

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

**Desenvolvimento de Procedimento Analítico para Determinação  
de Fármacos e Pesticidas em Amostra Aquosas Ambientais.**

**ANA CRISTINA BORBA DA CUNHA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Química.

**Janeiro, 2005**

O presente trabalho foi realizado entre março de 2000 e janeiro de 2005, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, sob a orientação do Professor Doutor João Henrique Zimnoch dos Santos e co-orientação da Professora Tânia Mara Pizzolato.

Essa Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de **DOUTOR EM QUÍMICA**, e aprovada em sua forma final pelo orientador, co-orientadora e pela Comissão Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS

Orientador: Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Co-orientadora: Dra. Tânia Mara Pizzolato.

Banca Examinadora: Dr. Renato Zanela  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Dr. Marçal José Rodrigues Pires  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- IQ/PUCRS

Dr. Pedro Eduardo Fröelich  
Faculdade de Farmácia – UFRGS

Dr. Celso Camilo Moro  
Instituto de Química – IQ/UFRGS

Coordenador da Pós-Graduação: Adriano Lisboa Monteiro

Ao meu marido **Heraldo** e meu filho **Cauê** pelo amor e tolerância dedicados durante esses quatro anos de trabalho.

Aos meus pais **Marcus e Arlete** pelo apoio incessante em todos os momentos.

Aos meus irmãos **Marcus Jr e George** “pela eterna parceria”.

## Agradecimentos

Aos meus orientadores João Henrique e Tânia pela amizade solidificada no decorrer desses anos, fortalecida pela atenção dispensada em todos esses anos, principalmente nos últimos meses de trabalho.

Ao UNILASALLE pelo apoio financeiro e tolerância.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seus funcionários em especial a Helga pelo apoio administrativo.

Ao grande amigo e professor Celso Camilo Moro pelo exemplo de profissionalismo e de competência, dignificando a profissão de professor, servindo de fonte de inspiração para diversos alunos.

A amiga e professora Maria do Carmo pelas valiosas trocas de informações durante a realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial Adriana e Fabiana.

Aos amigos: Ana Genta, Dudu, Chérída, Márcio, Ivana, Antônio Carlos, Zuleima, Zortéa, Marta, Mariur, Marcelo, Isabel, Guilherme, Gracianine, Marlete, Lucas pelo auxílio durante esse trabalho principalmente durante minha estadia em Barcelona.

Aos meus familiares Heraldo Cauê, Marcus, Arlete, Marcus Jr, George, Laura e Aline pelo carinho e atenção.

Ao prof. Dr Damià Barceló e Dra Miren pela recepção e auxílio durante minha estadia em Barcelona

Ao grupo de alunos do laboratório do Prof. Damià Barceló

## TRABALHO GERADO

Multianalyte Determination of Different Classes of Pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, organophosphates, molinate and propanil) by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem-Mass spectrometry.

Ana Cristina Borba da Cunha, Maria J. López de Alda, Damià Barceló, Tânia Mara Pizzolatto, João Henrique Z. dos Santos.

**Anal. Bioanal. Chem (2004) 378:940-954**

## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS.....  | ix   |
| LISTA DE TABELAS.....  | xi   |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....                                  | xiii |
| RESUMO.....  | xv   |
| ABSTRACT.....  | xvii |
| 1.INTRODUÇÃO.....  | 1    |
| 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 8    |
| 2.1.FÁRMACOS.....  | 8    |
| 2.2. PESTICIDAS.....   | 10   |
| 2.2.1.Pesticidas Organoclorados.....                                   | 10   |
| 2.2.2.Pesticidas Organofosforados .....                                | 11   |
| 2.2.3.Pesticidas Carbomatos e Tiocarbonatos .....                      | 11   |
| 2.2.4.Pesticidas Fenoxiacéticos (Pesticidas ácidos) .....              | 11   |
| 2.2.5.Pesticidas Triazinas .....                                       | 11   |
| 2.2.6.Pesticidas Feniluréia .....                                      | 12   |
| 2.2.7.Pesticidas Piridínico .....                                      | 12   |
| 2.2.8.Pesticidas Piretroides .....                                     | 12   |
| 2.2.9.Pesticidas Anilinas .....  | 12   |
| 2.2.10.Outros Pesticidas.....  | 12   |
| 2.3.Propriedades Físico-Químicas.....                                  | 15   |
| 2.3.1.Solubilidade em Água.....  | 15   |
| 2.3.2.Coefficiente de Partição Octanol-Água (log Kow ou log Pow) ..... | 15   |
| 2.3.3.Constante de Ionização Ácido-Base (Ka) .....                     | 16   |
| 2.3.4. Pressão de Vapor.....   | 16   |
| 2.3.5.Constante de Henry (H ou $K_H$ ) .....                           | 16   |
| 2.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....                               | 19   |
| 3.MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 27   |
| 3.1.FÁRMACOS.....  | 27   |
| 3.1.1.Materiais.....   | 27   |
| 3.1.1.2.Síntese das fases à base de zirconocenos.....                  | 28   |
| 3.1.2.Métodos.....   | 28   |
| 3.1.2.1.Quantificação.....   | 28   |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.2.2. Determinação de Comprimento de Onda ( $\lambda$ ) de trabalho.....         | 29 |
| 3.1.2.3. Fase Móvel.....  | 29 |
| 3.1.2.4. Limite de Detecção (LDO), Limite de Quantificação (LOQ) e Linearidade..... | 23 |
| 3.1.2.5. Instrumentos.....  | 30 |
| 3.1.2.6. Derivatização com Diazometano.....   | 30 |
| 3.1.2.7. Procedimentos para Extração em Fase Sólida.....                            | 31 |
| 3.1.2.7.1. Fases Comerciais.....  | 31 |
| 3.1.2.7.2. Fases à base de sílica funcionalizada com zirconocenos .....             | 32 |
| 3.1.2.7.3. Recuperação.....   | 33 |
| 3.1.2.8. Degradação do Fármaco.....   | 33 |
| 3.1.2.9. Amostra Real (para tetraciclina).....                                      | 34 |
| 3.2. PESTICIDAS .....   | 35 |
| 3.2.1. Materiais.....   | 35 |
| 3.2.2. Métodos.....   | 35 |
| 3.2.2.1. Quantificação.....   | 35 |
| 3.2.2.2. Coluna Analítica – LC-DAD.....   | 35 |
| 3.2.2.3. Fase Móvel –LC-DAD.....  | 36 |
| 3.2.2.4. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....              | 36 |
| 3.2.2.5. Instrumentos.....  | 36 |
| 3.2.2.5.1. LC-DAD-MS-MS.....  | 36 |
| 3.2.2.5.2. Sistema de Extração em Fase Sólida.....                                  | 37 |
| 3.2.2.6. Parâmetros para MS-MS.....   | 37 |
| 3.2.2.7. Curva de Analítica.....  | 38 |
| 3.2.2.8. SPE <i>on line</i> .....   | 38 |
| 3.2.2.9. Efeito do pH e da Presença de Ácidos Húmicos.....                          | 40 |
| 3.2.2.10. Amostra Real.....   | 41 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....   | 42 |
| 4.1. FÁRMACOS.....  | 42 |
| 4.1.1. Avaliação e Seleção da Fase Móvel.....                                       | 42 |
| 4.1.2. Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Linearidade .....              | 46 |
| 4.1.3. Extração em Fase Sólida.....   | 47 |
| 4.1.4. Degradação dos Fármacos.....   | 53 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1.5. Amostra Real.....  | 54 |
| 4.2. PESTICIDAS .....   | 55 |
| 4.2.1. Separação Cromatográfica.....                            | 55 |
| 4.2.2. Composição da Fase Móvel.....                            | 55 |
| 4.2.3. Otimização MS-MS.....                                    | 57 |
| 4.2.4. Estudo das Fragmentações.....                            | 61 |
| 4.2.5. Otimização da Extração em Fase Sólida (SPE on Line)..... | 63 |
| 4.2.6. Influência do pH e Ácidos Húmicos.....                   | 66 |
| 4.2.7. Desempenho do Método e do Instrumento.....               | 68 |
| 4.2.8. Aplicação do método em Amostra Real .....                | 71 |
| 5. CONCLUSÃO.....   | 74 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                              | 77 |
| 7. ANEXOS.....  | 84 |
| 7.1. Anexo 1.....   | 84 |
| 7.2. Anexo 2.....   | 84 |
| 7.3 Anexo 3.....  | 85 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1: Representação esquemática da contaminação do meio ambiente por pesticidas....  | 4  |
| FIGURA 2: Fórmula estrutural dos fármacos em estudo.....   | 9  |
| FIGURA 3: Estrutura dos pesticidas em estudo.....  | 13 |
| FIGURA 4: Comparação entre SPE <i>off line</i> e SPE <i>on line</i> (utilizando-se sistema Prospekt)...  | 25 |
| FIGURA 5: Esquema para o procedimento experimental de derivatização da amoxicilina com diazometano.....  | 30 |
| FIGURA 6: Sistema Prospekt.....  | 37 |
| FIGURA 7: Fotografia do cartucho PLRP-s.....   | 39 |
| FIGURA 8: Valores de recuperação da cefalexina as fases sintetizadas à base de sílica funcionalizada com a mistura de solventes 0,1% de ácido acético e acetonitrila (60:40), 1% de ácido acético e acetonitrila (60:40) e 1,25% de ácido acético e metanol (70:30)..... | 52 |
| FIGURA 9: Valores de recuperação da tetraciclina nas fases sintetizadas à base de sílica funcionalizada com os solventes 0,01 mol/L ácido oxálico/acetonitrila/metanol (73:17:10) e 0,01 mol L <sup>-1</sup> ácido oxálico / metanol (60:40).....                        | 52 |
| FIGURA 10: Comparação da degradação da área do pico cromatográfico da cefalexina: no momento da preparação e após 24 horas.....  | 54 |
| FIGURA 11: Separação cromatográfica com acetonitrila / água ultrapura por LC-DAD.....  | 56 |
| FIGURA 12: Cromatograma do padrão múltiplo de pesticidas em modo de ionização positivo ( <i>ESI +</i> ).....   | 56 |
| FIGURA 13: Cromatograma do padrão múltiplo de pesticidas em modo de ionização negativo ( <i>ESI -</i> ).....   | 57 |
| FIGURA 14: Influência da voltagem do capilar no sinal MS .....   | 60 |
| FIGURA 15: Cromatogramas obtidos para análise de uma mistura de padrão de pesticidas de 100 µg L <sup>-1</sup> por LC-ESI(+)MS-MS.....   | 61 |
| FIGURA 16 Cromatogramas obtidos para análise de uma mistura de padrão de pesticidas de 100 µg L <sup>-1</sup> por LC-ESI(-)MS-MS.....  | 62 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 17: Diferentes fases avaliadas em diferentes volumes de extração 20 e 40 mL com concentração 100 ng L <sup>-1</sup> .....                     | 66 |
| FIGURA 18: Diferentes valores de pH (5,0; 7,0 e 9,0) para os grupos representativos dos pesticidas em estudo.....                                    | 67 |
| FIGURA 19: Efeito de ácidos húmicos nos pesticidas em estudo .....   | 68 |
| FIGURA 20: Número de vezes de reutilização dos cartuchos PRLPs (ionização positiva ) e Hysphere Resin GP (ionização negativa).....                   | 71 |
| FIGURA 21: Concentração total de pesticidas detectada durante o processo de purificação da água na estação Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha)..... | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA I: Pesticidas e seus alvos.....  | 3  |
| TABELA II: Limites máximos permitidos para alguns pesticidas em águas doces, classe 1 <sup>a</sup> pelo CONAMA.....   | 5  |
| TABELA III: Propriedades Físico-Químicas dos pesticidas empregado nesse trabalho.....   | 18 |
| TABELA IV: Algumas propriedades físico-químicas para os fármaco em estudo.....  | 19 |
| TABELA V: Exemplos de aplicação de SPE <i>on line</i> na quantificação de pesticidas por HPLC   |    |
| TABELA VI: Exemplos de aplicação de SPE <i>off line</i> na quantificação de pesticidas por HPLC.....  | 23 |
| TABELA VII: Gradiente para a fase móvel acetonitrila/água.....  | 36 |
| TABELA VIII: Programação utilizada para eluição dos analitos.....   | 40 |
| TABELA IX: Composição das fases móveis empregadas para a separação dos fármacos em estudo.....  | 42 |
| TABELA X: Tempo de retenção( $t_r$ ), tempo de retenção corrigido ( $t_r'$ ) tempo morto ( $t_m$ ), número de pratos teóricos (N) e fator capacidade (k) para os quatro fármacos em estudo, utilizando diversas fases móveis.....   | 45 |
| TABELA XI: Avaliação da fase móvel, vazão, tempo de retenção ( $t_r$ ) e RSD para cada fármaco.....   | 46 |
| TABELA XII: Coeficiente de correlação (r), limite de detecção do instrumento ( $LOD_i$ ) e limite de quantificação do instrumento ( $LOQ_i$ ) .....   | 47 |
| TABELA XIII: Recuperação da tetraciclina para os experimentos de SPE, em três fases comerciais eluídas com solventes e/ou mistura de solventes.....   | 48 |
| TABELA XIV: Recuperação da Cefalexina para os experimentos de SPE, em três fases comerciais eluídas com solventes e/ou mistura de solventes (n=3).....  | 49 |
| TABELA XV: Recuperação da cefalexina para os experimentos de SPE, em uma fase comercial (LC-18), (Me-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> , (nBu-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> e (iBu-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> eluídas com solventes e/ou mistura de solventes .....                       | 50 |
| TABELA XVI: Recuperação da tetraciclina para os experimentos de SPE, em uma fase comercial (LC-18), e nas fases (Me-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> , (nBu-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> , (iBu-Cp) <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> e LC-18 eluídas com solventes e/ou mistura de solventes..... | 51 |

|  |    |
|--|----|
| TABELA XVII: Condições otimizadas de análises de pesticidas ácidos e propanil por LC-ESI(-)-MS-MS.....   | 58 |
| TABELA XVIII: Condições otimizadas de análise de pesticidas molinato e outros pesticidas pertencentes ao grupo de triazinas, feniluréias, anilinas e organofosforados por LC-ESI (+)-MS-MS.....  | 59 |
| TABELA XIX: Otimização dos parâmetros MS-MS.....   | 60 |
| TABELA XX: Comparação da percentagem de recuperação obtida a partir das análises para 20 e 40 mL de volume de amostra de água grau HPLC com a solução padrão dos pesticidas em estudo (100 ng L <sup>-1</sup> ) extraídas nas fases estudados.....                                 | 64 |
| TABELA XXI: Coeficiente de correlação (r), limite de detecção do método (LOD <sub>M</sub> ), limite de quantificação do método (LOQ <sub>M</sub> ) e limite de quantificação do instrumento (LOQ <sub>i</sub> ) obtido nas análises dos pesticidas estudados por LC-ESI-MS-MS..... | 69 |
| TABELA XXII: Concentração (em ng L <sup>-1</sup> ) dos pesticidas em amostras de água coletada durante o processo de purificação na estação de água Sant Joan Despi (Barcelona).....   | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 2,4 D- (2,4 diclorofenox), Ácido  
2,4,5-T-2-(2,4,5 triclorofenox) Ácido  
2,4,5-TP-Ácido 2-(2,4,5-triclorofenox) propanóico  
ACN-acetonitrila  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APCI – Ionização Química à Qressão Atmosférica., do inglês Atmosphere Pressure Chemical Ionization  
ASE – Extração Acelerada com Solvente, do inglês Acelerade Solvente Extraction  
CFCs – Clorofluorcarbonetos  
CONAMA –Conselho Nacional do Meio Ambiente  
DAD – Detecção por Arranjo de Diodos em série, do inglês Diode Array Detector  
DDT –Inseticida. Nome Químico: 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano  
DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto  
ECD – Detector de Captura de Elétrons, do inglês Electron Capture Detector  
EPA - Agência de Proteção Ambiental Americana, do inglês Environmental Protection Agency  
ESI- Spray Eletrônico, do inglês Eletrospray  
ETA – Estação de Tratamento de Afluenta  
ETEs- Estações de Tratamento de Efluentes  
FID – Detector de Ionização de Chama, do inglês Flame Ionization Detector  
GC –Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography  
H – Constante de Henry  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid Clromatography  
k – Fator de capacidade  
 $K_H$  - Constante de Henry  
Kow –Coeficiente de distribuução octanol-água  
LC –Cromatografia líquida, do inglês Liquid Chromatography  
LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês Liquid-Liquid Extraction  
LOD – Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification  
MASE –Extração Assistida por Microondas, do inglês Microwave Assisted Solid Extraction  
MCCP - Mecoprop  
MCPA – Ácido Aril Oxanóico  
MP – Mediamente Polar  
MRM-do inglês: Multiply Reaction Monitoring  
MS – Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry  
n – Número de Medidas  
N – Número de Pratos Teóricos  
ODS – Octadecilsilano  
P- Polar  
P.M. – Peso Molecular  
Pv- Pressão de Vapor  
RBS Espectrometria de Retroespalhamento Rutherford, do inglês Rutherford Backscattwring Spectrometry  
RP – Fase Reversa, do inglês Reversed Phase  
RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Desviation  
SFE – Extração com Fluido Supercrítico, do inglês Supercritic Fluid Extraction  
SPE – Extração em Fase Sólida do inglês Solid-Phase Extraction  
TM – Tempo Morto  
TR – Tempo de Retenção  
UV- Radiação Ultravioleta  
V – Volt  
V – Volume  
Z – carga

## RESUMO

O presente trabalho conjuga estudo de fármacos e pesticidas em nível de traços como poluentes no meio aquoso, envolvendo o uso de cromatografia líquida com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta (HPLC-UV) para fármacos e cromatografia líquida com detector espectrométrico de massas (LC-ESI-MS-MS) para pesticidas.

Quatro fármacos (antibióticos), a saber: ampicilina, amoxicilina, tetraciclina e cefalexina, foram avaliados em presença de diversas fases móveis, que foram selecionadas de acordo com a melhor performance cromatográfica, sendo que ampicilina e amoxicilina apresentaram melhor performance cromatográfica na mesma fase móvel. Para extração em fase sólida dos fármacos amoxicilina e ampicilina foram avaliados três fases comerciais: LC-18 (SUPELCLEAN), Supelclean™ ENVI™-Chrom P, Absolut NEXUS. Para os fármacos cefalexina e tetraciclina, além das fases comerciais foram avaliadas três novas fases a base de sílicas funcionalizadas com zirconocenos:  $(\text{MeCp})_2\text{ZrCl}_2$ ,  $(\text{nBuCp})_2\text{ZrCl}_2$  e  $(\text{iBuCp})_2\text{ZrCl}_2$ .

Amoxicilina e ampicilina não apresentaram boas recuperações nas fases e eluentes estudados. Para tetraciclina e cefalexina, a fase comercial Chrom P apresentou boas recuperações quando utilizados os solventes metanol e a mistura 1% de solução aquosa de ácido acético e metanol (60:40), respectivamente.

Com relação aos pesticidas, diversas classes (triazinas, feniluréias, organofosforados, anilina, ácidos, molinato e propanil) foram estudadas, somando um total de 20 pesticidas. Três colunas foram avaliadas em diferentes gradientes. Foi selecionada a coluna Purospher START RP e o gradiente acetonitrila-água. Triazinas, feniluréias, organofosforados, anilinas e o pesticida propanil foram determinadas em modo de *ionização spray eletrônico* positivo, os pesticidas ácidos e propanil foram determinados em modo de *ionização spray eletrônico* negativo. Para cada pesticida foi encontrada duas transições (íon produtor-íon produzido) e confirmadas por MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). O método apresentou linearidade com coeficientes de correlação maiores que 0,99. Uma metodologia para

extração em fase sólida *on line* foi também desenvolvida. Essa metodologia apresentou-se altamente sensível (limites de detecção entre 0,040 e 2,794 ng L<sup>-1</sup>), simples rápida (45 minutos por análise) e precisa (desvio padrão relativo entre 1,99 e 12,15 %).



## ABSTRACT

The present work combines the study of pharmaceutical and pesticides in trace level as organic pollutants in water, involving the use of liquid chromatography with UV spectrophotometer detector (HPLC-UV) for pharmaceuticals and liquid chromatography with mass spectrometer detector (LC-ESI-MS-MS) for pesticides.

Four pharmaceuticals (antibiotics), namely: Ampiciline, amoxyline, tetracycline and cephalaxine were evaluated in the presence of different mobile phases, which were selected according to the best performance in chromatographic run, having both ampiciline and amoxiline the best conditions in the same mobile phase. For the solid phase extraction, amoxiline and ampiciline were evaluated in three commercial phases: LC-18 (SUPELCLEAN), Supelclean™ ENVI TM-Chrom P, Absolut NEXUS. Cephalaxine and tetracycline were evaluated in the same commercial phases and in new silica-based materials, produced by grafting  $(\text{MeCp})_2\text{ZrCl}_2$ ,  $(\text{nBuCp})_2\text{ZrCl}_2$  and  $(\text{iBuCp})_2\text{ZrCl}_2$  on silica support.

Amoxyline and ampiciline did not showed good recovery results in the studied cartridges and eluants. For tetracycline and cephalaxine, the Chrom P cartridges presented better recoveries when methanol and the mixture 1 % aqueous acetic acid/methanol (60:40) solution were employed, respectively.

Concerning the pesticides, different classes (triazines, phenylurea, organophosphate, aniline, acids, molinate and propanyl) were studied, in a total of 20 pesticides. Three columns were evaluated in different gradients. Purospher START RP column and the mixture acetonitrile/water were selected. Triazines, phenylureas, organophosphate, anilines and propanyl were determined in positive ionization eletrospray mode, while acid pesticides and propanyl were determined in negative one. For each pesticide, two transitions were observed (producer ion-produced ion) and confirmed by MRM (Multiple Reaction Monitoring). The method presented linearity with correlation factor higher than 0.99. A methodology for on line solid phase extraction was developed. This methodology presented high sensitivity (detection limits between 0.040 and 2.794 ng L<sup>-1</sup>). It was simple

and rapid (45 minutes by sample) and with good precision (standard deviation between 1.99 and 12.15 %).

# 1. INTRODUÇÃO

A contaminação do meio hídrico por compostos orgânicos é um fenômeno que torna-se cada vez mais importante devido principalmente ao aumento constante na produção e consumo de substâncias orgânicas sintéticas. Estima-se que atualmente o número de compostos sintéticos é em torno de 1,8 milhões e que a cada ano são sintetizados 250 mil compostos novos. Calcula-se que a quantidade de substâncias orgânicas produzidas esteja em torno de 100 e 200 milhões de toneladas por ano. Inevitavelmente, depois de utilizados, os resíduos podem acabar sendo lançados no meio hídrico<sup>i</sup>

Inicialmente, acreditava-se que os produtos químicos lançados no ambiente seriam assimilados pela natureza: ou o sistema natural transformaria-os em substância de ocorrência natural, não prejudiciais, ou os produtos químicos seriam diluídos em tal extensão que não poderiam ser atribuídos aos mesmos quaisquer riscos à vida. A estratégia de que “*a solução para a poluição é a diluição*” é de fato bem sucedida para alguns poluentes. Porém, no século passado, ficou bem claro que muitos produtos químicos sintéticos não são assimilados porque são persistentes, isto é, não são alterados pela ação da luz, água, ar ou microorganismos (que atuam com frequência na degradação de muitos poluentes) mesmo passados muitos anos. Exemplos dessas substâncias persistentes incluem pesticidas como DDT, gases de refrigeração denominados CFCs (clorofluorcarbonetos), e as formas tóxicas do elemento mercúrio. Devido a sua persistência e contínua liberação, as concentrações ambientais de tais substâncias aumentaram no passado em níveis inquietantes. Além disso, foi descoberto que muitas substâncias persistentes não se tornam uniformemente dispersas no meio ambiente. Ao contrário, concentram-se em organismos vivos, podendo atingir seres humanos e outros animais em níveis que, em alguns casos, afetam à saúde e até levam à morte prematura<sup>1</sup>.

Os poluentes químicos compreendem várias classes de compostos, dentre as quais fármacos e pesticidas.

Atualmente, fármacos e seus metabólicos vêm chamando muita atenção. Nos últimos anos, milhões de toneladas de fármacos têm sido produzidos, prescritos por médicos e consumidos tanto pelo homem como por animais. Quando um fármaco entra no organismo é transformado, total ou parcialmente, em outras substâncias. A biotransformação ou metabolismo dos fármacos dá lugar à formação de compostos mais solúveis em água que, não sendo quase absorvidos nos canais renais, podem ser excretados com facilidade. Os processos

de biotransformação e de excreção são essenciais para que cesse a atividade biológica do fármaco e esse seja eliminado pelo organismo. As modificações químicas que surgem no processo metabólico são responsáveis pela perda total ou parcial da atividade dos fármacos. Assim, as substâncias que se formam denominam-se metabólitos e podendo não ter atividade farmacológica, ou serem ativos a partir de um fármaco inativo (que também podem ser denominados de pós-fármaco)<sup>ii</sup>. Segundo Richardson e colaboradores<sup>iii</sup>, nas estações de tratamento de efluentes (ETEs) há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual:

- pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como é o caso do ácido acetilsalicílico;
- pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como ocorre com as penicilinas;
- e, finalmente, pode ser persistente, como o clofibrato que é um antilipêmico.

De um modo geral, os fármacos e seus metabólitos que resistem à decomposição, causam diversos riscos à saúde humana e à vida animal, ameaçando o ecossistema, aumentando a resistência a antibióticos<sup>iv,v</sup> e, entrando nos sistemas de esgoto, passando pela planta de tratamento de água e acabando em águas consumidas por humanos e animais<sup>5</sup>.

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Pouco sabe-se sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau<sup>vi</sup>. De toda forma, os efeitos atravessam toda a hierarquia biológica, indo desde células e órgãos; passando por organismos, população e até mesmo ecossistema. De acordo com Jorgensen e colaboradores<sup>6</sup>, alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e já há indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica seja ainda favorecido por essas baixas concentrações.

Os pesticidas, produtos utilizados para o controle de pragas, doenças e ervas daninhas estão entre os principais instrumentos de controle para o desenvolvimento da agricultura brasileira.

O uso de pesticidas ou agrotóxicos encontra-se vinculado a fatores econômicos. O aumento na produção de alimentos de maneira sustentável é o grande desafio atual da produção agrícola. Esse aumento depende em parte do controle de organismos que deterioram de alguma forma os produtos agrícolas. Pesticidas podem atuar diretamente matando um

organismo indesejável ou indiretamente através do controle do processo reprodutivo<sup>vii</sup>. A tabela I exemplifica as diversas classes de pesticidas.

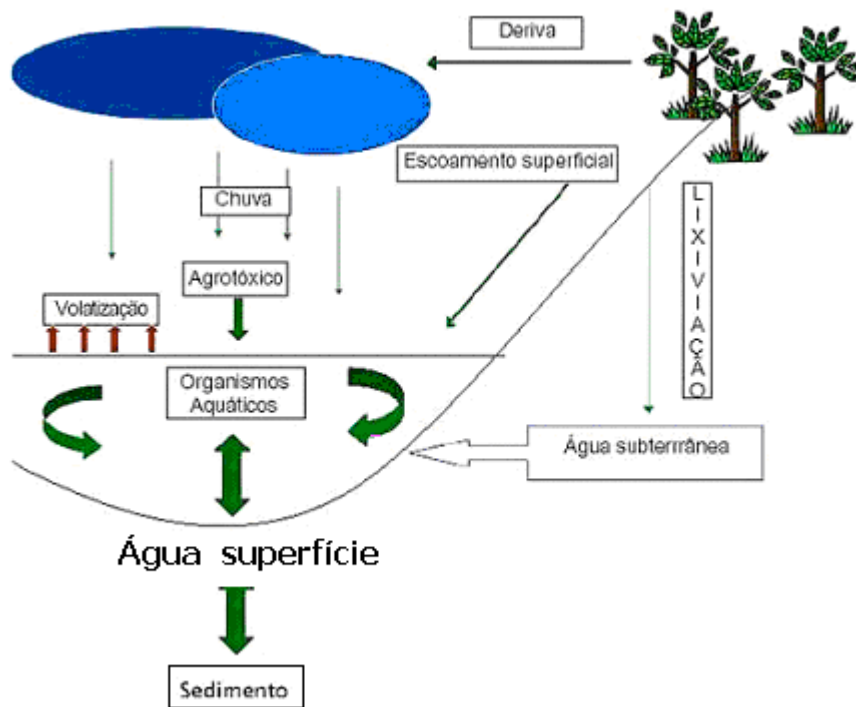
**Tabela I:** Pesticidas e seus alvos

| <b>Tipo de Pesticida</b> | <b>Organismo-Alvo</b> | <b>Tipo de Pesticida</b> | <b>Organismo -Alvo</b> |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| Acaricida                | Ácaros                | Herbicida                | Plantas                |
| Algicida                 | Algas                 | Inseticida               | Insetos                |
| Avicida                  | Pássaros              | Larvicida                | Larvas de Insetos      |
| Bactericida              | Bactérias             | Moluscicida              | Caracóis               |
| Desinfetante             | Microrganismos        | Nematicida               | Nematóide              |
| Fungicida                | Fungos                | Piscicida                | Peixes                 |
| Raticida                 | Roedores              |                          |                        |

FONTE: Colin Baird, 2002<sup>1</sup>.

Não se pode negar que esses produtos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças. Entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Dentre os efeitos nocivos ao ambiente podem ser citados a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e nos animais<sup>viiiix</sup>.

Pesticidas podem ser persistentes, acumulando-se no solo e na biota e seus resíduos podem chegar às águas de superfície, águas subterrâneas, sedimentos e organismos aquáticos por escoamento superficial, lixiviação ou pelo ciclo do meio ambiente<sup>9</sup> (figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática da contaminação do meio ambiente por pesticidas.

A lixiviação dos agrotóxicos através dos solos pode ocasionar a contaminação dos lençóis freáticos. Desta forma, além de afetar os próprios cursos de água superficiais, os agrotóxicos podem alcançar os lençóis freáticos cuja descontaminação apresenta grande dificuldade. Certas práticas agrícolas ligadas ao modelo de produção agrícola predominante, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não-preservação das matas ciliares<sup>1</sup> e das vegetações protetoras de nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos<sup>1,9, x</sup>.

A exposição humana e ambiental a esses produtos cresce em importância pelo aumento do volume de vendas. O uso intensivo de agrotóxicos está associado ao aumento de riscos à saúde da população, tanto dos consumidores, quanto dos trabalhadores que lidam diretamente com os produtos, como também a contaminação de alimentos e a degradação do meio ambiente<sup>2</sup>. A Comunidade Européia fixou em  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  o nível máximo para pesticidas individuais e  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para pesticidas totais em águas potáveis<sup>xi</sup>. Por sua vez, o EPA,

<sup>1</sup> Vegetação marginal de rios, lagos e lagoas.

(Agência de Proteção Ambiental Americana) estabeleceu níveis individuais para pesticidas em água potável, tais como alacloro,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ; atrazina,  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ; metolacloro,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e simazina  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  <sup>xii</sup>.

A resolução número 020/86, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA)<sup>xiii</sup> sobre a classificação e enquadramento de corpos de água estabelece os limites máximos para alguns pesticidas em águas doces <sup>13</sup> O texto aprovado na 42ª Reunião Extraordinária e na 76ª Reunião Ordinária do CONAMA, denominada Proposta de Resolução 15/12/2004 amplia a lista desses pesticidas e diminui os limites máximos permitidos dos pesticidas já listados na resolução 020/86 para águas doces. A tabela II apresenta os pesticidas citados na proposta de resolução revisada em 15/12/2004 e os limites máximos para esses.

**Tabela II:** Limites máximos permitidos para alguns pesticidas em águas doces, classe 1ª pelo CONAMA <sup>13</sup>.

| Pesticida                               | Limite máximo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Pesticida                | Limite máximo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|---|--|--------------------------|--|
| Alacloro                                | 20                                     | Lindano ( $\gamma$ -HCH) | 0,02                                   |
| Aldrin + Dieldrin                       | 0,005                                  | Malation                 | 0,1                                    |
| Atrazina                                | 2,0                                    | Metolacloro              | 10                                     |
| Carbaril                                | 0,02                                   | Malation                 | 0,1                                    |
| DDT (p.p'DDT + p.p'DDE + p.p'DDD)       | 0,002                                  | Paration                 | 0,04                                   |
| Endossulfan ( $\alpha+\beta$ + sulfato) | 0,056                                  | Toxafeno                 | 0,01                                   |
| Endrin                                  | 0,004                                  |                          |  |
| Glifosato                               | 65                                     | 2,4-D                    | 4,0                                    |
| Gution                                  | 0,005                                  | 2,4,5 - TP               | 10                                     |
| Heptacloro epóxido + Heptacloro         | 0,01                                   | 2,4,5- T                 | 2,0                                    |

Fonte: CONAMA<sup>8</sup>

Nas águas doces onde ocorrem pesca ou cultivo de organismos, para fins de consumo intensivo, os limites máximos para os pesticidas heptacloro epóxido + heptacloro e toxafeno baixam para  $0,000039$  e  $0,00028 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

Como pôde ser verificado na tabela II, os níveis permitidos são extremamente baixos, em níveis de traços, os que por sua vez exige técnicas e métodos de análise bastante sensíveis.

A análise direta dessas amostras, nesses níveis de concentração, é praticamente inviável, seja pela complexidade da matriz, seja pelo limite de detecção das técnicas instrumentais disponíveis. Assim, faz-se necessário um pré-tratamento da amostra para eliminar, ao máximo, os interferentes e pré-concentrar os analitos para alcançar os limites de detecção desejados. Esse pré-tratamento consiste basicamente em três etapas: percolação do analito (traços), eliminação dos interferentes e concentração do analito presentes na matriz.

Nesse âmbito, a técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid-phase extraction*) é uma alternativa prática para pré-concentração de amostras ambientais. Basicamente, a SPE consiste em percolar uma amostra através de um adsorvente sólido (sob forma de cartucho ou disco), de forma que analitos e interferentes que têm afinidade pela fase sólida ficam retidos, enquanto os demais compostos passam sem serem retidos. Os analitos retidos são recuperados mediante eluição do cartucho ou do disco com um solvente adequado, em geral, aquele permitido para a técnica de análise instrumental posterior. A seletividade do processo depende da escolha adequada do adsorvente e do solvente utilizado para a eluição. Vários adsorventes comerciais estão disponíveis para esse fim. No entanto, novos materiais têm sido propostos na literatura com o intuito de desenvolver fases mais estáveis frente a condições de valor de pH extremos ou mais seletivos perante matrizes complexas<sup>14</sup>.

Em trabalhos anteriores, o Laboratório de Química Analítica e Ambiental do IQ/UFRGS investigou fases à base de zirconocenos na pré-concentração de pesticidas organoclorados<sup>xiv</sup>. Essas fases buscam combinar acidez de Lewis (sobre o átomo de Zr) com hidrofobicidade através de ligantes alquila no anel ciclopentadienila, ligada na esfera de coordenação do átomo de zircônio. Em continuidade a este estudo, questionou-se a viabilidade dessas fases virem a serem utilizadas na pré-concentração de fármacos. Aliado a isso, o estabelecimento de legislações de controle ambiental cada vez mais exigentes demandam o desenvolvimento de protocolos analíticos, suficientemente sensíveis capazes de determinar poluentes em níveis cada vez mais baixos. Assim, pareceu-nos relevante investigar a viabilidade de aplicar a SPE no desenvolvimento de protocolos analíticos, específicos para fármacos e pesticidas.



## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo Geral:**

Desenvolver protocolos analíticos de pré-concentração específicos para análise de fármacos e pesticidas.

### **Objetivos Específicos:**

Com relação aos fármacos (tetraciclina, cefalexina, ampicilina, amoxicilina).

- Comparar a retenção relativa dos fármacos em fases comerciais e nas fases sintetizadas à base de zirconoceno, utilizando-se HPLC-UV.
- Utilizar o procedimento analítico para análise de uma amostra real.

Com relação aos pesticidas (grupos: ácido, trizinas, feniluréias, anilinas, organofosforados, molinato e propanil).

- Estabelecer protocolo analítico para quantificação de pesticidas em meio aquoso por LC-ESI-MS-MS.
- Avaliar a seletividade e recuperação por SPE de fases comerciais.
- Identificar os íons produtores e íons produzidos.
- Avaliar o protocolo analítico em amostra real.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fármacos

Fármacos compreendem uma grande família de compostos para fins terapêuticos. Alguns exemplos de medicamentos frequentemente utilizados por pessoas e em animais são antibióticos, anti-depressivos, analgésicos, hipoglicemiantes, quimioterápicos, anti-hipertensivos, hormônios e antiespasmódicos<sup>15</sup>.

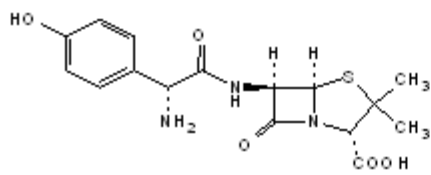
No presente trabalho foram selecionados quatro fármacos do grupo dos antibióticos, a saber, amoxicilina, ampicilina, cefalexina e tetraciclina, em função da disponibilidade de seus padrões<sup>18</sup>.

Amoxicilina: (4 tio-1-azabido[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico,6-[[amino(4 hidroxifenil)acetil]amino] – 3,3 dimetil – 7- oxo-[25-3,3 – dimetil [2  $\alpha$ , 3  $\alpha$ , 6  $\beta$ (S\*)]]) é usada como antibiótico. É insolúvel em hexano, benzeno, etilacetato ou acetonitrila. Em água, sua solubilidade é de 4,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Em metanol ou etanol, sua solubilidade é, respectivamente, 7,5 mg.mL<sup>-1</sup> e 3,5 mg.L<sup>-1</sup>.<sup>xv</sup>

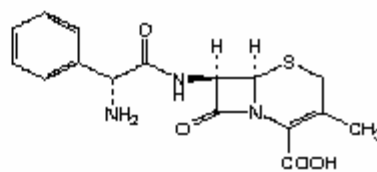
Ampicilina:([2S-[2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ (S\*)]]-6-[(Aminofenilacetil)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tio-1-azabido[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico) tem aplicação como antibiótico e é solúvel em água em temperatura ambiente<sup>15</sup>.

Cefalexina [6r-[6 $\alpha$ ,7 $\beta$ (R\*)]]-7-[(aminofenilacetil) amino-3metil-8-oxo-5-tio-1-azabido[4.2.0]octo-2-ene-2-ácido carboxílico pertence ao grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Apresenta solubilidade em aproximadamente 100 partes de água, mas é praticamente insolúvel em éter<sup>15</sup>.

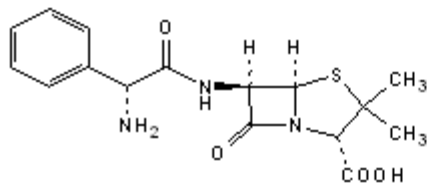
Tetraciclina ([4S-(4 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ , 12 $\alpha$ )]-4-(dimetilamino)-1, 4,4 $\alpha$ , 6-11,12 $\alpha$ -octahidro-3,6,10,12,12 $\alpha$ -pentahidroxy-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida), é um antibiótico solúvel em água, metanol e etanol, mas insolúvel em éter e hidrocarbonetos<sup>17</sup>. A figura 2 apresenta a fórmula estrutural desses fármacos<sup>15</sup>.



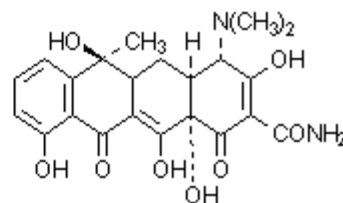
**Amoxicilina**



**Cefalexina**



**Ampicilina**



**Tetraciclina**

**Figura 2:** Fórmula estrutural dos fármacos em estudo.

## **2.2. PESTICIDAS**

Pesticidas são produtos químicos destinados a assegurar a destruição ou a prevenir a ação de animais, vegetais, microrganismos e vírus. Os pesticidas são encontrados no meio ambiente em consequência das diversas atividades agrícolas e em parte devido a sua utilização em zonas de recreação. No entanto, não deve ser descartado o uso doméstico de pesticidas em baixa dosagem (até 2% do produto) para eliminar diversos tipos de insetos<sup>xvi</sup>. Em geral, os pesticidas apresentam baixa solubilidade em água com tendência a adsorverem em partículas sólidas e a depositarem-se nos sedimentos. Devido a isso sua concentração no meio aquoso é baixa<sup>16</sup>.

Pesticidas são substâncias químicas neurotóxicas que atuam no sistema nervoso central, como órgão alvo. Eles interferem no equilíbrio das membranas celulares, no transporte dos íons sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloretos. Inibem ainda a atividade de enzimas seletivas, tais como ATPase e Colinesterase<sup>8</sup>. Atualmente, existem aproximadamente 100 mil formulações diferentes de pesticidas orgânicos, incluindo 1500 princípios ativos diferentes<sup>9</sup>. A seguir, serão discutidas brevemente as principais famílias, bem como seus princípios ativos.

### ***2.2.1. Pesticidas organoclorados***

Pesticidas organoclorados tem estruturas variadas com um ou vários átomos de cloro. Essa família compreende compostos tais como DDT (diclorodifeniletano), hexaclorobenzeno, clordane, toxafene, metoxicloro, aldrin, dieldrin, endrin e endosulfan. Pesticidas organoclorados são relativamente insolúveis, apresentam baixa volatilidade, são lipofílicos e são quimicamente estáveis, podendo persistir na água, solo e alimentos. Devido aos efeitos secundários que podem provocar a curto prazo sobre organismos e seres humanos, sua utilização foi proibida em uma grande quantidade de países e gradativamente foi sendo substituído por uma nova geração de pesticidas.<sup>1,9</sup>

### ***2.2.2. Pesticidas organofosforados***

Pesticidas organofosforados são substâncias do tipo ésteres de ácido fosfórico. São incluídos compostos como: paration, diazinon, triclorofon, carbofenotion, dimetoato entre outros. São menos persistentes que os organoclorados, não são biocumulativos. Entretanto, alguns deles são muito tóxicos e muitos foram utilizados como armas químicas, inicialmente desenvolvidos na 2ª Guerra Mundial. Sua ação reside na inibição da enzima acetilcolinesterase dos organismos, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos<sup>8,9,10</sup>.

### ***2.2.3. Pesticidas carbamatos e tiocarbamatos***

Pesticidas carbamatos compreendem o grupo químico dos agrotóxicos compostos por ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico. Em relação aos pesticidas organoclorados e organofosforados, os carbamatos são considerados de toxicidade aguda média, sendo degradados rapidamente e não se acumulando nos tecidos gordurosos. Os carbamatos também atuam inibindo a ação da colinesterase na transmissão dos impulsos nervosos cerebrais. Muitos desses produtos foram proibidos em diversos países também em virtude de seu efeito altamente cancerígeno. Essa classe química inclui também acaricidas e fungicidas. São exemplos carbaril, profan e carbofuran<sup>9,xvii,xviii</sup>.

### ***2.2.4. Pesticidas fenoxiacéticos (Pesticidas ácidos)***

São utilizados como herbicidas, pois são reguladores de plantas. São derivados do ácido fenoxiacético. Tendo como exemplos ácidos: 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 2,4,5- T, bentazone, MCPA e mecoprop<sup>16</sup>.

### ***2.2.5. Pesticidas triazinas***

As triazinas são utilizadas em grande quantidade na agricultura na Espanha (local onde foi desenvolvida essa parte do trabalho) como herbicida no controle de ervas daninhas em campos próximos a ferrovias, rodovias, áreas industriais, etc, apresentando um consumo de aproximadamente 60 toneladas /ano<sup>16</sup>. São exemplos: atrazina, deisopropilatrazina (produto de

degradação da atrazina em solo), desetilatrazina (produto de degradação da atrazina em solo), simazina, cianazina e terbutilazina.

#### ***2.2.6. Pesticidas feniluréia***

São herbicidas que inibem nas plantas o processo de fotossíntese. Exemplos: clortoluron, isoproturon, diuron e linuron

#### ***2.2.7. Pesticidas piridínicos***

Utilizados como herbicidas. Exemplos: picloran, paraquate e diquate

#### ***2.2.8. Pesticidas piretróides***

As piretrinas atuam de forma semelhante ao DDT, hiperexcitando o sistema nervoso do inseto. Esses compostos podem oxidar-se facilmente, sobretudo através de processos fotoquímicos. Conseqüentemente, não são persistentes no meio aquático. São exemplos desses compostos permetrina, cipermetrina, acrinatrina, bifentrina e teflutrina.<sup>16</sup>

#### ***2.2.9. Pesticidas anilinas***

São herbicidas, agem inibindo a síntese da proteína e o aumento das raízes das plantas. São exemplos: alacloro, acetaclor e metolacloro.

#### ***2.2.10. Outros pesticidas***

Outros pesticidas também podem ser citados, a saber:

Acetanilida: propanil (herbicida que inibe a fotossíntese da planta).

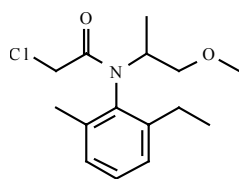
2,6-dinitroanilina: trifluralina (herbicida que atua interrompendo a divisão celular e inibindo o crescimento das raízes).

Molinato: herbicida utilizado principalmente no cultivo de arroz.

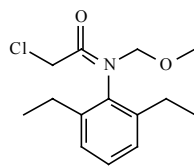
Atualmente, cerca de 15% do mercado mundial de pesticidas corresponde a piretróides (cujo consumo vem aumentando). Os pesticidas organofosforados são os mais consumidos (em torno de 40%) e em segundo lugar são os carbamatos (25%)<sup>16</sup>.

Os grupos de pesticidas selecionados para a parte experimental desse trabalho são ácidos (bentazona, MCPA, 2,4-D e, mecoprop), triazinas (deisopropilatrazina, desetilatrazina, simazina, cianazina, atrazina e terbutilazina), fenil uréias (clortoluron, isoproturon, diuron e linuron), anilinas (metolacoloro, alacloro), organofosforados (dimetoato e diazinon). Também foram utilizados os pesticidas molinato e propanil que são muito utilizados no plantio de arroz. Essa parte do trabalho foi desenvolvida no CSIC (*Centro Superior de Investigações Científicas*), em Barcelona (Espanha), sob a orientação do Prof. Dr. Damià Barceló. Esses pesticidas foram selecionados pelas seguintes razões: constarem na legislação ambiental da União Européia como substâncias poluidoras e tóxicas; serem largamente utilizados nesses países; apresentarem um procedimento analítico relativamente acessível para serem determinados simultaneamente e, finalmente, por fazerem parte de um projeto de validação interlaboratorial de material de referência certificado (PROJETO WARP). A figura 3 apresenta a estrutura química dos compostos estudados.

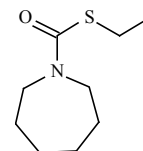
### Grupo Anilinas e Molinato



Metaloclor

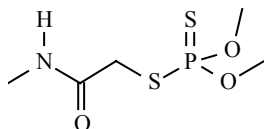


Alaclor

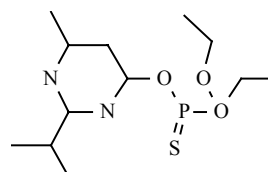


Molinato

### Grupo Organofosforados



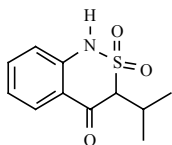
Dimetoato



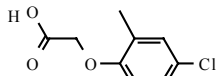
Diazinon

**Figura 3:** Estrutura dos pesticidas em estudo.

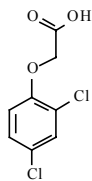
### Grupo Ácido e Propanil



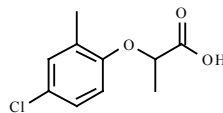
Bentazone



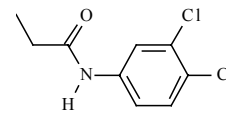
MCPA



2,4 D

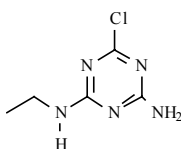


Mecoprop (MCCP)

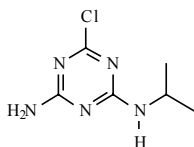


Propanil

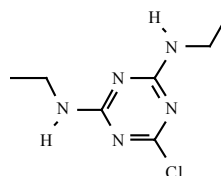
### Grupo Triazinas



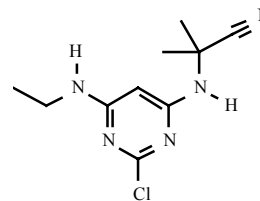
Deisopropilatrazina



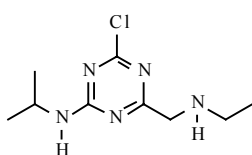
Desetilatrazina



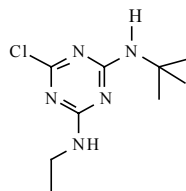
Simazina



Cianazina

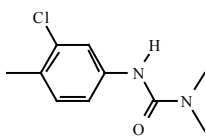


Atrazina

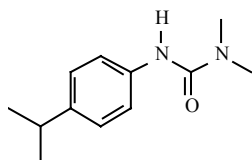


Terbutilazina

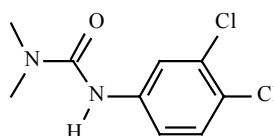
### Grupo Feniluréias



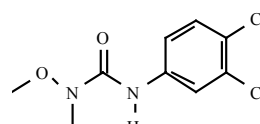
Clortoluron



Isoproturon



Diuron



Linuron

**Figura 3:** Estrutura dos pesticidas em estudo (continuação).



### ***2.3. Propriedades Físico-Químicas***

O comportamento e o destino de um composto químico no meio ambiente é fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade em água, polaridade e volatilidade. Essas propriedades são características de cada composto. O grupo funcional (ou grupos funcionais) e as propriedades ácido-bases são outros parâmetros que devem ser levados em consideração na hora da otimização do método de extração e análise cromatográfica<sup>9</sup>.

#### ***2.3.1. Solubilidade em água***

É uma propriedade definida como a máxima concentração de uma substância química que pode ser dissolvida em água, em condições tais que inexistam outras substâncias juntas, de forma que o único equilíbrio é aquele entre a substância química em questão e a água. Essa constante auxilia a indicar se a extração no meio aquoso será fácil, difícil ou impossível. Um composto é considerado pouco solúvel quando a solubilidade em água é inferior a 0,5-1 mg L<sup>-1</sup> <sup>9</sup>.

#### ***2.3.2. Coeficiente de partição octanol-água (log K<sub>OW</sub> ou log P<sub>OW</sub>)***

O coeficiente de partição K<sub>OW</sub> é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e 1-octanol. A quantificação de K<sub>OW</sub> tem sido recomendada pelo programa de evolução de compostos perigosos (OECD)<sup>xix</sup>. Nos últimos anos, K<sub>OW</sub> vem sendo muito utilizado em várias áreas, com um número elevado de publicações divulgando a sua quantificação com outras propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos, além do sucesso de seu uso na estimativa de fatores de bioconcentração, coeficiente de partição carbono-orgânico, toxicidade e solubilidade<sup>xx</sup>. Isto se deve ao fato de K<sub>OW</sub> estar relacionado com a interação do composto em estudo com o meio, no que diz respeito à absorção e transporte, uma vez que este encontra-se relacionado à polaridade da molécula.

Como regra geral, os compostos não polares têm  $\log K_{ow}$  acima de 4 ou 5 enquanto os polares apresentam valores inferiores a 1-1,5. Entre esses dois valores, as moléculas são moderadamente polares<sup>1</sup>. Especificamente com relação aos pesticidas empregados no presente estudo, encontram-se aqueles considerados como compostos polares, como por exemplo, o dimetoato ( $\log K_{ow} = 0,78$ ) e deisopropilatrizona ( $\log K_{ow} = 1,15$ ). Demais pesticidas podem ser considerados como mediantemente polares ( $\log K_{ow}$  entre 1,51 e 3,52). Esse parâmetro é determinante na seleção do processo de extração da água. A importância está na extração, independentemente da forma que será analisado posteriormente.<sup>9,16</sup>

### ***2.3.3. Constante de ionização ácido-base (Ka) e pKa***

É de grande importância a capacidade de ionização de um composto no meio água/solo, que em geral tem um pH em torno de 5-8. As substâncias ácidas com valores de pKa inferiores a 3-4 apresentam pH em torno de 5-8 e dispõem de maior mobilidade em meio aquático, enquanto as de pKa superior a 10 são consideradas como substâncias com maior tendência de ficarem retidas no solo (devido ao solo estar carregado negativamente, portanto serão retidas substâncias catiônicas<sup>1</sup>). Assim, conhecer o pKa desses compostos estudados é útil na hora de selecionar o pH mais adequado para extração e posterior análise.

Dentre os pesticidas, os compostos mais ácidos são as triazinas. Conseqüentemente, esses pesticidas não têm tendência a serem adsorvidos por material particulado e estarem presente em água. Para o grupo dos fármacos, amoxicilina é o composto mais ácido e tetraciclina é mais básico<sup>9,10,16</sup>.

### ***2.3.4. Pressão de vapor***

É definida como a pressão na qual a fase gasosa de uma substância coexiste em equilíbrio com a sua fase líquida ou sólida. Ela é característica da substância e aumenta com a temperatura. As substâncias voláteis apresentam valores de pressão de vapor elevados<sup>9,10</sup>.

### ***2.3.5. Constante de Henry (H ou $K_H$ )***

A constante de Henry é definida como o quociente entre a concentração de um composto químico na fase gasosa e sua concentração na fase líquida em equilíbrio. A

tendência de uma substância volatilizar-se de uma solução em água é determinada por seu valor de constante de Henry. Um valor alto dessa constante significa que o composto em questão tem tendência à volatilização<sup>9</sup>.

O conhecimento da constante de Henry deve ser levado em consideração no desenvolvimento do protocolo analítico, em particular no que se refere às etapas de concentração ou redução de volume, onde a passagem de fluxo de nitrogênio ou o emprego de rotavapor pode implicar na perda do analito, e conseqüentemente, inexatidão dos resultados. Por outro lado, se os compostos são muito voláteis pode ser utilizada a técnica cromatografia gasosa, por exemplo<sup>8,10</sup>.

O uso da constante de Henry é mais apropriado como indicador do potencial de volatilização dos compostos em meio ambiente que a pressão de vapor, pois leva em consideração o coeficiente de partição. Uma pressão de vapor baixa não indica necessariamente uma volatilização pouco provável. Se a solubilidade do composto em água é baixa, a volatilização pode vir a ser importante. Em geral, considera-se que um composto tem pouca tendência a volatilizar-se quando apresenta uma constante de Henry inferior a  $9,9 \times 10^{-11} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ <sup>9</sup>.

Com relação aos pesticidas do presente estudo, considerando os valores dessa constante, pode-se considerá-los todos como voláteis. As tabelas III e IV apresentam os parâmetros físico-químicos encontrados na literatura para os pesticidas e fármacos abordados no presente estudo.

**Tabela III:** Propriedades Físico-Químicas dos pesticidas empregados nesse estudo<sup>9</sup>.

| Pesticida           | Log K <sub>ow</sub> | Polari dade | pKa (25 <sup>0</sup> C) | Solubilida de em água (mg L <sup>-1</sup> ) 25 <sup>0</sup> C | Cte. Henry (atm·m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ) (25 <sup>0</sup> C) | P <sub>v</sub> (mmHg) 25 <sup>0</sup> C |
|---------------------|---------------------|-------------|-------------------------|---|--|---|
| Alacloro            | 3,52                | MP          | --                      | 240   | 8,32 × 10 <sup>-9</sup>  | 2,2 × 10 <sup>-5</sup>                  |
| Atrazina            | 2,61                | MP          | 1,7                     | 34,7  | 2,36 × 10 <sup>-9</sup>  | 2,89 × 10 <sup>-7</sup>                 |
| Bentazone           | 2,34                | MP          | 3,2                     | 500 (20 <sup>0</sup> C)                                       | 2,18 × 10 <sup>-9</sup>  | 3,454 × 10 <sup>-6</sup>                |
| Clortoluron         | 2,41                | MP          | --                      | 70  | 1,44 × 10 <sup>-10</sup>   | 3,6 × 10 <sup>-8</sup>                  |
| Cianazine           | 2,22                | MP          | 1,0                     | 170   | 2,57 × 10 <sup>-12</sup>   | 1,38 × 10 <sup>-7</sup>                 |
| 2,4-D               | 2,81                | MP          | 2,64                    | 311, pH 1,0   | 3,54 × 10 <sup>-8</sup>  | 8,25 × 10 <sup>-5</sup>                 |
| Desetilatrizina     | 1,51                | MP          | --                      | 3200  | 1,53 × 10 <sup>-9</sup>  | 9,33 × 10 <sup>-5</sup>                 |
| Deisopropilatrazina | 1,15                | P           | --                      | 670   | 1,16 × 10 <sup>-9</sup>  | 2,1 × 10 <sup>-4</sup>                  |
| Dimetoato           | 0,78                | P           | 4,5                     | 23  | 1,05 × 10 <sup>-10</sup>   | 8,25 × 10 <sup>-6</sup>                 |
| Diazinon            | 3,81                | MP          | --                      | 60  | 1,13 × 10 <sup>-7</sup>  | 9,01 × 10 <sup>-5</sup>                 |
| Diuron              | 2,68                | MP          | --                      | 42  | 5,04 × 10 <sup>-10</sup>   | 6,9 × 10 <sup>-8</sup>                  |
| Isoproturon         | 2,87                | MP          | --                      | 65  | 1,2 × 10 <sup>-11</sup>  | 2,47 × 10 <sup>-8</sup>                 |
| Linuron             | 3,20                | MP          | --                      | 75  | 6,25 × 10 <sup>-9</sup>  | 1,43 × 10 <sup>-6</sup>                 |
| MCPA                | 3,25                | MP          | 3,07                    | 630   | 1,33 × 10 <sup>-9</sup>  | 5,9 × 10 <sup>-6</sup>                  |
| Mecoprop            | 3,13                | MP          | 3,78                    | 620   | 1,82 × 10 <sup>-8</sup>  | 7,5 × 10 <sup>-7</sup>                  |
| Metolaclo           | 3,13                | MP          | --                      | 530   | 9 × 10 <sup>-9</sup>   | 3,14 × 10 <sup>-5</sup>                 |
| Molinato            | 3,21                | MP          | --                      | 88  | 4,1 × 10 <sup>-6</sup>   | 5,6 × 10 <sup>-3</sup>                  |
| Propanil            | 3,07                | MP          | --                      | 152   | 1,71 × 10 <sup>-8</sup>  | 9,08 × 10 <sup>-6</sup>                 |
| Simazina            | 2,18                | MP          | 1,7                     | 6,2   | 1,1 × 10 <sup>-11</sup>  | 2,21 × 10 <sup>-8</sup>                 |
| Tertbutilazina      | 3,04                | MP          | 2,0                     | --  | --   | --                                      |

P<sub>v</sub>= Pressão de vapor

Valores da solubilidade em água, constante de Henry e pressão de vapor a 25<sup>0</sup>C. Nos casos onde a constante refere-se a outra temperatura, esta está indicada entre parênteses; MP- Média Polaridade; P – Polar.

Fonte: Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water – D. Barceló, M.-C. Hennion

A tabela IV apresenta algumas propriedades físico-químicas referentes aos antibióticos estudados no presente trabalho.

**Tabela IV:** Algumas propriedades físico-químicas para os fármaco em estudo <sup>15</sup>.

| Fármaco      | Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> ) | pH       | pKa             |
|--------------|--|----------|-----------------|
| Amoxicilina  | 4  | 4,0      | 4,0             |
| Ampicilina   | Alta solubilidade em temperatura ambiente  | 3,5 -5.0 | 7.4             |
| Cefalexina   | 1,5  | 4,0-4,52 | 5,2             |
| Tetraciclina | 1,7  | 1,8-2,0  | 3,3; 7,68; 9,64 |

## 2.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A extração e pré-concentração de analitos requer uma combinação adequada de solvente e técnica. O estado físico da matriz também influencia. Para amostras sólidas, métodos tradicionalmente empregados compreendem a extração sólido-líquido, a extração por Soxhlet, a sonificação, e mais recentemente, métodos mais modernos de extração, tais como a extração acelerada com solvente, extração com fluido supercrítico, ou extração assistida por microondas<sup>xxi</sup>.

Entre os métodos comumente utilizados na preparação de amostras líquidas (e suspensões), pode-se citar: a extração líquido-líquido (LLE), a destilação, a microdialise, a liofilização e a extração em fase sólida (SPE). A destilação, por exemplo, é empregada geralmente para analitos voláteis. A liofilização é aplicável para concentrar e manipular amostras biológicas. A extração em fase sólida tem sido utilizada para analitos orgânicos, inorgânicos e biológicos<sup>21</sup>.

A SPE vem sendo cada vez mais aplicada como técnica seletiva de preparação de amostra. Os objetivos da SPE são: reduzir o nível de interferentes, minimizar o volume final de amostra a fim de maximizar a sensibilidade, fornecer a fração de analito em solvente compatível com as peculiaridades da técnica instrumental a vir a ser empregada, além de servir como filtro, removendo particulados da matriz. A técnica de SPE isola analitos e simplifica matrizes com base nos mesmos princípios da cromatografia líquida clássica. Tanto na SPE como na cromatografia à líquido (LC), ocorrem processos de migração diferencial na qual compostos são retidos e eluídos à medida que atravessam um meio poroso, funcionalizado ou não, sob fluxo de uma fase móvel. Diferenças entre ambas residem no formato da coluna (comprimento e diâmetro interno), tamanho de partícula do material de empacotamento e taxas de fluxo<sup>xxii</sup>.

A seletividade da SPE depende da escolha adequada do adsorvente e do solvente utilizado para a eluição. Observa-se uma crescente disponibilidade de adsorventes comerciais ou materiais pesquisados para extração<sup>9,xxiii,xxiv</sup>. A maioria desses adsorventes consiste em partículas de sílica funcionalizadas, onde o sólido quimicamente modificado com octadecilsilano (ODS) é o mais popular. Fritz<sup>xxv</sup> classifica a natureza das fases de SPE disponíveis em 3 grandes grupos:

I – SPE de fase reversa: empregada na separação de analitos apolares de matrizes polares (em geral, água). Esse tipo de aplicação requer o uso de partículas adsorventes relativamente hidrofóbicas, tais como sílica revestida com grupos octadecilsilano ou polímeros orgânicos com anéis benzênicos. As substâncias extraídas são eluídas com pequenas quantidades de solvente orgânico.

II – SPE de fase normal: empregada para isolar compostos polares de matrizes apolares (por exemplo, óleo vegetal dissolvido em hexano). Partículas sólidas polares são usadas para extrair os analitos da amostra, por meio de um solvente polar.

III – SPE de troca iônica: utilizada na extração de analitos iônicos ou convertidos na forma iônica, por meio de ajuste de pH. O sólido contém grupos trocadores de cátions ou ânions. Após a etapa de pré-concentração, as substâncias extraídas são comumente transformadas em sua forma molecular original.

Embora parte do sucesso na pré-concentração resida em propriedades texturais do sólido (tamanho de poro, superfície específica), a natureza química dos grupos funcionais sobre a superfície desempenha um papel importante na seletividade e eficiência de separação. Assim, paralelamente a este desenvolvimento analítico, novos adsorventes têm sido desenvolvidos, possibilitando com isso dar ênfase à seletividade na etapa de pré-concentração. Além disso, a tendência atual na área de análise de traços é enfatizar a automação, bem como desenvolver técnicas que minimizem a preparação da amostra sem perda na qualidade dos dados. Isto favorece especialmente a SPE para análise de amostras de águas, pois esta pode ser usada *off line*, onde a preparação da amostra é completamente separada da análise cromatográfica, ou *on line*, fazendo-se a conexão direta ao sistema cromatográfico.

As modificações químicas na sílica podem conferir acidez ou basicidade à superfície desses materiais. Novas fases têm sido propostas constantemente na literatura, dentre elas destaca-se a zircônia, dada as suas propriedades peculiares em termos de estabilidade química em uma ampla faixa de pH e uma química de superfície com sítios ácidos de Lewis<sup>xxvi,xxvii</sup>. Por exemplo, partículas de zircônia revestidas com polibutadieno,<sup>xxviii</sup> poliestireno<sup>xxix</sup>, carbono<sup>xxx</sup>, e albumina bovina<sup>xxxi</sup> foram empregados em LC. Nessas fases, o átomo de zircônio apresenta sítios ácidos de Lewis que

influenciam na interação com os analitos. Sistemas produzidos a partir da funcionalização de sílica com zirconocenos mostraram-se eficientes na pré-concentração/extração de alguns pesticidas organoclorados de amostras aquosas<sup>14</sup>. Nesses sistemas, a interação foi atribuída aos sítios ácidos de Lewis presentes na superfície e aos ligantes orgânicos (metil e butila) na esfera de coordenação do metal (ciclopentadienila).

A sensibilidade na quantificação dos analitos não depende exclusivamente dessa etapa de pré-concentração, mas também do meio de detecção empregado. Nesse sentido, em termos de cromatografia gasosa, instrumentos dotados de detectores por captura de elétrons (ECD)<sup>xxxii,xxxiii,xxxiv</sup>, fotométrico de chama (FPD)<sup>31</sup> e espectrométrico de massas (MS)<sup>33,xxxv</sup> são comumente empregados para quantificação de pesticidas<sup>xxxvi,xxxvii,xxxviii,xxxix</sup>. Devido a sensibilidade necessária, poucos utilizam o detector por ionização em chama (FID)<sup>x1</sup>. Contudo, na maioria dos casos, as etapas de derivatização e *de clean up* são necessárias, requerendo muito tempo de preparação da amostra.<sup>22,23</sup>

Essa grande desvantagem da cromatografia a gás aliada ao fato que a maioria dos pesticidas modernos e seus produtos de degradação serem polares, possuem baixa volatilidade e/ou serem termolábeis, tem levado a um considerável aumento de trabalhos envolvendo a quantificação desses compostos por cromatografia líquida<sup>xli,xlii</sup>. Neste caso, os detectores comumente utilizados são os de fluorescência ou de arranjo de diodos (DAD). No caso de utilização de detector MS, a forma de ionização empregada tem sido tanto o *spray* eletrônico (ESI) como o detector de ionização química à pressão atmosférica (APCI). A seleção do ionizador depende principalmente das propriedades químicas dos analitos. Thurman e colaboradores<sup>xliii</sup> demonstraram que compostos neutros e básicos são mais sensíveis na ionização por APCI (especialmente em modo positivo), enquanto herbicidas catiônicos e aniônicos por ESI. Parâmetros tais como afinidade do próton e polaridade também são levados em consideração na seleção do modo de ionização. A tabela V reúne alguns exemplos de trabalhos da literatura destinados à quantificação de pesticidas em amostras aquosas, usando SPE *on line*, enquanto a tabela VI, SPE *off line*. Em ambos os casos, observa-se que a maior parte das amostras aquosas estudadas é oriunda de água de rio. No caso da SPE *on line*, o detector MS é o mais empregado, em particular, com ionização APCI. No caso da SPE *off line*, verifica-se a utilização tanto de detector UV (ou DAD) e MS.

**Tabela V:** Exemplos de aplicação de SPE *on line* na quantificação de pesticidas por HPLC.

| <b>Pesticidas</b>  | <b>Amostra</b>        | <b>Detector</b> | <b>Interface</b> | <b>Ref.</b> |
|--|-----------------------|-----------------|------------------|-------------|
| Herbicidas ácidos e neutros  | Água de rio           | DAD e MS        | APCI             | xliv        |
| Atrazina, simazina, deisopropilatrazina, desetilatrazina, terbutilazina, diuron, metolacloro e outros pesticidas   | Água de rio           | MS-MS           | APCI             | xlv         |
| Desetilatrazina, clortoluron, diuron, deisopropilatrazina, simazina, atrazina e outros pesticidas.                 | Água da chuva         | DAD e MS-MS     | APCI             | xlvi        |
| Bentazone, 2,4-D, MCPA, entre outros pesticidas  | Água de rio           | MS-MS           | ESI              | xlvii       |
| Simazina, cianazina, atrazina, terbutilazina, clortoluron e diuron   | Água de rio           | MS-MS           | APCI             | xlviii      |
| Desetilatrazina, bentazone, atrazina, diuron, MCPA, alacloro e outros pesticidas                                   | Água de rio           | DAD e MS-MS     | APCI             | xliv        |
| Atrazina, diuron, propanil, molinato, alacloro, diazinon, deisopropilatrazina, desetilatrazina e outros pesticidas | Água de rio           | DAD             | -                | l           |
| Diuron e outros pesticidas   | Água do mar           | MS-MS           | APCI             | li          |
| Atrazina, simazina, terbutillazina, metolacloro, propanil, dimetoato, desetilatrazina e outros pesticidas          | Água de rio           | DAD e MS-MS     | ESI              | lii         |
| Isoproturon, diuron, clortoluron, atrazina, simazina, terbutilazina alacloro e outros pesticidas                   | Água potável e de rio | MS              | APCI             | liii        |
| Clortoluron, diuron, isoproturon, linuron e diflubenzuron  | Águas de rio          | DAD e MS-MS     | APCI             | liv         |
| N-metilcarbamatos, feniluréias, triazinas  | Água potável e de rio | MS              | ESI              | lv          |

DAD: arranjo de diodos; MS: detector de massas; ESI: ionização de *spray* eletrônico; APCI: ionização química a pressão atmosférica



**Tabela VI.** Exemplos de aplicação de SPE *off line* na quantificação de pesticidas por HPLC.

| <b>Pesticidas</b>   | <b>Amostra</b>        | <b>Detector</b> | <b>Interface</b> | <b>Ref.</b> |
|---|-----------------------|-----------------|------------------|-------------|
| Atrazina e seus metabólitos, desetilatrazina, deisopropilatrazina, clortoluron e outros herbicidas                | Água potável          | DAD             | -                | lvi         |
| Atrazina, deisopropilatrazina, atrazina, simazina e outros pesticidas   | Água de rio           | UV              | -                | lvii        |
| Dimetoato, simazina, propanil, alacloro, linuron, metolacloro e outros pesticidas                                 | Água de rio           | MS              | APCI             | lviii       |
| Pesticidas neutros: deisopropilatrazina, desetilatrazina, simazina, cianazina, terbutilazina. Ácidos: MCPA, 2,4-D | Água de rio           | DAD e MS-MS     | APCI             | lix         |
| Atrazina, terbutilazina, canazina dimetoato, diuron, isoproturon, simazina e outros pesticidas.                   | Água da chuva         | MS-MS           | ESI              | lx          |
| Alacloro, atrazina, clortoluron, dimetoato, diuron, isoproturon, simazina   | Água de lago          | DAD             | -                | lxi         |
| Simazina, atrazina, terbutilazina e terbutrin   | Água potável e de rio | UV              | -                | lxii        |
| Diuron e terbutilazina  | Água de rio           | DAD             | -                | lxiii       |
| Atrazina, simazina, metolacloro, cianazina e outros pesticidas  | Água de rio           | DAD             | -                | lxiv        |
| 2,4-D, MCPA, Mecoprop   | Água subterrânea      | MS-MS           | ESI              | lxv         |
| Atrazina, bentazone, mecoprop, molinato, terbutilazina e outros pesticidas  | Água de rio           | DAD e MS        | APCI             | lxvi        |
| Atrazina, simazina, MCPA, bentazone   | Água potável          | UV              | -                | lxvii       |

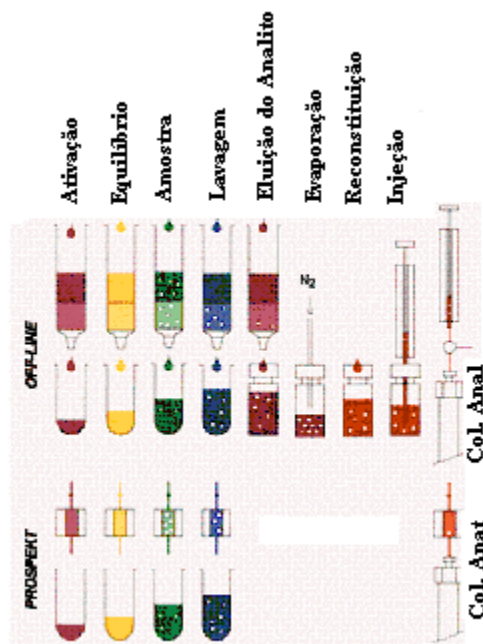
|  |                       |       |      |        |
|--|-----------------------|-------|------|--------|
| Atrazina, metalchlor, MCPA, simazina e outros pesticidas       | Água de rio           | MS-MS | ESI  | lxviii |
| 2,4-DP, 2,4,5 T, monolinuron, diuron, 2-cloroanilina, fenurion | Água potável          | UV    | -    | lxix   |
| Carbamatos   | Água potável          | MS    | ESI  | lxx    |
| Diuron, atrazina, simazina, terbutilazina, alacloro            | Água potável e de rio | MS-MS | APCI | lxxi   |
| Diclorofeniluréias, monouron, diuron e outros pesticidas       | Água ultrapura        | DAD   | -    | lxxii  |
| Clorotoluron, atrazina, tertbutirina                           | Água de rio           | DAD   | -    | lxxiii |
| Atrazina, simazina, diruron                                    | Água potável          | UV    | -    | lxxiv  |

DAD: arranjo de diodos; MS: detector de massas; ESI: ionização de *spray* eletrônico

Embora não constando nas tabelas V e VI, na maioria desses trabalhos citados foi utilizada coluna analítica do tipo C-18 e acetonitrila/água e metanol/água como fase móvel. Os cartuchos mais utilizados foram do tipo C-18, variando o nome comercial conforme a empresa fornecedora, tanto para a SPE *on line* como *off line*.

A vantagem do sistema *on line* é que as etapas de extração, *clean-up* e análise dos compostos de interesse podem ser efetuadas em linha. Estas formas de acoplamento automatizam mais o sistema, permitindo maior repetitividade e reprodutibilidade dos dados e evitando problemas comuns em processos de transferência, tais como perda de analitos voláteis, contaminação, perda de líquidos durante a transferência, etc.<sup>lxxv</sup>

Na SPE *on line*, a maioria das etapas são iguais à SPE *off line*, as mudanças ocorrem a partir da eluição do analito que ocorre fazendo-se passar a fase móvel do sistema através do cartucho de extração (figura 4). Desta maneira os analitos são dessorvidos à medida que aumenta a porcentagem do solvente orgânico da fase móvel com o passar do tempo. Então os analitos são separados na coluna cromatográfica e posteriormente detectados pelo sistema de detecção.



**Figura 4:** Comparação entre SPE *off line* e SPE *on line* (utilizando-se sistema Prospekt).

As técnicas analíticas para quantificação de fármacos são bem estabelecidas e registradas nos órgãos governamentais, como por exemplo a ANVISA. As metodologias oficiais são utilizadas tanto para o controle da qualidade da matéria-prima como para o controle do produto que acaba no mercado<sup>lxxvi</sup>.

Também muitos métodos foram desenvolvidos e implementados para o controle de resíduos de fármacos em alimentos<sup>lxxvii</sup>, podendo-se destacar em especial a presença de antibióticos no leite<sup>lxxviii,lxxix</sup>.

No entanto, quantificações de fármacos em meio aquoso em nível de traços (visando amostras aquosas ambientais) é uma área mais recente. Trabalhos nessa área têm sido desenvolvidos por Stumpf<sup>lxxx</sup>, Termes<sup>lxxxi</sup>, Hirsch<sup>lxxxii</sup>, Sacher<sup>lxxxiii</sup>, Kolpin<sup>lxxxiv</sup>, Hartig<sup>lxxxv</sup>, Johson<sup>lxxxvi</sup>, Desbrow<sup>lxxxvii</sup>, Buser<sup>lxxxviii</sup>, Winkler<sup>lxxxix</sup>, Xiao<sup>xc</sup> e colaboradores. Yang e Carlson estudaram a quantificação de tetraciclina e sulfonamida em água de rio, utilizando ensaio radioimunológico e LC-MS, com interface ESI<sup>xcii</sup>. Os mesmos autores quantificaram eritromicina e tilosina em rio por LC-MS-MS com ionização *spray* eletrônico<sup>xciii</sup>. Gentamicina foi dosada em esgoto hospitalar também por LC-MS, com ESI.<sup>xciii</sup>

Especificamente com relação à quantificação dos antibióticos, objeto de estudo da presente tese, poucos trabalhos empregaram a SPE como meio de pré-concentração em meio aquoso. A tetraciclina foi extraída de solo de plantio através de extração líquida pressurizada, pré-concentrada através de SPE e determinada por GC-MS<sup>xciv</sup>. Furusawa utilizou também SPE para quantificar tetraciclina no leite por

HPLC-DAD<sup>xv</sup>. A amoxicilina e a ampicilina foram quantificadas em tecidos de músculo, fígado e rins de porcos e gados. Os extratos após a pré-concentração foram determinados por HPLC-UV<sup>xvi</sup>. Becker e colaboradores empregaram a SPE para pré-concentrar amostras extraídas de músculo, rins e leite bovino. Amoxicilina, ampicilina e cefalexina foram posteriormente dosadas por LC-MS-MS com interface de ESI<sup>xvii</sup>.

A crescente preocupação com a presença de fármacos, pesticidas e seus metabólitos em meios aquáticos e seus possíveis impactos ambientais tem impulsionado a pesquisa na busca de métodos cada vez mais sensíveis, capazes de permitir a detecção desses e outros analitos em matrizes complexas. Nesse contexto, a SPE tem sido apontada como uma técnica potencial de pré-concentração. Nessa técnica, parte do sucesso reside na especificidade da natureza das fases sólidas frente aos analitos em questão. Dessa forma, pareceu-nos importante investigar a potencialidade de pré-concentrar compostos orgânicos, mais especificamente fármacos e pesticidas em fases sólidas através da técnica de SPE.

O próximo capítulo abordará os procedimentos analíticos empregados na quantificação dos fármacos e pesticidas em estudo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A apresentação de materiais e métodos empregados será feita em duas partes: a primeira referente aos fármacos e a segunda referente aos pesticidas.

#### 3.1. FÁRMACOS

##### 3.1.1 Materiais

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados com água, detergente diluído e água deionizada. O material não volumétrico foi enxaguado com acetona comum e levado ao forno a 300 °C por duas horas. O material foi embalado com papel laminado. Para a vidraria volumétrica o enxágüe foi com acetona comum, acetona grau pesticida, n-hexano grau pesticida e, após a evaporação, foi coberto com folha de alumínio.

Para quantificação de fármacos foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: acetona grau pesticida (OmniSolv®); hexano grau pesticida (OmniSolv®); sulfato de sódio anidro grau analítico, previamente tratado a 350 °C por 12 horas (Merck); acetonitrila - grau HPLC - (Carlo Erba); metanol - grau HPLC - (Mallinckrodt, LabGuard®); ácido fórmico p.a.- (A.C.S., Nuclear), ácido oxálico (Merck); difosfato de potássio (Merck); ácido acético (Merck).

Os padrões de cefalexina, tetraciclina, ampicilina e amoxicilina (laboratórios New Delli) foram preparados a partir de seus sais. Todas as soluções padrão e fases móveis foram preparadas com água ultrapura obtida com sistema Milli-Q (Purifications Parck), seguida por filtração com filtro 0,45 µm.

Os cartuchos comerciais empregados para pré-concentração foram LC-18 (SUPELLEAN, 6 mL/500mg - sílica funcionalizada com octadecilsilano), adquiridos da SUPELCO, Supelclean™ ENVI™-Chrom P (6 mL/500 mg), constituídos de material polimérico altamente reticulado), adquirido da Supelco, Absolut NEXUS (1 mL/30 mg - copolímero à base de estireno-divinilbenzeno) fornecido pela VARIAN. Para cada lote de cartuchos foram realizados testes em branco com um dos cartuchos. Os zirconocenos  $Cp_2ZrCl_2$  (Cp = ciclopentadienila),  $(nBuCp)_2ZrCl_2$  e  $(iBuCp)_2ZrCl_2$  (todos da Boulder) foram usados conforme recebidos. Silica (PQ Corporation), com área específica de 350 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, 272 Å de diâmetro médio de poros e com 87 µm de diâmetro médio foi aquecida sob vácuo ( $P < 10^{-5}$  mbar) por 16 horas. A manipulação desses reagentes na preparação das fases sólidas foi realizada sob atmosfera inerte utilizando a técnica de Schlenk<sup>xcviii</sup>

Para desgaseificação das fases móveis nas análises por HPLC foi empregado hélio grau 4,5 de pureza. Para redução de volumes das amostras foi utilizado nitrogênio grau 4,5 de pureza.

### **3.1.1.2. Síntese das fases à base de zirconocenos**

Sílicas funcionalizadas com zirconocenos foram preparadas através da técnica de *grafting*<sup>14</sup>. Cerca de 1,0 g de sílica ativada foi colocada em contato com uma solução de zirconoceno em tolueno com concentração equivalente a 0,5 %(p/p) Zr/SiO<sub>2</sub>. O sistema foi deixado em agitação por 1 h, a 80 °C e posteriormente filtrado em tubo Schlenk dotado de placa sinterizada. O sólido resultante foi lavado com 15 × 2,0 mL de tolueno e seco a vácuo por 4 h. O teor de metal nas fases foi determinado por Espectrometria de Retroespalhamento Rutherford (RBS). Cerca de 150 mg de cada fase foram condicionadas em cartuchos comerciais (volume = 6 mL). Para efeito de comparação, a fase LC 18 (a base de sílica) foi preparada com a mesma relação massa/volume das fases zirconocenos (150 mg/6 mL).

## **3.1.2 Métodos**

### **3.1.2.1. Quantificação**

Para a preparação da solução padrão de cefalexina foi pesado cerca de 50 mg do sal em balança analítica com precisão de 0,0001 g em um recipiente de vidro (barquinha) especialmente confeccionado para esse fim. O sal do fármaco foi então transferido para um balão volumétrico de 500 mL, adicionou-se 5 mL de metanol para dissolvê-lo e, após o volume foi ajustado com água ultrapura. Tetraciclina, amoxicilina e ampicilina foram dissolvidas em 500 mL (utilizando-se a mesmo procedimento de pesagem que o outro fármaco) de água ultrapura, resultando em soluções-padrão de 100 mg L<sup>-1</sup>. Para a curva analítica foram preparadas cinco soluções (a partir de 2000 µg L<sup>-1</sup>): 50, 100, 150, 200, 250 µg L<sup>-1</sup> em água ultrapura. Todas as soluções foram preparadas diariamente. O volume de injeção foi 50 µL. Também foi preparada uma curva analítica com padrão misto de amoxicilina e ampicilina com as mesmas soluções citadas anteriormente.

### **3.1.2.2. Determinação do comprimento de onda ( $\lambda$ ) de trabalho**

Para confirmação do comprimento de onda a ser utilizado no detector de ultravioleta, espectros individuais de cada composto foram obtidos na faixa de 200 a 500 nm. Os comprimentos de onda máximos de absorção foram: 254 nm para cefalexina, 350 nm para tetraciclina e 234 nm para amoxicilina e ampicilina. O instrumento utilizado foi um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Visível (SHIMADZU, 1601 PC).

### **3.1.2.3. Fase móvel**

Diferentes composições de fases móveis foram avaliadas, todas em modo isocrático, para separação dos fármacos.

### **3.1.2.4. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e linearidade**

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor concentração da substância em análise que o procedimento analítico pode identificar, com confiança que pode ser estatisticamente diferenciado do ruído. É geralmente expresso em unidade de concentração <sup>xcix,c</sup>. Com base na literatura<sup>ci</sup>, o LOD foi determinado por análises cromatográficas sucessivas de soluções de concentrações diluídas a partir da solução de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  até obter-se um pico em que altura correspondesse a três vezes a relação sinal / ruído.

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais, geralmente expresso em unidades de concentração <sup>100,101</sup>. De acordo com a literatura <sup>101</sup> o LOQ é determinado levando-se em consideração a concentração cujo sinal cromatográfico obtido for dez vezes maior, em relação ao sinal do ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos em interesse. No presente trabalho, o limite de quantificação foi calculado multiplicando-se o limite de detecção por 3,3 vezes.

A faixa de linearidade das concentrações utilizadas foi estabelecida com base na equação da reta e no coeficiente de correlação calculados na curva de calibração.

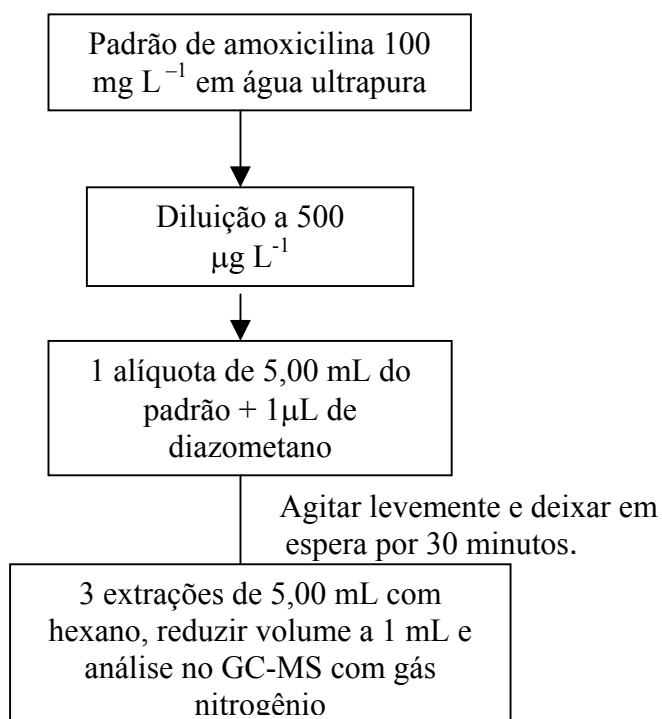
### 3.1.2.5. Instrumentos

Cromatógrafo a líquido, Shimadzu LC-10 A, equipado com detector de ultravioleta (UV), munido de pré-coluna com recheio Hyperprep C18 sílica, 30 $\mu$ m (Supelco) e coluna analítica Nucleosil C18, (5  $\mu$ m x 250 mm x 4,6 mm) (Supelco).

Cromatógrafo a gás, Varian 3800, Saturno 2000, com detector seletivo de massas com sistema *ion trap* (GC-ITMS), munido de coluna HP-5MS (30 m x 0,25  $\mu$ m) e com espectroteca interna NIST.

### 3.1.2.6. Derivatização com diazometano

A figura 5 representa o procedimento empregado na derivatização com diazometano.



**Figura 5:** Esquema para o procedimento experimental de derivatização da amoxicilina com diazometano.

Para esse mesmo fármaco foram também avaliadas as seguintes concentrações iniciais de 500, 200, e 50 mg L<sup>-1</sup>.

A amostra derivatizada foi analisada por cromatógrafo a gás com detector de massas (GC-ITMS). Para o modo SCAN, as condições de aquecimento do forno foram: 35 °C por 1 min,



aquecimento a  $3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , até  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantendo-se esta temperatura por 15 minutos, seguido do aquecimento a  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, aquecimento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura por 2 min. Vazão do gás de arraste foi de  $1\text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura do injetor de  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; modo de injeção splitless; energia de (600 eV) adicionada à multiplicadora de íons; temperatura da interface em  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Não foram encontrados picos que pudessem ser relacionados com prováveis produtos da reação de derivatização da amoxicilina com diazometano.

### **3.1.2.7. Procedimentos para extração em fase sólida**

A partir da solução padrão  $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , foram preparadas diluições de 5 e  $0,50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para experimentos de retenção em cartuchos comerciais.

#### Efeito do volume da amostra pré concentrada sobre a recuperação

Para quantificação do efeito do volume da amostra pré-concentrada sobre a recuperação 50 e 250 mL de soluções contendo tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina foram preparadas com concentrações de 5 e  $0,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

#### **3.1.2.7.1. Fases comerciais**

##### Condicionamento:

- a) LC-18: 2 mL de metanol, seguido de 5 mL de água ultrapura
- b) Envi Chrom P: 5 mL de água ultrapura
- c) Nexus: não necessita condicionamento

##### Procedimento de extração

\* Para o volume de 50 mL:

Amostras: Solução aquosa de tetraciclina, cefalexina, amoxicilina e ampicilina

Concentração inicial:  $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$

Vazão:  $10\text{ mL min}^{-1}$

##### Cartuchos: Envi Chrom P e LC-18

Eluição: 5 mL do solvente adequado

Volume final: 1 mL com fluxo de nitrogênio

Concentração teórica final:  $250\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  (considerando-se 100% de recuperação)

Cartucho: Nexus

Eluição: 1mL do solvente adequado

Volume final: 1 mL

Concentração teórica final: 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  (considerando-se 100% de recuperação)

\* Para volume de 250 mL:

Solução: Solução aquosa de amoxicilina, ampicilina, tetraciclina e cefalexina

Concentração inicial: 0,5  $\text{ng mL}^{-1}$

Vazão: 10  $\text{mL min}^{-1}$

Cartuchos: Chrom P e C18

Eluição: 5 mL do solvente adequado

Volume final: 1 mL com fluxo de nitrogênio

Concentração teórica final: 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  (considerando-se 100% de recuperação)

Cartucho: Nexus

Eluição: 1mL do solvente adequado

Volume final: 1 mL

Concentração teórica final: 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  (considerando-se 100% de recuperação)

Todas as amostras nos dois volumes foram analisadas por HPLC-UV.

**3.1.2.7.2. Fases à base de sílica funcionalizada com zirconocenos**

Cerca de 150 mg de cada fase sólida foram devidamente empacotados em cartuchos semelhantes aos cartuchos comerciais. As fases foram lavadas, seqüencialmente, com 10 mL de acetona, hexano e água. Após secagem com vácuo, foi percolado por cada fase sólida 5 mL de metanol seguido de 15 mL de água ultrapura. Todas as alíquotas de solvente utilizadas para a lavagem dessas fases dispostas nos cartuchos, foram analisadas a fim de verificar a presença de substâncias que pudessem ter sido arrastadas.

Aos cartuchos, contendo as fases, após a lavagem com a série de solventes acima citados, foi percolado 50 mL de solução aquosa de cada analito, na concentração de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a uma velocidade de escoamento de 10  $\text{mL min}^{-1}$ . Após, foi passado 5 mL de eluente (mistura de solventes) para remover os

analitos retidos na fase sólida. O extrato assim obtido teve o volume reduzido a 1mL com nitrogênio em temperatura ambiente e a seguir analisado por HPLC. A concentração teórica final é 250 µg L<sup>-1</sup>.

Para a etapa de eluição nas fases com zirconocenos, os seguintes solventes ou mistura de solventes foram utilizados:

Para cefalexina:

- 1) solução aquosa de ácido acético 0,1 % / acetonitrila (60:40 v/v);
- 2) solução aquosa de ácido acético 1 % / acetonitrila (60:40 v/v);
- 3) solução aquosa de ácido acético 1,25 % / metanol (70:30 v/v)

Para tetraciclina

- 4) solução aquosa de ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> / acetonitrila/metanol (73:17:10 v/v/v);
- 5) solução aquosa de ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> / metanol (60:40 v/v),.

### **3.1.2.7.3. Recuperação**

Recuperação é a medida da eficiência do procedimento de extração, a partir da matriz. A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra. A recuperação (R) foi calculada pela equação<sup>100,101</sup>.

$$R(\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100$$

onde, R(%) = percentual de recuperação da amostra fortificada

Os valores de massa obtidos após a extração nos cartuchos foram chamados de “valor obtido”, enquanto os valores de massa real relativo à concentração da solução padrão foram chamados de “valor real”.

### **3.1.2.8. Degradação do fármaco**

A partir de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup>, concentrações de 100, 250 e 500 µg L<sup>-1</sup> de cefalexina em água ultrapura foram preparadas. No final do dia (aproximadamente no final de 8 horas), as soluções foram guardadas na geladeira. As amostras em triplicatas para cada concentração foram analisadas em temperatura ambiente.

### ***3.1.2.9. Amostra real (para tetraciclina)***

O procedimento analítico foi aplicado para amostras de água do lago Guaíba. A água foi coletada no ponto 41B (ponto de coleta do DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto) do Lago Guaíba, margem esquerda, ponto de captação de água bruta da ETA José Loureiro da Silva (Menino Deus), a 50m da margem, junto à bóia de demarcação da captação.

A água do rio foi filtrada em filtro de membrana de nylon (Millipore), com 0,45 µm em seu tamanho de poro de filtro e 47 mm de diâmetro. 50 mL da amostra de água do rio foi pré-concentrada no cartucho Chrom P, eluída com o solvente metanol e a corrida cromatográfica foi efetuada com a fase móvel ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup>/ ACN/ metanol (73:17:10). O instrumento utilizado foi HPLC-UV.

## **3.2. PESTICIDAS**

### **3.2.1 Materiais**

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório utilizados foram lavados com água, detergente diluído, água deionizada, água grau HPLC (Merck), acetona, diclorometano, n-hexano e metanol, até a evaporação do metanol.

Todos os solventes (metanol, acetona, diclorometano, n-hexano) foram grau pesticida da Merck. A água foi grau HPLC (Merck). Os vinte padrões de pesticidas utilizados (deisopropilatrizona, dimetilatrizona, dimetoato, simazina, cianazina, clorotoluron, isoproturon, atrazina, diuron, propanil, terbutilazina, linuron, molinato, metalacloroo, alacloroo, diazimon, bentazone, 2,4-D, MCPA, e mecoprop) foram de alta pureza (Sigma-Aldrich, 98-99,9%).

### **3.2.2 Métodos**

#### **3.2.2.1. Quantificação (curva analítica desenvolvida para avaliar LOD e LOQ do instrumento)**

As soluções padrão ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas em metanol e guardadas a  $4^\circ\text{C}$  por 6 meses. A solução de trabalho (contendo os vinte pesticidas) foi preparada em metanol. A concentração utilizada foi  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . As soluções de calibração (9 soluções de  $5000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram preparadas pela diluição da solução de trabalho em metanol para as concentrações de 5000, 1000 ; 500; 100; 50; 25; 10; e  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **3.2.2.2. Coluna Analítica - LC-DAD**

Foram avaliadas três colunas na separação cromatográfica da solução padrão multicomponente de pesticida: a) coluna Purospher® START RP-18 empacotada e adaptada a uma pré-coluna com ( $2 \times 125 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); b) Chromolith Performance RP-18e ( $4,6 \times 100 \text{ mm}$ ; Merck), c) Zorbax Eclipse XDB-18 ( $2,1 \times 150 \text{ mm}$ ,  $35 \mu\text{m}$ , Agilent). As três colunas estavam conectadas a uma pré-coluna com o mesmo material de empacotamento. Todas as análises foram feitas em temperatura ambiente. O volume de injeção da amostra foi de  $20 \mu\text{L}$ .

### 3.2.2.3. Fase móvel – LC-DAD

Quatro diferentes fases móveis binárias foram avaliadas em gradiente para separação dos pesticidas: a) acetonitrila/água (gradiente: acetonitrila 10%-100%-10%) e (acetonitrila 0%-100%-50%); b) acetonitrila + solução aquosa de ácido fórmico 0,05 % / água (gradiente: acetonitrila 10%-100%-10%); c) acetonitrila + solução aquosa de ácido fórmico 0,025 %/ água (gradiente: acetonitrila 10%-100%-10%); d) metanol / água (gradiente: metanol 10%-100%-10%). O gradiente utilizado nesse trabalho encontra-se na tabela VII.

**Tabela VII:** Gradiente para a fase móvel acetonitrila/água.

| Tempo<br>(min) | Acetonitrila<br>(%) | Água<br>(%) |
|----------------|---------------------|-------------|
| 0              | 10                  | 90          |
| 5              | 50                  | 50          |
| 25             | 80                  | 20          |
| 26             | 100                 | 0           |
| 31             | 100                 | 0           |
| 32             | 10                  | 90          |
| 45             | 10                  | 90          |

### 3.2.2.4. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção foram determinados pela análise cromatográfica de uma série de mistura de padrões diluídos de até uma razão sinal/ruído de 3.

A quantificação do LOQ foi feita após a injeção do padrão misto dos pesticidas (concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ). O cálculo foi realizado pelo instrumento, sendo utilizado o programa de regressão linear dos mínimos quadrados.

### 3.2.2.5. Instrumentos

#### 3.2.2.5.1. LC-DAD-MS-MS

O sistema cromatográfico era constituído de uma bomba de cromatografia líquida (Waters Alliance 2690), com auto-amostrador e conectado a um detector de arranjo de fotodiodos (Waters 996)

e um espectrômetro de massas, (*Quatro LC*) triplo quadrupolo. O detector de massas era equipado com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e com *spray* eletrônico. Espectros moleculares no ultravioleta, na região de 191 a 400 nm foram registrados no detector de série de fotodiodos a cada segundo.

#### 3.2.2.5.2. Sistema de extração em fase sólida

A pré-concentração das amostras foi realizada através de um processador automático de SPE Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Holanda), acoplado em linha e configurado para volumes de amostra elevados. O sistema é constituído de um módulo de troca automática de cartuchos (ACE) que contém duas bandejas com capacidade para até 96 cartuchos cada uma, e um módulo de ajuste de alta pressão para manipulação de solventes e amostras (seringa de alta pressão de 2 mL). Esse módulo possui as duas unidades independentes de modo que sua configuração permite a eluição de um cartucho, enquanto a amostra está sendo carregada em outro cartucho. A figura 6 apresenta o sistema Prospekt.



**Figura 6:** Sistema Prospekt.

#### 3.2.2.6. Parâmetros para MS-MS

Os parâmetros voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação, extrator e lentes RF foram otimizados de acordo com a tabela XIX. Os parâmetros MS-MS foram

otimizados por injeções em fluxo na coluna, conforme descrição a seguir: após quantificação das melhores condições para isolamento do íon precursor, as melhores voltagens para dissociação desses íons foram otimizadas, induzidas por colisão com argônio. Os cromatogramas foram obtidos sob monitoramento de reações múltiplas (MRM – *Multiply Reaction Monitoring*), registrados para cada janela, em 100 ms para o modo *spray eletrônico* positivo e 60 ms para o modo *spray eletrônico* negativo. A otimização dos parâmetros encontra-se de acordo com os espectros de massas encontrados na literatura<sup>cii,ciii</sup>.

### 3.2.2.7. Curva analítica

A curva analítica foi obtida pela quantificação de oito soluções de analitos multicomponente com concentrações entre 25 ng L<sup>-1</sup> e 1000 ng L<sup>-1</sup>, passando pela origem.

### 3.2.2.8. SPE *on line*

#### Cartuchos

Cinco cartuchos diferentes (10 × 2 mm) foram utilizados para extração: Hysphere C<sub>18</sub> EC (fase: octadecil, 8 µm), Hysphere C<sub>18</sub> HD (fase dotada de alta densidade de cadeias octadecil, 7 µm) e Hysphere C2 (fase etil, 8 µm), e os cartuchos poliméricos Hysphere Resin GP (polidivinil-benzeno, 10-12 µm) e PLRP-s (estireno-divinilbenzeno reticulado, 15-25 µm), todos fornecidos pela Spark. Cada extração foi avaliada em triplicata.

Os cartuchos utilizados para extração dos pesticidas em estudo são projetados especialmente para o sistema Propekt. As dimensões desses cartuchos também são otimizadas combinando alta capacidade de extração com baixos volumes de eluição. Como é lógico esse cartucho resiste à pressão típica de um sistema HPLC (máx 350 bar) e são quimicamente inerte.

Um cartucho típico (PLRP-s) para extração em fase sólida é apresentado na figura 7.





**Figura 7:** Fotografia do cartucho PLRP-s

#### Efeito do volume da amostra sobre a recuperação

Para otimizar o efeito do volume da amostra sobre a recuperação foram extraídos e analisados por SPE *on line* em LC-MS-MS 20 e 40 mL de uma solução-padrão dos 20 pesticidas em estudo com concentração de 100 ng L<sup>-1</sup>. De acordo com literatura, essa concentração foi selecionada por que representa uma média aproximada da concentração dos analitos que podem ser pré concentrados <sup>16</sup>.

Este parâmetro foi otimizado utilizando-se o sistema Prospekt-2 e o estudo foi feito em triplicata para cada volume de amostra.

#### Condicionamento:

Os cinco cartuchos foram condicionados com 1 mL de acetonitrila e 1 mL água grau HPLC em uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>.

#### Pré-concentração do analito

A concentração do analito foi realizada passando-se dois volumes de 20 e 40 mL da amostra (água HPLC com adição dos 20 padrões dos pesticidas em estudo) a uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>.

#### Lavagem do cartucho

Essa etapa é necessária para completar a transferência da amostra e eliminar as interferências. Para essa etapa foi utilizado 1 mL de água grau HPLC a um fluxo de 5 mL min<sup>-1</sup>.

## Eluição

A eluição dos analitos ocorre fazendo-se passar a fase móvel do sistema cromatográfico pelo cartucho de extração no sentido inverso da pré-concentração (*back-flush mode*).

Todas as etapas da preparação da amostra foram programadas e automaticamente controladas pelo *software* do sistema Prospekt. A tabela VIII apresenta a programação utilizada para eluição dos analitos.

**Tabela VIII:** Programação utilizada para eluição dos analitos.

| Tempo (min) | Acetonitrila (%) | Água (%) | Vazão (mL min <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------|----------|-------------------------------|
| 0           | 10               | 90       | 0,1                           |
| 5           | 50               | 50       | 1                             |
| 25          | 80               | 20       | 1                             |
| 26          | 100              | 0        | 1                             |
| 31          | 100              | 0        | 1                             |
| 32          | 10               | 90       | 1                             |
| 45          | 10               | 90       | 1                             |

## Cálculo de recuperação

A recuperação do método é definida como a diferença entre o valor real do parâmetro analisado e o valor médio experimental obtido. Normalmente expressa em percentagem de recuperação<sup>17</sup>. Para calcular a percentagem de recuperação do método otimizado, foram utilizadas amostras de água fortificada a uma concentração de 100 ng L<sup>-1</sup> de cada um dos pesticidas em estudo.

### **3.2.2.9. Efeito do pH e da presença de ácidos húmicos**

Três valores de pH (5,0; 7,0 e 9,0) foram avaliados em uma amostra de água HPLC com os padrões de pesticidas a uma concentração 100 ng L<sup>-1</sup>. Os valores foram ajustados com a adição de ácido fórmico ou hidróxido de amônio (Aldrich).

O efeito da presença de ácidos húmicos foi avaliado em água grau HPLC com os padrões de pesticidas a uma concentração de  $100 \text{ ng L}^{-1}$ , em três condições: sem adição de ácidos húmicos e com adição de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácidos húmicos (Fluka).

### ***3.2.2.10. Amostra Real***

O procedimento analítico foi aplicado para análise de diferentes amostras de água coletada na estação de tratamento Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha). As amostras foram transportadas para o laboratório acondicionadas em baixa temperatura ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), filtradas através de filtro de nylon (tamanho do poro maior que  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ ) e analisadas imediatamente após a filtração.

A identificação dos analitos em estudo foi feita pela comparação do tempo de retenção e o sinal LC-MS-MS dos compostos em estudo na amostra com os dos padrões analisados nas mesmas condições. Para a confirmação da identificação foram seguidos os seguintes critérios:

- tempo de retenção com uma concordância de 2%;
- a abundância relativa de duas transições do íon precursor-íon produzido com concordância dentro de uma faixa de  $\pm 20\%$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão será apresentados em dois blocos: o primeiro, destinado aos fármacos e o segundo, referente aos pesticidas. Essa disposição deve-se ao fato que cada família de compostos possui procedimento analítico distinto.

### 4.1 FÁRMACOS

#### 4.1.1. Avaliação e seleção da fase móvel

A seleção das fases móveis em estudo envolveu primeiramente uma pesquisa bibliográfica em artigos de resíduos de fármacos em sangue<sup>civ,cv,cvi,cvii,cviii,cix,ex,cxi,cxii,cxiii,cxiv</sup> e na farmacopéia<sup>cxv</sup>. Com base nesses dados algumas fases móveis foram avaliadas de acordo com a literatura, enquanto outras foram modificadas para esse trabalho. A tabela IX apresenta as fases móveis avaliadas para cada um dos fármacos em estudo.

**Tabela IX:** Composição das fases móveis empregadas para a separação dos fármacos em estudo.

| <b>Tetraciclina <math>\Lambda= 350 \text{ nm}</math></b>                  |                  |
|---|------------------|
| <b>Fase Móvel</b>   | <b>Proporção</b> |
| 1) Metanol / Acetonitrila / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>        | 20:30:50         |
| 2) Metanol/ Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>                        | 50:50            |
| 3) Metanol / Acetonitrila/ Difosfato de Potássio 0,02 mol L <sup>-1</sup> | 20:30:50         |
| 4) Metanol / Difosfato de Potássio 0,02 mol L <sup>-1</sup>               | 50:50            |
| 5) Acetonitrila / Água ultrapura  | 30:70            |
| 6) Ácido Acético 0,1 % / Acetonitrila                                     | 60:40            |
| 7) Ácido Acético 0,095% / Acetonitrila                                    | 60:40            |
| 8) Metanol / Acetonitrila / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>        | 20:35:45         |
| 9) Ácido Oxálico 0,01 Mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila / Metanol        | 73:17:10         |
| <b>Cefalexina <math>\Lambda= 254\text{nm}</math></b>                      |                  |
| <b>Fase Móvel</b>   | <b>Proporção</b> |
| 1) Metanol / Difosfato de Potássio 0,1 mol L <sup>-1</sup>                | 30:70            |
| 2) Ácido Acético 0,1% / Acetonitrila                                      | 60:40            |
| 3) Acetonitrila / Ácido Acético 1%  | 70:30            |
| 4) Ácido Acético Glacial / Metanol  | 70:30            |
| 5) Metanol / Acetonitrilla / Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup>       | 20:35:45         |
| 6) Ácido Acético 1,25% / Metanol  | 70:30            |
| 7) Ácido Acético 1% / Acetonitrila  | 60:40            |
| 8) Acetonitrila / Ácido Acético Glacial                                   | 70:30            |

| <b>Amoxicilina <math>\lambda = 234 \text{ nm}</math></b>   |                  |
|--|------------------|
| <b>Fase Móvel</b>  | <b>Proporção</b> |
| 1) Ácido Acético 0,1 Mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila  | 60:40            |
| 2) Metanol / Ácido Acético 1,25%   | 30:70            |
| 3) Água ultrapura / Acetonitrila/Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup> /<br>Ácido Acético Glacial              | 909:80:10:1      |
| 4) Água ultrapura / Acetonitrila /Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup>  | 910:80:10        |
| <b>Ampicilina <math>\lambda = 234 \text{ nm}</math></b>  |                  |
| <b>Fase Móvel</b>  | <b>Proporção</b> |
| 1) Ácido Acético 0,1 mol L <sup>-1</sup> /Acetonitrila   | 60:40            |
| 2) Metanol/Ácido Acético 1,25%   | 30:70            |
| 3) Água ultrapura/ Acetonitrila/Difosfato de potássio 1 mol L <sup>-1</sup> /<br>Ácido Acético 1 Mol L <sup>-1</sup> | 909:80:10:1      |
| 4) Água ultrapura/ Acetonitrila/Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup>  | 910:80:10        |

Com base nas condições descritas na tabela IX, foram obtidos os seguintes resultados:

-Tetraciclina:

As fases móveis ácido oxálico (0,01 mol L<sup>-1</sup>) / acetonitrila / metanol (73:17:10); metanol / acetonitrila / difosfato de potássio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (20:30:50) e metanol / difosfato de potássio 0,02 mol L<sup>-1</sup> (50:50) apresentaram picos bem definidos, isentos de interferência. As demais fases avaliadas não apresentaram picos no tempo de retenção do padrão ou os picos com mesmo tempo de retenção do padrão apresentaram ombros ou caudas.

-Cefalexina:

As fases móveis: ácido acético 1,25% / metanol (70:30) e ácido acético 1% / acetonitrila (60:40) apresentaram picos bem definidos nos tempos de retenção da cefalexina. Nas outras fases móveis não foram identificados picos referentes ao padrão.

- Amoxicilina e Ampicilina

É importante salientar que ampicilina e amoxicilina apresentaram absorção no mesmo comprimento de onda e semelhante performance cromatográfica para as fases móveis testadas. Por essas razões, esses dois fármacos foram avaliados nas mesmas fases móveis.

A fase móvel constituída por água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup>/ ácido acético 1 mol L<sup>-1</sup> (909:80:10:1)<sup>115</sup> (indicada pela Farmacopéia Americana para testes cromatográficos com ampicilina) e uma modificação dessa fase para água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio

1 mol L<sup>-1</sup> (910:80:10) foram avaliadas, apresentando bons resultados para esses dois fármacos. A fase móvel constituída de metanol / Difosfato de potássio (30:70) apresentou picos pouco definidos (2 ou 3 ombros) e as outras fases em estudo não apresentaram pico referente ao padrão.

O detector UV utilizado permite somente a seleção de um comprimento de onda em cada corrida cromatográfica. Para otimização do procedimento foi feito um padrão duplo (amoxicilina e ampicilina) com os fármacos que apresentaram mesmo comprimento de onda. Na análise cromatográfica desses fármacos as áreas dos picos referentes aos fármacos não reproduziam, diminuindo a cada reinjeção, sugerindo uma interação entre esses. Um estudo mais aprofundado das interações eventuais entre os fármacos não foi objeto da presente tese. Cabe salientar que ocorreu também a detecção de um novo pico ( $t_r = 19,39$  min) que não pôde ser identificado porque o instrumento de trabalho não dispunha de detector de massas.

Para testes de retenção, diferentes fases estacionárias ou diferentes fases móveis podem ser avaliadas. Nesse trabalho, foi escolhida a opção de diferentes fases móveis por ser economicamente mais viável.

A tabela X apresenta os cálculos de tempo de retenção ( $t_r$ ), tempo de retenção corrigido ( $t_r'$ ), tempo morto ( $t_m$ ), número de pratos teóricos (N) e fator capacidade (k) para os quatro fármacos em estudo.

**Tabela X.** Tempo de retenção( $t_r$ ), tempo de retenção corrigido ( $t_r'$ ) tempo morto ( $t_m$ ), número de pratos teóricos (N) e fator capacidade (k) para os quatro fármacos em estudo, utilizando diversas fases móveis.

| Fase Móvel   | $t_r$ | $T_m$ | $t_r'$ | N (pratos/m) | k   |
|--|-------|-------|--------|--------------|-----|
| <b>TETRACICLINA</b>  |       |       |        |              |     |
| <u>1) Ácido Oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> / Acetonitrila / Metanol (73:17:10)</u>  | 8,8   | 2,6   | 6,2    | 3402         | 3,4 |
| 2) Metanol / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 0,02 Mol L <sup>-1</sup> (20:30:50)  | 9,7   | 2,3   | 7,4    | 2930         | 4,0 |
| <b>CEFALEXINA</b>  |       |       |        |              |     |
| <u>1) Ácido Acético 1,25 mol L<sup>-1</sup> / Metanol (70:30)</u>  | 11,7  | 3,5   | 8,2    | 3600         | 2,3 |
| 2) Ácido Acético 0,1% / Acetonitrila (60:40)   | 6,5   | 2,9   | 3,6    | 3080         | 1,2 |
| <b>AMOXICILINA</b>   |       |       |        |              |     |
| 1) Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup> /Ácido Acético 1 mol L <sup>-1</sup> (909:80:10:1)  | 4,9   | 2,8   | 2,2    | 1236         | 0,7 |
| <u>2) Água Ultrapura /Acetonitrila/Difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80: 10)</u>                                     | 4,8   | 2,6   | 2,2    | 3408         | 0,9 |
| <b>AMPICILINA</b>  |       |       |        |              |     |
| 1) Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup> / Ácido Acético 1 mol L <sup>-1</sup> (909:80:10:1) | 14,4  | 2,7   | 11,7   | 895          | 4,3 |
| <u>2) Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80: 10)</u>                                  | 14,0  | 2,5   | 11,5   | 2304         | 4,8 |

Fases móveis selecionadas estão sublinhadas.

De acordo com a tabela X as fases móveis ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> / acetonitrila / metanol (73:17:10), ácido acético 1,25 mol L<sup>-1</sup> / metanol (70:30) e água ultrapura / acetonitrila / difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80: 10) foram selecionadas para esse trabalho por apresentaram maior número

de pratos teóricos e fator capacidade dentro dos valores indicados na literatura como ideal (entre 1 e 5)<sup>cxvi</sup>, tendo como exceção somente a fase móvel água ultrapura /acetonitrila/difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80: 10) (k=0,9), que foi aceito nesse trabalho por estar muito próximo de 1.

Para todos os fármacos foram avaliadas diversas vazões da fase móvel de 0,8 a 1,2 mL min<sup>-1</sup> (considerando-se a melhor distribuição gaussiana do pico). A tabela XI apresenta as fases móveis, as vazões, os tempos de retenção com os respectivos RSD (melhor performance cromatográfica).

**Tabela XI:** Avaliação da fase móvel, vazão, tempo de retenção ( $t_r$ ) e RSD para cada fármaco, para n=3 (injeções).

| Fase Móvel   | Vazão<br>(mL min <sup>-1</sup> ) | $t_r$<br>(min) | RSD<br>(%) |
|--|----------------------------------|----------------|------------|
| <b>Tetraciclina</b>  |                                  |                |            |
| Ácido Oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> / Acetonitrila / Metanol (73:17:10)                 | 1,0                              | 8,8            | 0,4        |
| <b>Cefalexina</b>  |                                  |                |            |
| Ácido Acético 1,25% / Metanol (70:30)  | 0,9                              | 11,7           | 0,8        |
| <b>Amoxicilina</b>   |                                  |                |            |
| Água Ultrapura / Acetonitrila / Difosfato de Potássio 1 mol L <sup>-1</sup><br>(910:80:10) | 1,2                              | 4,9            | 0,1        |
| <b>Ampicilina</b>  |                                  |                |            |
| Água Ultrapura / Acetonitrila/ Difosfato de Potássio 1 mol L<br>(910:80:10)                | 1,2                              | 14,4           | 0,2        |

#### 4.1.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

A tabela XII apresenta os valores de coeficiente de correlação (r), limite de detecção do instrumento (LOD<sub>i</sub>) e limite de quantificação do instrumento (LOQ<sub>i</sub>) para os fármacos em estudo.



Tabela XII: Coeficiente de correlação (r), limite de detecção do instrumento (LOD<sub>i</sub>) e limite de quantificação do instrumento (LOQ<sub>i</sub>) para os fármacos (n=3).

| <b>Fármaco</b> | <b>r</b> | <b>LOD<sub>i</sub></b><br><b>(µg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>LOQ<sub>i</sub></b><br><b>(µg L<sup>-1</sup>)</b> |
|----------------|----------|--|--|
| Tetraciclina   | 0,9999   | 14 ng mL <sup>-1</sup>                               | 46,2 ng mL <sup>-1</sup>                             |
| Cefalexina     | 0,9952   | 10 ng mL <sup>-1</sup>                               | 33 ng mL <sup>-1</sup>                               |
| Amoxicilina    | 0,9842   | 10 ng mL <sup>-1</sup>                               | 33 ng mL <sup>-1</sup>                               |
| Ampicilina     | 0,9971   | 18 ng mL <sup>-1</sup>                               | 54 ng mL <sup>-1</sup>                               |

De acordo com a tabela XII e considerando os fatores de correlação das retas resultantes, pode-se considerar que as curvas de calibração obtidas, os limites de detecção e de quantificação foram satisfatórios.

#### **4.1.3. Extração em fase sólida**

O estudo de extração em fase sólida para fármacos foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foram avaliadas três fases comerciais disponíveis no mercado (LC-18, Envi Chrom P e NEXUS). Na segunda etapa do trabalho, foram avaliadas as fases sintetizadas a partir da funcionalização de sílica com (Me-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (nBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (iBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>. Para fins de comparação a fase comercial LC-18 (sílica funcionalizada com octadecilsilano) também foi avaliada.

Na primeira etapa, dois volumes (50 e 250 mL) foram utilizados para avaliar o efeito do volume da amostra sobre a recuperação.

O volume que apresentou melhor retenção para os fármacos foi 50 mL. Para o volume de 250 mL observou-se que os analitos eram arrastados pelo próprio solvente da amostra, no caso, a água. Para a segunda etapa (fases sintetizadas) também foi selecionado o volume de 50 mL. Essas fases apresentaram baixa retenção no volume de 250 mL.

Cefalexina e tetraciclina apresentaram bons resultados nos testes de retenção dos cartuchos e recuperação dos analitos em estudo, entretanto ampicilina e amoxicilina não foram retidas nesses cartuchos.

De acordo com a literatura, para validação de procedimentos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 85 e 115%<sup>cxvii</sup>. Para RSD são aceitos valores de até 15% para analitos nesse nível de

concentração<sup>cxviii</sup>. Na seqüência será apresentado um estudo detalhado de extração e pré-concentração dos cartuchos comerciais. As tabelas XIII e XIV apresentam os valores de recuperação obtidos para os fármacos tetraciclina e cefalexina, respectivamente.

**Tabela XIII:** Recuperação da tetraciclina para os experimentos de SPE, em três cartuchos comerciais (C-18, Envi Chrom P e NEXUS), eluídas com solventes e/ou mistura de solventes, (n=3).

| Fase    | Solventes (v/v)  | Recuperação (%) | RSD (%) | V (mL) eluição |
|---------|--|-----------------|---------|----------------|
| Chrom P | 0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40   | 31,5            | 9,0     | 5              |
| Chrom P | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40  | 54,9            | 9,1     | 5              |
| Chrom P | Metanol  | 81,0            | 4,0     | 5              |
| Chrom P | 1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40  | nd              |         | 5              |
| LC-18   | 0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40   | 28,9            | 9,9     | 5              |
| LC-18   | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40  | nd              | -       | 5              |
| LC-18   | Metanol  | 62,9            | 8,4     | 5              |
| LC-18   | 0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40  | nd              | -       | 5              |
| Nexus   | 0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40<br>+<br>1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40 | 52,9            | 11,4    | 1              |
| Nexus   | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40<br>+<br>1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40      | 58,3            | 12,0    | 1              |
| Nexus   | Metanol  | 24,1            | 6,9     | 1              |
| Nexus   | 1 % de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40   | 23,2            | 23,2    | 1              |

nd: não detectado

Para os ensaios de retenção da tetraciclina, o cartucho Chrom P apresentou melhor recuperação com o solvente metanol (81,0 %, RSD 4,0%). Valores Similares foram encontrados na literatura: 60%: (60%-90%)<sup>cxix</sup>, (71%-89%)<sup>cxx</sup>, (84-103%)<sup>cxxi</sup>, (62%-100%)<sup>cxxii</sup>, (80-102%)<sup>cxxiii</sup> para recuperação de

poluentes em nível de traços. Entretanto, se objetivo desse trabalho fosse validação de método, seria necessário otimizar o procedimento até atingir o valor mínimo de 70 %<sup>cxxiv</sup>.

**Tabela XIV:** Recuperação da Cefalexina para os experimentos de SPE, em três cartuchos comerciais (C-18, Envi Chrom P e Nexus), eluídos com solventes e/ou mistura de solventes, (n=3).

| Fase    | Solventes (v/v)                            | Recuperação (%) | RSD (%) | V (mL) eluição |
|---------|--|-----------------|---------|----------------|
| Chrom P | 0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40  | 54,0            | 9,8     | 5              |
| Chrom P | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40      | 71,7            | 7,5     | 5              |
| Chrom P | 1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40    | 95,6            | 2,4     | 5              |
| LC-18   | 0,01% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40 | nd              | -       | 5              |
| LC-18   | 0,1% de Ácido Acético/Acetonitrila, 60:40  | nd              | -       | 5              |
| LC-18   | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40      | 64,3            | 7,2     | 5              |
| Nexus   | Metanol                                    | nd              | -       | 1              |
| Nexus   | 1,25% de Ácido Acético/Metanol, 60:40      | nd              | -       | 1              |

nd: não detectado

Para a cefalexina, os cartuchos Nexus não apresentaram boa retenção pois no descarte, foi constatada a presença do fármaco, indicando que a retenção não foi efetiva. A melhor recuperação foi atribuída ao cartucho Chrom P, utilizando-se a mistura de solventes de ácido acético 1% e acetonitrila como eluente (95,6 %, RSD =2,4 %).

Os testes de recuperação para amoxicilina e ampicilina, utilizando-se cartuchos Chrom P, LC-18 e Nexus, apresentaram baixo percentual de recuperação inferior. Na análise do descarte desses fármacos foi detectada a presença de até 95% de amoxicilina e ampicilina. Com base nesses resultados pôde ser concluído que amoxicilina e ampicilina não são adsorvidas nos cartuchos citados.

Como segunda etapa da extração em fase sólida em fármacos, foram avaliadas a adsorção e pré-concentração de cefalexina e tetraciclina em três sílicas funcionalizadas com zirconocenos, preparadas a partir da imobilização de (Me-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (nBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> e (iBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> sobre sílica. Para efeitos comparativos o cartucho comercial LC-18 constituído de sílica funcionalizada com octadecilsilano também foi avaliado nessa etapa do trabalho. A tabela XV apresenta os valores de recuperação para cefalexina nas fases indicadas acima.

**Tabela XV:** Recuperação da cefalexina para os experimentos de SPE, em uma fase comercial: (LC-18), e nas fases sintetizadas com zircinoceno: (Me-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (nBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> e (iBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, eluídas com solventes e/ou mistura de solventes, (n=3).

| Fase    | Solventes (v/v)                            | Recuperação (%) | RSD (%) | V(mL) eluição |
|---------|--|-----------------|---------|---------------|
| LC-18   | 0,1% de Ácido acético/Acetonitrila,, 60:40 | 68,0            | 3,8     | 5             |
| LC-18   | 1% de Ácido acético/Acetonitrila 60:40     | 62,0            | 4,3     | 5             |
| LC-18   | 1,25% de Ácido acético/Metanol, 70:30      | n.d.            | --      | 5             |
| Me-Cp   | 0,1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40  | 16,3            | 5,5     | 5             |
| Me-Cp   | 1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40    | 52,6            | 7,9     | 5             |
| Me-Cp   | 1,25% de Ácido acético/Metanol, 70:30      | n.d.            | --      | 5             |
| n-Bu-Cp | 0,1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40  | 6,7             | 9,8     | 5             |
| n-Bu-Cp | 1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40    | 24,5            | 7,9     | 5             |
| n-Bu-Cp | 1,25% de Ácido acético/Metanol, 70:30      | 26,8            | 10,1    | 5             |
| i-Bu-Cp | 0,1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40  | 17,2            | 4,8     | 5             |
| i-Bu-Cp | 1% de Ácido acético/Acetonitrila, 60:40    | 10,8            | 8,3     | 5             |
| i-Bu-Cp | 1,25% de Ácido acético/Metanol, 70:30      | n.d.            | --      | 5             |

nd: não detectado

Para essa etapa, três misturas de solventes foram avaliadas: 0,1% ácido acético / acetonitrila (60:40), 1% ácido acético / acetonitrila (60:40) e 1,25% ácido acético / metanol (70:30). Para a mistura de solvente 0,1% de ácido acético e acetonitrila (60:40), a fase LC-18 apresentou o melhor resultado de recuperação: 68%. A recuperação da cefalexina nas três fases sintetizadas apresentou baixos resultados (recuperação inferior a 30%) para a maioria das fases com exceção de Me-Cp na mistura 1% de ácido acético / acetonitrila 60:40. Um aumento na acidez do solvente apresentou uma sensível redução na recuperação da cefalexina no cartucho LC-18. Resultados similares foram obtidos no caso da fase iBu-Cp. Nas outras duas fases (nBu-Cp, Me-Cp), o aumento da acidez apresentou melhores recuperações. A fase Me-Cp apresentou um grande aumento na recuperação nessas condições, passando de 16,3 % na fase com ácido acético 0,1% para 52,6% na fase com presença de ácido acético 1%. Na terceira eluição, 1,25 % de ácido acético / metanol (70:30), não foi observada recuperação dos fármacos em nenhuma das fases LC-18, Me-Cp, e iBu-Cp. Na fase nBu-Cp, foi observada uma recuperação de 26,8 % nesse solvente. Entretanto esse valor é muito baixo e será desconsiderado.

Esses resultados sugerem que a presença de aromaticidade (Cp) ou da cadeia alifática curta nas fases sintetizadas, não é adequada para interação com esse fármaco. A tabela XVI apresenta valores de recuperação para tetraciclina nas fases avaliadas na tabela XV.

**Tabela XVI:** Recuperação da tetraciclina para os experimentos de SPE, em uma fase comercial (LC-18), e nas fases (Me-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (nBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, (iBu-Cp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> e LC-18 eluídas com solventes e/ou mistura de solventes, (n=3).

| <b>Fase</b> | <b>Solventes (v/v)</b>                                       | <b>Recuperação (%)</b> | <b>RSD (%)</b> | <b>V(mL) eluição</b> |
|-------------|--|------------------------|----------------|----------------------|
| LC-18       | 0,01 mol/L Ácido oxálico / Acetonitrila / Metanol, 73:17: 10 | 29,3                   | 4,8            | 5                    |
| LC-18       | 0,01 mol L <sup>-1</sup> Ácido oxálico / Metanol, 60:40      | 64,6                   | 5,9            | 5                    |
| Me-Cp       | 0,01 mol/L Ácido oxálico / Acetonitrila / Metanol, 73:17: 10 | n.d.                   | -              | 5                    |
| Me-Cp       | 0,01 mol L <sup>-1</sup> Ácido oxálico / Metanol, 60:40      | 62,0                   | 8,4            | 5                    |
| nBu-Cp      | 0,01 mol/L Ácido oxálico / Acetonitrila / Metanol, 73:17: 10 | 29,1                   | 7,5            | 5                    |
| nBu-Cp      | 0,01 mol L <sup>-1</sup> Ácido oxálico / Metanol, 60:40      | 60,2                   | 3,8            | 5                    |
| iBu-Cp      | 0,01 mol/L Ácido oxálico / Acetonitrila / Metanol, 73:17: 10 | 30,0                   | 5,9            | 5                    |
| iBu-Cp      | 0,01 mol L <sup>-1</sup> Ácido oxálico / Metanol, 60:40      | 63,1                   | 4,7            | 5                    |

nd: não detectado

As quatro fases também foram utilizadas para avaliar a recuperação da tetraciclina.

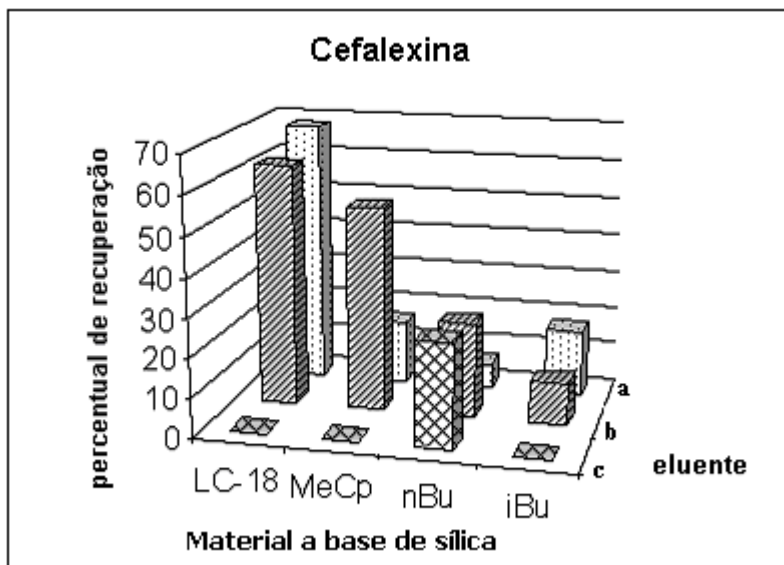
Cabe salientar que o solvente metanol também foi avaliado nas quatro fases e os resultados de recuperação foram menor que 15%, por esse motivo esse solvente não consta nas tabelas XV e XVI.

A mistura de solventes 0,01 mol L<sup>-1</sup> ácido oxálico / metanol (60:40) apresentou os melhores valores de recuperação no caso da fase Me-Cp.

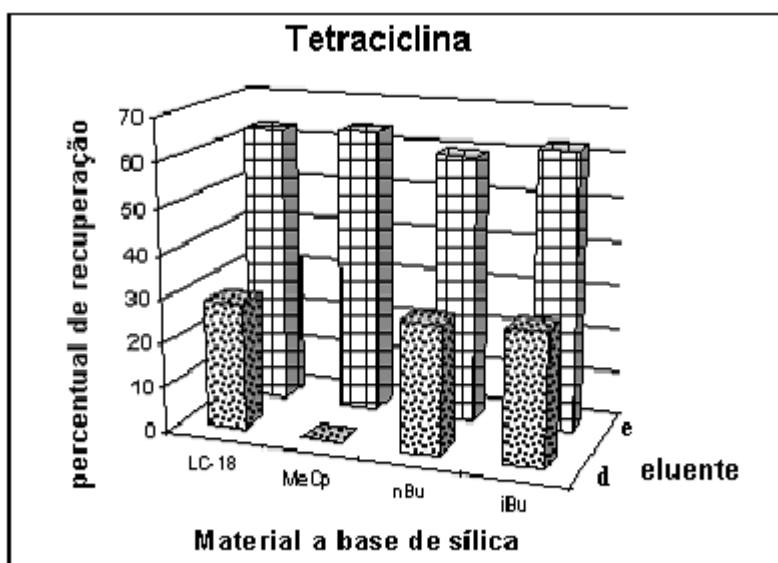
A mistura de solventes 0,01 mol/L ácido oxálico / acetonitrila / metanol (73:17:10) apresentou baixas recuperações para todas as fases não ultrapassando 30%. A mistura de solventes 0,01 mol L<sup>-1</sup> ácido oxálico / metanol 60:40 apresentou recuperações em torno de 60-63% para todas as fases. Esses valores sugerem a forte interação da tetraciclina nas fases sintetizadas.

Para melhor visualização da recuperação das fases em estudo as tabelas XV e XVI foram organizadas em forma de gráfico de barras. As figura 8 e 9 apresentam uma comparação entre as recuperações da cefalexina e tetraciclina, respectivamente, nas fases estudadas.

**Figura 8:**  
Valores de recuperação da cefalexina as fases sintetizadas à base de sílica funcionalizada com a



mistura de solventes (a) 0,1% de ácido acético e acetonitrila (60:40), (b) 1% de ácido acético e acetonitrila (60:40) e (c) 1,25% de ácido acético e metanol (70:30).



**Figura 9:** Valores de recuperação da tetraciclina nas fases sintetizadas à base de sílica funcionalizada com os solventes (d) 0,01 mol/L ácido oxálico/acetonitrila/metanol (73:17: 10) e (e) 0,01 mol L<sup>-1</sup> ácido oxálico / metanol (60:40).

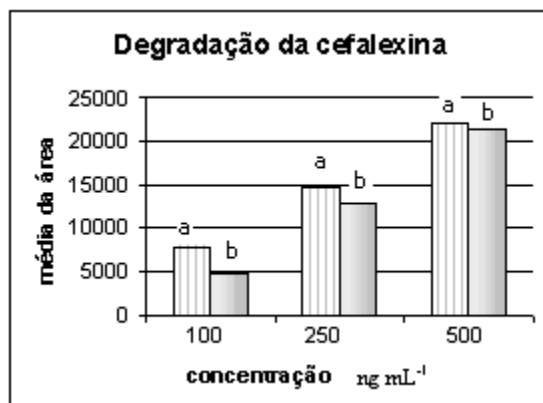
De acordo com a figura 9, foi observado que as fases sintetizadas permitem valores de recuperação similares àquelas obtidas com a fase comercial LC-18, quando se utiliza a mistura de solventes 0,01 mol L<sup>-1</sup> ácido oxálico/ metanol 60:40.<sup>14</sup>

As fases sintetizadas apresentam cerca de 0,3 % Zr/SiO<sub>2</sub>. As medidas por espectroscopia molecular no Infravermelho mostraram que nesses teores de metal, existem ainda grupos silanóis não-consumidos. Esse nível de saturação da superfície (0,3 % Zr/SiO<sub>2</sub>) fixado a partir de uma solução inicial de 1,0 % Zr/SiO<sub>2</sub>) indica que o teor máximo de fixação não está restrito à disponibilidade de sítios (silanóis) para fixação, mas sim pelo efeito estérico desempenhado pelas próprias moléculas de zirconoceno immobilizados na superfície da sílica, que impedem o acesso daquelas moléculas presentes na solução aos sítios silanóis residuais da superfície. Dessa forma, as fases sintetizadas possuem grupos silanóis que podem vir a interagir com os analitos. Assim, tendo em vista a presença de grupos silanóis na superfície e a presença de grupos OH na estrutura da tetraciclina, parece que esse analito tem uma tendência maior a interagir com as fases à base de sílica funcionalizada com zirconocenos. Além disso, a presença de ácido de Lewis nos derivados zirconocenos deve garantir sítios extras para interagir com a porção carbonil desse analito. Tais características parecem influenciar na interação da tetraciclina com essas fases sintetizadas.

Conforme observado no caso da mistura ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> /metanol (60:40), a presença de metanol parece extrair uma quantidade superior de tetraciclina da fase sólida. O papel do metanol na extração de compostos immobilizados ou adsorvidos na sílica já foi discutido na literatura. Tal solvente pode competir com grupos silanol na interação do fármaco com a superfície da sílica. Assim, a presença de grupos silanol residuais nas fases zirconoceno parece garantir um maior teor de tetraciclina na etapa de percolação, que é posteriormente facilmente extraído com a mistura de solventes contendo metanol. A fase comercial LC-18 contém apenas cerca de 10 % dos grupos silanóis silanizados, sugerindo também que a presença desses grupos silanóis remanescentes possam vir a influenciar na adsorção/pré-concentração da tetraciclina.

#### ***4.1.4. Degradação dos Fármacos***

Como estávamos trabalhando com concentrações muito baixas, pareceu-nos interessante avaliar a degradação dos fármacos em baixas concentrações. Um teste de degradação foi feito para cefalexina (figura 10).



**Figura 10:** Comparação da degradação da área do pico cromatográfico da cefalexina: no momento da preparação (a) e após 24 horas (b), (n=3).

Após várias injeções da cefalexina foi observado um decréscimo nas áreas após 24 horas de preparação da solução. Foi observado também que quanto menor a concentração do fármaco, maior a degradação.

#### 4.1.5. Amostra real

Uma amostra de água coletada no lago Guaíba (especificada em materiais e métodos) fortificada com 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de tetraciclina foi testada. Uma recuperação de 78% foi observada nessa amostra (anexo 1).

O anexo 2 apresenta o cromatograma referente à amostra coletada no lago Guaíba e posteriormente quantificada por HPLC-UV. Como pôde ser observado (anexo 2) no tempo de retenção próximo ao da tetraciclina (8,8 min - fase móvel: ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> / acetonitrila / metanol (73:17:10) foi detectado um pico, porém não pode ser identificado como pico da tetraciclina, pois amostras de águas são matrizes muito complexas e somente pode ser confirmada a presença do contaminante orgânico com detector de espectrometria de massas. O aparelho de trabalho não possuía esse detector.



## 4.2. PESTICIDAS

Os pesticidas aqui estudados são muito utilizados nos países da União Européia. Na União Européia entre eles a presença de pesticidas no meio aquático é regulamentada por diversas diretrizes que impõem limites restritivos para pesticidas individuais e totais e exige monitoramento regular cxxxv,cxxxvi,cxxxvii,cxxxviii,cxxxix.

### 4.2.1. Separação cromatográfica

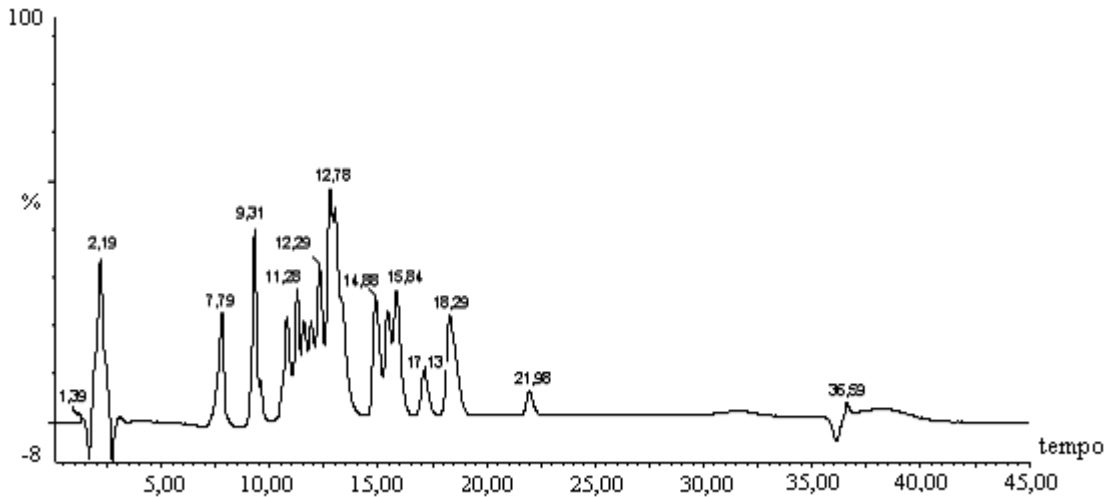
Para separação cromatográfica dos analitos em estudo foram utilizadas três colunas cromatográficas distintas. Em geral, o uso de espectrômetro de massas acoplado em delineamento com MS-MS (*tandem mass spectrometry*) não requer completa separação cromatográfica entre os analitos, pois é raro encontrar moléculas com o mesmo tempo de retenção compartilhando uma única transição MS-MS<sup>cxxx</sup>.

Entretanto, a sensibilidade do detector de massas diminui quando o número de transições registradas aumenta. Portanto, é necessário um certo grau de separação para ativar a programação de várias transições MRM (*Multiply Reaction Monitoring*) selecionadas em intervalos de tempos diferentes ao longo do cromatograma. Levando-se em consideração esses e outros aspectos, tais como forma do pico, tempo de corrida cromatográfica e meia vida da coluna, a coluna Purospher STAR RP 18 foi selecionada para a separação dos pesticidas em estudo. O tempo de retenção para eluição do último pico foi 21,98 min com a coluna Purospher, aproximadamente o mesmo (21,25 min) com a coluna Zorbax, e mais longo (32,47 min) com a coluna Chromolith.

### 4.2.2. Composição da fase móvel

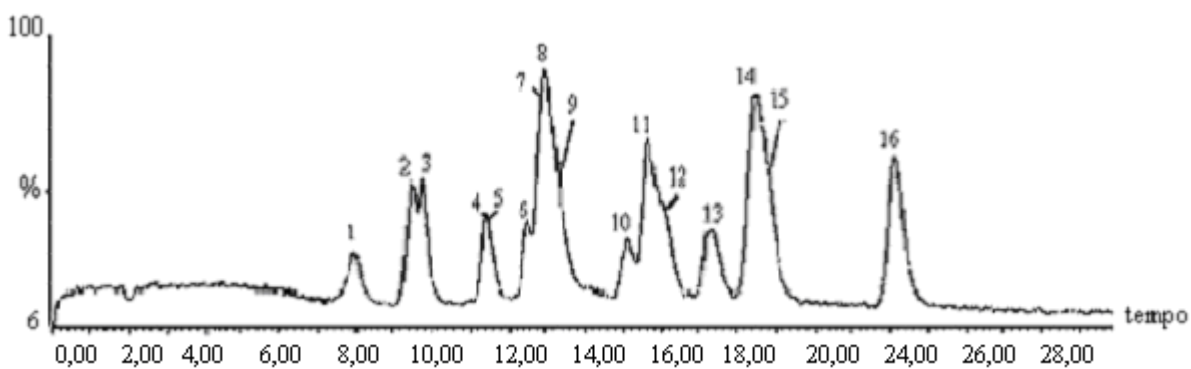
Diferentes misturas de água/metanol, água/acetonitrila e água/acetonitrila modificadas com ácido fórmico (0,025% e 0,050%) foram avaliadas. Na primeira série de experimentos, foram avaliados o efeito de acetonitrila e metanol como modificadores orgânicos na ionização dos compostos estudados. Foi observada que em todos os casos, com exceção do diazinon, a acetonitrila apresentou melhor sensibilidade em relação ao metanol. Modificações da fase móvel água/acetonitrila com ácido fórmico levaram a melhores resultados para nove dos vinte pesticidas estudados (triazinas, organofosforados e molinato), mas teve um impacto negativo nos demais pesticidas analisados em modo positivo e nos pesticidas ácidos analisados no modo de ionização negativo. Nesse modo de

ionização, a adição do ácido na fase resultou na extinção do sinal MS. Então, a fase móvel selecionada para a separação cromatográfica dos pesticidas em estudo foi a mistura acetonitrila/água sem adição de ácido, usando o programa de eluição demonstrado na tabela VII (no item Materiais e Métodos). A figura 11 apresenta a separação cromatográfica dos pesticidas em estudo em acetonitrila e água.



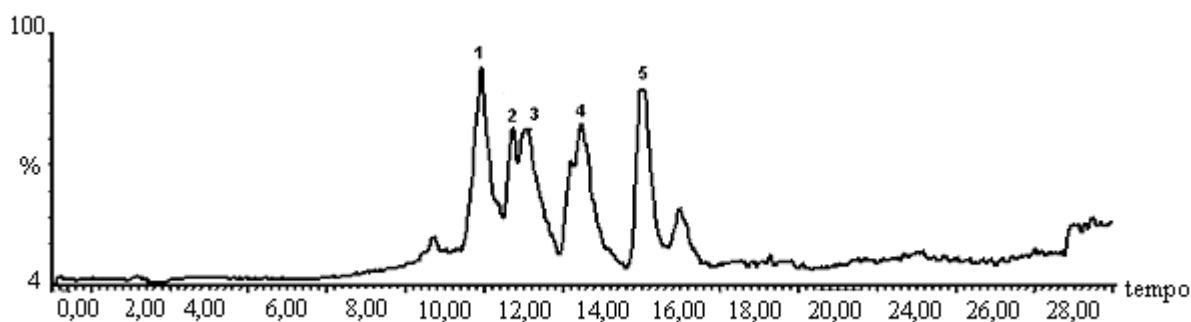
**Figura 11:** Separação cromatográfica com acetonitrila / água ultrapura no gradiente indicado pela tabela VII (em Materiais e Métodos) por LC-DAD.

As figuras 12 e 13 apresentam a separação cromatográfica em acetonitrila e água ultrapura por LC-MS-MS, o cromatograma dos padrões de pesticidas em ionização *spray eletrônico* positivo (ESI +) e em *spray eletrônico* negativo (ESI -), respectivamente.



1 – Deisopropilatrazine; 2 Desetilatrazine; 3- Dimetoato; 4- Propanil; 5- Cianazine; 6- Clortoluron; 7- Isoproturon; 8- Atrazina; 9- Diuron; 10- Simazina; 11- Molinato; 12- Linuron; 13- Tertbutilazine; 14- Metolacoloro; 15- Alacloro; 16- Diazimon.

**Figura 12:** Cromatograma do padrão múltiplo de pesticidas em modo de ionização (ESI +).



1- Bentazone; 2- 4 D; 3- MCPA; 4- Mecoprop; 5- Propanil

**Figura 13:** Cromatograma do padrão múltiplo de pesticidas em modo de ionização ESI (-).

#### 4.2.3 Otimização MS-MS

A otimização de diversas condições experimentais MS-MS foram testadas por injeções na coluna de soluções padrão de pesticida individual e da mistura de todos os pesticidas. A identificação do íon produzido, modo de ionização, seleção e otimização da voltagem aplicada para cada analito foram feitas no modo de varredura total (*full scan*), registrando os espectros de massas (na faixa  $m/z$ ) de 50 a 500 em ambos os modos: positivo e negativo em diferentes valores de voltagem aplicada (de 5 a 45 V, em intervalos de 5s). O modo positivo apresentou melhor ionização para a análise de 15 dos 20 pesticidas estudados (molinato, anilinas, organofosforados, feniluréias e triazinas). Entretanto, o modo negativo apresentou melhor sensibilidade para os pesticidas ácidos e propanil. Propanil pode ser medido em ambos os modos de operação (positivo e negativo), contudo o sinal MS no modo negativo foi mais intenso. Para a seleção da voltagem aplicada (tabelas XVII e XVIII), todos os compostos sofreram pequenas fragmentações, apresentando somente um íon predominante, os quais correspondem à molécula protonada  $[M+1]^+$  no caso dos analitos medidos no modo positivo e a molécula desprotonada  $[M-1]^-$ , no caso dos analitos medidos em modo negativo. A identificação subsequente dos íons produzidos mais abundantes e a seleção da melhor energia de colisão para cada analito foram realizadas em modo *SCAN*. As tabelas XVII e XVIII apresentam as duas primeiras transições MRM para cada analito. Essas condições estão em concordância com a literatura<sup>cxxxi</sup>.

**Tabela XVII:** Condições otimizadas de análises de pesticidas ácidos e propanil por LC-ESI(-)-MS-MS.

| <b>Pesticida</b> | <b>Tempo (min)</b> | <b>Transição MRM (m/z)<br/>Íon precursor → Íon produzido</b> | <b>Cone (V)</b> | <b>Energia Colisão (eV)</b> |
|------------------|--------------------|--|-----------------|-----------------------------|
| Bentazone        | 00,0-14,0          | 239 → 132  | 35              | 25                          |
|                  | 00,0-14,0          | 239 → 197  | 35              | 20                          |
| MCPA             | 00,0-14,0          | 199 → 141  | 20              | 15                          |
|                  | 00,0-14,0          | 201 → 143  | 15              | 15                          |
| 2,4-D            | 00,0-14,0          | 219 → 161  | 15              | 10                          |
|                  | 00,0-14,0          | 219 → 125  | 15              | 30                          |
| Mecoprop         | 00,0-14,0          | 213 → 141  | 15              | 15                          |
|                  | 00,0-14,0          | 215 → 143  | 15              | 15                          |
| Propanil         | 14,0-20,0          | 216 → 160  | 30              | 15                          |
|                  | 14,0-20,0          | 218 → 162  | 30              | 15                          |

**Tabela XVIII:** Condições otimizadas de análise de pesticidas molinato e outros pesticidas pertencentes ao grupo de triazinas, feniluréias, anilinas e organofosforados por LC-ESI (+)-MS-MS.

| <b>Pesticida</b>    | <b>Tempo (min)</b> | <b>Transição MRM (m/z)<br/>Íon Precursor → Íon produzido</b> | <b>Cone (V)</b> | <b>Energia Colisão. (eV)</b> |
|---------------------|--------------------|--|-----------------|------------------------------|
| Deisopropilatrazina | 00,00-8,80         | 174 → 104  | 25              | 20                           |
|                     | 00,00-8,80         | 174 → 132  | 25              | 15                           |
| Desetilatrazina     | 8,80-10,65         | 188 → 146  | 25              | 15                           |
|                     | 8,80-10,65         | 188 → 104  | 25              | 25                           |
| Dimetoato           | 8,80-10,65         | 230 → 199  | 15              | 10                           |
|                     | 8,80-10,65         | 230 → 125  | 15              | 20                           |
| Simazina            | 10,65-14,25        | 202 → 132  | 30              | 20                           |
|                     | 10,65-14,25        | 202 → 124  | 30              | 20                           |
| Cianazina           | 10,65-14,25        | 241 → 214  | 30              | 15                           |
|                     | 10,65-14,25        | 241 → 174  | 30              | 20                           |
| Clortoluron         | 10,65-14,25        | 213 → 72   | 25              | 15                           |
|                     | 10,65-14,25        | 213 → 140  | 25              | 25                           |
| Isoproturon         | 10,65-14,25        | 207 → 72   | 25              | 15                           |
|                     | 10,65-14,25        | 207 → 165  | 25              | 25                           |
| Atrazina            | 10,65-14,25        | 216 → 174  | 30              | 15                           |
|                     | 10,65-14,25        | 216 → 132  | 30              | 20                           |
| Diuron              | 10,65-14,25        | 233 → 72   | 15              | 15                           |
|                     | 10,65-14,25        | 235 → 72   | 15              | 30                           |
| Terbutilazina       | 16,40-22,0         | 230 → 174  | 20              | 15                           |
|                     | 16,40-22,0         | 230 → 132  | 20              | 25                           |
| Linuron             | 16,40-22,0         | 249 → 160  | 25              | 20                           |
|                     | 16,40-22,0         | 249 → 182  | 25              | 15                           |
| Molinato            | 16,40-22,0         | 188 → 126  | 25              | 10                           |
|                     | 16,40-22,0         | 188 → 83   | 25              | 20                           |
| Metolaclo           | 16,40-22,0         | 284 → 252  | 25              | 15                           |
|                     | 16,40-22,0         | 284 → 176  | 25              | 25                           |
| Alaclo              | 16,40-22,0         | 270 → 238  | 15              | 10                           |
|                     | 16,40-22,0         | 270 → 162  | 15              | 25                           |
| Diazinon            | 22,50-27,00        | 305 → 169  | 25              | 20                           |
|                     | 22,50-27,00        | 305 → 153  | 25              | 20                           |

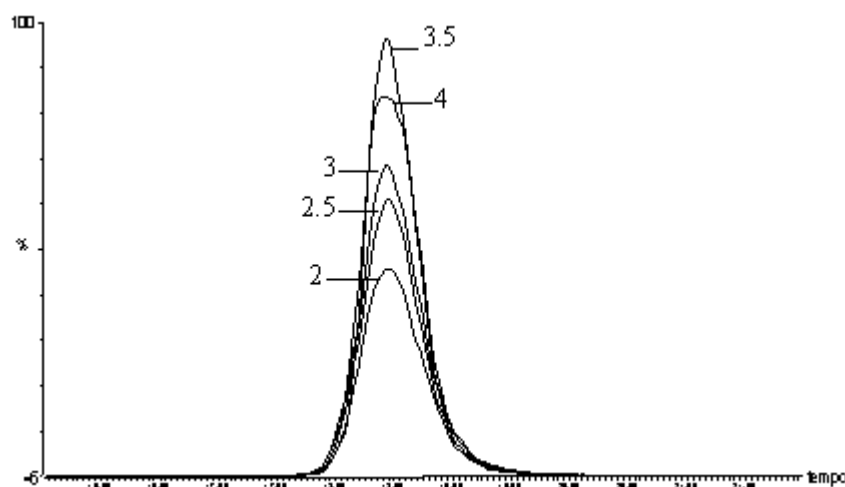
Os parâmetros MS-MS de voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação, extrator e lentes RF foram otimizados de acordo com os valores listados na tabela XVIII. Os parâmetros mais relevantes em termos de sensibilidade foram voltagem do capilar e temperatura de dessolvatação.

**Tabela XIX:** Otimização dos parâmetros MS-MS (valores selecionados estão sublinhados).

| Parâmetro                         | Valores Otimizados             |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Voltagem do capilar (kV)          | 2; 2,5; 3; <u>3,5</u> ; 4      |
| Temperatura da fonte (°C)         | 120; <u>150</u>                |
| Temperatura de dessolvatação (°C) | 250; 300; 350; 400; <u>450</u> |
| Extrator (V)                      | 1; <u>2</u> ; 3; 4; 5; 6       |
| Lentes RF (V)                     | 0,1; 0,2; 0,3; <u>0,4</u>      |

É importante salientar que os parâmetros voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação, extrator e lentes RF apresentaram a mesma otimização para modo positivo e negativo.

A título de exemplificação, a figura 14 apresenta o efeito da voltagem do capilar em MS-MS sobre a intensidade do sinal obtido para o pesticida metolacloro (ESI +).



**Figura 14:** Influência da voltagem do capilar no sinal MS : Transição: MRM 284 → 252 característica para metolacloro (ESI +).

#### 4.2.4 Estudo das Fragmentações

O uso de LC-MS-MS para análise de pesticidas em amostras ambientais complexas está crescendo rapidamente. A confirmação da existência das fragmentações torna as análises em nível de traços mais confiáveis.

As figuras 15 e 16 apresentam os cromatogramas em MRM (*multiply reaction monitoring*) obtidos para análise de uma mistura de padrão de cada pesticida a uma concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses cromatogramas confirmam a presença da primeira transição (tabelas XVI e XVII) para cada pesticida.

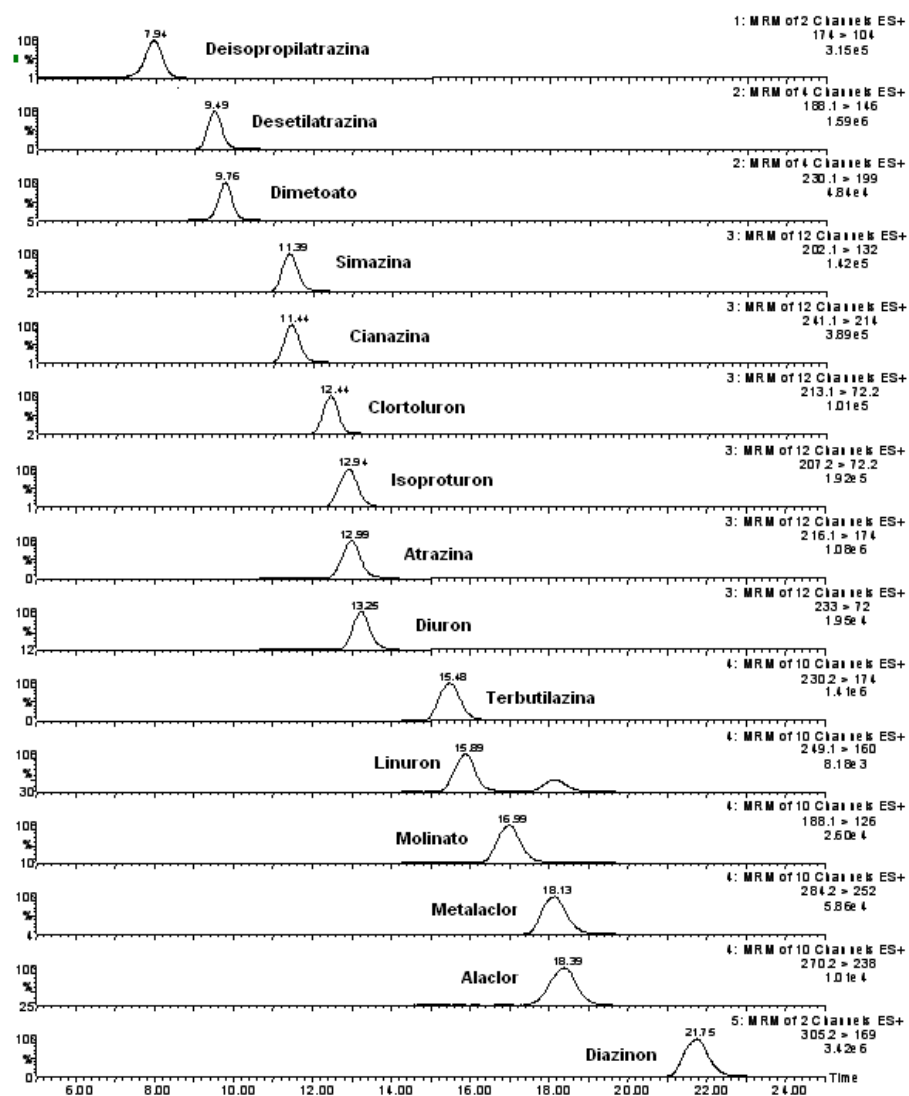
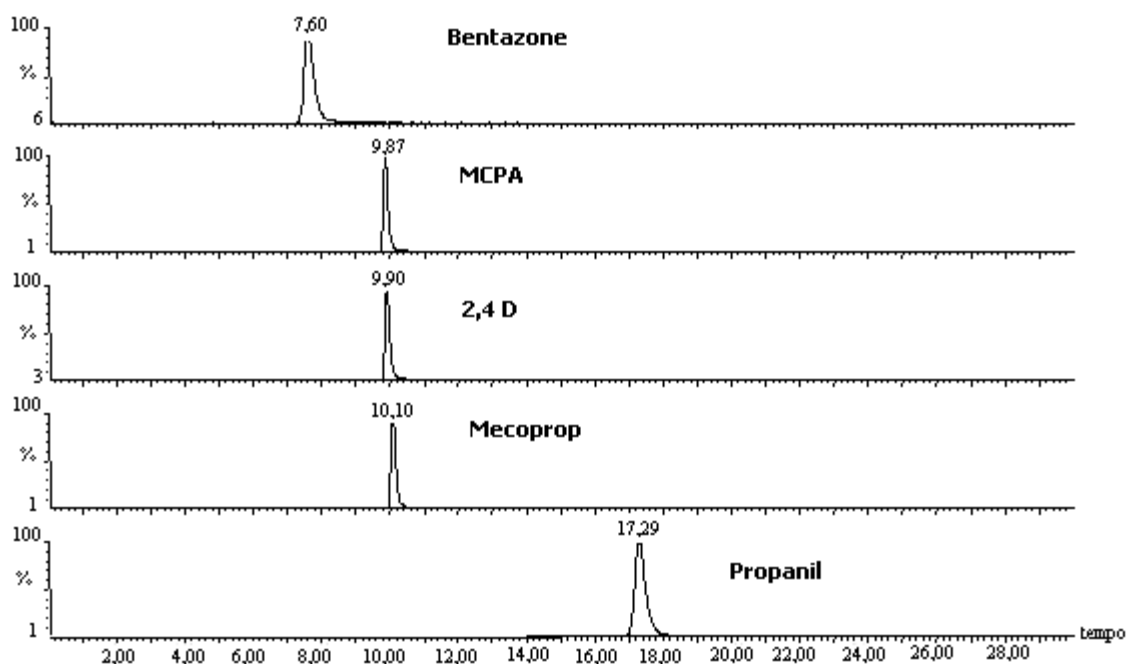


Figura 15: Cromatogramas obtidos para análise de uma mistura de padrão de pesticidas de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  por LC-ESI(+)-MS-MS.



**Figura 16:** Cromatogramas obtidos para análise de uma mistura de padrão de pesticidas de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  por LC-ESI(-)MS-MS.

Como parte desse trabalho, uma proposta de elucidação estrutural foi feita para as duas principais transições dos pesticidas em estudo. A abundância de um fragmento iônico específico relativo à abundância do íon molecular e outros fragmentos iônicos pode ser um indicador útil da estrutura do fragmento, bem como da distribuição de certos grupos funcionais em uma molécula. Em modo *SCAN* positivo foram determinadas fragmentações para 16 pesticidas e em modo *SCAN* negativo, de cinco pesticidas (propanil foi analisado em modo positivo e negativo). As maiores fragmentações para modo positivo  $[M + 1]^+$  ou modo negativo  $[M-1]^-$  foram definidas como íons precursores. Com o aumento da voltagem aplicada ocorreu uma maior fragmentação do íon precursor originando os principais íons produzidos. Por MRM foram confirmadas as duas transições mais importantes. As melhores transições foram escolhidas para os picos que apresentaram melhor sensibilidade. Para os compostos que apresentavam presença de cloro (Cl), foi feito o MRM levando-se em consideração a abundância isotópica  $\text{Cl}^{35}$  e  $\text{Cl}^{37}$ . Por exemplo, o diuron (modo positivo), com massa molar  $233 \text{ g mol}^{-1}$ , apresenta dois cloros na sua fórmula estrutural. Para o diuron foram encontrados os mesmos valores para os dois íons produzidos. No entanto, os valores dos íons precursores apresentam diferença de dois números, conforme exemplo da tabela XVIII. Outro exemplo que pode ser observado é o MCPA (modo negativo) que apresenta massa molecular  $200 \text{ g mol}^{-1}$  e possui um cloro na sua fórmula



estrutural: foram encontrados dois íons precursores e dois íons produzidos e também foi observada a presença de  $Cl^{35}$  e  $Cl^{37}$ .

O anexo 3 apresenta as duas primeiras transições com a estrutura química deduzida para cada fragmento selecionado, determinado em ambos os modos de ionização (positivo e negativo). Como o propanil pode ser determinado em ambos os modos de ionização (positivo e negativo), ambas as fragmentações podem ser observadas.

Em geral, os pesticidas estudados, inclusive aqueles pertencentes às mesmas classes, não possuem mecanismo de fragmentação similar. Algumas similaridades podem ser observadas no fragmento principal (primeira transição) por compostos pertencentes ao mesmo grupo de pesticidas. Este é o caso, por exemplo, dos pesticidas ácidos mecoprop e MCPA que apresentam as mesmas fragmentações íons com  $m/z$  141 e 143. Outro exemplo são as triazinas: atrazinas, cianazina e tertbutlazines que compartilham o mesmo íon produzido  $m/z$  174, devido à perda de substituintes presentes nos grupos adjacentes à molécula de triazina. Outro exemplo corresponde às triazinas: atrazina, simazina e terbutilazina que apresentam como maior fragmento o íon com  $m/z$  132, resultado de uma quebra do anel. O mesmo pode ser observado por 3 das 4 feniluréias estudadas (clortoluron, diuron e isoproturon), as quais apresentam o maior fragmento o íon com  $m/z$  72, correspondente à dimetil uréia, resultante da clivagem da ligação feniluréia.

#### 4.2.5 Otimização da Extração em Fase Sólida (SPE on line)

Uma das grandes vantagens do método SPE *on line* é que as recuperações afetam igualmente padrões e amostras porque ambos são processados exatamente da mesma forma através de todo o procedimento analítico. Entretanto, atingir boas eficiências de extração é ainda importante em termos de sensibilidade.

Atualmente já existe um grande número de estudos em relação à aplicação de extração *on line* utilizando o sistema Prospekt, o que comprova a eficiência desse.

Para a determinação das condições apropriadas para a realização de SPE *on line* e análise dos compostos de interesse, alguns testes foram realizados.

Para a seleção do efeito do volume da amostra sobre a recuperação e do melhor sorbente foram avaliados em triplicata, os volumes de 20 e 40 mL. A tabela XX apresenta as percentagens de recuperação obtidas nesse estudo.

**Tabela XX:** Comparação da percentagem de recuperação obtida a partir das análises (n=3) para 20 e 40 mL de volume de amostra de água grau HPLC com a solução padrão dos pesticidas em estudo (100 ng L<sup>-1</sup>) extraídas nas fases estudadas.

| SPE (cartucho)      | LC-18-EC            |     | LC-18-HD |     | C2  |    | GP  |    | PLRP-S |    |
|---------------------|---------------------|-----|----------|-----|-----|----|-----|----|--------|----|
|                     | Amostra volume (mL) | 20  | 40       | 20  | 40  | 20 | 40  | 20 | 40     | 20 |
| Deisopropilatrizona | 0                   | 0   | 0        | 1   | 0   | 0  | 22  | 14 | 23     | 10 |
| Desetilatrizona     | 0                   | 2   | 7        | 9   | 0   | 3  | 6   | 12 | 21     | 25 |
| Dimetoato           | 1                   | 2   | 8        | 8   | 0   | 8  | 24  | 41 | 33     | 40 |
| Simazina            | 23                  | 9   | 61       | 42  | 6   | 5  | 29  | 13 | 57     | 34 |
| Cianazina           | 31                  | 21  | 63       | 53  | 33  | 10 | 43  | 18 | 62     | 44 |
| Clortoluron         | 97                  | 59  | 77       | 68  | 26  | 18 | 47  | 48 | 81     | 61 |
| Isoproturon         | 124                 | 118 | 97       | 74  | 124 | 40 | 63  | 56 | 111    | 66 |
| Atrazina            | 28                  | 30  | 67       | 66  | 42  | 21 | 57  | 40 | 91     | 66 |
| Diuron              | 97                  | 54  | 90       | 74  | 37  | 25 | 82  | 84 | 96     | 74 |
| Terbutilazina       | 26                  | 31  | 64       | 57  | 54  | 40 | 64  | 39 | 84     | 45 |
| Linuron             | 112                 | 42  | 101      | 62  | 110 | 25 | 97  | 54 | 104    | 58 |
| Molinato            | 80                  | 37  | 81       | 54  | 91  | 28 | 79  | 44 | 88     | 59 |
| Metolaclo           | 97                  | 79  | 81       | 64  | 97  | 59 | 73  | 57 | 94     | 76 |
| Alacloro            | 60                  | 33  | 90       | 53  | 86  | 41 | 86  | 52 | 100    | 56 |
| Diazinon            | 44                  | 20  | 76       | 40  | 61  | 31 | 76  | 29 | 84     | 40 |
| Bentazone           | 0                   | 0   | 19       | 4   | 0   | 0  | 69  | 9  | 3      | 1  |
| MCPA                | 0                   | 0   | 67       | 14  | 0   | 0  | 88  | 16 | 14     | 3  |
| 2,4-D               | 0                   | 0   | 61       | 12  | 0   | 0  | 80  | 13 | 12     | 3  |
| Mecoprop            | 1                   | 1   | 107      | 30  | 0   | 0  | 108 | 25 | 27     | 6  |
| Propanil            | 94                  | 100 | 106      | 116 | 45  | 19 | 96  | 87 | 87     | 95 |

Valores em percentual.

LC-18-EC: Hysphere C<sub>18</sub> EC

LC-18-HD: Hysphere C<sub>18</sub> HD

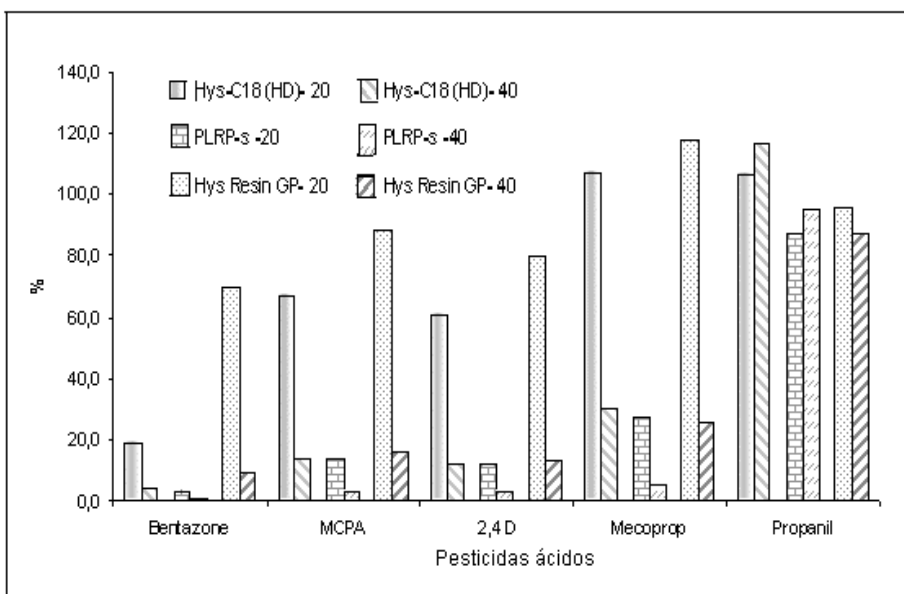
C2: Hysphere C2

GP: Hysphere Resin GP

Os valores de recuperação foram calculados a partir das áreas do pico de cada analito nas amostras da solução padrão de pesticidas como percentagem das áreas dos picos obtidos diretamente do cromatograma de injeção (20  $\mu$ L) das quantidades equivalentes das misturas de padrões em metanol.

Como pôde ser verificado na tabela XX foram obtidas diferentes recuperações dependendo do volume da amostra, da fase e do pesticida em estudo. As recuperações com valores mais baixos foram obtidos quando foi utilizado volume de amostra de 40 mL, provavelmente em função efeito do volume da amostra pré concentrada sobre a recuperação desses pesticidas. Uma exceção ocorreu com o propanil que nos cartuchos Hysphere C-18(EC) e Hysphere C-18(HD) que apresentaram melhores recuperações a 40 mL. Os cartuchos à base de sílica Hysphere-C<sub>2</sub> e Hysphere C-18(EC) não apresentaram bons resultados de recuperação. Os melhores resultados foram encontrados com volume de 20 mL e utilizando-se os cartuchos poliméricos PLRP-s, no caso dos pesticidas analisados em modo positivo, e Hysphere Resin GP, no caso dos pesticidas analisados em modo negativo. Nessas condições, os percentuais de recuperação foram maiores que 50% para todos os compostos exceto para deisopropilatrizona (23%), desetilatrizona (21%) e dimetoato (33%), isto é, os compostos com menor tempo de retenção na corrida cromatográfica por ESI positivo.

Para melhor visualização, a figura 17 apresenta uma comparação entre os volumes de 20 e 40 mL para os cartuchos que apresentaram melhores recuperações em modo de ionização negativo.



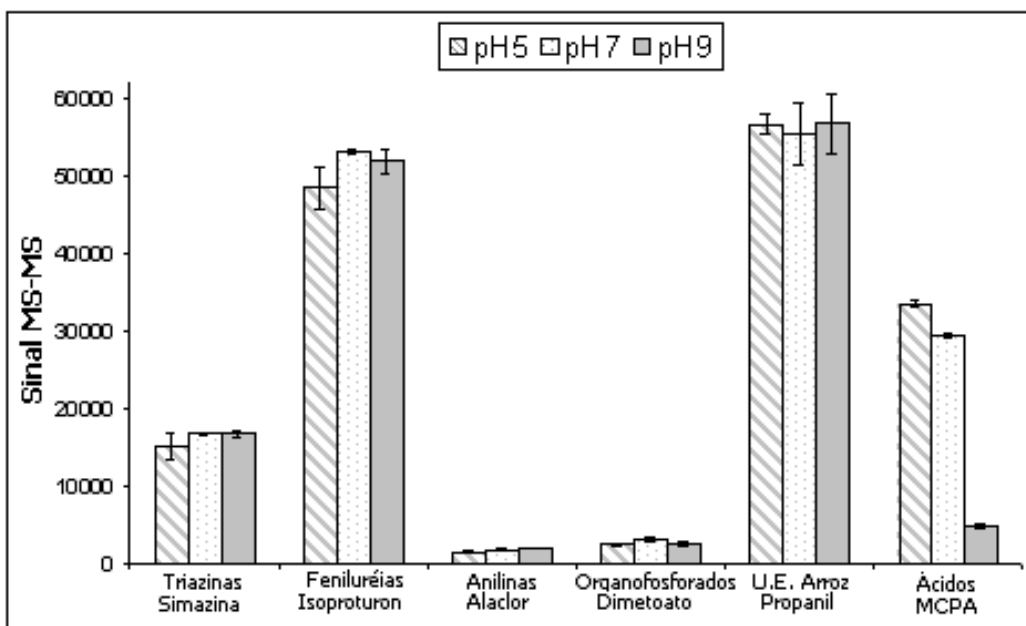
**Figura 17:** Diferentes fases avaliadas em diferentes volumes de extração 20 e 40 mL com concentração 100 ng L<sup>-1</sup> (n=3).

A eficiência na extração também é afetada por alguns fatores como pH e a presença de ácidos húmicos. Segundo Santos e colaboradores<sup>cxxxii</sup>, a análise de pesticidas por SPE/LC pode ser seriamente afetada pela presença de substâncias húmicas e a variação pode ser dramática quando se utiliza sistema de SPE com quantidades limitadas de sorbentes. Os sítios disponíveis do sorbente podem interagir tanto com a molécula do pesticida e/ou com os ácidos húmicos ocorrendo co-extração dos ácidos húmicos. Dessa maneira, a competição geralmente dependerá do valor do pH e da concentração do ácido húmico.

Como a eficiência do processo SPE pode ser afetada pela presença de ácidos húmicos e pelo valor de pH, esses dois fatores também foram estudados. Os experimentos foram avaliados em triplicata, utilizando-se água grau HPLC com os padrões de pesticidas a uma concentração de 100 ng L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.6 Influência do pH e ácidos húmicos

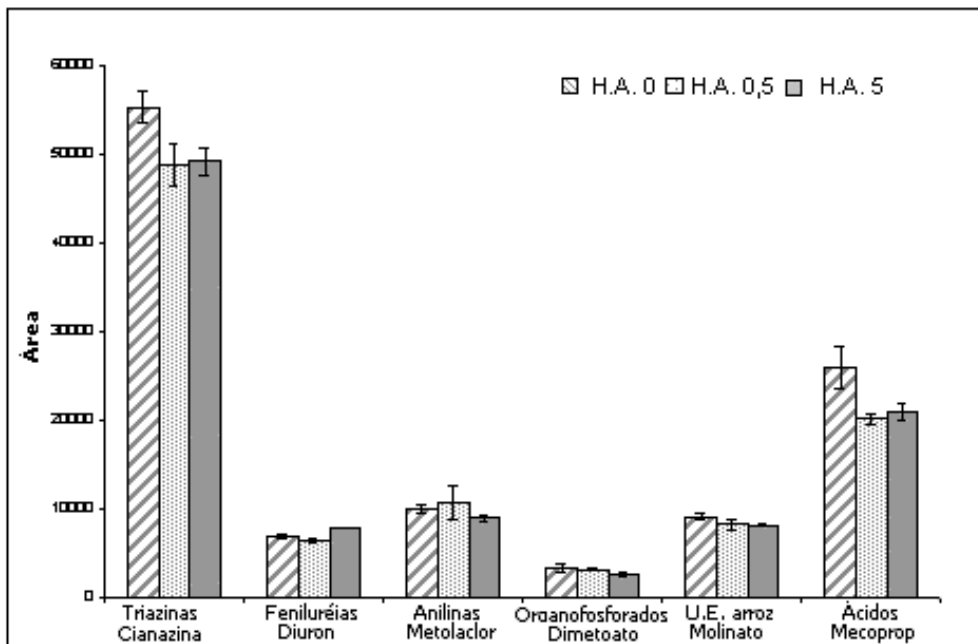
A figura 18 ilustra os resultados obtidos para alguns pesticidas representativos de cada grupo em estudo.



**Figura 18:** Diferentes valores de pH (5,0; 7,0 e 9,0) para os grupos representativos dos pesticidas em estudo (n=3).

Como pôde ser observado, exceto no caso dos pesticidas ácidos, o pH da amostra não apresentou efeito na eficiência de extração dos pesticidas em estudo. O sinal MS-MS obtido para os pesticidas ácidos foi menor a pH 9,0 e apresentou melhor sinal em pH 7,0 e 5,0. Isso indica que o pH da amostra necessita ser cuidadosamente ajustado entre pH 5,0 e 7,0, entretanto deverá ser o mesmo em ambas amostra e padrão, antes da análise dos pesticidas ácidos.

Como demonstra a figura 19 para cianazine e mecoprop ocorreu um leve decréscimo no sinal MS-MS na presença de ácidos húmicos. Entretanto esse efeito foi considerado moderado e completamente aleatório, independente da classe de pesticida e da concentração do ácido húmico.



**Figura 19:** Efeito de ácidos húmicos nos pesticidas em estudo (n=3).

#### 4.2.7. Desempenho do método e do Instrumento

O desempenho do método foi avaliado a partir de sensibilidade, linearidade e repetitividade do sinal MS. A versão do *software MassLynx* versão 3,5 (*Micromass*) foi usado para auxiliar nos cálculos de quantificação, levando em consideração a relação pico/área. A tabela XXI apresenta os valores para coeficiente de correlação, limite de detecção do método ( $LOD_M$ ), limite de quantificação do método ( $LOQ_M$ ) e limite de detecção do instrumento ( $LOD_i$ ) obtido na quantificação dos pesticidas estudados por LC-ESI-MS-MS.

**Tabela XXI.** Coeficiente de correlação ( $r$ ), limite de detecção do método ( $LOD_M$ ), limite de quantificação do método ( $LOQ_M$ ) e limite de quantificação do instrumento ( $LOQ_i$ ) obtido nas análises dos pesticidas estudados por LC-ESI-MS-MS ( $n=6$ ).

| <b>Pesticidas</b>   | <b><math>r</math></b> | <b><math>LOD_M</math></b><br>(ng L <sup>-1</sup> ) | <b><math>LOQ_M</math></b><br>(ng L <sup>-1</sup> ) | <b><math>LOD_i</math></b><br>(µg L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|-----------------------|--|--|--|
| Deisopropilatrizona | 0,9913                | 0,096  | 0,255  | 0,0690   |
| Desetilatrizona     | 0,9916                | 0,056  | 0,151  | 0,012  |
| Dimetoato           | 0,9996                | 0,296  | 0,788  | 0,112  |
| Simazina            | 0,9959                | 0,350  | 0,934  | 0,240  |
| Cianazina           | 0,9927                | 0,069  | 0,185  | 0,746  |
| Clortoluron         | 0,9984                | 0,334  | 0,890  | 0,248  |
| Isoproturon         | 0,9945                | 0,074  | 0,196  | 0,106  |
| Atrazina            | 0,9990                | 0,044  | 0,117  | 0,0582   |
| Diuron              | 0,9985                | 0,587  | 1,565  | 0,613  |
| Terbutilazina       | 0,9968                | 0,068  | 0,180  | 1,009  |
| Linuron             | 0,9985                | 2,329  | 6,210  | 4,528  |
| Molinato            | 0,9962                | 0,880  | 2,346  | 1,601  |
| Metolaclo           | 0,9986                | 0,438  | 1,167  | 1,181  |
| Alacloro            | 0,9926                | 2,794  | 7,449  | 2,990  |
| Diazinon            | 0,9874                | 0,040  | 0,110  | 4,090  |
| Bentazone           | 0,8894                | 0,136  | 0,362  | 0,053  |
| MCPA                | 0,9904                | 0,063  | 0,168  | 0,046  |
| 2,4-D               | 0,9915                | 0,094  | 0,250  | 0,050  |
| Mecoprop            | 0,9985                | 0,053  | 0,142  | 0,052  |
| Propanil            | 0,9933                | 0,051  | 0,134  | 0,076  |

O método padronização externa foi utilizado para calcular a quantificação. Para curva da calibração foram utilizados cinco pontos, utilizando-se análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, na faixa de concentração de 25 a 1000 ng L<sup>-1</sup>, passando pela origem. Coeficientes de quantificação maiores que 0,99 foram obtidos para todos os compostos, exceto para diazinon ( $r = 0,9802$ ) e bentazone ( $r = 0,8894$ ).

Os limites de detecção ( $LOD_M$ ) e de quantificação foram estimados experimentalmente a partir de análise de soluções aquosas do padrão, como a mínima concentração do analito até obter-se uma área correspondente a 3 ( $LOD_M$ ) e 8 ( $LOQ_M$ ) vezes a relação sinal/ruído.

Os maiores limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos para linuron (LOD = 2,329 ng L<sup>-1</sup> e LOQ = 6,210 ng L<sup>-1</sup>) e alacloro (LOD=2,794 ng L<sup>-1</sup>e LOQ=7,499 ng L<sup>-1</sup>), e os menores LOD e LOQ pertencem ao diazimon (LOD=0,040 ng L<sup>-1</sup>e LOQ= 0,110 ng L<sup>-1</sup>).

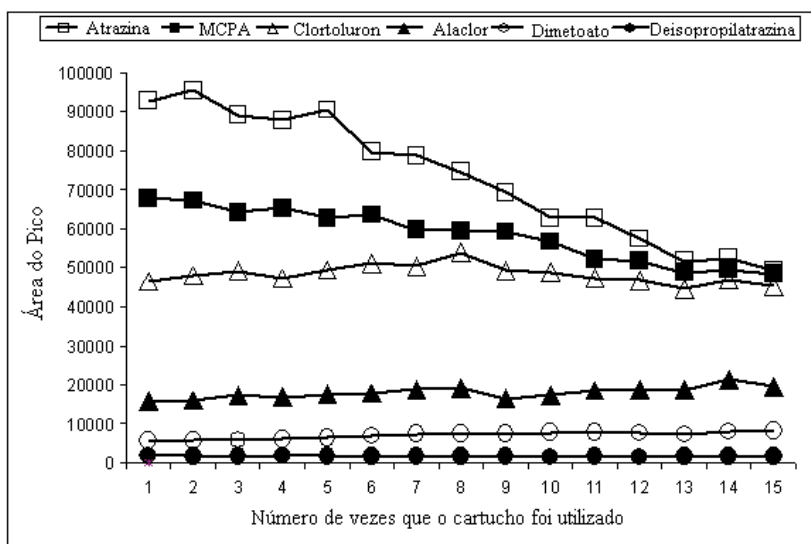
A repetitividade da técnica, calculada a partir de análise em replicata (n=6) de uma mistura de padrão de analitos em concentrações de 100 ng L<sup>-1</sup> foi satisfatória apresentando desvios-padrão entre 1,99 % (diuron) e 12,15 % (deisopropilatrazina).

Como pôde ser observado na tabela (XX) o LOD<sub>M</sub> apresentou-se aproximadamente 1000 vezes mais sensível que o LOD<sub>i</sub> com exceção dos pesticidas cianazina, isoproturon, terbutilazina, molinato, metolacloro e diazinon.

Tendo como objetivo fazer uma comparação entre o sistema de extração *on line* e *off line*, 20 mL de amostra de água do rio em estudo foi concentrada por SPE *off line*. O extrato foi evaporado e reconstituído a um volume de 500 µL. Foi injetado 20 µL do extrato no LC-MS-MS. A sensibilidade encontrada por SPE *off line* foi 20 vezes menor que por SPE *on line*

Tendo como objetivo minimizar gastos também foi avaliada nesse trabalho a reutilização das fases. Essa possibilidade foi avaliada experimentalmente pela análise da água do rio fortificada com 100 ng L<sup>-1</sup> (com os 20 pesticidas em estudo). Foram feitas quinze repetições com o mesmo cartucho. Como pode ser observado na figura a seguir, o cartucho pode ser reutilizado sem ocorrer perda na recuperação por cinco vezes. Essa vantagem minimiza o custo com cartuchos no procedimento de pré- concentração *on line*. A figura 20 apresenta o gradual decréscimo da área do pico observado para alguns compostos avaliados. O maior decréscimo ocorreu com a terbutilazina (48% do sinal inicial na 15<sup>a</sup> análise), atrazina(47%), desetilatrazina (37%), MCPA (29%), 24D (24%) e propanil (21%).





**Figura 20:** Número de vezes de reutilização dos cartuchos PRLP-s (ionização positiva ) e Hysphere Resin GP (ionização negativa), (n=3).

#### 4.2.8 Aplicação do método em amostra real

Como parte desse trabalho, o método analítico desenvolvido foi usado para monitorar a presença dos pesticidas selecionados em águas de rio, coletada em junho de 2002 na estação de tratamento em Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha). A tabela XXI apresenta as concentrações individuais de pesticidas obtidas nesse estudo.

**Tabela XXII:** Concentração (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) dos pesticidas em amostras de água coletada durante o processo de purificação na estação de água Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha).

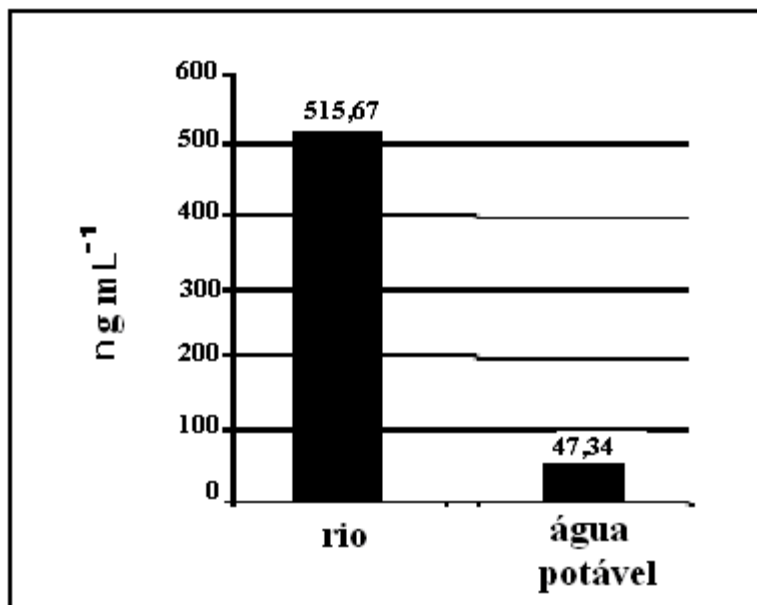
| Pesticida           | Água de Superfície<br>( $\text{ng L}^{-1}$ ) | Água Potável (após<br>ozonização)<br>( $\text{ng L}^{-1}$ ) |
|---------------------|--|---|
| Deisopropilatrizona | 1,04   | nd  |
| Desatiltrazina      | 0,63   | nd  |
| Dimetoato           | 41,54  | nd  |
| Simazina            | 9,86   | 6,86  |
| Cianazina           | 0,4  | nd  |
| Clortoluron         | nd   | nd  |
| Isoproturon         | 0,52   | nd  |
| Atrazina            | 7,77   | 0,82  |
| Diuron              | 9,49   | nd  |
| Tertbutilazina      | 12,23  | 6,7   |
| Linuron             | nd   | nd  |
| Molinato            | nd   | nd  |
| Metolacoloro        | 1,51   | nd  |
| Alacoloro           | nd   | nd  |
| Diazinon            | 8,44   | 1,36  |
| Bentazone           | nd   | nd  |
| MCPA                | 414,64                                       | 27,74   |
| 2,4D                | 6,03   | 2,06  |
| Mecoprop            | 0,88   | 0,95  |
| Propanil            | 0,69   | 0,85  |

\* nd= não detectado

Todos os pesticidas foram quantificados utilizando-se a mesma curva analítica ( $25$  a  $1000 \text{ ng L}^{-1}$ ), passando pela origem. Essa curva foi aceita para todos os pesticidas, inclusive os que apresentaram concentrações muito abaixo do segundo ponto da curva ( $25 \text{ ng L}^{-1}$ ) por que os coeficientes de correlação para esses foram maiores que  $0,99$ . Com exceção do diazinon  $0,98$  que está bem próximo de  $0,99$  e foi considerado aceito nessa faixa de concentração. Bentazone que apresentou coeficiente de correlação  $0,8894$  não foi detectado nas amostras de águas estudadas.

Cabe salientar que todos os pesticidas em estudo com exceção de clortoluron, linuron, molinato e bentazone, foram encontrados nas amostras de águas analisadas. A concentração total de pesticidas na água de rio ( $516 \text{ ng L}^{-1}$ ) ficou muito distante da concentração máxima permitida para pesticidas total, que é  $5000 \text{ ng L}^{-1}$  estabelecida pela diretiva 75/440/EC<sup>127</sup>

(União Européia) para águas superficiais. Os compostos que apresentaram maior concentração na água de rio foram MCPA ( $414,64 \text{ ng L}^{-1}$ ), seguido de dimetoato ( $41,54 \text{ ng L}^{-1}$ ) e tertbutilazina ( $12 \text{ ng L}^{-1}$ ). Na água potável, coletada na estação após o processo de ozonização, o pesticida MCPA foi o encontrado em maior concentração ( $27,74 \text{ ng L}^{-1}$ ). Também foram detectados os pesticidas propanil ( $0,85 \text{ ng L}^{-1}$ ), mecoprop ( $0,95 \text{ ng L}^{-1}$ ), 2,4 D ( $2,06 \text{ ng L}^{-1}$ ), simazina ( $6,86 \text{ ng L}^{-1}$ ), atrazina ( $0,82 \text{ ng L}^{-1}$ ), terbutilaziana ( $6,70 \text{ ng L}^{-1}$ ) e diazinon ( $1,36 \text{ ng L}^{-1}$ ) em menores concentrações, apresentando um valor total de  $47,34 \text{ ng L}^{-1}$ . Esses valores estão abaixo dos valores permitidos pela diretiva 98/83/EC<sup>129</sup> que admite valores máximos para pesticidas individuais de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  e  $500 \text{ ng L}^{-1}$  para pesticidas totais em água potável. A figura 21 apresenta a concentração total de pesticidas em água do rio Llobregat e após o processo de purificação na estação de tratamento Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha).



**Figura 21:** Concentração total de pesticidas detectada durante o processo de purificação da água na estação Sant Joan Despi (Barcelona, Espanha).

## 5. CONCLUSÕES

A presença de pesticidas e fármacos em águas, solos e em outros ambientes é uma realidade atual e necessita regulamentação e monitoramento ambiental.

Dois procedimentos analíticos foram empregados para fármacos e pesticidas em estudo.

Para estudo de fármacos, nesse trabalho foi utilizada a técnica de HPLC-UV. Diversas fases móveis foram avaliadas. As fases móveis: ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup>/ acetonitrila / metanol (73:17:10), ácido acético 1,25% / metanol (70:30) e água ultrapura / acetonitrila / Difosfato de potássio 1 mol L<sup>-1</sup> (910:80:10) foram selecionadas por apresentarem melhor performance cromatográfica.

As avaliações da extração em fase sólida demonstraram que cefalexina e tetraciclina apresentaram boa retenção nas fases comerciais Chrom P e boa eluição com a mistura de solventes 1% de ácido acético e metanol (60:40) e o solvente metanol, respectivamente. Ampicilina e amoxicilina não foram retidas nessas fases.

Na extração em fase sólida com fases à base de sílica, para a cefalexina, a fase comercial LC 18 eluída com a mistura de solventes 0,1 % ác. acético/acetonitrila (60:40) apresentou melhor recuperação (68%). Para tetraciclina, todas as fases à base de sílica apresentaram recuperações acima de 60%.

A tentativa de derivatização dos fármacos com diazometano e posterior quantificação em cromatógrafo à gás não apresentou resultados positivos.

Sabemos da importância da confirmação da presença de poluentes em amostra real, mas infelizmente por uma limitação do instrumento de trabalho não foi possível confirmar a presença de tetraciclina em amostra real (água do lago Guaíba). Entretanto o procedimento analítico já está estabelecido e fica como uma das sugestões para futuros trabalhos a aplicação do procedimento em amostra real em um instrumento de cromatografia líquida com detector de massas.

O procedimento automatizado SPE-LC-ESI-MS-MS foi desenvolvido para quantificação inequívoca dos vinte pesticidas estudados.

A coluna analítica Purospher STAR RP-18e Merck foi selecionada para esse trabalho, pois apresentou melhor resolução dos picos e maior meia vida.

A influência da fase móvel foi avaliada com e sem a presença de aditivo, ficando estabelecido que a fase móvel acetonitrila /água sem a presença de aditivos apresentou melhor performance cromatográfica.

Na otimização das condições MS-MS, a ionização no modo positivo (+) apresentou-se mais sensível para análise das famílias anilina, organofosforados, fenil uréias, atrazinas e o pesticida propanil. A ionização em modo negativo apresentou-se mais sensível para pesticidas ácidos e propanil.

Em relação à fragmentação, pôde ser concluído que os pesticidas (inclusive da mesma família) não possuem mecanismo de fragmentação similar.

Para SPE *on line* dois dos cinco fases foram selecionadas. A fase PRLP-s (para o pesticida propanil e os grupos anilinas, organofosforados, fenil uréias e triazinas e propanil – ionização no modo positivo) e a fase Hysphere GP para o pesticida propanil e o grupo de pesticidas ácidos- ionização em modo negativo).

Após avaliação do efeito dos ácidos húmicos e pH (por SPE), foi comprovada que a eficiência de extração apresentou significante redução no caso dos pesticidas ácidos a pH 9,0, entretanto não apresentou nenhum efeito significante na presença de ácidos húmicos.

O método foi considerado linear para todos os compostos, (exceto diazinon,  $r = 0,98$ ), e bentazone,  $r = 0,8894$  e altamente preciso com LOD em níveis de  $\text{ng L}^{-1}$ .

Outra característica da SPE *on line* é que essa técnica diminui a manipulação da amostra, que é considerada uma das grandes fontes de erro em análise de traços, aliada a rapidez, que permitiu 36 extrações diárias nesse estudo.

Na análise da amostra real a concentração de pesticidas totais encontrados em água potável foi menor do que a concentração estabelecida pela legislação.

## **- Futuros Trabalhos**

- Sintetizar novas fases à base de sílica com outros substituintes.
- Sintetizar novas fases poliméricas
- Realizar estudo de adsorção das novas fases com outros fármacos .
- Implementar procedimento analítico para os fármacos em estudo, com as fases novas que apresentarem melhor capacidade de adsorção.

-

=

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>i</sup> Baird, C. *Química Ambiental*; Artmed ; Porto Alegre, Brasil, 2002.
- <sup>ii</sup> Cedric, M. S. *Essentials of Pharmacology*, Wb Saunders, Philadelphia, 2005.
- <sup>iii</sup> Richardson, M. L.; Bowron, J.M.; *Journal Pharm. Pharmacol.* **1985**, 37, 1.
- <sup>iv</sup> Mckeon, D. M.; Calabrese, J. P.; Bissonete, G. K.; *Water Res.* **1995**, 29, 1902.
- <sup>v</sup> Miranda, C.D.; Castillo, G.; *Sci. Total Environ.* **1998**, 224,167.
- <sup>vi</sup> Jorgensen, S.E.; Halling-Sorensen, B.; *Chemosphere.* **2000**, 40, 691.
- <sup>vii</sup> Disponível [http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado em 23/07/2003
- <sup>viii</sup> Disponível [http:// www.ph.ucla.edu/epi/snow.html](http://www.ph.ucla.edu/epi/snow.html). Acessado em 13/04/2004
- <sup>ix</sup> Barceló D, Hennion MC. *Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water*, Elsevier, Amsterdam1997.
- <sup>x</sup> Disponível em [www.geocities.com/~esabio/tomita.html](http://www.geocities.com/~esabio/tomita.html). Acessado em 29/05/2004
- <sup>xi</sup> Halling-Sorensen, B. *Chemosphere*, **1998**,36.
- <sup>xii</sup> Tauler, R.; de Azevedo,D.; Lacorte,S.; Céspedes,R.; Viana, P.; Barceló, D.; *Environmental Technology*,. **2001**, 22,1043.
- <sup>xiii</sup> Disponível [http:// www.mma.gov.br/port/conama](http://www.mma.gov.br/port/conama) Acessado em 13/12/2004.
- <sup>xiv</sup> Geller, A. M.; *Preparação de sílica organofuncionalizada à base de zircônia e estudos de adsorção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas organoclorados*". *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Química,UFRGS, 2003.
- <sup>xv</sup> Disponível [http:// merckhomeedition.com/home](http://merckhomeedition.com/home). Acessado em 20/04/2001.
- <sup>xvi</sup> Raldán,P.L.; “*Análisis automatizado de palguicidas, fenoles y ftalatos em águas*”. *Dissertação de mestrado*. Universidad de Barcelona, 2002.
- <sup>xvii</sup> Carey, A.E.; *Monitoring pesticidas in Agricultur and Urban soils in the United Status*. *Pesticides Monitoring Journal*, **1979**,13,23.
- <sup>xviii</sup> Carey, A. E.; Garven , J.A.; Tai, H. ; Michael, W.G.; Wiersma, G.B.; *Pesticides Residue Levels in Soils and Crops from 37 States- National Soil Monitoring program (IV)*. *Pesticides Monitoring Journal* . 1979,12(4), 209-233.
- <sup>xix</sup> Nogueira, J. M. F.; Sandra, T.; Sandra,P.; *Analytical Chim. Acta*; **2004**, 505, 209.

- 
- <sup>xx</sup> Freitas, L. G.; Götz, C. W.; Ruft, M.; Singer, H. P.; Muller, S. R. J.; *Chromatogr. A*, **2004**, 277,1028.
- <sup>xxi</sup> Handbook of Instrumental Analysis. Siglas: Accelerated Solvent Extraction; Superfluid Extraction, Microwave Assisted Solid Extraction.
- <sup>xxii</sup> Majors, R. E.; Sample preparation in Analytical Chemistry. In: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Settle, F.(Edt.).Prentice Hall: New Jersey, 1997, 17, 54.
- <sup>xxiii</sup> Aguilar C., Ferrer I., Borrull F., Marcé, R.M. , Barceló D., *Analytical Chimica Acta*, **1999**, 386,248.
- <sup>xxiv</sup> Renner T., Baumgarten D., Unger K.K., *Chromatographia*, **1997**, 45, 199.
- <sup>xxv</sup> Fritz, J. S.; *Analytical Solid-Phase Extraction*; Wiley: New York, **1999**, 3, 28.
- <sup>xxvi</sup> Nawrocki, J.; Rigney, M. P.; A.; McCormick, Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A*, **1993**, 229,657.
- <sup>xxvii</sup> Dunlap, C. J.; McNeff, C. V.; Stoll, D.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 598A.
- <sup>xxviii</sup> Xiang, Y.; Yan, B.; Yue, B.; McNeff, C. V.; Carr, P. W.; Lee, M. L.; *J. Chromatogr. A*. **2003**, 83, 983.
- <sup>xxix</sup> Zhao, J.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.***1998**, 70, 3619.
- <sup>xxx</sup> Weber, T. P.; Jackson, P. T.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.***1995**, 67, 3042.
- <sup>xxxi</sup> Park, J. H.; Ryo, J. K.; Park, J. K.; McNeff, C. V.; Carr, P. W.; *Chromatographia*. **2001**, 53, 405.
- <sup>xxxii</sup> López-Blanco, M. C.; Reboreda-Rodríguez, B.; Caucho-Grande, B.; *J. Simal-Gándara, J. Chromatogr. A*, **2002**, 293, 976A.
- <sup>xxxiii</sup> Zulin, Z.; Huasheng, H.; Xingong,W.; Jianqing, L.; Weiqi, C.; Li, X.; *Marine Pollution Bull.* **2002**, 45, 397.
- <sup>xxxiv</sup> Brossa, L.; Marcé, R. M.; Bosroll, F.; Pocurull,E.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 287, 963A.
- <sup>xxxv</sup> Brossa, L.; Marcé, R. M.; Bosroll, F.; Pocurull,E.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 41, 998.
- <sup>xxxvi</sup> Lacorte, S.; Molina, C.; Barcelò, D.; *Anal. Chim. Acta.***1993**, 71, 281.
- <sup>xxxvii</sup> Leoni, V.; *AOAC Int.***1992**, 75, 511.
- <sup>xxxviii</sup> Geerdink , R.B.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.Th.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 65, 970 A.
- <sup>xxxix</sup> Van der Hoff, G.R.; Van Zoonen, P.; *J. Chromatogr. A*,**1999**, 301 , 843.



- 
- <sup>xl</sup> Bagheri, H.; Mohammadi, A.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 23, 1015.
- <sup>xli</sup> E. Hogendoorn and P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 435.
- <sup>xlii</sup> A Hogenboom, A.C.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.T.; *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 331.
- <sup>xliii</sup> Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Barceló, D.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5441.
- <sup>xliv</sup> Santos, T.C. R.; Rocha, J.C.; Barceló, D.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 3, 879.
- <sup>xlv</sup> Azevedo, D.A.; Lacorte, S.; Viana, P.; Barceló, D.; *Chromatography*, **2001**, 53.
- <sup>xlvi</sup> Geerdink, R.B.; Kooistra-Sijpersma, A.; Tiesnitsch, J.; Kienhuis, P.G.M.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 863, 147.
- <sup>xlvii</sup> Bossi, R.; Vejrup, K.V.; Mogensen, B.B.; Asman, W.A.H.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 957, 27.
- <sup>xlviii</sup> Hogenboom, A.C.; speksnijder, P.; Vreeken, R.J.; Niessen, W.M.A.; *J. Chromatogr. A*, **1997**, 777, 81.
- <sup>xlix</sup> Hogenboom, A.C.; Hofmann, M.P.; Jolly, D.A.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A. Th., *J. Chromatogr.*, **2000**, 885, 377.
- <sup>l</sup> Santos, T.C. R.; Rocha, J.C.; Barceló, D.; *J. Environ. Anal. Chem.* **1997**, 701, 19.
- <sup>li</sup> Ferrer, I.; Barceló, D.; *J. Chromatogr.*, **1999**, 854, 197.
- <sup>lii</sup> Hernandez, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.; Lara, A.; Pitarch, E.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 939, 1.
- <sup>liii</sup> Asperger A.; Efer J.; Koal T.; Engewald W.; *Journal of Chromatogr. A*, **2002**, 960, 109.
- <sup>liv</sup> Ferrer, I.; Pichon, V.; Hennion, H.C.; Barceló, D.; *Journal of Chromatogr. A*, **1997**, 777, 91.
- <sup>lv</sup> J. M. F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Analytical Chim. Acta* **2004**, 209, 505.
- <sup>lvi</sup> Martinez, R.C.; Gonzalo, Hernández, E.R.; Roman, F.J.S.S.; Flores, M.G.P.; *Journal of Chromatogr. A*, **2002**, 950, 157.
- <sup>lvii</sup> Hernández, F.; Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; López, F.J. *Journal of Chromatogr. A*, 1997, 778, 171.
- <sup>lviii</sup> Azevedo, D.A.; Lacorte, S.; Vinhas, T.; Viana, P.; Barceló, D.; *Journal of Chromatogr. A*, **2000**, 879, 13.
- <sup>lix</sup> Jeannot R.; Sabik H.; Sauvard E.; Genin E.; *Journal of Chromatogr. A*, **2000**, 879, 51.
- <sup>lx</sup> Bossi R.; Vejrup K.V.; Mogensen B.B.; Asman W.A.H.; *Journal of Chromatogr. A*, **2002**, 957, 27.
- <sup>lxi</sup> Jimenez J.J.; Bernal, J.J.; Nozal del M.J.; Riveira, J.M.; *Journal of Chromatogr. A*, **1997**, 778, 289.

- 
- lxii Hidalgo C.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; *Analytical Chimica Acta*, 1997, 338, 223.
- lxiii Hogenboon, A.C.; Malmquist, U.K.; Vreuls, J.J.; Brinkman, U.A. Th.; *Journal of Chromatogr. A*, **1997**, 759, 55.
- lxiv Sabic, H.; Jeannot, R.; *Journal of Chromatogr. A*, **1998**, 818, 197.
- lxv Koppen, B.; Spliid, N.H.; *Journal of Chromatogr. A*, **1998**, 803, 157.
- lxvi Aguilar, R.M.; Ferrer, I.; Borrul, R.; Maccé, R.M.; Barceló, D.; *Journal of Chromatogr. A*, **1998**, 794, 147.
- lxvii Masqué, N.; Marcé, R.M.; Borrul, F.A.; *Journal of Chromatogr. A*, **1998**, 793, 257.
- lxviii Freitas, L. G.; Götz, C. W.; Ruft, M.; Singer, H. P.; Muller, S. R.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 277.
- lxix Farran, A.; Ruiz, S.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 267, 1024.
- lxx Nogueira, J. M. F.; Sandra, T.; Sandra, P.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 133, 996.
- lxxi Asperger, A.; J.; Efer, T.; Koal, W.; Engewald, *J. Chromatogr. A* **2002**, 109, 960.
- lxxii Tahmasseb, L. A.; Nélien, S.; Kerhoas, L.; Einhorn, J.; *Sci. Total Environm.* **2002**, 33, 291.
- lxxiii R Carabias, R.; Martinez, R.; Rodríguez, E.; Gonzalo, Herrero, E.E.; -Hernandez, E.E.; Román, J. S.S.; Flores, M. G. P.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 157, 950.
- lxxiv Queiroz, S. C. N.; Melo, L. F. C.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 171, 948.
- lxxv Lanças, F.M.; *Extração em Fase Sólida*. RiMa: São Paulo, 2004.
- lxxvi Disponível <http://www.anvisa.org.br/> Acessado em 18/05/2003.
- lxxvii Kaufmann A.; Pacciarelli, B.; Prijic, A.; *Mitt Lebensmittelunters*, **1999**, 90, 167.
- lxxviii Abate, M. C.; Genta, E. S.; *Ist. Zooprofilático Sper. Piemont*, **1997**, 36, 360.
- lxxix Sokol, J. Dudrikova; E.; Cabadaj, R.; Matisova, E.; *Imt. Dairy Fed. Spes Issue*, 1995, 9509 Symposium on Residues of Antimicrobia Drugs and Other Inhibitors in Milk 308.
- lxxx Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Wilken, R.; Rodrigues, S.v.; Baumann, W.; *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 135.
- lxxxii Ternes, T.A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Haberer, K.; Wilken, R-D.; Servos, M.; *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 81.
- lxxxiii Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Habere, K.; Mehlich, A.; Ballwanz, F.; Kratz, K.; *J. Chromatogr. A*, **1998**, 815, 213.

- 
- lxxxiii Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H.; Blankenhorn, I.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 938, 199.
- lxxxiv Kolpin, D. W.; Furlog, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202.
- lxxxv Hartig, C.; Storm, T. J.; Jekel, M.; *J. Chromatogr. A*, **1999**, 854, 163.
- lxxxvi Jonhson, A. C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A.; *Sci Total Environ.* **2000**, 256, 163
- lxxxvii Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M.; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 1549.
- lxxxviii Buser, H.-R.; Poiger, T.; Muller, M. D.; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3449.
- lxxxix Winkler, H.; Lawrence, J. R.; Neu, T. R.; *Water Res.* **2001**, 35, 3197.
- xc Xiao, X.-Y.; McCalley, D. V.; McEvoy, J.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 923, 195.
- xc<sup>i</sup> Yang, S.; Carlson, K.; *Water Research.* **2004**, 38, 3155.
- xc<sup>ii</sup> Yang, S.; Carlson, K.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 141, 1038.
- xc<sup>iii</sup> Löffler, D.; Ternas, T. A.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 583, 1000.
- xc<sup>iv</sup> Jacobsen, A. M.; Halling, B.; Sørensen, B.; Hansen, F.; S. H.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 157, 1038.
- xc<sup>v</sup> Furusawa, N.; *Talanta.* **2003**, 59, 155.
- xc<sup>vi</sup> Sørensen, L. K.; Snor, L. K.; Elkaer, T.; Hansen, H.; *J. Chromatogr. A*, **1999**, 307, 734B
- xc<sup>vii</sup> Becker, M.; Zittlan, E.; Petz, M.; *Analytica Chim. Acta.* **2004**, (no prelo).
- xc<sup>viii</sup> Shriver, D. F. *The Manipulation of Air-Sensitive Compounds*, John Wiley, Nova York, 1986.
- xc<sup>ix</sup> Clifton, E. M. *Pesticides Laboratory Training Manual, AOAC International, Gaithersburg, Maryland USA*, 1996, p 18, 19, 70-72, 162, 373-375.
- <sup>c</sup> GARP-Associação Grupo de Analistas de resíduos de pesticidas, *Manual de Resíduos de pesticidas em alimentos*, 1999, p. 66-73.
- ci . Causon, R., *J. Chromatography B*, **1997**, 689, 175.
- cii Lacorte S, Molina C, Barcelò D.; *Anal Chim Acta* **1993**, 281: 71.
- ciii Leoni V, Cariccia A.M; Chiavarini S.; *J AOAC Int*, **1992**, 75, 511.
- civ Khalid, A.; *Jornal of Chromatogr A*, **1995**, 18, 2457.
- cv Oka, H; Matsumoto, H.; Harada, K.; Kadowaki, S.; Suzuki, M.; *J. Chromatogr. A*, **1985**, 325(1), 265.
- cvi El -Wality, A.F.M.; El-Anwar, F.; Eid, M.A.; Aguad, H.; *Analyst*, **1992**, 117, 981.

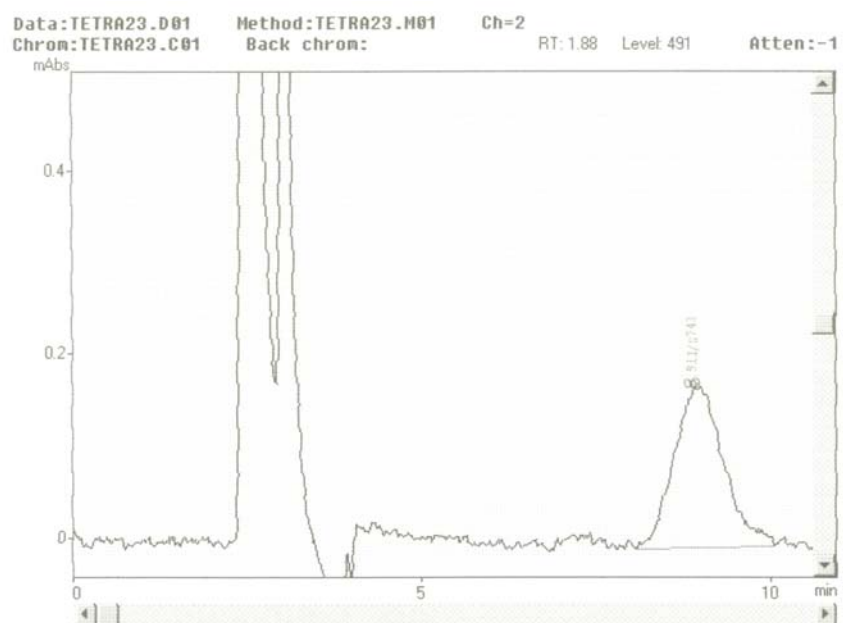
- 
- <sup>cvii</sup> Haginaka, J.; Nishimura, Y.; *J. Chromatogr. Biomed Appl.*, **1990**, 97,87.
- <sup>cviii</sup> Leroy, P.; Decolin, D.; Nicolas, S.; Archimbault, J. *Pharm. Biomed.* **1989**,7(12),1837.
- <sup>cix</sup> Erah, P.O.; Barret, D.A.; Shaw, P.N. *Journal of Chromatogr. B*, **1998**, 705,63.
- <sup>cx</sup> Sorensen, L.K.; Snor, L.K, Elkaer, T.; Nanse, H.; *Jornal of Chromatogr. B*, **1999**, 734,307.
- <sup>cxii</sup> Miyazaki, K.; Otani, K.; *J. Chromatography*, **1983**,276, 483.
- <sup>cxiii</sup> Sokol, J.; Matisova, E.; *Journal of Chromatogr A*, **1994**,669, 65.
- <sup>cxiiii</sup> Hendrix, C.; Zhu Yongxin, C.V.; Thomas, J.; Roets, E.; Hoogmartens, J.; *International Journal of Pharmaceutics*,**1993**, 100,213.
- <sup>cxv</sup> Mei-Chich,H.; Yu-Shan, L.; Hsiou-Chung, C.; *Journal of Chromatography A*, 1995,692,67.
- <sup>cxvi</sup> Disponível [http:// www.farmacopeia.org.br/](http://www.farmacopeia.org.br/) Acessado em 23/03/2001.
- <sup>cxvii</sup> Skoog, D.A; West, D.M.; HOLLER, F. J. – Fundamentals of Analytical Chemistry library of Congress Catalog. Card, 1991.
- <sup>cxviii</sup> GARP-Associação Grupo de Analistas de resíduos de pesticidas, *Manual de Resíduos de pesticidas em alimentos*, 1999, p. 66-73.
- <sup>cxix</sup> Causon, R., *J. Chromatogr. B*, **1997**, 689, 175,.
- <sup>cx</sup> Azevedo, D. A.; Lacorte, S.; Vinhas, T.; Viana, P.; Barceló, D.; *Journal Chromatogr. A*, **1966**, 143, 733.
- <sup>cxii</sup> Hogenboon, A.C.; Malmquist,U.K.; Vreuls, J.J.; Brinkman, U.A. Th.; *Journal of Chromatogr. A*, **1997**,759,55.
- <sup>cxiii</sup> Hidalgo C.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; *Analytical Chimica Acta*, **1997**, 338, 223.
- <sup>cxiiii</sup> Sabik, H.; Jeannot, R.; *Journal of Chromatography A*, **1998**, 818, 197.
- <sup>cxv</sup> Masqué, N.; Marcé, R.M., Borrul, F.A.; *Journal of Chromatogr. A*, **1998**, 793, 257.
- <sup>cxvi</sup> Lanças, M.F. *Validação de métodos Cromatográficos de Análise*, RiMa, São Paulo, 2004.
- <sup>cxvii</sup> Council of the European Communities (2000) *Directive 2000/60/EC*, Off J Eur Commun L 327: 1
- <sup>cxviii</sup> Council of the European Communities (1975) *Directive 75/440/EC*, Off. J. Eur. Commun. L 194: 26.
- <sup>cxix</sup> Council of the European Communities (1979) *Directive 79/869/EC*, Off. J. Eur. Commun. L 271: 44

- 
- <sup>cxxviii</sup> Council of the European Communities (1980) *Directive 80/778/EEC*, Off. J. Eur. Commun. L 229: 11.
- <sup>cxxix</sup> Council of the European Communities (1998) *Directive 98/83/EC*, Off. J. Eur. Commun. L 330: 32.
- <sup>cxxx</sup> Koppen B, Spliid N.H.; *J Chromatogr A*, **1998** 803: 157.
- <sup>cxxxix</sup> Dijkman E.; Mooibroek D., Hoogerbrugge R.; Hogendoorn E.; Sancho J-V.; Pozo O.; Hernández F.; *J. Chromatogr A*, **2001**, 926: 113.
- <sup>cxxxii</sup> Santos, T.C.R.; Rocha, J.C.; Barceló, D.; *J. Environ. Anal. Chem.* **1998**,701,19.

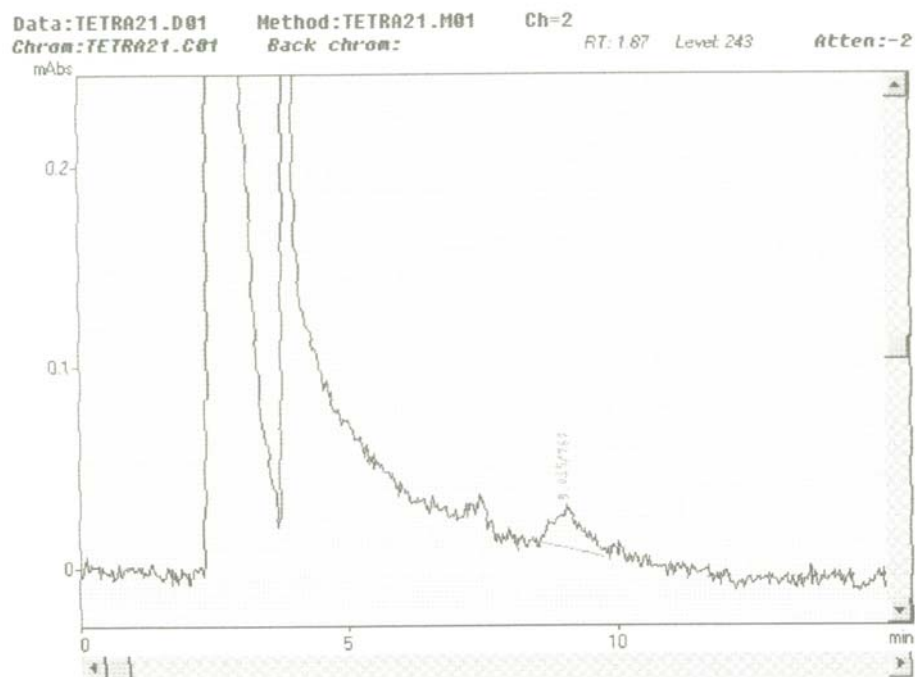
---

## 7. ANEXOS

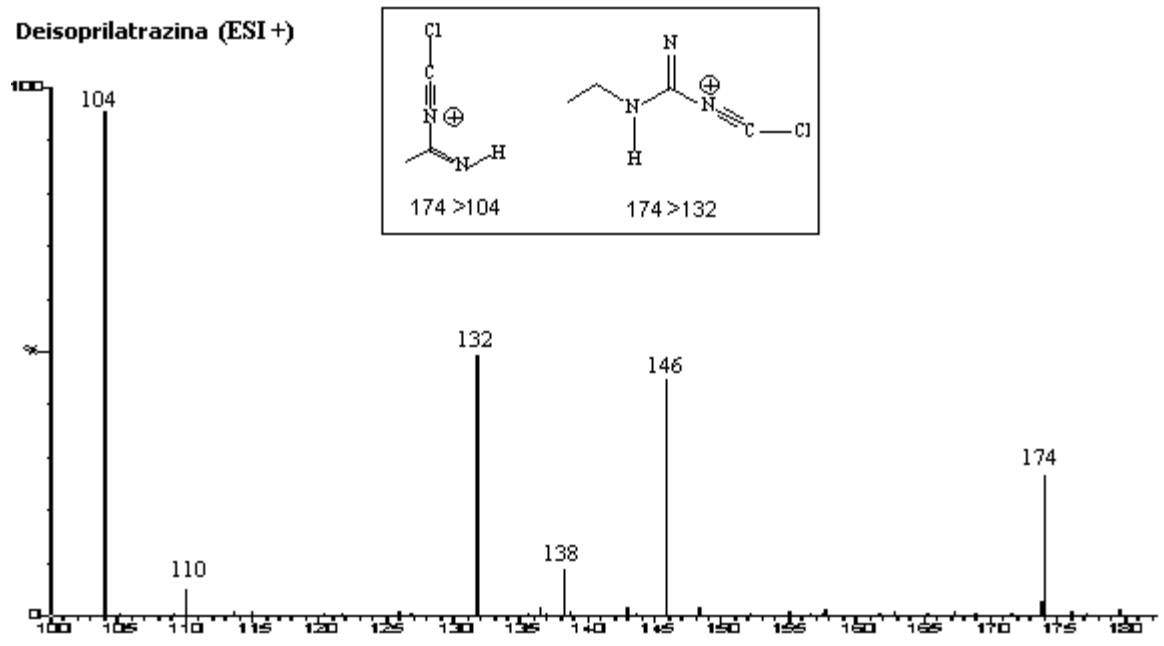
Anexo 1: Amostra fortificada com  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  de tetraciclina.



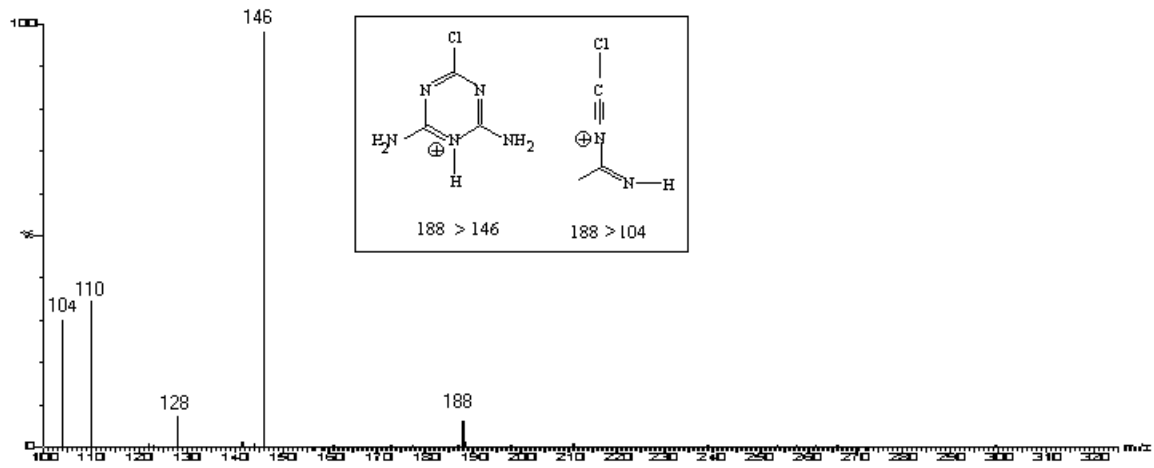
Anexo 2: Cromatograma da amostra real



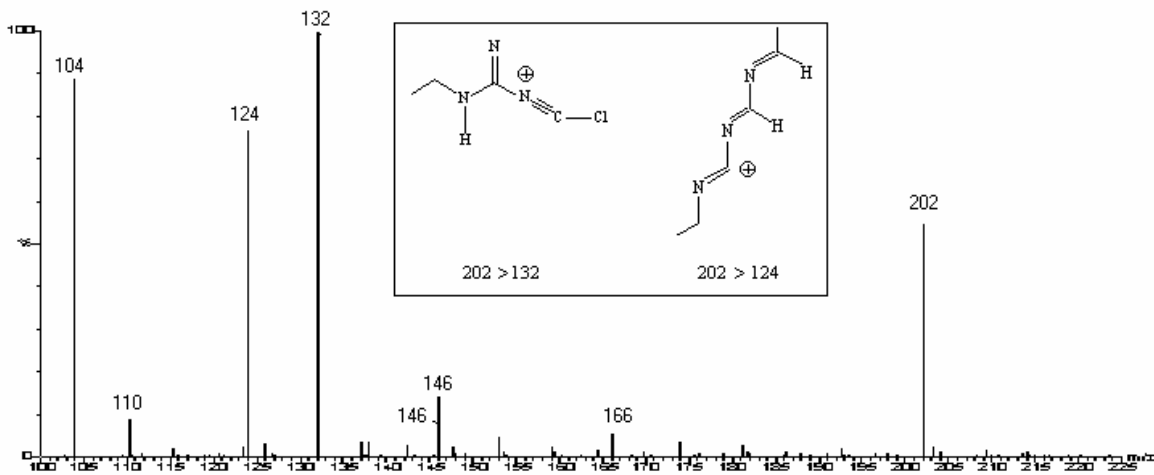
Anexo 3: Fragmentações. Fórmula estrutural das duas primeiras transições (ion produtor-íon produzido) dos pesticidas em estudo.



Desetilatrazina (ESI+)

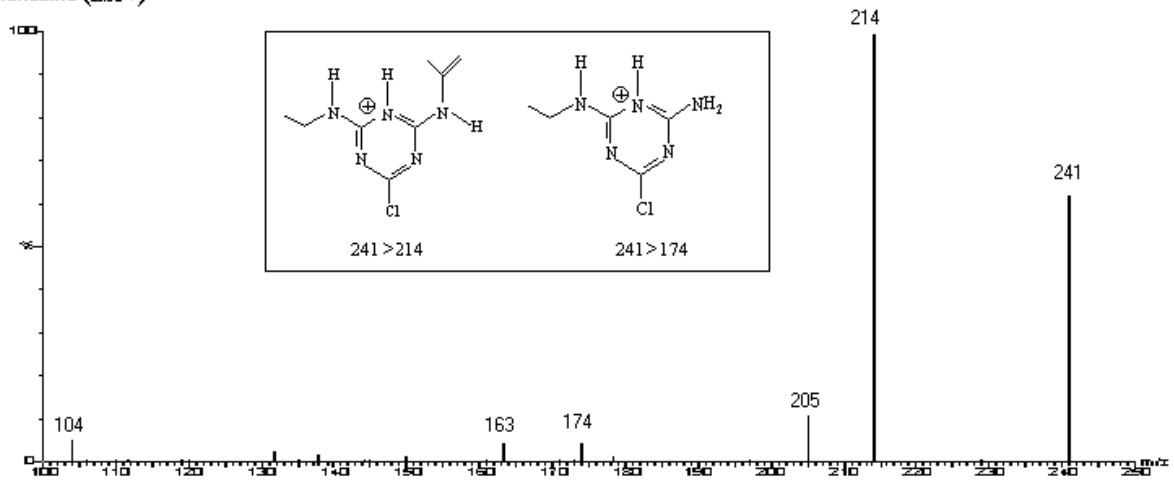


Simazina (ESI+)

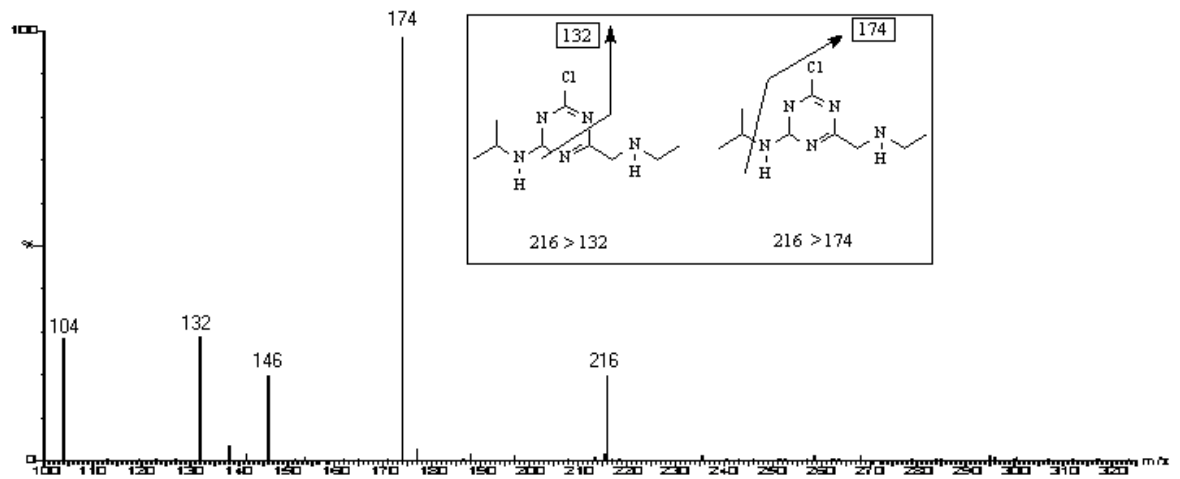




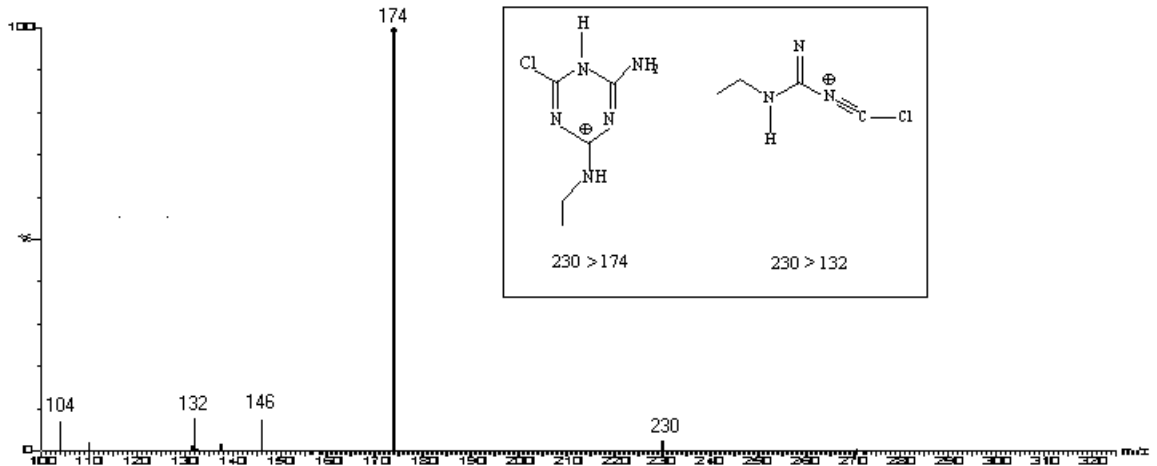
Cianazina (ESI+)



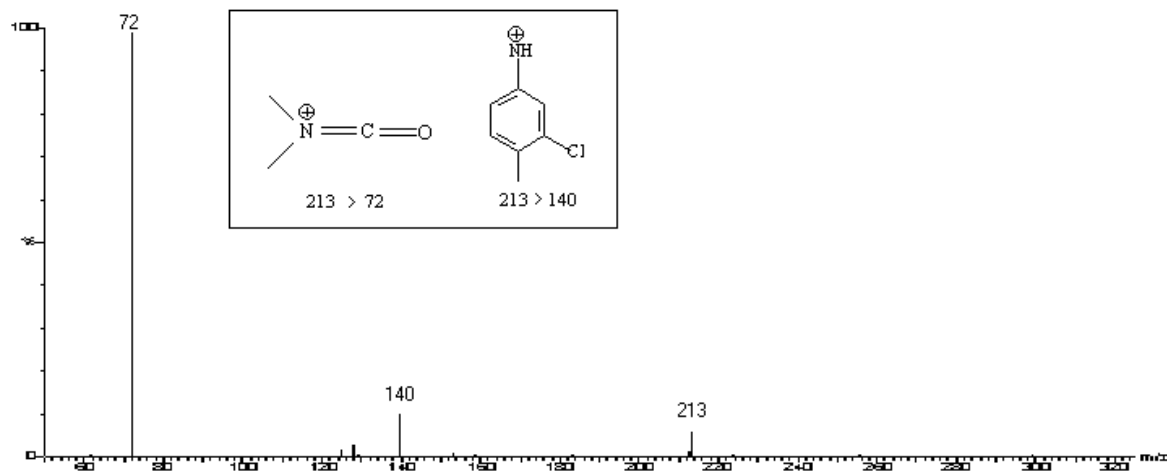
Atrazina (ESI+)



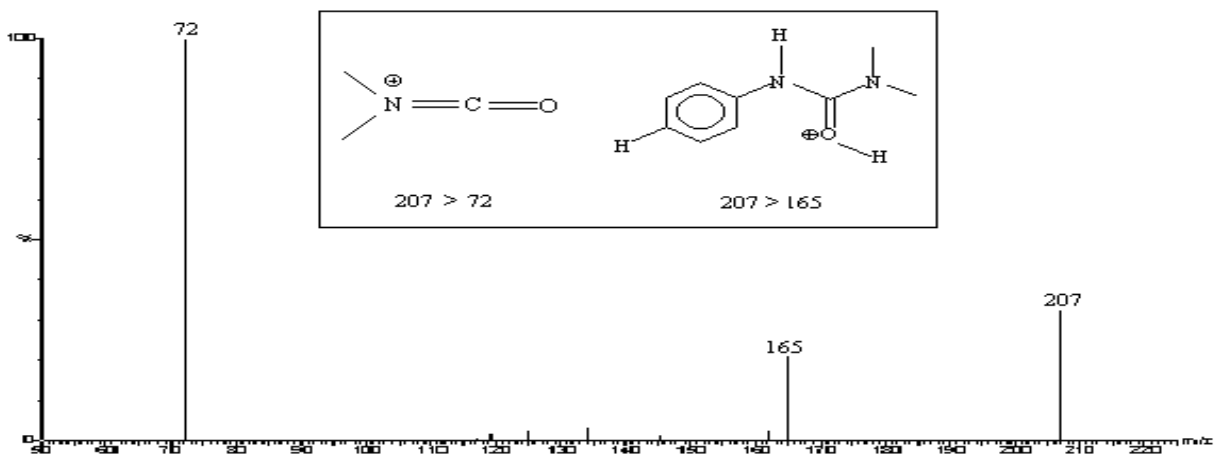
Terbutilazina (ESI+)



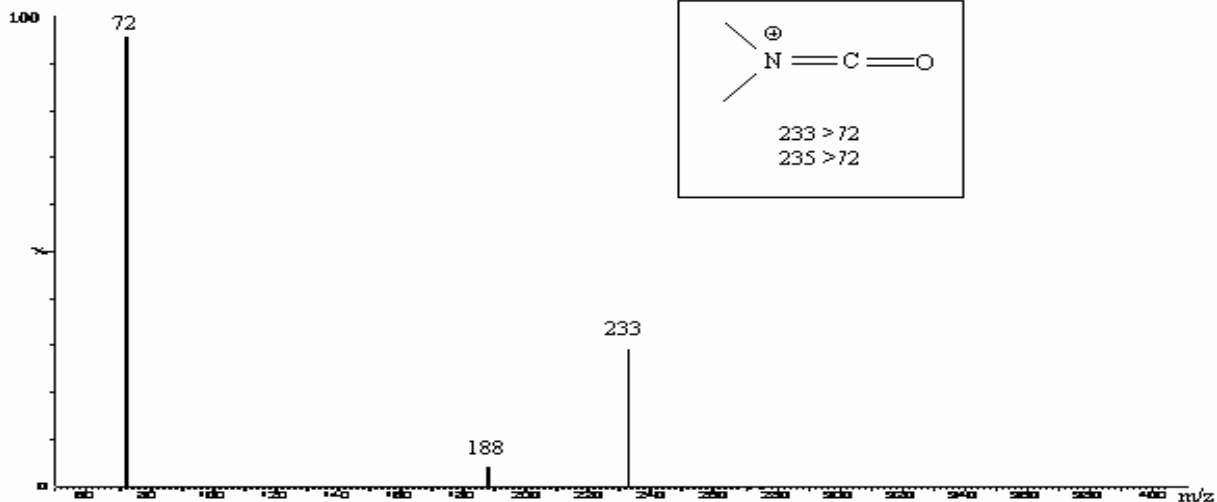
**Clortoluron (ESI+)**



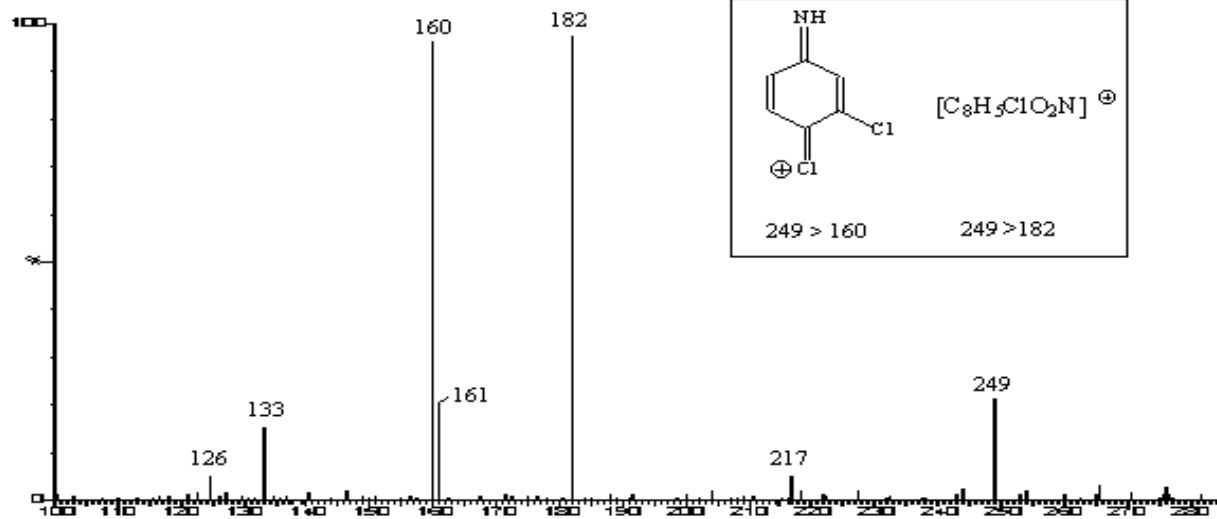
**Isoproturon (ESI+)**



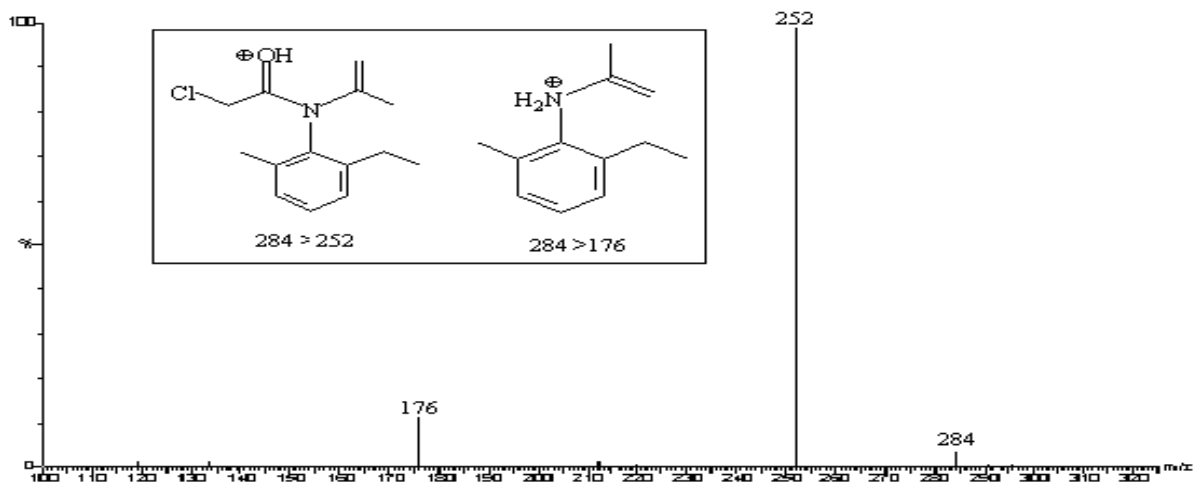
### Diuron (ESI+)



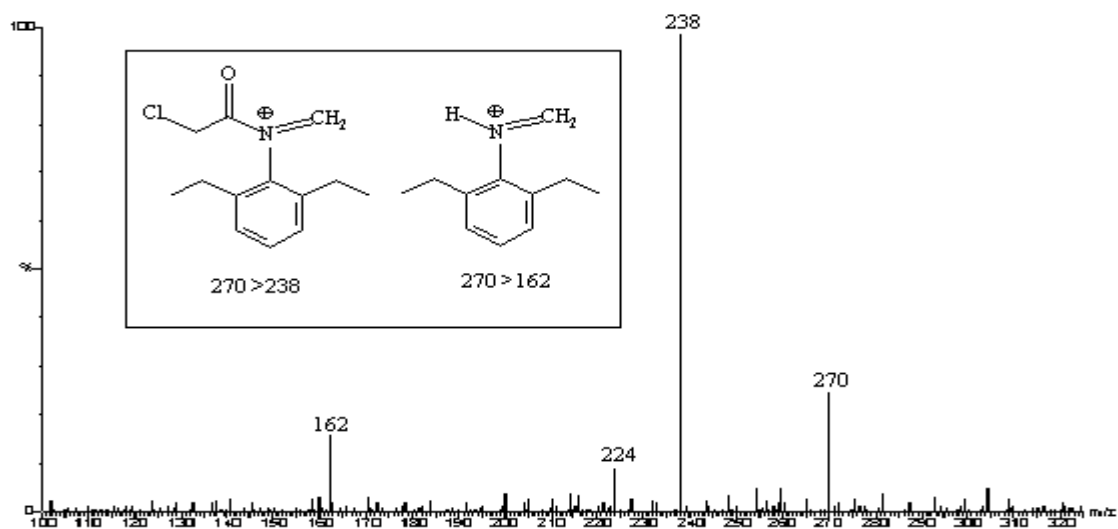
### Linuron (ESI+)



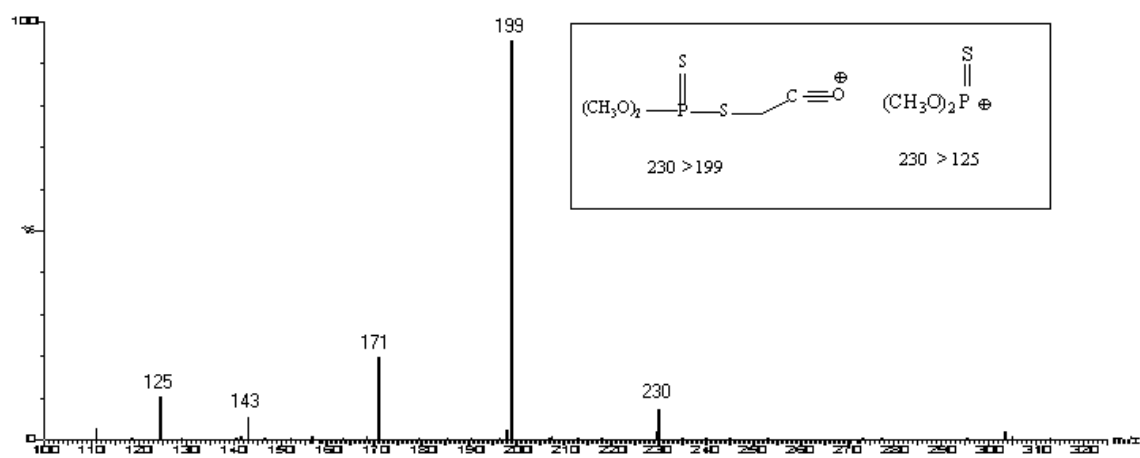
### Metolaclor (ESI+)



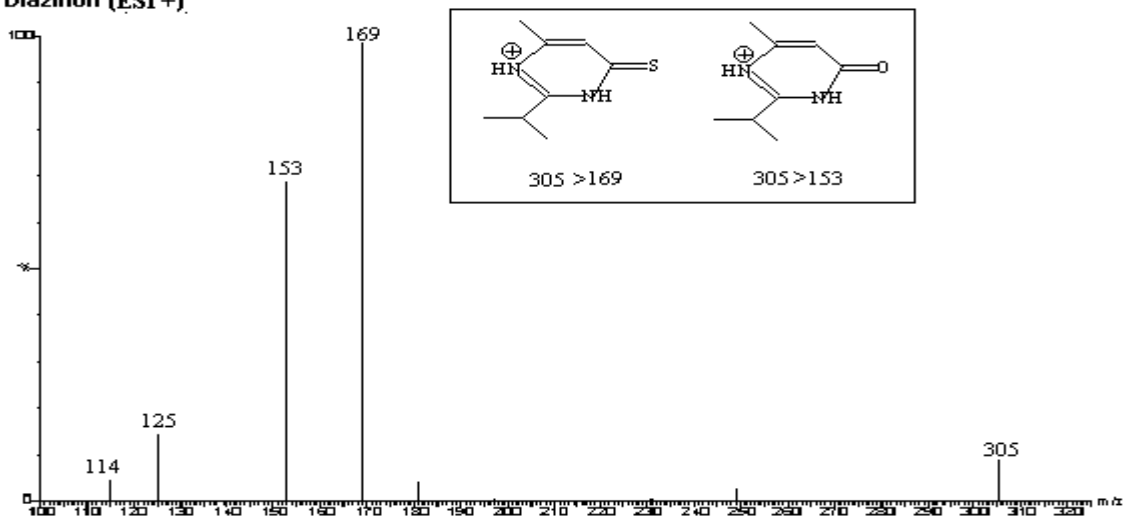
**Alaclor (ESI +)**



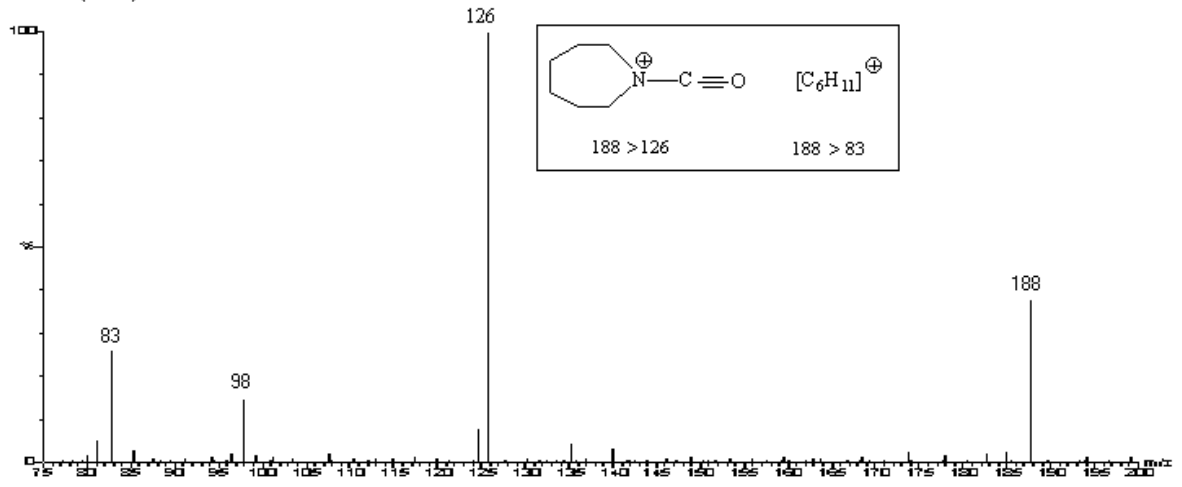
**Dimetoato (ESI +)**



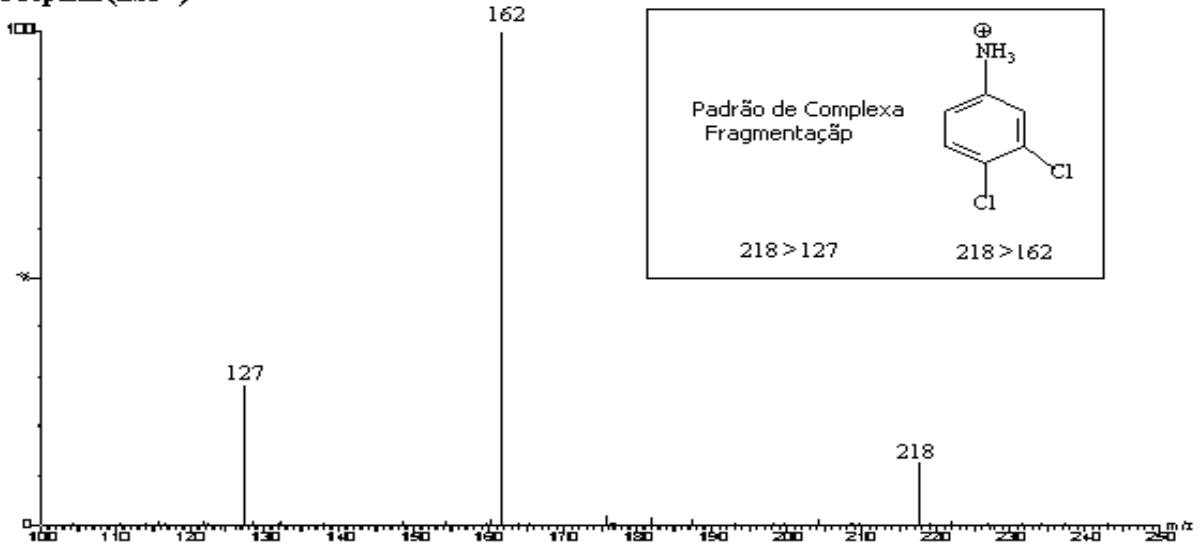
**Diazinon (ESI +)**



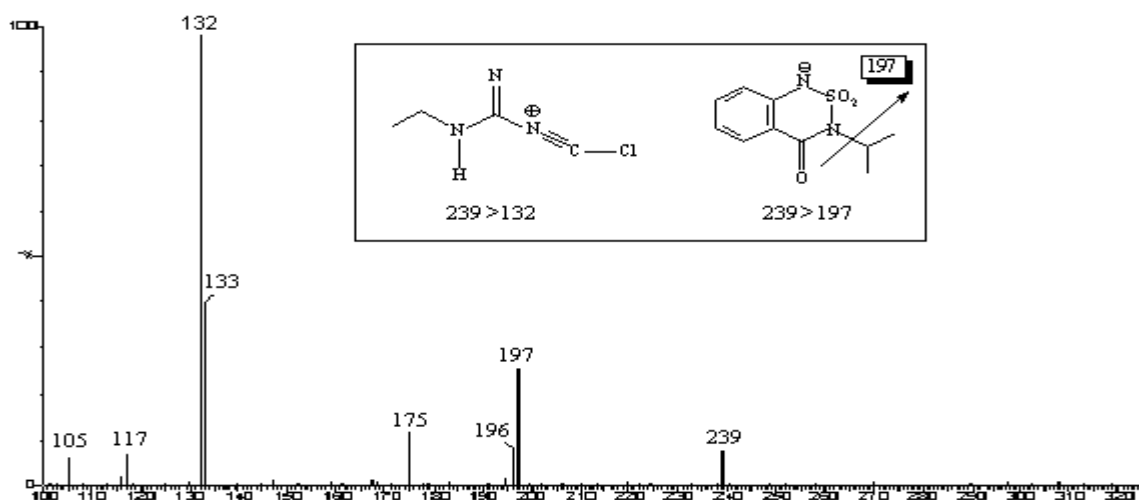
**Molinato (ESI +)**



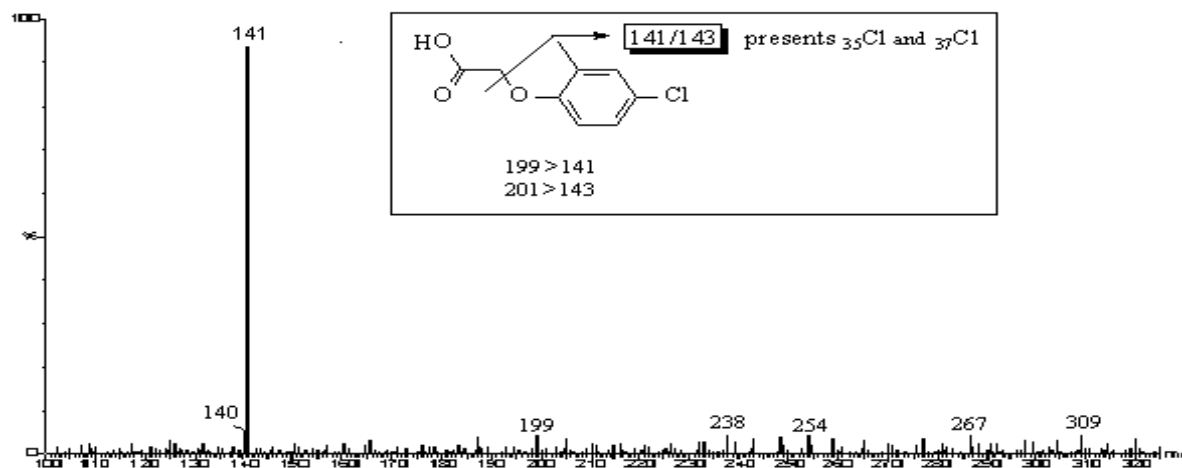
**Propanil (ESI +)**



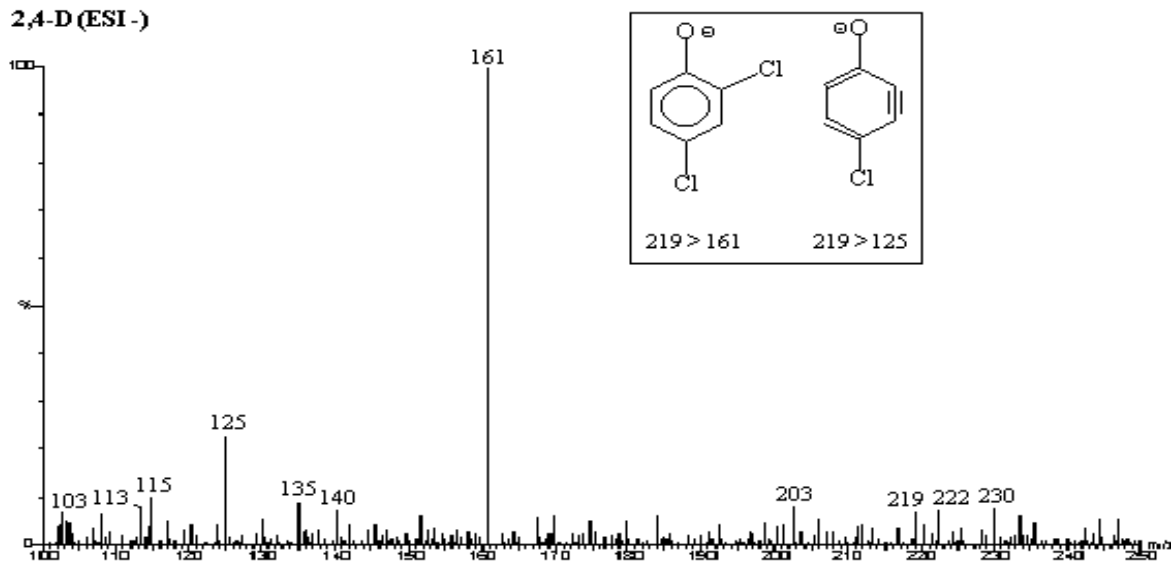
### Bentazone (ESI-)



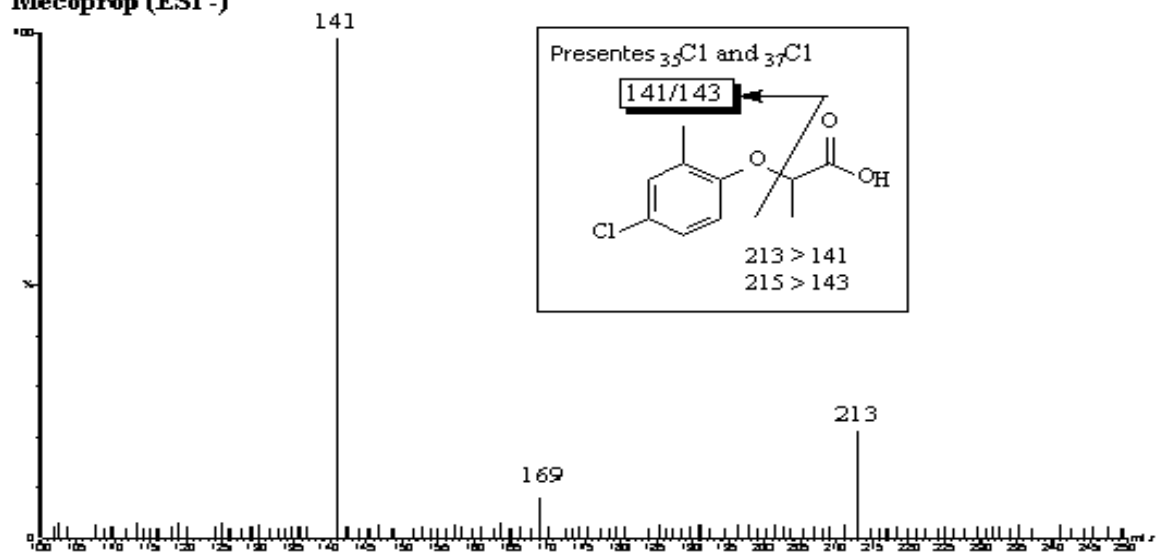
### MCPA (ESI-)



### 2,4-D (ESI-)



**Mecoprop (ESI -)**



**Propanil (ESI -)**

