ms, onde é possível observar que os picos se encontram dispersos pelas várias regiões do espaço de separação.

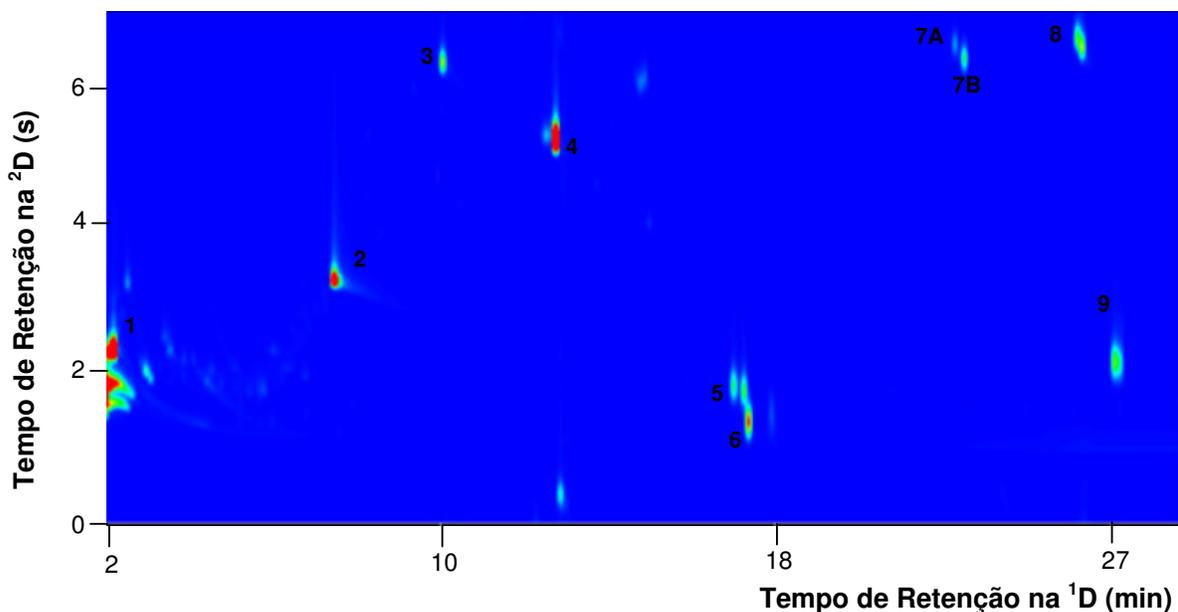


Figura 20. Diagrama de cores obtido para a mistura de padrões na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ no jogo de colunas n^o1 (DB-5/DB-17ms). Condições cromatográficas descritas na **Tabela XII**.

1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7A) Permetrina *cis*, 7B) Permetrina *trans*, 8) Difenconazol I e II e 9) Azoxistrobina.

4.2.2. Conjunto de Colunas n^o2 (HP-50+/DB-1ms)

Os parâmetros otimizados para esse conjunto de colunas foram período de modulação, diferença de temperatura entre forno primário e secundário e duração do jato quente.

Os períodos de modulação testados foram de 2, 4 e 6 s e as diferenças de temperaturas entre os fornos foram de 5, 20, 30 e 40 °C. Devido à maior resistência de temperatura da coluna da ²D, o método anteriormente utilizado para 1D-GC foi modificado para uma isotérmica final a 280 °C (temperatura limite da HP-50+, no modo isotérmico) com duração de 30 minutos. Esse aumento de temperatura possibilitou diminuição no tempo total de análise em relação à 1D-GC, já que os compostos eluíram em menor tempo de retenção. O P_M que resultou em melhor distribuição dos picos cromatográficos no espaço de separação foi o de 4 s.

A variação da diferença de temperatura entre os fornos não contribuiu para melhor separação dos compostos e também não favoreceu o aumento da intensidade de sinal dos picos cromatográficos. Entretanto, constatou-se que com uma diferença de 5 °C entre o forno primário e o secundário, os analitos

distribuíram-se amplamente no espaço de separação, de forma a melhor aproveitá-lo.

Um terceiro parâmetro otimizado foi a duração do jato quente. Os valores testados foram de 0,6; 0,8; 1,0; e 1,2 s. De forma geral, não houve melhora na simetria dos picos, quando se alterou a duração do jato quente. O fator de assimetria para os picos cromatográficos foi calculado da mesma forma como para o conjunto de colunas nº1. A Tabela XII apresenta os valores encontrados para os fatores de assimetria de acordo com a duração de jato quente utilizada, desvio padrão e tempos de retenção na ¹D e ²D.

A duração de 0,8 s foi escolhida em função dos valores de assimetria obtidos ser mais próximos dos valores aceitáveis e por apresentar menor desvio padrão, em comparação com os outros valores testados. As maiores intensidades dos picos foram obtidas com a utilização dos jatos quentes com durações de 0,8 e 1,2 s, sendo que as alturas observadas para os picos cromatográficos foram muito próximas para esses dois valores. A **Figura 21** apresenta o diagrama de cores obtido com o conjunto de colunas nº2 – HP-50+/DB-1ms para a separação dos nove compostos.

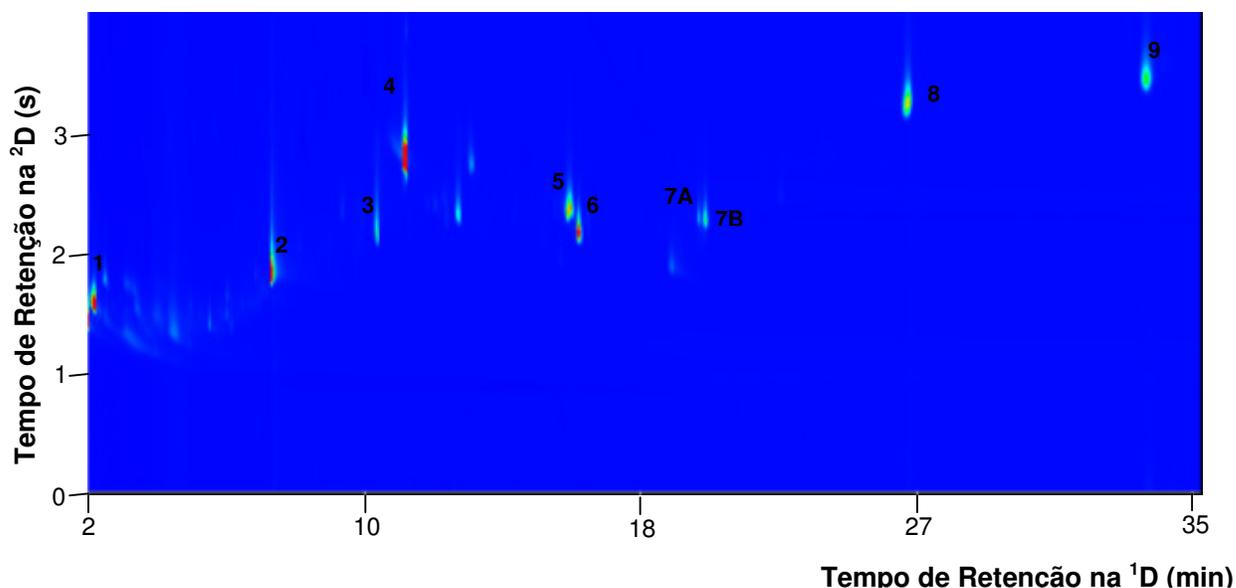


Figura 21. Diagrama de cores obtido para a mistura de padrões na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ no jogo de colunas nº2 (HP-50+/DB-1ms). *Condições cromatográficas descritas na Tabela XII.*

1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7A) Permetrina *cis* 7B) Permetrina *trans*, 8) Difenconazol I e II e 9) Azoxistrobina.

4.2.3. Comparação entre os jogos de colunas DB-5/DB-17ms e HP-50+/DB-1ms

O conjunto de colunas n^o1 (DB-5/DB-17ms) proporcionou melhores resultados analíticos em relação ao n^o2 (HP-50+/DB-1ms) devido ao menor tempo de análise (29,4 min para o conjunto n^o1 e 35,7 min para o conjunto n^o2) e melhor resolução para permetrina (7) ($R_s = 0,72$ para o conj. n^o1 – Fig. 23 – e $R_s = 0,36$ para o conj. n^o2 – Fig. 24). A resolução entre o propiconazol (5) e trifloxistrobina (6) foi de 0,6 para os dois jogos de colunas.

Em relação à assimetria de pico, os valores encontrados para o conjunto n^o1 foram significativamente melhores que os obtidos para o conjunto n^o2 (Tabela XII). Idealmente, o fator de assimetria deve situar-se entre 0,8 e 1,2.⁸³ Para o conjunto n^o1, os valores ficaram entre 1,1 e 1,8 para o jato quente de 2,1 s, sendo que apenas quatro compostos apresentaram valores de assimetria acima de 1,2 (triclorfom, 3,4,5-tricloroguaiacol, fipronil e difenoconazol). O conjunto n^o2 não apresentou fatores de assimetria satisfatórios, com valores entre 1,5 a 3,6, com a utilização da melhor duração de jato quente (0,8 s).

Apesar do conjunto n^o1 ter proporcionado melhor aproveitamento do espaço de separação, o conjunto n^o2 apresentou picos mais estreitos na ²D, o que resulta em um aumento na capacidade de pico e aumento de sensibilidade pelo aumento na intensidade de sinal analítico. Os picos modulados foram cerca de 8 a 62% mais estreitos que os obtidos para o conjunto n^o1, com exceção do triclorfom e propanil, que apresentaram picos mais largos, de 31 e 15%, respectivamente.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura apresenta o jogo convencional de colunas (fase estacionária apolar na ¹D e polar na ²D) como sendo o que proporciona melhores resultados de análise para agrotóxicos em diversas matrizes.^{91,94} Khummueng e colaboradores⁹² avaliaram três conjuntos de colunas para determinação de fungicidas em vegetais, sendo dois conjuntos de geometria inversa (fase estacionária polar ou de média polaridade na ¹D e apolar na ²D) e um conjunto de geometria convencional. O conjunto de colunas convencional foi considerado o mais eficiente, pois resultou na separação de todos os compostos estudados e em bons formatos de pico. Entretanto, Bordajandi e colaboradores⁹⁵ verificaram que, para a determinação de organoclorados, os melhores resultados de separação foram obtidos com conjunto de colunas polar versus não polar, apesar da

restrição de ortogonalidade caracterizada pela utilização de um conjunto inverso de colunas.

O conjunto de colunas nº1 (DB-5/DB-17ms) foi escolhido para o desenvolvimento do método analítico e sua aplicação, visto que apresentou melhor aproveitamento do espaço de separação, com ampla distribuição dos analitos na ²D (o que é uma característica importante e desejável quando da análise de amostras complexas), menor tempo de análise e boa simetria para os picos cromatográficos.

4.2.4. Parâmetros de Mérito

4.2.4.1. Linearidade e Curva de Calibração

A **Tabela XIV** apresenta os parâmetros da curva de calibração obtidos para os agrotóxicos estudados por GC × GC.

Tabela XIV. Parâmetros da curva de calibração para os compostos estudados por GC × GC.

Compostos	Equação da Reta	r ²	Linearidade (µg L ⁻¹)
Propanil	y = 0,0023x + 0,0186	0,9992	5 - 295
Fipronil	y = 0,0061x + 0,0756	0,9945	5 - 415
Propiconazol ^a	y = 0,0044x - 0,0234	0,9920	15 - 295
Trifloxistrobina	y = 0,0029x + 0,0061	0,9993	5 - 415
Permetrina ^b	y = 0,001x + 0,0013	0,9990	5 - 295
Difenoconazol	y = 0,0014x - 0,0058	0,9942	5 - 415
Azoxistrobina	y = 0,0027x + 0,0092	0,9963	5 - 415

^a Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

Através das equações obtidas para as curvas analíticas pode-se observar que o método proposto apresentou ótima linearidade numa ampla faixa de concentração, com coeficientes de determinação (r²) entre 0,9920 e 0,9993. As curvas obtidas para cada analito estão apresentadas na **Figura 22**.

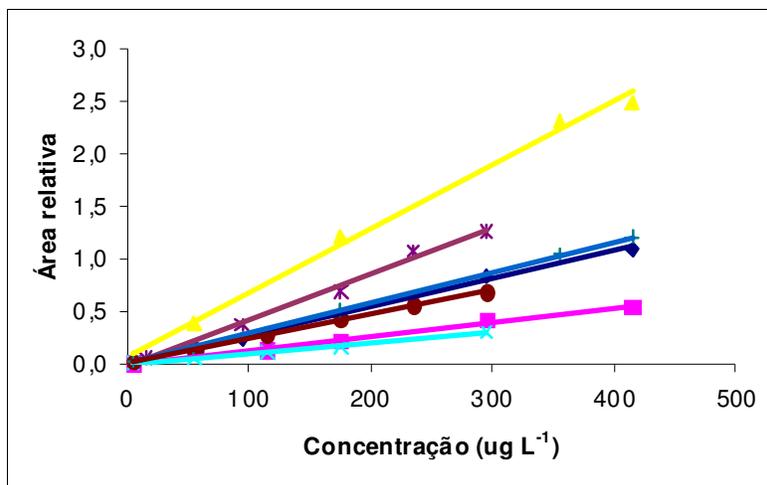


Figura 22. Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos por GC × GC.
 Legenda: ◆ Azoxistrobina, ■ Difenoconazol, ▲ Fipronil, × Permetrina, * Propanil, ◆ Propiconazol, + Trifloxistrobina. Área relativa = Apadrão/Api

4.2.4.2. Precisão

A **Tabela XV** apresenta os valores obtidos para o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) para o estudo da precisão analítica.

Tabela XV. Avaliação da precisão analítica da GC × GC expressa através do coeficiente de variação (CV %) para repetitividade e precisão intermediária (n = 8).

Compostos	Repetitividade		Precisão Intermediária	
	Área	Altura	Área	Altura
Propanil	1,60	0,78	1,58	1,15
Fipronil	0,85	0,78	1,01	0,82
Propiconazol I	1,22	1,25	0,66	0,83
Propiconazol II	0,64	0,77	0,54	0,81
Trifloxistrobina	1,45	1,08	1,60	1,72
Permetrina <i>cis</i>	2,66	2,38	3,50	3,35
Permetrina <i>trans</i>	2,52	2,74	3,34	3,74
Difenoconazol	1,99	2,96	1,99	2,15
Azoxistrobina	3,78	3,16	2,06	3,62

Para a repetitividade, as áreas dos picos cromatográficos, para os sete compostos, apresentaram valores de coeficiente de variação de 0,64 a 3,78%. Para as alturas dos picos, os valores situaram-se entre 0,77 e 3,16%.

Para a precisão intermediária, o coeficiente de variação para a área dos compostos situou-se entre 0,54 e 3,50% e para as alturas 0,81 e 3,74%. Os tempos de retenção na ¹D não sofreram variação, enquanto que na ²D o coeficiente de variação ficou entre 0,11 e 0,66%.

Tendo em vista que os valores obtidos para repetitividade e precisão intermediária situaram-se abaixo de 20%, o método cromatográfico proposto para a determinação dos sete compostos pode ser considerado preciso.

4.2.4.3. Exatidão

A **Tabela XVI** apresenta os valores encontrados para os testes de recuperação com três níveis de fortificação.

Tabela XVI. Níveis de recuperação em base seca e coeficiente de variação (CV %) para os compostos estudados em sedimento.

Nível de fortificação	15 (µg kg ⁻¹)		30 (µg kg ⁻¹)		150 (µg kg ⁻¹)	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Propanil	74	13	67	9	60	20
Fipronil	64	14	67	11	65	18
Propiconazol ^a	54	7	61	9	47	18
Trifloxistrobina	40	9	52	9	42	16
Permetrina ^b	133	20	52	30	39	23
Difenoconazol	254	15	115	9	92	24
Azoxistrobina	127	14	78	9	62	20

^a Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

O presente método se mostrou eficiente (recuperação entre 50 e 120 % e CV ≤ 20 %) para todos os agrotóxicos, com exceção da permetrina, no nível de fortificação de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$, pois esse composto apresentou coeficiente de variação de 30%.

Apesar da baixa recuperação obtida para a trifloxistrobina nos níveis de 15 e $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para o propiconazol em $150 \mu\text{g kg}^{-1}$, considerou-se o método aplicável a estes analitos, pois o coeficiente de variação foi menor do que 20%, o que indica que o método foi repetitivo.

Para os compostos difenoconazol e azoxistrobina houve elevada recuperação (acima de 120%) que pode ter sido causada por coeluições com interferentes da matriz, no nível de recuperação de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para o difenoconazol, no nível de fortificação de $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ houve boa recuperação, mas a precisão do método não foi satisfatória (24%). Para determinação da permetrina o método não foi considerado satisfatório.

A **Figura 23** apresenta os diagramas de cores e o cromatograma monodimensional para amostra de sedimento fortificada (amostra controle) a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$.

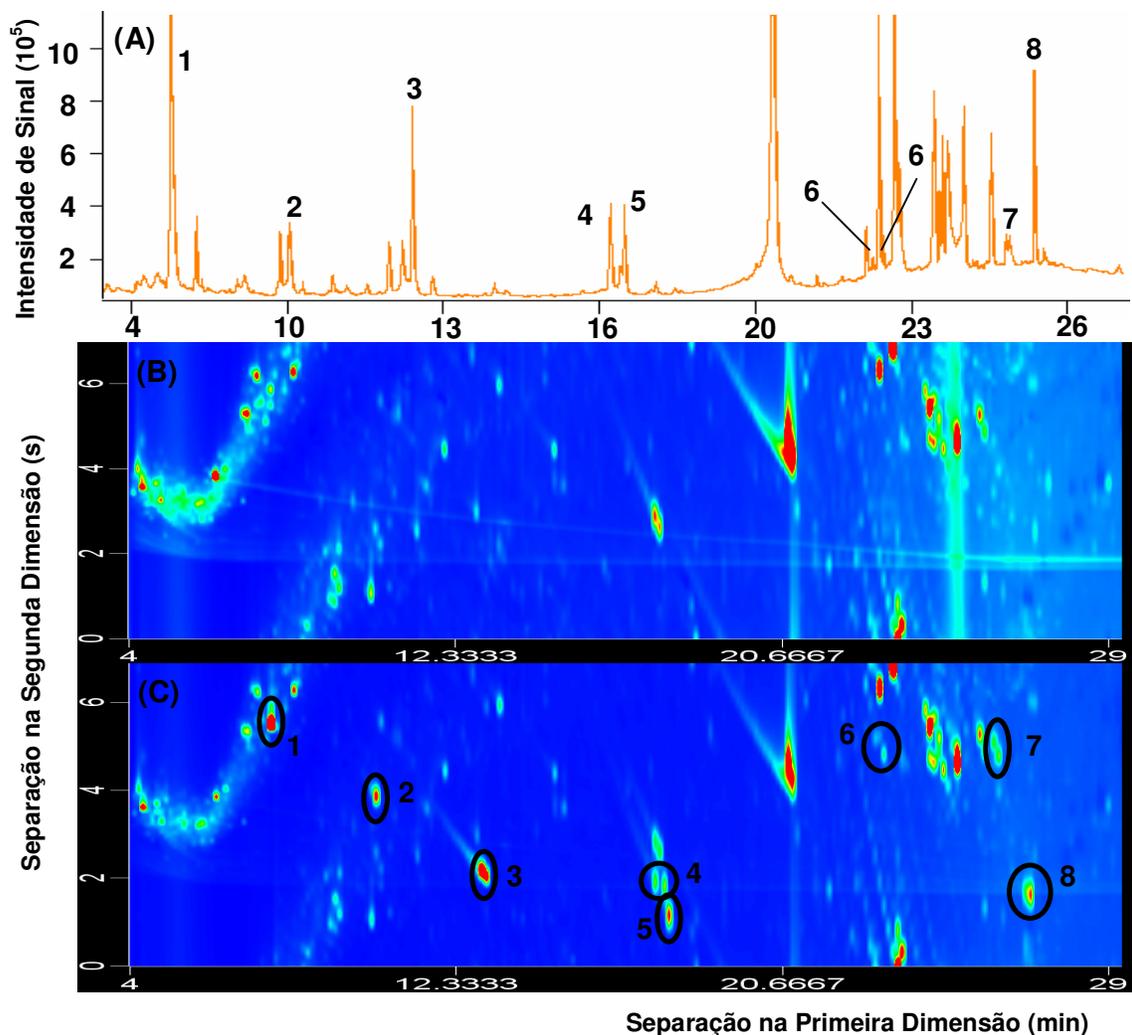


Figura 23. Cromatogramas da amostra de sedimento fortificada a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ **(A)** monodimensional; **(B)** diagrama de cores do branco da amostra; **(C)** diagrama de cores da amostra fortificada. *Condições cromatográficas descritas nas Tabelas VI e XII.*

1) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I e II, 5) Trifloxistrobina, 6) Permetrina *cis* e *trans*, 7) Difenconazol I e II e 8) Azoxistrobina.

A **Figura 24** apresenta os diagramas tridimensionais e os cromatogramas reconstruídos da 1^{D} e 2^{D} para amostra de sedimento fortificada.

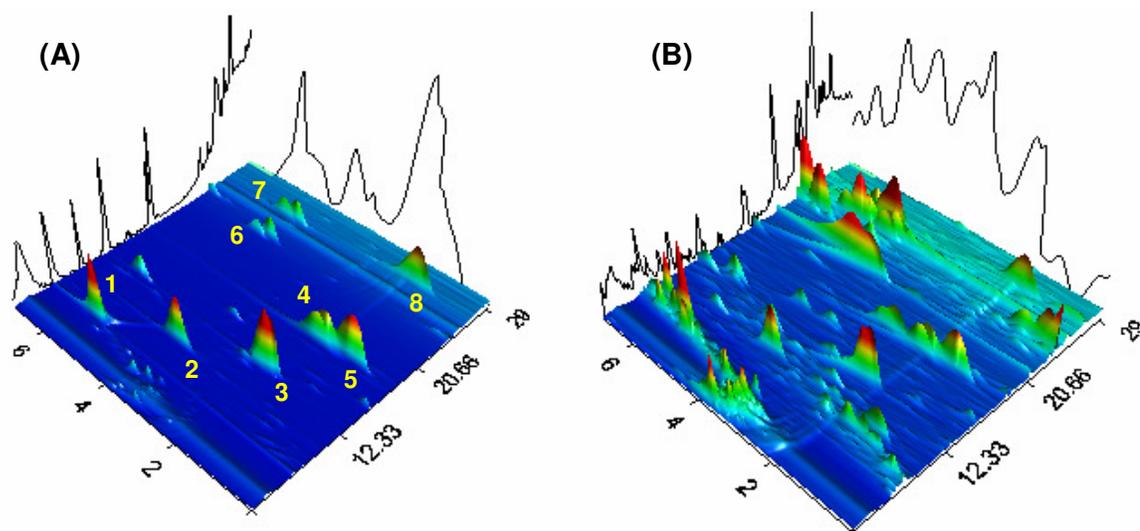


Figura 24. Diagrama tridimensional (3D) com reconstrução dos cromatogramas da ^1D e ^2D : **(A)** dos padrões na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, **(B)** da amostra fortificada a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XII**.

1) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I e II, 5) Trifloxistrobina, 6) Permetrina *cis* e *trans*, 7) Difenconazol I e II e 8) Azoxistrobina.

As **Figuras 28 e 29** propiciam a observação da distribuição dos constituintes (padrão e amostra) no espaço de separação, confirmando que a utilização da técnica monodimensional não seria suficiente para obter separação dos analitos com os constituintes da matriz.

4.2.4.4. Limites de Detecção (LOD), Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (MDL)

A **Tabela XVII** apresenta os limites instrumentais de detecção e quantificação e o limite de detecção do método para os agrotóxicos em estudo.

Tabela XVII. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) instrumentais e o MDL para os compostos estudados por GC × GC.

Compostos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MDL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Propanil	1,07	3,23	2,95
Fipronil	0,26	0,77	3,06
Propiconazol ^a	0,08	0,25	1,92
Trifloxistrobina	0,25	0,74	1,97
Permetrina ^b	0,19	0,58	2,44
Difenoconazol	0,64	1,94	4,43
Azoxistrobina	0,35	1,06	2,36

^a Soma dos estereoisômeros.

^b Soma dos isômeros *cis* e *trans*.

Os limites de detecção e quantificação instrumentais variaram de 0,08 a 1,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,25 a 3,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites do método variaram de 1,92 a 4,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para fins de ilustração, os LMR dos analitos para a matriz arroz variam de 0,01 a 2 mg kg^{-1} ,¹³ evidenciando que os limites encontrados foram considerados satisfatórios.

4.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

Inicialmente, para verificação da aplicabilidade da técnica para determinação de agrotóxicos em sedimentos, foram realizadas injeções de duas amostras de pontos localizados na região do rio Santa Maria (RS). Nesta etapa, os extratos das amostras foram submetidos a um processo de limpeza com Florisil e foram fortificadas com solução padrão na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ no momento da injeção. Apesar da obtenção de separação total dos analitos com a técnica monodimensional, através das injeções de amostra na técnica bidimensional, foi possível perceber claramente as coeluições dos analitos com os interferentes da matriz. A **Figura 25** apresenta o cromatograma monodimensional e o diagrama de cores de uma amostra de sedimento fortificada.

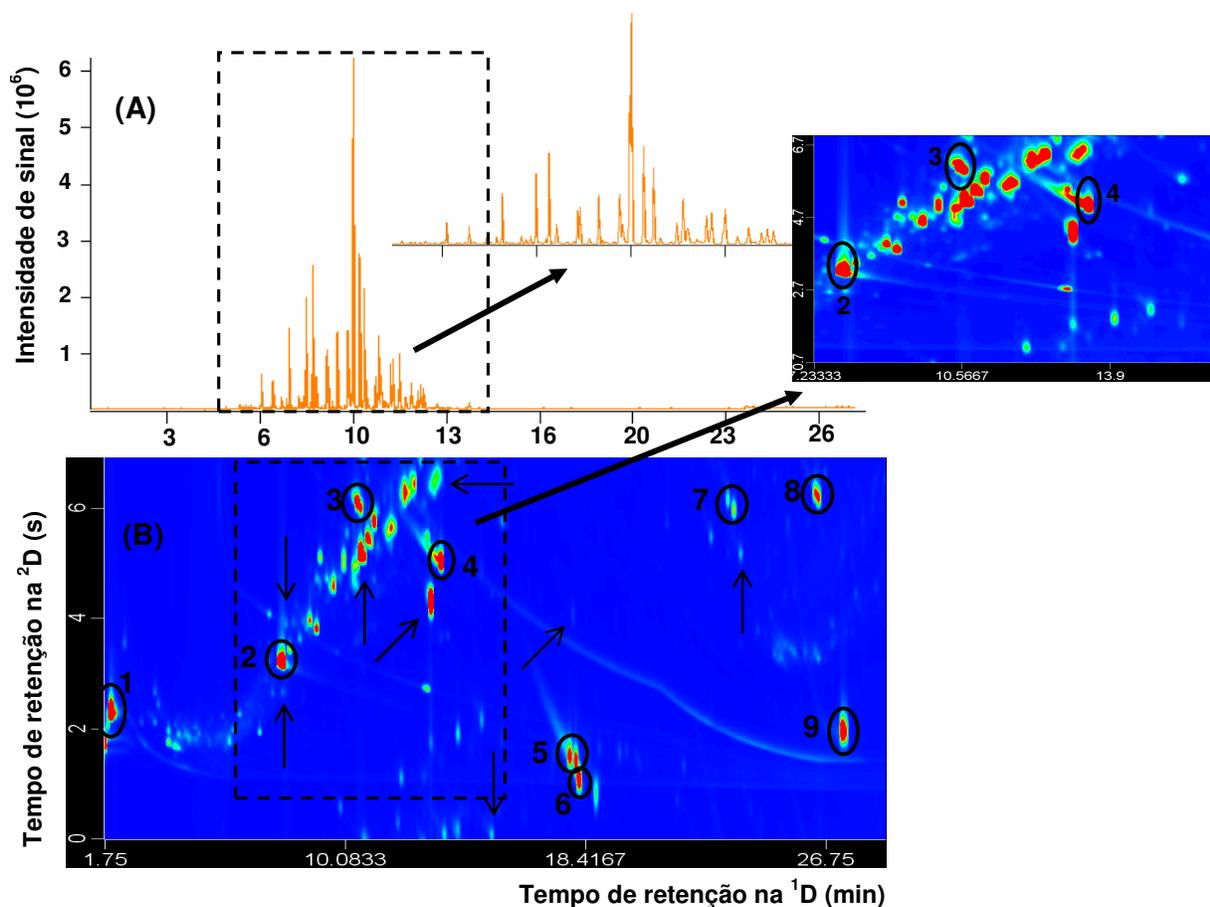


Figura 25. Cromatogramas do extrato da amostra de sedimento **(A)** monodimensional – não fortificada; **(B)** diagrama de cores de uma amostra de sedimento fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de mistura dos padrões. *Condições cromatográficas descritas nas Tabelas VI e XII.*

1) Triclorfom, 2) 3,4,5-Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7) Permetrina *cis* e *trans*, 8) Difenconazol I e II e 9) Azoxistrobina. As setas indicam os interferentes da matriz que coeluem com os analitos na 1D-GC.

Através análise dos cromatogramas da amostra fortificada com compostos padrão **(Figura 25)** e dos obtidos por 1D-GC, observa-se que esta última traria prejuízo à quantificação, caso fossem encontrados os compostos nas amostras, devido à coeluição dos analitos com constituintes da matriz.

A aplicabilidade do método de extração sem a etapa de limpeza com Florisil (devido à adsorção irreversível dos compostos na coluna de *clean up*) foi avaliada através da análise de duas amostras de sedimentos – SD₁ e SD₂. Apenas na amostra SD₂ foram encontrados resíduos dos agrotóxicos trifloxistrobina e azoxistrobina. Os valores de concentração encontrados divergem nas duas técnicas de análise. Na 1D-GC, a concentração encontrada da trifloxistrobina foi de $21,18 \mu\text{g}$

kg⁻¹, enquanto que para GC × GC foi de 3,34 µg kg⁻¹, ambas em base seca. Tendo por base os dados que foram apresentados neste trabalho, supõe-se que a coeluição da trifloxistrobina com outros componentes da matriz contribuiu para que a concentração encontrada na 1D-GC fosse maior do que na GC × GC. A concentração para azoxistrobina ficou abaixo do LOD para as duas técnicas de análise. A confirmação da presença de um determinado analito em uma amostra pode ser realizada através do uso do detector de espectrometria de massas ou de injeções em colunas cromatográficas de mecanismos de separação distintos, caso não exista a disponibilidade de um detector de espectrometria de massas. Sendo assim, a confirmação da presença dos resíduos de azoxistrobina e trifloxistrobina foi realizada através de coinjeções em colunas de fases estacionárias diferentes, com o conjunto de colunas nº2 (HP-50+/DB-1ms), utilizando-se GC × GC-µECD.

Tanto a azoxistrobina quanto a trifloxistrobina apresentam baixa solubilidade em água.³⁹ De acordo com o método de GUS, que leva em consideração os valores de meia vida no solo e coeficiente de adsorção à matéria orgânica [$GUS = (\log DT_{50}) \times (4 - \log K_{oc})$],¹²³ esses compostos não tendem à lixiviação, pois apresentam índice de GUS < 1,8.

A determinação de agrotóxicos e outros poluentes em sedimentos é de grande importância, pois são indicadores da qualidade ambiental do corpo hídrico onde se situa. A investigação desses compostos pode levar a informações relevantes quanto ao seu destino no ambiente e a má utilização pelos agricultores, já que podem vir a causar danos a toda uma população que de alguma forma utiliza o recurso hídrico e ao meio ambiente como um todo.

RESUMO DOS RESULTADOS



5. RESUMO DOS RESULTADOS

Na etapa de desenvolvimento de método para 1D-GC, a coluna DB-5 proporcionou melhores resultados dentre as três colunas testadas (DB-5, HP-50+ e DB-WAXetr). A coluna DB-5 proporcionou menor tempo de análise e melhor resolução cromatográfica com assimetria de pico satisfatória. A otimização da vazão do gás de *make up* indicou um fluxo de 30 mL min⁻¹ como sendo o ideal, quando comparado a 60 mL min⁻¹, pois as intensidades dos picos cromatográficos foram maiores, em função da menor diluição dos compostos no detector. Esses dois fluxos são os recomendados pelo manual do fabricante. A temperatura de injeção pode ser um parâmetro crítico na determinação de agrotóxicos. Portanto, a verificação da melhor temperatura de injeção para os compostos estudados foi realizada. Dentre as três temperaturas testadas (250, 280 e 300 °C), 280 °C foi escolhida por ter propiciado maior intensidade do sinal cromatográfico do componente fipronil, sendo que, de forma geral, não ocorreu diferença significativa nas alturas relativas dos picos dos outros compostos nas temperaturas de 280 e 300 °C.

No desenvolvimento de metodologia por GC × GC foram testados dois conjuntos de colunas (DB-5/DB-17ms e HP-50+/DB-1ms). Os parâmetros avaliados na técnica bidimensional foram: período de modulação, diferença de temperatura entre os fornos e duração do pulso quente. O fluxo de gás de *make up* utilizado nos experimentos foi de 150 mL min⁻¹ (fluxo máximo permitido pelo equipamento), pois quanto maior o fluxo do gás de *make up* na determinação de compostos por GC × GC-μECD, menor é o efeito de cauda observado nos picos cromatográficos.⁸⁹ O conjunto de colunas n°1 (DB-5/DB-17ms) proporcionou melhores resultados analíticos em relação ao n°2 (HP-50+/DB-1ms) devido ao menor tempo de análise (29,4 min para o conjunto n°1 e 35,7 min para o conjunto n°2) e melhor resolução para permetrina ($R_s = 0,72$ para o conj. n°1 e $R_s = 0,36$ para o conj. n°2). A escolha do período de modulação foi feita de modo que todos os compostos ficassem distribuídos dentro do espaço de separação. A duração dos jatos quentes utilizada foi aquela que proporcionou os melhores resultados de assimetria de pico. As melhores condições de análise obtidas para o conjunto DB-5/DB-17ms foram: período de modulação de 7 s, duração de pulso quente de 2,1 s e diferença de temperatura entre forno primário e secundário de 5 °C.

Em relação ao tempo de análise, as duas metodologias praticamente se equivalem, com 27,9 min para 1D-GC e 29,4 min para GC × GC. O processo de validação para as duas técnicas de análise confirmou a maior sensibilidade da GC × GC frente à 1D-GC. Os limites de detecção instrumentais para a técnica bidimensional foram cerca de 36% mais baixos do que os obtidos para a monodimensional. Os resultados obtidos para o MDL foram bastante próximos, com valores entre 1,92 e 4,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a GC × GC, enquanto que para 1D-GC ficaram entre 1,51 e 5,78 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão analítica, expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária foi excelente para as duas técnicas, pois os coeficientes de variação para área e altura dos picos ficaram abaixo de 20%. A exatidão dos métodos, verificada através dos testes de recuperação, indicou melhores resultados para a GC × GC, possivelmente pela maior sensibilidade da técnica e também devido à menor contribuição das coeluições com componentes da matriz, as quais puderam ser minimizadas pela maior capacidade de pico da técnica.

Durante a verificação da aplicabilidade do método foram encontrados resíduos de dois agrotóxicos em uma amostra de sedimento: azoxistrobina e trifloxistrobina. A azoxistrobina foi encontrada em concentrações abaixo do LOD e a trifloxistrobina em concentrações de 21,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na 1D-GC e 3,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GC × GC, ambas em base seca. Possivelmente, coeluições com interferentes da matriz favoreceram uma maior concentração da trifloxistrobina na 1D-GC.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilita a futura aplicação de dois métodos analíticos validados para determinação de poluição ambiental em sedimentos influenciados pela orizicultura no estado. Os resultados obtidos apontam para um número maior de vantagens analíticas com a utilização da GC × GC- μ ECD, quando comparada a GC- μ ECD para determinação de agrotóxicos em sedimentos localizados em áreas sob influência da cultura de arroz.

Inicialmente, a proposta do trabalho era desenvolver e validar os métodos de análises para oito compostos. Contudo, devido a eluição do triclorfom ser muito próxima ao do solvente, optou-se em retirar esse agrotóxico do processo de validação. Através desse processo foi possível verificar que o método foi satisfatório apenas para dois compostos, permetrina e azoxistrobina, por 1D-GC. Para GC × GC, o processo de validação indicou que o método apenas não foi satisfatório para a permetrina.

Verificou-se maior sensibilidade da GC × GC em relação à técnica monodimensional, tendo aquela apresentado melhores limites de detecção e exatidão analítica. Os LOD foram, em média, cerca de 36% mais baixos do que os da 1D-GC e os testes de recuperação indicaram maiores faixas aceitáveis de recuperação com boa precisão.

O uso da GC × GC para análise das amostras de sedimentos evidenciou também a maior seletividade e capacidade de pico desta técnica relativamente a 1D-GC para a separação e quantificação dos analitos com menor probabilidade de interferência de constituintes da matriz. Uma clara demonstração disto é a quantificação da trifloxistrobina em amostra de sedimento nas concentrações de 21,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na 1D-GC e 3,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GC × GC, onde se verificou a capacidade de separação de interferentes em coeluição com os analitos providenciada pela técnica bidimensional.

Estas vantagens tornam possível o uso de um detector seletivo, como o μ ECD para determinação desses compostos em sedimentos, tornando-o uma alternativa interessante comparativamente ao emprego de um GC/MS no modo SIM, visto que os riscos de coeluição são minimizados, os custos de ambos os equipamentos são semelhantes e o μ ECD apresenta maior sensibilidade.

REFERÊNCIAS



7. REFERÊNCIAS

1. IRGA; *Lavoura Arrozeira* **2008**, 56, 1.
2. <http://www.epa.gov/pesticides>, acessada em: outubro, 2007.
3. Picó, y.; Blasco, C.; Font, G.; *Mass Spectrom.* **2004**, 23, 45.
4. van der Hoff, R. G.; van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, 843, 301.
5. Decreto 98.816, publicado no DOU em 11 de janeiro de 1990.
6. Flores, A. V.; Ribeiro, J. N.; Neves, A. A.; Queiroz, E. L. R.; *Amb. & Soc.* **2004**, 7, 111.
7. Grupo GERHI; *Desenvolvimento de Ações para Implantação de Outorga na Bacia do Rio Santa Maria*. 2006.
8. <http://www.irga.rs.gov.br/>, acessada em: novembro, 2008.
9. Cabrera, L.; Costa, F. P.; Primel, E. G.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 1982.
10. Coutinho, C. F. B.; Tanimoto, S. T.; Galli, A.; Garbellini, G. S.; Takayama, M.; Amaral, R. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L.; A.; Machado, S. A. S.; *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente* **2005**, 15, 65.
11. Al Saleh, I. A.; *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **1994**, 13, 151.
12. <http://www.pesticideinfo.org>, acessada em: novembro, 2008.
13. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>, acessada em: novembro, 2007.
14. Santos, R. V. M.; Donnici, C. L.; Da Costa, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 159.
15. Martinez, C. O.; Silva, C. M. M. S.; Maia, A. H. N.; *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente* **2005**, 15, 113.
16. Primel, E. G.; Zanella, R.; Kurz, M. H. S.; Gonçalves, F. F.; Martins, M. L.; Machado, S. L. O.; Marchesan, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, 18, 585.
17. <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>, acessada em: novembro, 2007.
18. INFOR; Efecto de los Herbicidas en los Suelos Forestales. Concepción, 2006.
19. Jones, W. J.; Mazur, C. S.; Kenneke, J. F.; Garrison, A. W.; *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 8301.
20. Mize, S. V.; Porter, S. D.; Demcheck, D.K.; *Environ. Pollution* **2008**, 152, 491.
21. Liu, D.; Wang, P.; Zhu, W.; Gu, X.; Zhou, W.; Zhou, Z.; *Food Chem.* **2008**, 110, 399.

22. Toribio, L.; del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Jiménez, J. J.; Alonso, C. J.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 249.
23. Health Canada Pest Management Regulatory Agency: Proposed Registration Decision – Trifloxystrobin. Canadá, 2008.
24. Hirata, R.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 368.
25. Santos, M. A. T.; Áreas, M. A.; Reyes, F. G.; *Alim. Nutr.* **2007**, *18*, 339.
26. Wu, Y. S.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *912*, 171.
27. <http://www.reference.com/browse/wiki/Azoxystrobin>, acessada em: janeiro, 2009.
28. <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/azoxystr.htm>, acessada em: janeiro, 2009.
29. Golterman, H. L., Sly, P. G., Thomas, R. L. *Study of the relationship between water quality and sediment transport*. Paris: Unesco, 1983.
30. Secco, T.; Pellizzato, F.; Sfriso, A.; Pavoni, B.; *Chemosphere* **2005**, *58*, 279.
31. Gao, J. P.; Maguhn, J.; Spitzauer, P.; Kettrup, A.; *Wat. Res.* **1998**, *32*, 1662.
32. Smalling, K. L.; Kuivila, K. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1210*, 8.
33. Vieira, E. M.; Prado, A. G. S.; Landgraf, M. D.; Rezende, M. O. O.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 305.
34. Faria, L. J. S.; *Avaliação de Diferentes Sorventes na Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água*, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Brasil, 2004.
35. Ribeiro, M. L.; Lourencetti, C.; Pereira, S. Y.; Marchi, M. R. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 688.
36. Dores, E. F. G. C.; De-Lamonica-Freire, E. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 27.
37. Cunha, M. L. F.; *Determinação de Resíduos de Pesticidas em Sedimento dos principais Rios do Pantanal Mato-Grossense por GC/EM*, Dissertação de Mestrado, UFMT, Brasil, 2003.
38. Tinsley, I. J.; *Chemical Concepts in Pollutant Behavior*, 2^a ed.; Wiley, 2004.
39. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>, acessada em: novembro, 2007.
40. Vagi, M.C.; Petsas, A.S.; Kostopoulou, M.N.; Karamanoli, M.K.; Lekkas, T.D.; *Desalination* **2007**, *210*, 146.
41. Majors, R. E.; *LCGC*, **2006**, *9*, 8.
42. Patnaik, P; *Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes*, 1th ed., CRC Press, 1997.
43. Woudneh, M. B.; Oros, D. R.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1135*, 71.

44. Darko, G.; Akoto, O.; Oppong, C.; *Chemosphere* **2008**, 72, 21.
45. Covaci, A.; Gheorghe, A.; Hulea, O.; Schepens, P.; *Environm. Pollut.* **2006**, 140, 136.
46. Hong, S. H.; Yim, U. H.; Shim, W. J.; Oh, J. R.; Viet, P. H.; Park, P. S.; *Chemosphere* **2008**, 72, 1193.
47. Hong, S. H.; Yim, U. H.; Shim, W. J.; Oh, J. R.; *Chemosphere* **2006**, 64, 1479.
48. Chen, S. J.; Luo, X. J.; Mai, B. X.; Sheng, G. Y.; Fu, J. M.; Zeng, E. Y.; *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 709.
49. Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Júnior, M. J.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 251.
50. You, J.; Weston, D. P.; Lydy, M. J.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, 47, 141.
51. Xue, N.; Zhang, D.; Xu, X.; *Water Res.* **2006**, 40, 183.
52. Schantz, M. M.; Bowadt, S.; Jr Benner, B. A.; Wise, S. A.; Howthorne, S. B.; *J. Chrom. A.* **1998**, 816, 213.
53. Robertson, A. M.; Lester, J. N.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 346.
54. Carrasco, P. B.; Díez, S.; Jiménez, J.; Marco, M. P.; Bayona, J. M.; *Wat. Res.* **2003**, 37, 3658.
55. Dabrowski, L.; Mozajska, H. G.; Biziuk, M.; Gaca, J.; Namiesnik, J.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 957, 59.
56. Graña, E. C.; Carou, M. I. T.; Lorenzo, S. M.; Mahía, P. L.; Rodríguez, D. P.; Fernández, E. F.; *Chemosphere* **2006**, 64, 588.
57. Villaverde, J.; Hildebrandt, A.; Martínez, E.; Lacorte, S.; Morillo, E.; Maqueda, C.; Viana, P.; Barceló, D.; *Sci. Tot. Environ.* **2008**, 390, 507.
58. Numata, M.; Yarita, T.; Aoyagi, Y.; Takatsu, A.; *Anal. Sci.* **2004**, 20, 793.
59. Camel, V.; *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 229.
60. Gfrerer, M.; Lankmayer, E.; *Anal. Chem. Acta* **2005**, 533, 203.
61. Imoto, M. N.; *Validação de Método Multiresíduo para Pesticidas Organohalogenados em Maçã por Cromatografia Gasosa com Captura de Elétrons (GC/ECD) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS)*. Dissertação de Mestrado, UFPR, Brasil, 2004.
62. Smalling, K.L.; Kuivila, K. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1210, 8.
63. Vidal, J. L. M.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 6767.
64. Liu, Z. Y.; Phillips, J.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 227.

65. Blumberg, L. M.; David, F.; Klee, M. S.; Sandra, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1188*, 2.
66. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J Chromatogr. A* **1999**, *856*, 331.
67. Pedroso, M. P.; Godoy, L. A. F.; Fidélis, C. H. V.; Ferreira, E. C.; Poppi, R. J.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 421.
68. Górecki, T.; Harynuk, J.; Panić, O.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 359.
69. Pegasus HT and ChromaTOF Software Instruction Manual, Version 3.3, Leco, St. Joseph, MI, 2007.
70. Hoh, E.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1145*, 210.
71. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 682.
72. von Mühlen, C.; *Caracterização Química de Compostos Nitrogenados do Petróleo Brasileiro e de Óleos Voláteis de Plantas Brasileiras usando Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente*, Tese de Doutorado, UFRGS, Brasil, 2007.
73. Zrostlíková, J.; Hajslová, J.; Cajka, T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1019*, 173.
74. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 438.
75. Ryan, D.; Morrison, P.; Marriott, P.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1071*, 47.
76. Vivó-Truyols, G.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 273.
77. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 101.
78. Phillips, J. B.; Xu, J.; *J Chromatogr. A* **1995**, *703*, 327.
79. Schure, M. R.; *J. Microcol. Sep.* **1997**, *9*, 169.
80. Peters, S.; Truyols, G. V.; Marriott, P. J.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1146*, 232.
81. Adam, F.; Vendeuvie, C.; Bertoncini, F.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1178*, 171.
82. Adam, F.; Bertoncini, F.; Coupard, V.; Charon, N.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 236.
83. Jönsson, J. Å.; *LCGC*, **2002**, *20*, 920.
84. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 765.
85. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 540.

86. von Mühlen, C.; Khummueng, W.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *1921*, 1909.
87. Ryan, D.; Marriott, P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 295.
88. Cd room Agilent 6890N: Series Gas Chromatograph, 2001.
89. Kristenson, E.M.; Korytár, P.; Danielsson, C.; Kallio, M.; brandt, M.; Mäkelä, J.; Vreuls, R. J.J.; Blens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1019*, 65.
90. Dallüge, J.; van Rijn, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 207.
91. Banerjee, K.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Savant, R.; Adsule, P. G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 350.
92. Khummueng, W.; Trenerry, C.; Rose, G.; Marriott, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131*, 203.
93. Bordajandi, L. R.; Ramos, L.; González, M. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 220.
94. Pizzutti, I. R.; Vreuls, R. J. J.; Kok, A.; Roehrs, R.; Martel, S.; Friggi, C. A.; Zanella, R.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3305.
95. Bordajandi, L. R.; Ramos, J. J.; Sanz, J.; González, M. J.; Ramos, L.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 312.
96. Korytár, P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1086*, 29.
97. Korytár, P.; van Stee, L. L. P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *994*, 179.
98. Focant, J. F.; Sjdin, A.; Turner, W. E.; Patterson, D. G.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6313.
99. Schurek, J.; Portolés, T.; Hajslova, J.; Riddellova, K.; Hernández, F.; *Anal. Chem. Acta* **2008**, *611*, 163.
100. Ong, R.; Marriott, P.; Morrison, P.; Haglund, P.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *962*, 135.
101. Liu, Z.; Sirimanne, S. R.; Patterson, D.G.; Needham, L.; Phillips, J. B.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3086.
102. Cochran, J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 202.
103. van der Lee, M. K.; van der Weg, G.; Traag, W. A.; Mol, H. G. J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 325.
104. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.

105. Lanças, F. M.; *Validação de Métodos Cromatográficos*, 1ª ed., Rima, 2006.
106. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>, acessada em: janeiro, 2008.
107. INMETRO; *Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, 2007.
108. ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. 1996.
109. CITAC/Eurachem; *Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*. 2002.
110. APVMA; *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products*, Austrália, 2004.
111. Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente* **2003**, 13, 129.
112. Chasin, A. A. M. ; Nascimento, E. S. ; Ribeiro Neto, L. M. ; Siqueira, M. E. P. B. ; Andraus, M. H. ; Salvatori, M. C. ; Fernícola, N. A. G. ; Gorni, R. ; Salcedo, S.; *R. Bras. Toxicol.* **1998**, 11, 1.
113. Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Santos, T. C. R.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente* **2002**, 12, 155.
114. Wisconsin Department of Natural Resources; *Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits*, 1996.
115. EPA 3550C; *Ultrasonic Extraction*, 2007.
116. NBR 13408; *Sedimento – Determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia gasosa*, 1995.
117. Godula, M.; Hajšlová, J.; Alterová, K.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 395.
118. Grob, K.; *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley: Weinheim, 2001.
119. Zhang, B.; Pan, X.; Venne, L.; Dunnum, S.; McMurry, S. T.; Cobb, G. P.; Anderson, T. A.; *Talanta*, **2008**, 75, 1055.
120. Rhoden, K. K.; *Desenvolvimento e validação de método multirresíduo, empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de pesticidas em morango, maçã e uva*, Dissertação de Mestrado, UFSM, Brasil, 2005.

121. Grob, R. L.; Barry, E. F.; *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley, 2004.
122. Barboza, J. C. S.; Serra, A. A.; *Quim. Nova* **1992**, *15*, 301.
123. Lima, L. M.; Souza, E. L.; Figueiredo, R. O.; *Acta Amazonica* **2007**, *37*, 187.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA
GERADA



8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA

8.1. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- Silva, J. M.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Agrotóxicos em Sedimento por GC- μ ECD. XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009. Rio Grande, Brasil.

- Silva, J. M.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Agrotóxicos em Sedimento por GC \times GC- μ ECD. 15^o Encontro Nacional de Química Analítica e 3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009. Salvador, Brasil.

- Silva, J. M.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Desenvolvimento de Método para Determinação de Agrotóxicos por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC \times GC- μ ECD). 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009. Fortaleza, Brasil.

- Silva, J. M.; Borowski, J.; Machado, M. E.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Estudo Comparativo entre GC- μ ECD e GC \times GC- μ ECD na Determinação de Oito Agrotóxicos em Sedimentos de Lavoura de Arroz. XII - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008. Florianópolis, Brasil.

8.2. TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

- Silva, J. M.; Canizares, E. M. P. N.; Leal, K. A.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Agrotóxicos em Sedimentos por Cromatografia Gasosa Monodimensional e Bidimensional Abrangente com Micro Detector de Captura de Elétrons. Química Nova. Aceito em 11/08/2009. **Anexo 1.**

8.3. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

- Silva, J. M.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Aplicação da Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Micro Detector de Captura de Elétrons para

Determinação de Agrotóxicos em Sedimentos. Química Nova. Enviado em 15/10/2009. **Anexo 2.**

8.4. OUTRAS PUBLICAÇÕES

- Abad, F. C.; Winck P. R.; Silva, J. M.; Caramão, E. B.; Zini, C. A.; Multiresidue Determination of Pesticides in Carrots using Pressurized Liquid Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detector. Journal of Brazilian Chemical Society. *In Press*, 2009.

ANEXO 1. TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE COM MICRO DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS

Juliana Macedo da Silva, Cláudia Alcaraz Zini e Elina Bastos Caramão*.

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Av. Bento Gonçalves, 9500; CEP: 91501-970, Porto Alegre – RS, Brasil.

Ewelín Monica Paturi Navarro Canizares, Karen Alam Leal

Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM) – Rua Aurélio Porto, 37; CEP: 90620-090, Porto Alegre – RS, Brasil.

*e-mail: elina@ufrgs.br

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR PESTICIDES IN SEDIMENTS BY MONODIMENSIONAL AND COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY WITH MICRO ELECTRON-CAPTURE DETECTION

Abstract

The development of analytical methods for determination of eight pesticides of different chemical classes (trichlorfon, propanil, fipronil, propiconazole, trifloxystrobin, permethrin, difenoconazole and azoxystrobin) in sediments with gas chromatography-micro-electron capture detector (GC- μ ECD) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC \times GC- μ ECD) is described. These methods were applied to real sediment samples, and the best results were obtained using a 5% diphenyl-methylpolysiloxane column for 1D-GC. For GC \times GC the same column was employed in the first dimension and a 50%-phenyl-methylpolysiloxane stationary phase was placed in the second dimension. Due to the superior peak capacity and selectivity of GC \times GC, interfering matrix peaks were separated from analytes, showing a better performance of GC \times GC.

Keywords: pesticides, GC \times GC, μ ECD.

INTRODUÇÃO

O homem vem usufruindo os recursos naturais sem levar em consideração todo o cuidado necessário com sua reposição ou preservação e, com isso, muitos recursos hídricos se encontram em situação precária, seja pela atividade agrícola ou por outras atividades antrópicas. A utilização de agrotóxicos na agricultura vem obtendo cada vez mais destaque no cenário mundial. O Brasil, que até 2007 era o quarto colocado no consumo desses compostos, em 2008 passou a ocupar o segundo lugar, considerando o consumo de dez países que contribuem com 70% do consumo mundial.¹

Os agrotóxicos pertencem à classe dos poluentes ambientais mais estudados atualmente e sua determinação em diferentes matrizes se torna cada vez mais necessária devido à relação direta entre saúde e qualidade ambiental. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas de separação, identificação e quantificação desses compostos ganha grande destaque para que os limites de detecção e quantificação de tais métodos sejam cada vez menores e contemplem os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelos órgãos competentes. Atualmente, a Cromatografia Gasosa é a técnica mais utilizada para a determinação desses compostos em diferentes matrizes.²

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido intensamente aplicada na pesquisa de resíduos em diferentes matrizes devido à capacidade de detectar compostos termicamente instáveis e não voláteis, que não são identificados por cromatografia gasosa. A literatura científica apresenta alguns artigos de revisão em que o potencial desta técnica acoplada a espectrometria de massas é discutida. Devido ao grande poder de separação para análise de matrizes complexas, a técnica é considerada sensível e seletiva e provê identificação segura em baixas concentrações para diferentes analitos.^{3,4} Porém, para amostras complexas, contendo de 150 a 250 compostos de interesse, por exemplo, a separação obtida por cromatografia gasosa ou líquida, com uma única coluna, não é suficiente para separação de todos os compostos. Outras técnicas multidimensionais como GC-GC (Cromatografia Gasosa Bidimensional de Frações Parciais ou de *heartcut*), HPLC-GC (Cromatografia Líquida acoplada à Cromatografia Gasosa) e SFC-GC (Cromatografia de Fluido Supercrítico acoplada à Cromatografia Gasosa) não produzem também a separação efetiva de todos os analitos.^{5,6}

A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC) é uma técnica relativamente recente, idealizada em 1991 por Phillips⁷ e apresenta grande poder de separação. Na GC×GC, geralmente, duas colunas cromatográficas de diferentes mecanismos de retenção são acopladas em série, sendo a primeira de dimensões convencionais e a segunda mais curta, do tipo *fast-GC*. O modulador é considerado o “coração” da técnica e é acoplado entre as duas colunas, tendo a função de amostrar e focalizar as estreitas frações eluídas da primeira coluna e, em seguida, liberar estas porções, rapidamente, para a segunda coluna. O termo “abrangente” é utilizado para designar que todo o efluente da primeira dimensão, ou uma parte representativa do mesmo seja introduzido na segunda dimensão (²D), sem perda das características da separação na ¹D (primeira dimensão). Os princípios da GC×GC, aspectos instrumentais, nomenclatura e aplicações a diversas matrizes encontram-se abordados na literatura científica.⁸⁻¹²

Mondello e colaboradores¹³ descrevem a GC×GC como sendo uma das inovações mais revolucionárias na cromatografia gasosa. Os autores também afirmam que, provavelmente, a diferença do poder de separação entre a GC×GC e a 1D-GC seja ainda maior do que a diferença existente entre as colunas capilares e empacotadas. Em geral, a GC×GC apresenta quatro vantagens sobre a 1D-GC: (1) aumento de resolução, (2) aumento de sensibilidade devido à re-concentração da banda do soluto durante o processo de modulação, favorecendo a detecção de componentes em nível de traços, (3) construção de cromatograma 2D (bidimensional) com estruturação por compostos quimicamente similares e (4) aumento da capacidade de pico, pois a retenção nas duas colunas através de diferentes mecanismos de interação analito – fase estacionária, faz com que a capacidade teórica de pico na GC×GC se aproxime do produto das capacidades de pico das duas dimensões.^{6,13,14}

Uma consequência importante da utilização dos agrotóxicos na agricultura é a possível presença de resíduos desses compostos e de seus metabólitos em alimentos. Investigação sobre o poder de separação da GC×GC/TOFMS (TOFMS, detector de espectrometria de massas com analisador por tempo de voo - do inglês “*Time-of-Flight Mass Spectrometry*”) para determinação de 58 compostos da classe dos organofosforados e nitrogenados em amostras alimentícias foi realizado por Dallüge e colaboradores.¹⁵ Os autores observaram que a determinação de alguns

compostos por 1D-GC/TOFMS seria prejudicada em função da coeluição com interferentes da matriz, já que o espectro de massas obtido pela deconvolução espectral ou pela subtração da linha de base não é claro o suficiente para proporcionar a identificação dos analitos de interesse. Em outro estudo de otimização de metodologia para determinação de 51 agrotóxicos em uva, Banerjee e colaboradores¹⁶ verificaram que a sensibilidade da análise por GC×GC /TOFMS foi consideravelmente aumentada quando comparada a 1D-GC/TOFMS. A GC×GC ainda proporcionou a separação cromatográfica de alguns compostos que coeluem quando analisados por GC/MS; embora estes tenham sido identificados por deconvolução espectral na cromatografia monodimensional. Além disso, a GC×GC possibilita a obtenção de espectros de massas mais nítidos, evitando assim a possível confirmação de falsos positivos. O aumento de sensibilidade analítica da GC×GC-NPD quando comparada a GC-NPD, para análise de vegetais, foi verificado por Khummueng e colaboradores, visto que a soma das alturas dos picos cromatográficos obtidos pela técnica bidimensional abrangente foi cerca de 20 vezes maior do que as obtidas na técnica monodimensional.¹⁸

O potencial da GC×GC- μ ECD foi verificado por Bordajandi e colaboradores¹⁸ através de desenvolvimento de método para determinação de poluentes quirais como toxafeno em óleo de peixe. O método descrito para determinação de cinco congêneros do toxafeno com coluna enantiosseletiva na ¹D providenciou completa separação dos isômeros, enquanto que para a 1D-GC, com a mesma coluna enantiosseletiva, ocorreu sobreposição de dois compostos. Além disso, a GC×GC possibilitou excelente separação entre os compostos estudados e os interferentes da matriz complexa.

Korytár e colaboradores¹⁹ avaliaram a separação de doze diferentes classes de poluentes, dentre eles agrotóxicos da classe dos organoclorados e toxafeno, por GC×GC- μ ECD. Nesse estudo foram utilizados cinco conjuntos de colunas, sendo que em todas as combinações a fase estacionária apolar 100% dimetilpolisiloxano (DB-1) ou semelhante foi empregada para a separação na ¹D. A fase estacionária constituída de 65% fenil-metilpolisiloxano (007-65HT) proporcionou melhor separação para os agrotóxicos organoclorados e também possibilitou a ordenação estrutural dos congêneros do toxafeno, baseada no número de substituintes clorados. A fase estacionária contendo 70 a 90% de grupos ciano (VF-23ms)

proporcionou excelente separação na ²D para os organoclorados e toxafeno, embora não tenha sido possível visualizar a separação de todas as doze classes estudadas. Para avaliar o potencial da técnica, os autores determinaram dibenzodioxinas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/F) em amostras de sedimentos e éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e alcanos policlorados (PCAs) em amostras de poeira.

O número de publicações científicas contemplando a determinação de agrotóxicos por GC×GC ainda é relativamente pequeno, mas suficiente para demonstrar as potenciais vantagens da técnica em relação a 1D-GC.²⁰ Não é do conhecimento destes autores a existência de artigos publicados envolvendo a determinação de agrotóxicos por GC×GC-μECD em sedimentos.

Este estudo tem por objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos por 1D-GC e GC×GC-μECD para a determinação de oito agrotóxicos de diferentes classes químicas em sedimentos de rios provenientes de regiões sob influência da cultura do arroz, utilizados no estado do Rio Grande do Sul, uma vez que o mesmo é responsável por 61% da produção desse cereal no país.¹ Estes níveis de produção são alcançados através do intenso uso de agrotóxicos durante o plantio.

PARTE EXPERIMENTAL

Os Sedimentos e Agrotóxicos Estudados

Para os estudos qualitativos, como verificação da complexidade da matriz, foram analisadas duas amostras de sedimentos de pontos localizados em diferentes bacias hídricas: Rio Gravataí (latitude sul = 29° 56' 10" e longitude oeste = 50° 36' 05") e Rio Santa Maria (latitude sul = 30° 52' 15" e longitude oeste = 55° 20' 57"). Foram coletados em média 1 kg de sedimento com auxílio de pá de aço inoxidável, próximo à margem e em locais de deposição de partículas finas e de pouca profundidade. Os sedimentos foram armazenados em frascos de vidro e transportados a 4 °C até o laboratório, onde foram congelados a -18 °C em *freezer* antes do processo de extração.

Os compostos estudados foram triclorfom, propanil, fipronil, propiconazol, trifloxistrobina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina (pureza > 97%, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemanha). Estes agrotóxicos são largamente empregados na agricultura, mais especificamente na cultura do arroz da região do Rio Santa Maria

no estado do Rio Grande do Sul.^{21,22} A química Ewelín Canizares, da FEPAM, realizou pesquisa com os agricultores e com os trabalhadores que fazem a aplicação desses compostos na lavoura, bem como com a EMBRAPA para embasar a escolha dos agrotóxicos. A **Tabela 1** apresenta algumas características e estruturas químicas dos compostos estudados.

TABELA 1

Extração das Amostras de Sedimentos

O processo de extração empregado está baseado no método reportado por You e colaboradores.²³ A água residual presente no sedimento foi retirada e o mesmo foi homogeneizado. Em seguida, foi parcialmente seco ao ar, à temperatura ambiente, em vidros de relógio. Para a etapa de extração, foram pesados 20 g de sedimento e adicionados a este, 40 g de sulfato de sódio anidro (Quimex, SP, Brasil), procedendo-se à homogeneização do material. Uma alíquota de 50 mL de uma solução 50:50 v/v de acetona:diclorometano foi adicionada à amostra, e esta foi submetida à extração em 3 ciclos de 15 min no banho de ultra-som Maxiclean (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) com potência de 120 Watts. A etapa de purificação (*clean up*) foi realizada em colunas de vidro de 30 cm de altura por 14 mm de diâmetro interno, contendo 10 g de Florisil (60-100 mesh; T.J. Baker, Phillipsburg, EUA) ativado a 90°C por 12 horas e, posteriormente, parcialmente desativado com água destilada (6% m/v). No topo da coluna foi colocado aproximadamente 1 cm de sulfato de sódio anidro para reter qualquer umidade residual. A eluição dos analitos foi realizada com 50 mL de solução 30% de éter etílico em hexano. O extrato foi levado à secura e o resíduo final dissolvido com 1,5 mL de hexano. Todos os solventes utilizados para extração são grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e bidestilados.

Desenvolvimento dos Métodos Cromatográficos

As análises por 1D-GC e GC×GC foram realizadas em um cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com μ ECD, equipado com amostrador automático Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça). O cromatógrafo também possui um forno secundário (LECO, St. Joseph, MI, EUA) utilizado nas análises por GC×GC e um modulador térmico de dois estágios com quatro jatos (*quad jet*) de N₂ (dois jatos quentes e dois frios que são resfriados por

N₂ líquido). Durante o desenvolvimento dos métodos foram utilizadas colunas cromatográficas de diferentes fases estacionárias que estão apresentadas na **Tabela 2**. Outros parâmetros experimentais que influenciam na análise dos compostos estudados, tais como programação de temperatura do forno, temperatura do injetor (250, 280 e 300 °C) e fluxo de gás de *make up* (N₂, 99,999%, Linde Gás) foram otimizados para a análise por GC-μECD. O fluxo de gás de arraste (H₂, 99,999%, Linde Gás) utilizado nos experimentos foi de 2 mL min⁻¹. A partir dos melhores resultados obtidos para a 1D-GC, parâmetros como período de modulação, diferença de temperatura entre forno primário e secundário e duração do jato quente foram otimizados para as análises por GC×GC-μECD, utilizando-se diferentes jogos de colunas.

TABELA 2

Para a verificação dos tempos de retenção dos analitos, foi realizada a injeção de solução padrão contendo os nove compostos (oito agrotóxicos e um padrão interno - 3,4,5-tricloroguaiacol para posterior estudo quantitativo), na concentração de 100 μg L⁻¹. As soluções padrão estoque foram preparadas pesando-se os agrotóxicos em frascos individuais em balança analítica de precisão (Shimadzu, AY220, Quioto, Japão) e dissolvendo-os em acetato de etila grau HPLC (Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA) em balões volumétricos de 5 mL, previamente silanizados. As diluições posteriores foram também feitas em balões volumétricos de 5 mL e em acetato de etila, utilizando-se micropipeta (Brand, Wertheim, Alemanha) para coleta das alíquotas. Todas as soluções foram guardadas em *freezer* à -18 °C em frascos de vidro âmbar silanizados. As injeções foram realizadas com volume de 1 μL, sem divisão de fluxo e com pulso de pressão de 60 psi. Durante todas as análises, a temperatura do detector foi mantida entre 20-25 °C acima da temperatura mais alta do forno, a fim de evitar e/ou diminuir o efeito de cauda nos picos e manter a célula do detector limpa.²⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia Gasosa Monodimensional (1D-GC)

Inicialmente foram feitos testes para verificar a influência do gás de *make up* (N₂) na resposta do detector aos diferentes agrotóxicos, empregando-se para isto a

coluna HP-50+. Os fluxos testados foram de 30 e 60 mL min⁻¹, que são os recomendados pelo manual do fabricante.²⁴ A condição de 30 mL min⁻¹ foi considerada a mais apropriada devido à obtenção das melhores intensidades de sinal para os agrotóxicos em estudo e, por esta razão, nos experimentos posteriores essa condição foi mantida. A diminuição de fluxo de gás de *make up* faz com que o efeito de diluição dos compostos no detector seja minimizado, com conseqüente diminuição na largura da base dos picos, proporcionando melhor desempenho no processo cromatográfico. A partir dessa condição foram realizadas injeções sem divisão de fluxo com pulso de pressão de 60 psi com diferentes períodos de duração, a fim de se obter uma transferência mais rápida da banda cromatográfica para o interior da coluna, bem como conseqüente estreitamento e aumento de intensidade da mesma.²⁵ A literatura reporta algumas vantagens da utilização da injeção com pulso de pressão, tais como o aumento da velocidade de transferência de analitos com elevado ponto de ebulição e de compostos que possam ser adsorvidos no injetor, redução do tempo de residência da amostra no injetor, aumento da capacidade do mesmo, em função do volume de vapor ser inversamente proporcional a pressão.²⁶ Verificou-se que a eluição do triclorfom durante o pulso de pressão faz com que a intensidade de sinal deste pico aumente desproporcionalmente em relação aos demais analitos, podendo também ocorrer coeluição do triclorfom com o pico cromatográfico do solvente. A escolha de um pulso de pressão cuja duração seja apropriada (36,6 s para HP-50+ e DB-WAXetr; 29,4 s para DB-5) resulta em um gerenciamento adequado destes fenômenos, proporcionando uma condição cromatográfica satisfatória. As três colunas utilizadas para os experimentos apresentam dimensões idênticas, mas fases estacionárias diferenciadas, o que implica em tempos de retenção distintos para os analitos e solvente em cada fase.

Outras duas fases estacionárias foram utilizadas na 1D-GC e diversos testes de programação de temperatura do forno foram testados. A **Tabela 3** apresenta as condições analíticas que resultaram na melhor performance cromatográfica para cada coluna capilar empregada. A DB-5 foi a coluna cromatográfica que permitiu a melhor separação de todos os compostos em um menor tempo de análise.

TABELA 3

Sabendo-se que a DB-5 apresenta maior resistência a temperaturas elevadas do que a HP-50+ (325 e 280 °C em condição isotérmica, respectivamente), foram

realizados testes com três diferentes temperaturas de injeção – 250, 280 e 300 °C – a fim de verificar a influência deste parâmetro no sinal cromatográfico obtido para os compostos em estudo. De acordo com a **Figura 1**, os dados indicaram que, de forma geral, não há diferença significativa nas alturas relativas dos picos nas temperaturas de 280 e 300 °C. Contudo, a temperatura de 280 °C foi escolhida por ter propiciado maior intensidade do sinal cromatográfico do componente fipronil. Zhang e colaboradores²⁷ também verificaram que ocorre uma melhora do sinal cromatográfico para vários analitos, quando da utilização de temperaturas mais elevadas no injetor.

FIGURA 1

Em função da baixa temperatura máxima de trabalho em condição isotérmica para a coluna DB-WAXetr, de fase estacionária 100% polietilenoglicol, observou-se que, mesmo após 180 min a 235 °C, não houve a eluição de dois dos compostos - difenoconazol e azoxistrobina - os quais possuem massas moleculares maiores do que as dos demais analitos ($406,2 \text{ g mol}^{-1}$ e $403,4 \text{ g mol}^{-1}$, respectivamente). Tal fato inviabiliza o uso da DB-WAXetr. Além da dificuldade de eluição destes compostos, constatou-se que essa coluna possivelmente provocou sorção parcial dos compostos, devido à sua alta polaridade. Isto pode ser observado através da baixa intensidade dos sinais cromatográficos, quando comparados àqueles obtidos em análises feitas com as mesmas soluções em outras fases estacionárias.

O uso da DB-5 oferece vantagens em relação à HP-50+, pois além de proporcionar menor tempo de análise na separação dos nove compostos (27,9 min e 61,1 min, respectivamente), ainda oferece melhor resolução na separação dos picos cromatográficos, com exceção do propiconazol II e do trifloxistrobina que apresentaram resolução de 1,26 e 2,04 para DB-5 e HP-50+, respectivamente. A coluna DB-5 também proporcionou a separação dos dois isômeros do difenoconazol com resolução de 0,89, enquanto que na HP-50+ estes dois isômeros coeluem. Isto se deve às diferenças nas interações entre analito e fase estacionária e também ao fato de a DB-5 permitir o emprego de uma temperatura máxima maior (300 °C) na análise cromatográfica do que a temperatura máxima da HP-50+(255 °C).

O fator de assimetria (A_s) de um pico cromatográfico está diretamente relacionado à eficiência cromatográfica. Fatores de assimetria entre 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios, com pouca ou nenhuma influência de cauda nos picos cromatográficos. Tanto a HP-50+ quanto a DB-5 apresentaram, em geral, valores

satisfatórios de assimetria. A **Tabela 4** apresenta os fatores de assimetria para os picos cromatográficos e os tempos de retenção obtidos para os compostos estudados. Esse fator foi calculado utilizando-se a razão entre as larguras B e A a 10% da altura do pico, conforme **Figura 2**.²⁸

FIGURA 2

À luz dos resultados obtidos para os vários testes realizados com as três colunas cromatográficas, a DB-5 foi escolhida por sua melhor performance.

TABELA 4

Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)

De acordo com Kristenson e colaboradores,²⁹ quanto maior o fluxo do gás de *make up* na determinação de compostos por GC×GC-μECD, menor é o efeito de cauda observado nos picos cromatográficos. Contudo o efeito de diluição dos compostos no detector é maior. Tendo por base os resultados destes pesquisadores e também de outros,^{18, 30} o fluxo de nitrogênio utilizado para todos os experimentos foi de 150 mL min⁻¹, que é o fluxo máximo permitido pelo equipamento. A **Tabela 5** apresenta as melhores condições de análise obtidas para a GC×GC.

TABELA 5

Parâmetros como período de modulação e duração dos jatos quentes foram testados para todos os conjuntos de colunas. Os máximos períodos testados para a duração do jato quente foram de 30% do período de modulação. A **Tabela 6** apresenta os tempos de retenção na primeira e segunda dimensões, obtidos para os analitos com a utilização dos diferentes jogos de colunas, bem como os fatores de assimetria encontrados para as diferentes durações de jato quente. O texto a seguir discute os resultados obtidos.

TABELA 6

Conjunto de colunas nº1 (DB-5/DB-17ms)

Inicialmente, foram testados diferentes períodos de modulação (P_M): 2, 4, 6, 7 e 8 s. Destes, foi escolhido 7 s, pois neste P_M foi observada a melhor distribuição de picos no diagrama de cores. A duração do jato quente é um fator importante na análise, pois pode influenciar no formato e intensidade dos picos.³¹ Com isso, foram testadas diferentes durações do jato, tais como 0,6 s (valor padrão de operação do equipamento); 1,4; 1,75 e 2,1 s. Os fatores de assimetria para esse conjunto de

colunas foram calculados levando-se em consideração o pico modulado mais intenso.¹⁷ Para uma duração de 0,6 s, a simetria dos picos no diagrama de cores é bastante distorcida, fazendo com que ocorra coeluição parcial entre alguns compostos e, portanto, o fator de assimetria não foi calculado para esse parâmetro. Com a utilização de uma duração de jato quente de 2,1 s, houve melhoria da simetria dos picos relativamente aos demais períodos testados. Cabe acrescentar que as diferentes durações de jato quente testadas não contribuíram com aumento de sinal analítico dos compostos.

A diferença de temperatura utilizada entre o forno primário e secundário foi mantida em 5 °C, visto que, devido aos máximos de temperatura permitidos para cada coluna, não foi possível variar este parâmetro.

Conjunto de colunas nº2 (HP-50+/DB-1ms)

Os períodos de modulação testados foram de 2, 4 e 6 s e as diferenças de temperaturas entre os fornos foram de 5, 20, 30 e 40 °C. Devido à maior resistência de temperatura da coluna da ²D (DB-1ms), o método anteriormente utilizado para 1D-GC foi modificado ao final para uma isoterma a 280 °C (temperatura limite da HP-50+, no modo isotérmico) com duração de 30 min. Esse aumento de temperatura possibilitou diminuição no tempo total de análise em relação à 1D-GC, já que os compostos eluíram em menor tempo de retenção. O P_M que resultou em melhor distribuição dos picos cromatográficos no espaço de separação foi o de 4 s. A variação da diferença de temperatura entre os fornos não contribuiu para melhor separação dos compostos e também não favoreceu o aumento da intensidade de sinal dos picos cromatográficos. Entretanto, constatou-se que com uma diferença de 5 °C entre o forno primário e o secundário, os analitos distribuíram-se amplamente no espaço de separação, de forma a melhor aproveitá-lo.

Um terceiro parâmetro otimizado foi a duração do jato quente. Os valores testados foram de 0,6; 0,8; 1; e 1,2 s. De forma geral, não houve melhoria na simetria dos picos, quando se alterou a duração do jato quente, sendo que esse fator foi calculado da mesma forma como para o conjunto de colunas nº1. Nenhum dos valores testados contribuiu para a obtenção de bons resultados para a simetria. Em relação à altura dos picos, as maiores intensidades foram obtidas com a utilização dos jatos quentes com durações de 0,8 e 1,2 s, sendo que as alturas observadas foram muito próximas para esses dois valores. A duração de 0,8 s foi

escolhida em função dos valores de assimetria obtidos serem mais próximos dos valores aceitáveis e por apresentar menor desvio padrão, em comparação com os outros valores testados.

Comparação entre os jogos de colunas DB-5/DB-17ms e HP-50+/DB-1ms

O conjunto de colunas nº1 (DB-5/DB-17ms) proporcionou melhores resultados analíticos em relação ao nº2 (HP-50+/DB-1ms) devido ao menor tempo de análise (29,4 min para o conjunto nº1 e 35,7 min para o conjunto nº2) e melhor resolução para permetrina ($R_s = 0,72$ para o conj. nº1 e $R_s = 0,36$ para o conj. nº2). A resolução entre o propiconazol e trifloxistrobina foi de 0,6 para os dois jogos de colunas. Diferentemente da 1D-GC, na GC×GC mais de dois picos podem ser considerados como vizinhos de um determinado analito e este novo conceito de vizinhança foi introduzido por Schure,³² que foi o primeiro autor a propor a abordagem relacionada a teoria da razão vale-pico para cromatografia bidimensional. Para tanto, utiliza-se a distância entre os máximos de dois picos, o ponto de menor intensidade na reta entre estes dois picos e os valores de intensidade nesses três pontos. Contudo, essa abordagem é válida apenas para picos gaussianos. Peters e colaboradores³³ propuseram uma abordagem para cálculo de resolução baseada na teoria da razão vale-pico (monodimensional), a qual pode ser aplicada tanto para picos gaussianos, quanto não gaussianos. Por outro lado, Adam e colaboradores^{34,35} calcularam a resolução em GC×GC como sendo a média euclidiana das resoluções em cada uma das duas dimensões. Neste trabalho, as resoluções foram calculadas de acordo com esta última abordagem.

Em relação ao fator de assimetria dos picos, o conjunto nº1 apresentou melhores resultados, com valores entre 1,1 e 1,8 para o jato quente de 2,1 s, sendo que apenas quatro compostos apresentaram valores de assimetria acima de 1,2 (triclorfom, tricloroguaiacol, fipronil e difenoconazol). O uso do conjunto nº2 não resultou em fatores de assimetria satisfatórios, apresentando valores entre 1,5 a 3,6. Apesar do conjunto nº1 ter proporcionado maior aproveitamento do espaço de separação, o conjunto nº2 apresentou picos mais estreitos na ²D, o que resulta em aumento de sensibilidade pelo aumento na intensidade de sinal analítico e, eventualmente, aumento na capacidade de pico. Os picos modulados foram cerca de 8 a 62% mais estreitos que os obtidos para o conjunto nº1, com exceção do

triclorfom e propanil, que apresentaram picos mais largos, de 31 e 15%, respectivamente.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura apresenta o jogo convencional de colunas (fase estacionária apolar na ¹D e polar na ²D) como sendo o que proporciona melhores resultados de análise para agrotóxicos em diversas matrizes.^{16,36} Khummueng e colaboradores¹⁷ avaliaram três conjuntos de colunas para determinação de fungicidas em vegetais, sendo dois conjuntos de geometria inversa (fase estacionária polar ou de média polaridade na ¹D e apolar na ²D) e um conjunto de geometria convencional. O conjunto de colunas convencional foi considerado o mais eficiente, pois resultou na separação de todos os compostos estudados e em bons formatos de pico. Entretanto, Bordajandi e colaboradores³⁰ verificaram que, para a determinação de organoclorados, os melhores resultados de separação foram obtidos com conjunto de colunas polar versus não polar, apesar da restrição de ortogonalidade caracterizada pela utilização de um conjunto inverso de colunas. Em concordância com a maior parte dos estudos relatados anteriormente, o conjunto de colunas n°1 (DB-5/DB-17ms) apresentou melhor aproveitamento do espaço de separação, com ampla distribuição dos analitos na ²D, o que é uma característica importante e desejável quando da análise de amostras complexas.

Análise de Amostras Reais de Sedimentos

A aplicabilidade dos métodos por 1D-GC com a coluna DB-5 e GC × GC com o jogo de colunas n°1 (DB-5/DB-17ms) foi investigada através da análise de duas amostras de sedimentos. Em nenhuma das amostras foi verificada a presença dos analitos estudados, mas percebe-se claramente, através do cromatograma de uma amostra fortificada com compostos padrão (**Figura 3**), que a análise por 1D-GC traria prejuízo à quantificação, caso fossem encontrados os analitos nas amostras, devido à coeluição dos mesmos com constituintes da matriz.

FIGURA 3

Uma das técnicas mais empregadas para separação e análise quantitativa de agrotóxicos em sedimentos é a GC/MS no modo monitoramento de íon selecionado (SIM). Neste caso, mesmo no modo SIM, é possível que ocorram coeluições com interferentes que apresentam em sua estrutura os íons escolhidos para o monitoramento dos analitos. A separação em duas dimensões, proporcionada pela GC × GC, minimiza a possibilidade de coeluições. Em estudo realizado por Smalling

e colaboradores ³⁷ para determinação de agrotóxicos em sedimento foram verificados os limite de detecção instrumentais para oitenta e cinco agrotóxicos, por GC- μ ECD e GC/MS. Os resultados obtidos mostraram a grande sensibilidade da GC- μ ECD, pois os limites de detecção foram mais baixos para essa técnica (0,5 a 1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para GC- μ ECD e 1 a 2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para GC/MS).

A maior seletividade e capacidade de pico do sistema GC \times GC proporcionou a possibilidade de separação entre os analitos e os interferentes da matriz, fazendo com que seja possível o emprego da GC \times GC com um detector seletivo, como o μ ECD para determinação desses compostos em sedimentos. Outra opção seria o uso de um detector universal, como o TOFMS, que permite deconvolução espectral nos casos de coeluição. Entretanto, o seu custo é ainda proibitivo para muitos laboratórios. Por outro lado, o custo de um GC \times GC- μ ECD se assemelha ao de um GC/MS O μ ECD é um detector que apresenta alta sensibilidade e seletividade para a determinação de compostos halogenados.³⁸ Essas importantes características de detecção quando aliadas ao potencial de separação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente propiciam ótimos resultados de separação e detecção. Assim, os resultados obtidos até agora, apontam para o desenvolvimento de um método analítico para determinação destes oito agrotóxicos em sedimentos localizados em áreas próximas à lavouras de arroz.

CONCLUSÕES

A análise das amostras de sedimentos por GC \times GC, devido à alta seletividade e capacidade de pico da técnica, possibilita a separação dos oito agrotóxicos com menor probabilidade de interferência de constituintes da matriz. Através dos cromatogramas das amostras fortificadas com padrões dos agrotóxicos ficou evidente o maior potencial da técnica GC \times GC (conjunto de colunas DB-5/DB-17ms) em relação à 1D-GC para a separação e quantificação dos compostos estudados. Em relação ao tempo de análise, as duas metodologias praticamente se equivalem, com 27,9 min para 1D-GC e 29,4 min para GC \times GC.

Os resultados obtidos até agora apontam para a possibilidade de desenvolvimento de um método analítico para determinação destes oito agrotóxicos, provenientes da orizicultura do Rio Grande do Sul, em sedimentos, através do emprego de GC \times GC- μ ECD, sem a necessidade de emprego de um detector de mais

alto custo, como o TOFMS. Tal método poderá, futuramente, contribuir para o monitoramento de rotina da qualidade ambiental dos sedimentos localizados em sítios próximos à lavoura de arroz neste estado.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro a este projeto.

REFERÊNCIAS

1. IRGA; *Lavoura Arrozeira*, **2008**, 56, 1.
2. van der Hoff, R. G.; van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, 843, 301.
3. Barceló, D.; *Chromatographia*. **1988**, 25, 928.
4. Hogendoorn, E.; van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 892, 435.
5. Blumberg, L. M.; David, F.; Klee, M. S.; Sandra, P.; *J. Cromatogr. A* **2008**, 1188, 2.
6. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J Chromatogr. A* **1999**, 856, 331.
7. Liu, Z. Y.; Phillips, J.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 227.
8. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 438.
9. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1186, 67.
10. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 765.
11. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 682.
12. Pedroso, M. P.; Godoy, L. A. F.; Fidélis, C. H. V.; Ferreira, E. C.; Poppi, R. J.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 421.
13. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, 27, 101.
14. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 69.

15. Dallüge, J.; van Rijn, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 207.
16. Banerjee, K.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Savant, R.; Adsule, P. G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 350.
17. Khummueng, W.; Trenerry, C.; Rose, G.; Marriott, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131*, 203.
18. Bordajandi, L. R.; Ramos, L.; González, M. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 220.
19. Koritár, P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1086*, 29.
20. Panić, O.; Górecki, T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1013.
21. <http://www.irga.rs.gov.br/>, acessada em novembro 2008.
22. Grupo GERHI; *Desenvolvimento de Ações para Implantação de Outorga na Bacia do Rio Santa Maria*. 2006.
23. You, J.; Weston, D. P.; Lydy, M. J.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 141.
24. Cd room Agilent 6890N: Series Gas Chromatograph, 2001
25. Godula, M.; Hajšlová, J.; Alterová, K.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 395.
26. Grob, K.; *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley: Weinheim, 2001.
27. Zhang, B.; Pan, X.; Venne, L.; Dunnum, S.; McMurry, S. T.; Cobb, G. P.; Anderson, T. A.; *Talanta*, **2008**, *75*, 1055.
28. Jönsson, J. Å.; *LCGC*, **2002**, *20*, 920.
29. Kristenson, E.M.; Korytár, P.; Danielsson, C.; Kallio, M.; brandt, M.; Mäkelä, J.; Vreuls, R. J.J.; Blens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1019*, 65.
30. Bordajandi, L. R.; Ramos, J. J.; Sanz, J.; González, M. J.; Ramos, L.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 312.
31. Hoh, E.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1145*, 210.
32. Schure, M. R.; *J. Microcol. Sep.* **1997**, *9*, 169.
33. Peters, S.; Truyols, G. V.; Marriott, P. J.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1146*, 232.
34. Adam, F.; Vendeuvre, C.; Bertoncini, F.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1178*, 171.
35. Adam, F.; Bertoncini, F.; Coupard, V.; Charon, N.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 236.

36. Pizzutti, I. R.; Vreuls, R. J. J.; Kok, A.; Roehrs, R.; Martel, S.; Friggi, C. A.; Zanella, R.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3305.
37. Smalling, K.L.; Kuivila, K. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1210*, 8.
38. Koritár, P.; Haglund, P.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 373.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Comparação das médias das respostas relativas dos picos cromatográficos (n=3) para diferentes temperaturas de injeção. 1) Triclorfom, 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I, 5) Propiconazol II, 6) Trifloxistrobina, 7 e 8) Permetrina *cis* e *trans*, 9) Difenoconazol I, 10) Difenoconazol II e 11) Azoxistrobina.

Figura 2. Representação de um pico cromatográfico genérico, ilustrando os parâmetros empregados para cálculo do fator de assimetria.

Figura 3. Cromatogramas do extrato da amostra de sedimento **(A)** monodimensional; **(B)** diagrama de cores de uma amostra de sedimento fortificada com 500 µg L⁻¹ de mistura dos padrões. 1) Triclorfom, 2) Tricloroguaiacol (PI), 3) Propanil, 4) Fipronil, 5) Propiconazol I e II, 6) Trifloxistrobina, 7) Permetrina *cis* e *trans*, 8) Difenoconazol I e II e 9) Azoxistrobina. As setas indicam os interferentes da matriz que coeluem com os analitos na 1D-GC.

Tabela 1. Agrotóxicos estudados, uso, grupo químico e fórmula estrutural.

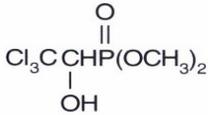
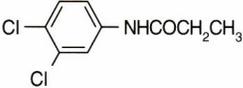
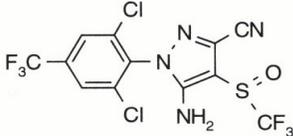
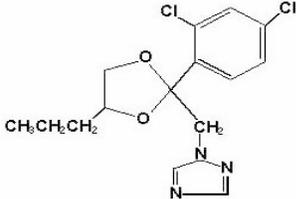
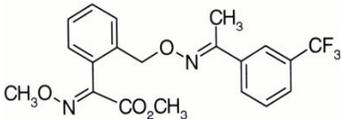
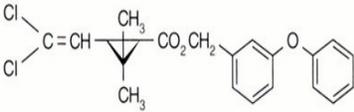
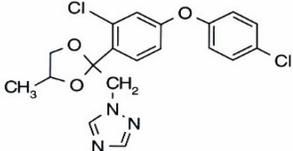
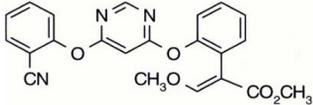
Nome	Uso	Grupo Químico	Fórmula Estrutural
Triclorfom	Inseticida	Organofosforado	
Propanil	Herbicida	Anilida	
Fipronil	Inseticida	Pirazol	
Propiconazol	Fungicida	Triazol	
Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	
Permetrina	Inseticida	Piretróide	
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	

Tabela 2. Colunas utilizadas nas otimizações dos parâmetros cromatográficos para 1D-GC e GCxGC.

Conj. de Colunas	Primeira Dimensão (¹ D) e para 1D-GC*		Segunda Dimensão (² D)		
	Nome	Fase estacionária	Nome	Fase estacionária	Dimensões
(1)	DB-5	5% difenil-95% dimetilpolisiloxano	DB-17ms	50% fenil-50% metilpolisiloxano	1,70 m x 0,18 mm x 0,18 µm
(2)	HP-50+	50% fenil - 50% metilpolisiloxano	DB-1ms	100% metilpolisiloxano	1,70 m x 0,10 mm x 0,10 µm

* As dimensões das colunas empregadas em 1D-GC ou na ¹D foram sempre 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A coluna DBWAXetr possui fase estacionária constituída por 100% polietilenoglicol.

Tabela 3. Condições cromatográficas obtidas para 1D-GC.

Condições	Colunas Cromatográficas		
	HP-50+	DB-5	DB-WAXetr
Programação de Temperatura (T) do Forno	50 °C (1,5 min)-30 °C min ⁻¹ / 1/190 °C-5 °C min ⁻¹ /220 °C-7 °C min ⁻¹ /255 °C (44 min)	60 °C (2,53 min)-35 °C min ⁻¹ / 1/180 °C-4 °C min ⁻¹ /240 °C-12 °C min ⁻¹ /300 °C (2 min)	40 °C (1,5)-12 °C min ⁻¹ /100 °C-30 °C min ⁻¹ /235 °C (44 min)
T do Injetor (°C)	280	280	260
T do Detector (°C)	280	325	260
Pulso de Pressão (s)	36,6	29,4	36,6

Tabela 4. Tempos de retenção (t_R), fatores de assimetria (A_s) e desvio padrão (DP) obtidos para os compostos estudados com as diferentes colunas cromatográficas.

Analito	HP-50+		DB-5	
	t_R (min)	A_s (DP)	t_R (min)	A_s (DP)
Triclorfom	0,77	1,4 (0,07)	0,59	2,0 (0,87)
Tricloroguaiacol (PI)	7,74	1,5 (0,29)	7,46	1,0 (0,24)
Propanil	10,93	1,0 (0,00)	9,90	1,5 (0,29)
Fipronil	11,77	0,8 (0,14)	12,59	1,0 (0,19)
Propiconazol I	16,54	1,0 (0,19)	16,75	1,0 (0,00)
Propiconazol II	16,63	1,3 (0,34)	16,98	1,3 (0,33)
Trifloxistrobina	16,87	1,0 (0,14)	17,14	1,1 (0,23)
Permetrina I	21,79	0,9 (0,08)	22,43	1,0 (0,14)
Permetrina II	22,19	1,0 (0,07)	22,65	1,0 (0,19)
*Difenoconazol I	36,80	-	25,24	1,5 (0,00)
*Difenoconazol II	-	-	25,31	1,0 (0,24)
Azoxistrobina	57,35	1,1 (0,07)	25,89	0,7 (0,19)

*O fator de assimetria para o difenoconazol, com a utilização da coluna HP-50+, não foi calculado em função da coeluição parcial entre os isômeros.

Tabela 5. Condições cromatográficas obtidas para GC×GC.

Conj. Colunas	Temperatura (°C)			Tempo (s)		
	Programação do Forno	Injetor	Detector	ΔT entre os Fornos	P_M	Jato Quente
(1)	60 °C (2,53 min)-35 °C min ⁻¹ /180 °C-4 °C min ⁻¹ /240 °C-10 °C min ⁻¹ /295 °C (3 min)	280	320	5	7	2,1
(2)	50 °C (1,5 min)-50 °C min ⁻¹ /190 °C-5 °C min ⁻¹ /220 °C-5 °C min ⁻¹ /280 °C (12 min)	280	335	5	4	0,8

A temperatura do modulador foi mantida a 20 °C acima da temperatura do forno primário. P_M é o período de modulação em segundos.

Tabela 6. Tempos de retenção, fatores de assimetria (2A_s) e desvio padrão para os picos na 2D com a utilização de diferentes durações de jato quente.

			DB-5/DB-17ms			HP-50+/DB-1ms				
Analito	t_R (min) ² t_R (s)		Duração dos jatos quentes (s) / Desvio padrão						t_R (min) ² t_R (s)	
	1,4	1,75	2,1	0,8	1,0	1,2				
Triclorfom	2,80	2,06	1,2/0,08	1,1/0,00	1,8/0,14	1,9/0,46	1,7/0,46	1,4/0,00	2,20	1,58
Tricloroguaiacol (PI)	7,93	3,16	1,8/0,11	2,1/0,38	1,4/0,21	2,7/0,87	3,4/0,87	2,9/0,62	7,60	1,80
Propanil	10,61	5,94	1,5/0,03	1,6/0,03	1,1/0,31	3,6/0,29	3,9/0,29	3,6/0,48	10,80	2,12
Fipronil	13,41	4,94	1,3/0,07	1,3/0,07	1,3/0,03	1,5/0,00	1,5/0,00	2,0/0,28	11,66	2,76
Propiconazol I	17,85	1,36	1,3/0,11	1,4/0,07	1,2/0,12	1,9/0,36	1,9/0,36	2,0/0,12	16,60	2,40
Propiconazol II	18,08	1,30	1,3/0,10	1,4/0,03	1,2/0,06	-	-	-	-	-
Trifloxistrobina	18,2	0,90	1,1/0,07	1,1/0,11	1,2/0,10	2,1/0,36	2,0/0,36	1,8/0,21	16,86	2,16
Permetrina I	23,33	6,00	1,3/0,03	1,3/0,10	1,2/0,09	1,8/0,18	1,9/0,18	1,9/0,16	20,53	2,26
Permetrina II	23,56	5,84	1,1/0,03	1,2/0,03	1,2/0,08	2,4/0,00	2,4/0,00	1,9/0,13	20,73	2,24
Difenoconazol	26,36	5,94	1,3/0,03	1,5/0,08	1,3/0,04	2,1/0,17	1,9/0,17	2,2/0,26	26,80	3,22
Azoxistrobina	27,18	1,40	1,3/0,12	1,3/0,06	1,2/0,11	2,2/0,23	2,3/0,36	2,2/0,20	34,06	3,44

Figura 1

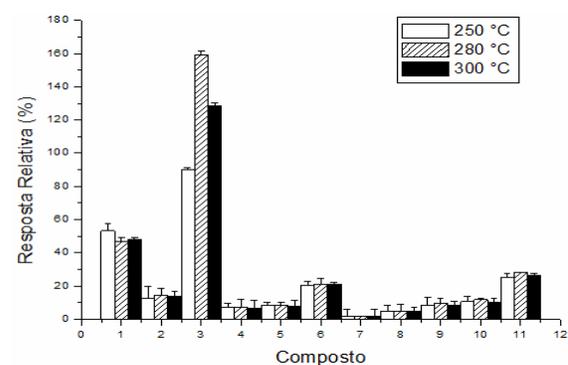


Figura 2

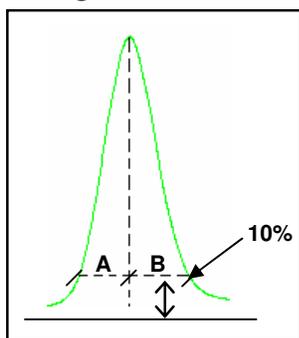
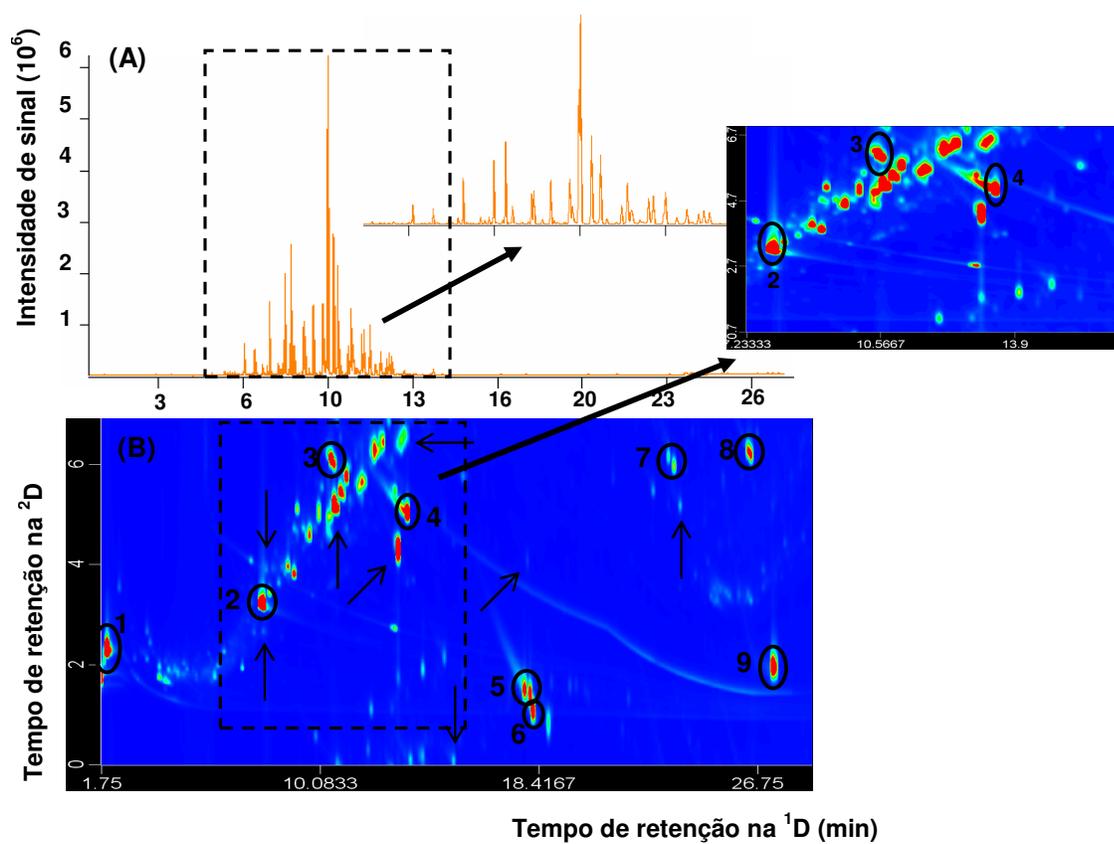


Figura 3



ANEXO 2. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

**APLICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE
COM MICRO DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS PARA DETERMINAÇÃO
DE AGROTÓXICOS EM SEDIMENTOS**

Juliana Macedo da Silva, Cláudia Alcaraz Zini e Elina Bastos Caramão*.
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Av. Bento
Gonçalves, 9500; CEP: 91501-970, Porto Alegre – RS, Brasil.

*e-mail: elina@ufrgs.br

**APPLICATION OF COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS
CHROMATOGRAPHY WITH MICRO-ELECTRON CAPTURE DETECTION FOR
DETERMINATION OF PESTICIDES IN SEDIMENTS**

Abstract

This study evaluated the applicability of GC × GC- μ ECD for determination of seven pesticides of different chemical classes in sediments with the column set DB-5/DB-17ms. The repeatability and intermediate precision of the areas and heights of the chromatographic peaks were less than 4%. The percentage of recovery for the compounds investigated were between 52 and 115%. Instrumental LOD and LOQ were found in the range from 0.60 to 2.31 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1.83 to 5.62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The detection limits of the method ranged from 1.43 to 5.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Concentrations of 3.34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (dry basis) for trifloxystrobin and azoxystrobin (below the LOD) were found in a sediment sample which was collected close to an area of rice plantation.

Keywords: pesticides, GC × GC, μ ECD.

INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos nas produções agrícolas vem obtendo cada vez mais destaque no cenário mundial. O controle de pragas, através do uso de diferentes princípios ativos, reduziu o índice de doenças para os homens e animais e proporcionou aumento na produção agrícola. Contudo, resíduos desses compostos podem permanecer no ambiente por longos períodos e causar impactos nocivos a diferentes ecossistemas. Nesse contexto, o monitoramento desses compostos em diferentes matrizes como ar, água, solo, sedimento e alimentos se torna de extrema importância para que problemas de saúde pública sejam minimizados e/ou evitados.¹

O estudo da ocorrência de agrotóxicos em sedimentos fornece informação a respeito da contaminação do corpo hídrico receptor. O sedimento se comporta como fonte de acumulação de poluentes (compostos orgânicos em geral e metais, por exemplo) e este comportamento se relaciona diretamente com sua constituição físico-química. Este fato confere ao sedimento grande importância no que tange à investigação de processos físicos, geoquímicos e biológicos no ambiente.² As suas propriedades físico-químicas podem influenciar tanto no transporte e destino desses compostos no ambiente quanto no comportamento dos mesmos durante as etapas de extração, limpeza (*clean up*) e análise instrumental. A interação existente entre os agrotóxicos e o sedimento pode ser bastante forte, resultando em resíduos quimicamente ligados à matriz. Tendo em vista este contexto, esforço significativo vem sendo realizado para o desenvolvimento de métodos eficientes que possibilitem a análise multirresíduo de agrotóxicos, minimizando etapas de extração e de *clean up* das amostras.^{3,4}

Atualmente, técnicas rápidas e automatizadas para extração de amostras sólidas, que utilizam altas pressões e temperaturas, vêm sendo reportadas com destaque na literatura. Dentre estas, podem ser citadas a extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês “Supercritical Fluid Extraction”),⁵¹⁻⁵³ extração acelerada com solvente (ASE, do inglês “Accelerated Solvent Extraction”),⁵⁴⁻⁵⁶ extração assistida por microondas (MAE, do inglês “Microwave Assisted Extraction”),⁵⁻⁷ ou técnica que utiliza forte agitação como a extração por ultra-som (USE, do inglês “Ultrasonic Extraction”).^{4,8,9} Outras técnicas como Soxhlet,¹⁰⁻¹² extração em fase sólida (SPE, do inglês “Solid-Phase Extraction”) ^{13,14} e micro extração em fase sólida

(SPME, do inglês “Solid-Phase Micro Extraction”)¹⁵⁻¹⁷ também são utilizadas para determinação de agrotóxicos em sedimentos. A extração por ultra-som é uma técnica bastante versátil que permite a extração de várias amostras simultaneamente, sem demandar o uso de materiais sofisticados.¹⁸ O processo de extração por ultra-som proporciona um contato mais efetivo entre a matriz e o solvente, devido aos processos térmicos, mecânicos e de cavitação acústica. A exposição à irradiação ultra-sônica faz com que haja formação de micro bolhas, quando a pressão negativa exercida no sistema é alta o suficiente; sendo que, durante períodos de pressão positiva, as bolhas são comprimidas. Quando ocorre um colapso perto da superfície de um sólido, causado pela compressão e expansão das bolhas, as paredes do sólido podem ser danificadas e ter seu conteúdo (analitos) liberado para o meio.¹⁹

Atualmente, a Cromatografia Gasosa é a técnica mais utilizada para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes.²⁰ A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC × GC) é uma técnica relativamente recente, idealizada em 1991 por Liu e Phillips²¹ e que apresenta grande poder de separação. Na GC × GC, duas colunas cromatográficas de diferentes mecanismos de retenção são acopladas em série, sendo a coluna da primeira dimensão (¹D) comumente de 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 a 0,32 mm. A coluna da segunda dimensão (²D) deve ser mais curta, do tipo *fast-GC*, para que o perfil de separação obtido na ¹D seja mantido.²² O modulador é considerado o “coração” da técnica e é acoplado entre as duas colunas, sendo que sua função é de amostrar e focalizar as pequenas frações eluídas da primeira coluna e, em seguida, liberar essas porções, rapidamente, para a segunda coluna.²³ O período de amostragem corresponde ao período de modulação (P_M), que é a duração de um ciclo completo de modulação, e ao tempo de separação na coluna da segunda dimensão. Devido ao tempo de separação da segunda dimensão ser muito curto, geralmente de 2 a 10 segundos, a separação na segunda coluna é essencialmente isotérmica.²⁴ Os picos gerados por um sistema GC × GC apresentam dois tempos de retenção, na primeira e segunda dimensão (¹t_R e ²t_R, respectivamente). Essa característica proporciona grande vantagem analítica, pois se refere a dois mecanismos de separação, podendo ser utilizada com o propósito de identificação de compostos.²⁵

O número de publicações científicas relacionado à determinação de agrotóxicos por GC × GC ainda é relativamente pequeno, mas suficiente para demonstrar as potenciais vantagens da técnica em relação à cromatografia monodimensional (1D-GC). As principais vantagens apresentadas pela GC × GC em relação a 1D-GC são: aumento de resolução; aumento de sensibilidade devido à reconcentração da banda do soluto na ²D, favorecendo a detecção de componentes em nível de traços; estruturação do cromatograma 2D (bidimensional) de acordo com as características químicas dos compostos em análise e aumento da capacidade de pico.^{26,27} A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos científicos que utilizam a GC × GC-μECD como ferramenta analítica para determinação de agrotóxicos e organoclorados em diferentes matrizes.

TABELA 1

Desta forma, este estudo teve por objetivo a validação de um método multirresíduo, por GC × GC-μECD, para a determinação de sete agrotóxicos (propanil, fipronil, propiconazol, trifloxistrobina, permetrina, difenoconazol e azoxistrobina) de diferentes classes químicas (anilida, pirazol, triazol, estrobilurina e piretróide) em sedimentos de rio proveniente de regiões sob influência da cultura orizícola no estado do Rio Grande do Sul. O processo de validação foi realizado através da avaliação de parâmetros como curva de calibração e linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (teste de recuperação) e limites de detecção e quantificação instrumentais e do método.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e Reagentes

Os padrões dos agrotóxicos foram obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha) com pureza superior a 97%. Para as análises quantitativas foi utilizado o 3,4,5-tricloroguaiacol como padrão interno. As soluções padrão estoque foram preparadas pesando-se os agrotóxicos em frascos individuais em balança analítica de precisão (Shimadzu, AY220, Quioto, Japão) e dissolvendo-os em acetato de etila grau HPLC (Mallincrodt, Phillipsburg, EUA) em balões volumétricos de 5 mL, previamente silanizados. Todas as soluções foram guardadas em *freezer* à -18 °C em frascos de vidro âmbar silanizados. O sulfato de sódio anidro (Quimex, São

Paulo, SP, Brasil), utilizado para retirar a umidade residual dos sedimentos, foi previamente seco em estufa a 400 °C por 4 horas e armazenado em dessecador. Os papéis filtro utilizados foram de grau quantitativo (Quanty, Alemanha). O banho de ultra-som utilizado foi Maxiclean (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) com potência de 120 Watts.

Amostragem e Preparação da Amostra

As coletas foram realizadas por técnicos da FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler) na região da Bacia do Rio Santa Maria e na região do Rio Gravataí, no estado do Rio Grande do Sul. Foi coletado em média 1 kg de sedimento, com retirada de qualquer vegetação presente, próximo à margem, em locais de deposição de partículas finas (preferencialmente), e pouca profundidade. Os sedimentos foram coletados em frascos de vidro e transportadas à 4 °C, até o laboratório, onde foram congelados a -18 °C em freezer, antes do processo de extração. O processo de extração empregado foi baseado no método reportado por You e colaboradores.⁴¹ A água residual presente no sedimento foi retirada e o mesmo foi homogeneizado. Em seguida, foi parcialmente seco ao ar, à temperatura ambiente, em vidros de relógio. Para a etapa de extração, foram pesados 20 g de sedimento e adicionados a este, 10 g de sulfato de sódio anidro, procedendo-se à homogeneização do material. Uma alíquota de 50 mL de uma solução 50:50 v/v de acetona:diclorometano foi adicionada à amostra, a qual foi submetida à extração em 3 ciclos de 15 min no banho de ultra-som. O extrato foi levado à secura e o resíduo final dissolvido com 1,5 mL de acetato de etila. Para os testes de recuperação foram adicionadas quantidades de 300, 60 e 30 µL de uma solução dos analitos a 10 µg L⁻¹, para obtenção da fortificação a 150, 30 e 15 µg kg⁻¹, respectivamente. As amostras foram deixadas em contato com a solução padrão contendo os agrotóxicos durante 24 horas, após homogeneização e evaporação do solvente. Todos os solventes utilizados para extração são grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e bidestilados. A **Tabela 2** apresenta as características e localização geográfica desses sedimentos.

TABELA 2

Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com μ ECD, equipado com amostrador automático Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça). O cromatógrafo também possui um forno secundário (LECO, St. Joseph, MI, EUA) e um modulador térmico de dois estágios com quatro jatos (*quad jet*) de N_2 (dois jatos quentes e dois frios que são resfriados por N_2 líquido). A coluna utilizada na primeira dimensão foi uma DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e na segunda dimensão, DB-17ms (1,7 m x 0,18 mm x 0,18 μ m), ambas adquiridas da Agilent Technologies - J&W Scientific (Palo Alto, CA, EUA). As temperaturas de injeção e detecção foram de 280 e 320 °C, respectivamente. O fluxo de gás de arraste (H_2 , 99,999%, Linde Gás, Canoas-RS) foi de 2 mL min^{-1} , enquanto que o fluxo de gás de *make up* (N_2 , 99,999%, Linde Gás, Canoas-RS) foi de 150 mL min^{-1} . O P_M utilizado foi de 7 s, com duração de pulso quente de 2,1 s. A programação de temperatura do forno foi de 60 °C (2,53 min)-35 °C min^{-1} /180 °C-4 °C min^{-1} /240 °C-10 °C min^{-1} /295 °C (3 min), com diferença de temperatura de mais 5 °C no forno secundário. As injeções foram realizadas com volume de 1 μ L, sem divisão de fluxo e com pulso de pressão de 60 psi por 29,4 s. O desenvolvimento do método de análise está descrito em artigo anteriormente publicado.⁴²

Validação do Método

O processo de validação possibilita uma avaliação da eficiência de um processo analítico, quando do seu desenvolvimento, adaptação ou implementação. Este processo garante que um método analítico ofereça informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra.⁴³ Os parâmetros avaliados no processo de validação foram linearidade e curva de calibração, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (testes de recuperação) e limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A curva de calibração foi avaliada através da injeção de soluções com concentrações na faixa de 5 a 415 μ g L^{-1} . Cada solução foi analisada cinco vezes. O composto 3,4,5-tricloroguaiacol foi utilizado como padrão interno na concentração de 100 μ g L^{-1} . A precisão do método foi verificada em termos de repetitividade e precisão intermediária, expressas como coeficiente de variação (CV%). A repetitividade foi avaliada através da análise de oito injeções de solução

padrão a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em um único dia e mantendo-se constante as condições operacionais. A precisão intermediária foi verificada através da análise de oito injeções da mesma solução padrão, mas em dois dias diferentes. O CV% foi calculado utilizando-se a média das áreas e alturas dos picos cromatográficos para cada agrotóxico. A exatidão de um processo analítico representa o quanto os resultados individuais, de um determinado ensaio, concordam com um valor de referência aceito como verdadeiro. Esse parâmetro mede o desvio do valor obtido em relação ao valor adotado como real^{43,44} e foi avaliado através dos testes de recuperação com amostra fortificada (amostra controle) nos níveis de 15, 30 e $150 \mu\text{g kg}^{-1}$. O LOD pode ser definido como sendo a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou seja, é a menor concentração de um analito que pode ser diferenciada do ruído gerado por equipamentos que produzem linhas de base.⁴⁴ O LOQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.⁴⁵ O limite de detecção do método, MDL (do inglês, "Method Detection Limit") é a mínima concentração de uma determinada substância que pode ser medida e reportada com 99% de confiança de que a concentração seja maior do que zero. O MDL foi avaliado através da extração de sete replicatas de sedimento fortificado a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. A fórmula que expressa o resultado é apresentada abaixo:

$$\text{MDL} = st(0,99; n-1)$$

Na equação acima, s é o desvio padrão das replicatas e t é o valor da distribuição t de Student, com 99% de confiança e $n-1$ graus de liberdade.^{3,46}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições Cromatográficas

A Figura 1 apresenta o diagrama de cores obtido para os sete agrotóxicos com o jogo de colunas DB-5/DB-17ms, onde é possível observar que os picos encontram-se dispersos pelas várias regiões do espaço de separação.

FIGURA 1

A utilização deste jogo de colunas favoreceu o aproveitamento do espaço de separação, com ampla distribuição dos analitos na 2^{D} , boa simetria para os picos cromatográficos, características importantes e desejáveis quando da análise de amostras complexas.⁴² Estes resultados confirmam o que é reportado na literatura,

visto que a maioria dos trabalhos publicados apresenta a geometria convencional de colunas (fase estacionária apolar na ¹D e polar na ²D) como sendo o que proporciona melhores resultados de análise para agrotóxicos em diversas matrizes.^{28,47}

Processo de Extração por Ultra-som

O processo de extração empregado foi baseado no método reportado por You e colaboradores.⁴¹ No trabalho descrito por esses autores foi utilizada uma etapa de limpeza com 10 g de Florisil ativado e posteriormente, parcialmente desativado com 6% m/v de água destilada. Os autores obtiveram bons resultados de recuperação. Entretanto, testes realizados com Florisil durante este trabalho mostraram que para os sete agrotóxicos em estudo houve adsorção irreversível dos analitos na coluna de Florisil, o que inviabilizou a utilização desta etapa de limpeza.

Validação do Método

As equações da curva de calibração, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de concentração são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3

Através das equações obtidas para as curvas analíticas pode-se observar que o método proposto apresentou ótima linearidade numa ampla faixa de concentração, com coeficientes de determinação (r^2) entre 0,9920 e 0,9993. Valores de r^2 acima de 0,98 são considerados satisfatórios.⁴⁸ Para a repetitividade, as áreas dos picos cromatográficos, para os sete compostos, apresentaram valores de coeficiente de variação de 0,64 a 3,78%. Para as alturas dos picos, os valores situaram-se entre 0,77 e 3,16%. Para a precisão intermediária, o coeficiente de variação relativo às áreas dos compostos situou-se entre 0,54 e 3,50% e para as alturas 0,81 e 3,74%. Os tempos de retenção tiveram variação de 0,00% para a ¹D e de 0,11 a 0,66% para a ²D. Tendo em vista que os valores obtidos para repetitividade e precisão intermediária situaram-se abaixo de 20%,^{43,49} o método cromatográfico proposto para a determinação dos sete compostos pode ser considerado preciso. A Tabela 4 apresenta os níveis de concentração encontrados para os testes de recuperação.

TABELA 4

O presente método se mostrou eficiente (recuperação entre 50 e 120% e CV $\leq 20\%$) para todos os agrotóxicos para o nível de concentração de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar da baixa recuperação obtida para a trifloxistrobina nos níveis de 15 e $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para o propiconazol em $150 \mu\text{g kg}^{-1}$, o coeficiente de variação foi menor do que 20%, o que indica que o método foi repetitivo. Para os compostos difenoconazol e azoxistrobina houve elevada recuperação (acima de 120%) que pode ter sido causada por coeluições com interferentes da matriz, no nível de recuperação de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para o difenoconazol no nível de fortificação de $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para a permetrina, no nível de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$, houve boa recuperação mas a precisão do método não foi satisfatória ($>20\%$). A resposta relativa obtida para alguns compostos no ECD, como os hidrocarbonetos, é de 0,01 (tendo como base o clorobenzeno com resposta igual a 1).⁵⁰ Caso ocorra coeluição dos agrotóxicos estudados com esses compostos, por exemplo, pode ocorrer uma contribuição negativa na resposta analítica, com diminuição de intensidade de sinal. No banho de ultra-som o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrasonora é transmitida através da água.⁵¹ Com isso, há muita dispersão de energia e, conseqüentemente, maior probabilidade de geração de pontos de maior e menor intensidade de extração. O sinergismo causado pelo efeito negativo no sinal (sinal diminuído por coeluições com compostos de baixa resposta relativa no ECD) e pela alta variabilidade no processo de extração no ultra-som pode ter contribuído para que alguns resultados de recuperação não fossem tão satisfatórios. O emprego de uma sonda de ultra-som poderia melhorar a repetibilidade do processo de extração, como já constatado por You e colaboradores.⁴¹ A Figura 2 apresenta os diagramas tridimensionais e os cromatogramas reconstruídos da ¹D e ²D para amostra de sedimento fortificada.

FIGURA 2

A Figura 2 propicia a observação da distribuição dos constituintes (padrão e amostra) no espaço de separação, confirmando que a utilização da técnica monodimensional (GC- μ ECD) não seria suficiente para obter separação entre os analitos e os constituintes da matriz. A Tabela 5 apresenta os limites instrumentais de detecção e quantificação e o limite de detecção do método para os agrotóxicos em estudo. Os limites de detecção e quantificação instrumentais variaram de 0,08 a $1,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,25 a $3,23 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites do método variaram

de 1,92 a 4,43 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para fins de ilustração, já que não existe legislação vigente que contemple esses agrotóxicos em sedimentos, os LMR dos analitos para a matriz arroz variam de 0,01 a 2 mg kg^{-1} ,⁵² evidenciando que os limites encontrados foram considerados satisfatórios.

TABELA 5

Aplicabilidade do Método a Amostras Reais

A aplicabilidade do método de extração foi avaliada através da análise de duas amostras de sedimentos – SD₁ e SD₂. Foram encontrados resíduos dos agrotóxicos trifloxistrobina e azoxistrobina somente na amostra SD₂. O valor de concentração encontrado para trifloxistrobina foi de 3,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em base seca e para azoxistrobina a concentração ficou abaixo do LOD. A confirmação da presença de um determinado analito em uma amostra pode ser realizada através do uso do detector de espectrometria de massas ou de injeções em colunas cromatográficas cujas fases estacionárias propiciem a separação através de distintos mecanismos de separação, caso não exista a disponibilidade de um detector de espectrometria de massas.⁴¹ Sendo assim, a confirmação da presença dos resíduos de azoxistrobina e trifloxistrobina foi realizada através de coinjeções em colunas de fases estacionárias diferentes, com o jogo de colunas HP-50+/DB-1ms, utilizando-se o μECD .

CONCLUSÃO

O método de análise de agrotóxicos proposto neste trabalho apresentou ótimos resultados, evidenciando o potencial da técnica de GC \times GC para a análise de poluentes em nível de traços em matrizes complexas. A alta capacidade de pico da técnica contribuiu para que o processo de quantificação tivesse pouca influência de coeluições de interferentes da matriz com os analitos em estudo, apesar de as amostras não terem sido submetidas a uma etapa de limpeza. Além disso, os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação comprovam a grande sensibilidade da técnica. Este trabalho amplia o uso da GC \times GC para mais uma situação específica de relevante importância ambiental, visto que o número de aplicações desta técnica ainda é pequeno na literatura científica. O método em questão pode ser empregado por laboratórios de instituições governamentais de fiscalização ou por outros laboratórios prestadores de serviço, contribuindo assim

para obtenção de informações relevantes sobre estes compostos no meio ambiente ou sobre um possível mau gerenciamento de sua aplicação nas lavouras. Informações obtidas por métodos analíticos como este podem minimizar riscos de poluição do meio ambiente e também riscos à saúde da população.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro a este projeto.

REFERÊNCIAS

1. Flores, A. V.; Ribeiro, J. N.; Neves, A. A.; Queiroz, E. L. R.; *Amb. & Soc.* **2004**, *7*, 111.
2. Secco, T.; Pellizzato, F.; Sfriso, A.; Pavoni, B.; *Chemosphere* **2005**, *58*, 279.
3. Smalling, K. L.; Kuivila, K. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1210*, 8.
4. Vagi, M.C.; Petsas, A.S.; Kostopoulou, M.N.; Karamanoli, M.K.; Lekkas, T.D.; *Desalination* **2007**, *210*, 146.
5. Schantz, M. M.; Bowadt, S.; Jr Benner, B. A.; Wise, S. A.; Howthorne, S. B.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *816*, 213.
6. Robertson, A. M.; Lester, J. N.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 346.
7. Carrasco, P. B.; Díez, S.; Jiménez, J.; Marco, M. P.; Bayona, J. M.; *Wat. Res.* **2003**, *37*, 3658.
8. You, J.; Weston, D. P.; Lydy, M. J.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 141.
9. Xue, N.; Zhang, D.; Xu, X.; *Water Res.* **2006**, *40*, 183.
10. Woudneh, M. B.; Oros, D. R.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1135*, 71.
11. Darko, G.; Akoto, O.; Oppong, C.; *Chemosphere* **2008**, *72*, 21.
12. Covaci, A.; Gheorghe, A.; Hulea, O.; Schepens, P.; *Environm. Pollut.* **2006**, *140*, 136.
13. Peñuela, G.A.; Barceló, D.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *795*, 93.
14. Dąbrowska, H.; Dąbrowski, Ł.; Biziuk, M.; Gaca, J.; Namieśnik, J.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1003*, 29.
15. Aguilar, C.; Peñalver, S.; Pocerull, E.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *795*, 105.

16. Diaz, A.; Vásquez, L.; Ventura, F.; Galceran, M. T.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506*, 71.
17. Chang, S.; Doong, R.; *Chemosphere* **2006**, *62*, 1869.
18. Gonçalves, C.; Alpendurada, M. F.; *Talanta* **2005**, *65*, 1179.
19. Pan, J.; Xia, X. X.; Liang, J.; *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15*, 25.
20. van der Hoff, R. G.; van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *843*, 301.
21. Liu, Z. Y.; Phillips, J.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227.
22. Pedroso, M. P.; Godoy, L. A. F.; Fidélis, C. H. V.; Ferreira, E. C.; Poppi, R. J.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 421.
23. Górecki, T.; Harynuk, J.; Panić, O.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 359.
24. Pegasus HT and ChromaTOF Software Instruction Manual, Version 3.3, Leco, St. Joseph, MI, 2007.
25. Phillips, J. B.; Xu, J.; *J Chromatogr. A* **1995**, *703*, 327.
26. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J Chromatogr. A* **1999**, *856*, 331.
27. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 101.
28. Pizzutti, I. R.; Vreuls, R. J. J.; Kok, A.; Roehrs, R.; Martel, S.; Friggi, C. A.; Zanella, R.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3305.
29. Bordajandi, L. R.; Ramos, J. J.; Sanz, J.; González, M. J.; Ramos, L.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 312.
30. Bordajandi, L. R.; Ramos, L.; González, M. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 220.
31. Korytár, P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1086*, 29.
32. Khummueng, W.; Trenerry, C.; Rose, G.; Marriott, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131*, 203.
33. Korytár, P.; van Stee, L. L. P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *994*, 179.
34. Focant, J. F.; Sjdin, A.; Turner, W. E.; Patterson, D. G.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6313.
35. Zrostlíková, J.; Hajslová, J.; Cajka, T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1019*, 173.
36. Schurek, J.; Portolés, T.; Hajslova, J.; Riddellova, K.; Hernández, F.; *Anal. Chem. Acta* **2008**, *611*, 163.
37. Ong, R.; Marriott, P.; Morrison, P.; Haglund, P.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *962*, 135.

38. Liu, Z.; Sirimanne, S. R.; Patterson, D.G.; Needham, L.; Phillips, J. B.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3086.
39. Cochran, J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 202.
40. van der Lee, M. K.; van der Weg, G.; Traag, W. A.; Mol, H. G. J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 325.
41. You, J.; Weston, D. P.; Lydy, M. J.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 141.
42. Silva, J. M.; Zini, C. A.; Canizares, E. M. P. N.; Leal, K, A.; Caramão, E. B.; *Quim. Nova*, no prelo.
43. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
44. Lanças, F. M.; *Validação de Métodos Cromatográficos*, 1ª ed., Rima, 2006.
45. INMETRO; *Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, 2007.
46. Wisconsin Department of Natural Resources; *Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits*, 1996.
47. Banerjee, K.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Savant, R.; Adsule, P. G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 350.
48. Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvatori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S.; *Rev. Bras. Toxicol.* **1998**, *11*, 1.
49. Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente* **2003**, *13*, 129.
50. Grob, R. L.; Barry, E. F.; *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley, 2004.
51. Barboza, J. C. S.; Serra, A. A.; *Quim. Nova* **1992**, *15*, 301.
52. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>, acessada em: novembro, 2007.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de cores obtido para a mistura de padrões a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

1) Tricloroguaiacol (PI), 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I e II, 5) Trifloxistrobina, 6) Permetrina *cis* e *trans*, 7) Difenconazol I e II e 8) Azoxistrobina.

Figura 2. Diagrama tridimensional (3D) com reconstrução dos cromatogramas da ^1D e ^2D : **(A)** dos padrões na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, **(B)** da amostra fortificada a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$.

1) Tricloroguaiacol (PI), 2) Propanil, 3) Fipronil, 4) Propiconazol I e II, 5) Trifloxistrobina, 6) Permetrina *cis* e *trans*, 7) Difenconazol I e II e 8) Azoxistrobina.

FIGURA 1

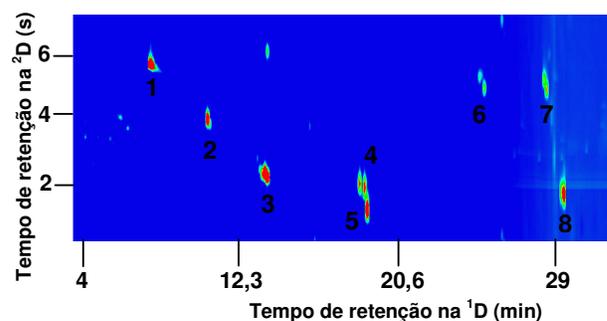
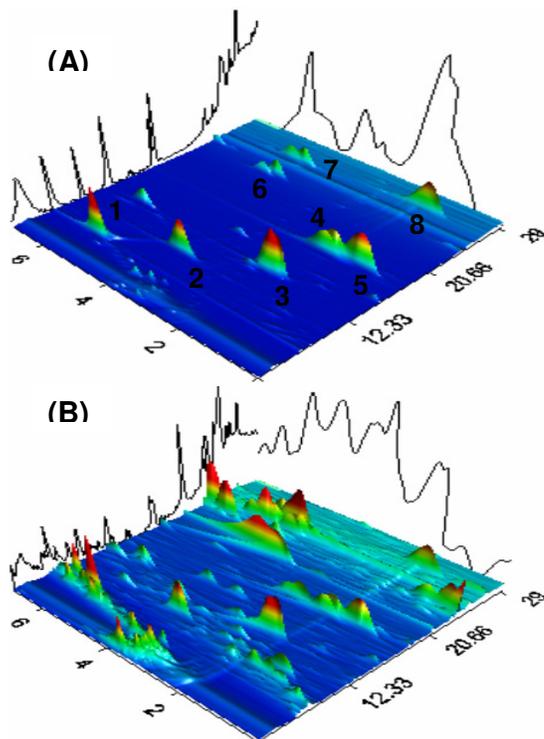


FIGURA 2



TABELAS

Tabela 1. Aplicações da GC × GC a agrotóxicos e outros poluentes em diferentes matrizes.

Analitos	Tipo de amostra	Deteção	Ref.
Seis compostos da classe dos piretróides	Uva	μECD	28
Agrotóxicos organoclorados (OCPs), bifenilas policloradas (PCBs), éteres difenílicos policlorados (PBDEs), dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), naftalenos policlorados (PCNs), terfenilas policloradas (PCTs) e toxafeno (CTT)	Carne de porco, ovos e leite materno	μECD	29
Cinco enantiômeros do toxafeno	Óleo de peixe	μECD	30
Agrotóxicos organoclorados (OCPs), bifenilas policloradas (PCBs) e polibromadas (PBBs), éteres difenílicos policlorados (PBDEs), dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), naftalenos policlorados (PCNs), terfenils policlorados (PCTs), toxafeno (CTT), naftalenos (PCNs) e dibenzotiofenos (PCDTs)	Sedimento e poeira	μECD	31

Analitos	Tipo de amostra	Deteção	Ref.
Nove fungicidas	Vegetais	μECD	32
Toxafeno	Misturas técnicas	μECD	33
Éteres difenílicos policlorados, bifenilas policloradas (PCBs) e polibromadas (PBBs) e agrotóxicos organoclorados (OCPs)	Leite e soro humano	TOFMS	34
20 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Maçã e pêsego	TOFMS	35
36 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Chás de frutas, verde e preto	TOFMS	36
Compostos organoclorados, tridecano, benzenos, fenóis, naftalenos aminas e ftalatos	Mistura de padrões	FID	37
15 agrotóxicos de diferentes classes químicas	Soro humano	FID	38
32 compostos pertencentes à classe dos organoclorados e organofosforados	Fumo	TOFMS	39
106 agrotóxicos e outros poluentes, como PCBs e HPAs	Cereal	TOFMS	40

Tabela 2. Localização geográfica e características físico-químicas dos sedimentos analisados.

Amostra	Localização Geográfica	Carbono Orgânico	Cascalho	Areia			Argila
				Silte (%)			
SD ₁	31° 8' 11" – latitude sul	2,53	3,20	70,97	19,49	6,33	
	54° 22' 42" – longitude oeste						
SD ₂	30° 16' 49" – latitude sul	0,99	0	83,11	10,20	6,69	
	54° 54' 10" – longitude oeste						
Amostra controle	29° 56' 10" – latitude sul	1,98	24,90	66,20	5,08	3,77	
	50° 36' 05" – longitude oeste						

Tabela 3. Parâmetros da curva de calibração para os compostos estudados.

Compostos	Equação da Reta	r ²	Linearidade (µg L ⁻¹)
Propanil	y = 0,0023x + 0,0186	0,9992	5 - 295
Fipronil	y = 0,0061x + 0,0756	0,9945	5 - 415
Propiconazol ^a	y = 0,0044x - 0,0234	0,9920	15 - 295
Trifloxistrobina	y = 0,0029x + 0,0061	0,9993	5 - 415
Permetrina ^b	y = 0,001x + 0,0013	0,9990	5 - 295
Difenoconazol	y = 0,0014x - 0,0058	0,9942	5 - 415
Azoxistrobina	y = 0,0027x + 0,0092	0,9963	5 - 415

^{a,b} Soma dos isômeros.

Tabela 4. Níveis de recuperação em base seca e coeficiente de variação (CV %) para os compostos estudados em sedimento.

Nível de fortificação	15 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		30 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		150 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Propanil	74	13	67	9	60	20
Fipronil	64	14	67	11	65	18
Propiconazol ^a	54	7	61	9	47	18
Trifloxistrobina	40	9	52	9	42	16
Permetrina ^b	133	20	52	30	39	23
Difenoconazol	254	15	115	9	92	24
Azoxistrobina	127	14	78	9	62	20

^{a,b} Soma dos isômeros.

Tabela 5. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) instrumentais e o MDL para os compostos estudados por GC × GC.

Compostos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MDL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Propanil	1,07	3,23	2,95
Fipronil	0,26	0,77	3,06
Propiconazol ^a	0,08	0,25	1,92
Trifloxistrobina	0,25	0,74	1,97
Permetrina ^b	0,19	0,58	2,44
Difenoconazol	0,64	1,94	4,43
Azoxistrobina	0,35	1,06	2,36

^{a,b} Soma dos isômeros.