

Michelle Barcellos

**DETERMINAÇÃO DE FENITROTION EM ALVOS
ARTIFICIAIS DE ALGODÃO POR HPLC-UV E DE
PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS POR GC/MS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutora em
Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barcellos, Michelle
METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS EM
ALVOS ARTIFICIAIS DE ALGODÃO E EM RESÍDUOS SÓLIDOS COM
DETERMINAÇÃO POR HPLC-UV E GC/MS / Michelle Barcellos ;
orientador, Luiz Augusto dos Santos Madureira -
Florianópolis, SC, 2017.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Agrotóxicos. 3. Cromatografia. 4.
Classificação de resíduos. 5. Nível de exposição. I.
Madureira, Luiz Augusto dos Santos. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Michelle Barcellos

**DETERMINAÇÃO DE FENITROTION EM ALVOS
ARTIFICIAIS DE ALGODÃO POR HPLC-UV E DE
PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS POR GC/MS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora em Química Analítica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 10 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira
Orientador (DQ-UFSC)

Prof. Dr. Gustavo A. Mücke
(DQ-UFSC)

Dr.^a Jacqueline Pereira Vistuba
(DQ-UFSC-Lages)

Prof. Dr. Luciano Vitali
(DQ-UFSC)

Prof. Dr. Marcel Piovezan
(DQ-UFSC-Lages)

Prof.^a Dr.^a Vera L.A.F. Bascuñan
(DQ-UFSC)

Prof.^a Dr.^a Tatiane A. Maranhão
(DQ-UFSC)

Este trabalho é dedicado à minha
família, meu apoio eterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Vida, por me guiar com força e sabedoria para trilhar este caminho com determinação e esperança;

Ao meu marido Marcio, companheiro de todas as horas, por me apoiar, com boas doses de amor, racionalidade e confiança;

Aos meus pais, por colaborarem em todas as etapas de meu desenvolvimento científico e me guiarem com segurança e amor;

Ao meu irmão, que sempre me inspirou com a palavra certa para os momentos mais complexos;

Às minhas avós, que me iluminam diariamente com sua fé e perseverança;

À toda minha família, pela união e convivência sempre alegre e harmoniosa;

Aos meus amigos de toda vida, que torceram por minhas lutas e vibraram por minhas conquistas;

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira, por proporcionar grandes aprendizados para meu desenvolvimento científico-pessoal;

Ao Prof. Dr Gustavo Amadeu Micke pela contribuição do espaço físico e sugestões;

Aos colegas de laboratório, pelos aprendizados compartilhados;

À Dr^a Jacqueline Pereira Vistuba pela amizade e por aceitar a relatoria deste trabalho;

À Prof^a Dr^a Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan pela amizade e pelas longas conversas estimulantes e sugestões;

Aos demais membros da banca Prof. Dr Luciano Vitali, Prof. Dr Marcel Piovezan, Prof^a. Dr^a. Tatiane de Andrade Maranhão, pela amizade, contribuição atenciosa e estímulo;

À Prof^a Dr^a Maria da Graça Nascimento pelo carinho de sempre e incentivo;

Aos demais professores e colegas do departamento, pelo bom convívio durante tantos anos de convivência e aprendizados;

Ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro durante todo meu desenvolvimento científico.

À Petrobrás pela estrutura física disponível ao desenvolvimento deste trabalho;

Foi mais uma etapa de grande crescimento e muitos aprendizados!

“É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu!” Ana Vilela.

“ O que prevemos raramente ocorre; o que menos
esperamos geralmente acontece. ”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Este trabalho tem como foco o desenvolvimento de metodologias para a determinação de pesticidas em diferentes matrizes. O primeiro capítulo trata da avaliação da exposição de operadores de tratores agrícolas com cabines seladas, durante a aplicação real de fenitrotion em pomares de maçã. Esta exposição foi testada por meio do uso de alvos artificiais de algodão como método de amostragem, com posterior extração ultrassônica e determinação por cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (HPLC-UV). Para a cromatografia foi aplicado um planejamento experimental com resposta máxima utilizando a composição em fase móvel de 35:65 (água: acetonitrila), temperatura da coluna em 40 °C e taxa de fluxo de fase móvel de 1,0 mL min⁻¹. O método foi avaliado por critérios estipulados pela ANVISA, apresentando boa seletividade e calibração por adição de padrão sobre a matriz linear na faixa de 0,50 a 2,01 mg kg⁻¹. A metodologia demonstrou-se precisa e exata, com coeficientes de variação entre 0,17 e 3,41% e recuperação entre 94 e 104 %. O método foi capaz de detectar o fenitrotion sobre a matriz a partir de 0,18 mg kg⁻¹ e quantificar a partir de 0,50 mg kg⁻¹. As amostras de alvos artificiais de algodão, usadas na avaliação da exposição dos EPIs dos agricultores e do interior da cabine de um trator agrícola, apresentaram valores de fenitrotion abaixo do limite de detecção do método. O segundo capítulo trata da aplicação de metodologias propostas pela Norma Brasileira, NBR 10004/2004, no preparo de amostras e determinação de dezoito pesticidas em matrizes de água residual e resíduos de diatomáceas, utilizadas como modelo de resíduos líquidos e sólidos, respectivamente, da indústria petrolífera. As amostras líquidas foram submetidas à microextração líquida e as sólidas à extração ultrassônica, com determinação por cromatografia a gás e espectrometria de massa (GC/MS). A avaliação do método apresentou linearidade ideal ($r > 0,99$) na calibração externa para todos os analitos em duas faixas lineares estudadas, a curva 1 de 0,5 a 10 µg L⁻¹ e a curva 2 de 10 a 200 µg L⁻¹. As precisões intra-corridas e intermediárias apresentam coeficientes de variação superiores a 5%, porém a exatidão se mostrou adequada com porcentagens de recuperação entre 94,4 e 103,7 % na curva 1, e entre 103,0 a 109,8 % na curva 2. Por fim, os limites de detecção e quantificação demonstraram a capacidade em determinar os analitos nos limites preconizados pela NBR 10004/2004.

Palavras-chave: Pesticidas. Nível de exposição. Classificação de resíduos.

ABSTRACT

This work has as main focus the development of methodologies for the determination of agrochemicals in different matrices. The first chapter deals with the evaluation of the level of exposure of farmers in agricultural tractors with sealed cabins, during the actual application of fenitrothion in apple orchards. The exposure was evaluated through the use of artificial cotton targets with subsequent ultrasonic extraction and determination by liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). For the latter, a maximum response experimental design using the mobile phase composition of 35:65 (water: acetonitrile), column temperature at 40 ° C and mobile phase flow rate of 1.0 mL min⁻¹ was applied. The method was evaluated by criteria stipulated by ANVISA, showing good selectivity and calibration by addition of standard on the linear matrix in the range of 0.50 to 2.01 mL min⁻¹. The methodology was shown to be accurate and accurate, with coefficients of variation between 0.17 and 3.41% and recovery levels between 94 and 104%. The method was able to detect fenitrothion on the matrix from 0.18 mg kg⁻¹ and quantify it from 0.50 mg kg⁻¹. All actual samples of artificial cotton targets showed fenitrothion values below the detection limit of the method. The second chapter deals with the application of methodologies proposed by the Brazilian Standard, NBR 10004/2004, in the preparation of samples and determination of eighteen pesticides in diatomaceous and wastewater matrices from the petroleum industry. The liquid samples were submitted to liquid microextraction and the solid samples were subjected to ultrasonic extraction, determined by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). The evaluation of the method showed ideal linearity ($r > 0.99$) in the external calibration for all analytes in two linear ranges studied, curve 1 of 0.5 to 10 µg L⁻¹ and curve 2 of 10 to 200 µg L⁻¹. The daily precision of the method presented a slight imprecision, with variations between 7.80 and 13.50% for curve 1 and between 6.15 and 8.78% for curve 2. The intermediate precision presented values with greater variation, with Between 23.6 and 33.0% for curve 1 and 19.0 to 30.5% for curve 2. The accuracy of the method presented adequate values, with recovery levels between 94.4 and 103.7% for Curve 1, 103 to 109.8% and curve 2. Finally, the limits of detection and quantification demonstrated the ability of the method to determine the analytes within the limits stipulated by NBR 10004.

Keywords: Agrochemicals. Exposure level. Waste classification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular do Fenitrothion	33
Figura 2 -	Estruturas de segurança em tratores	36
Figura 3 -	Distribuição de alvos artificiais para estudo de exposição de aplicadores	40
Figura 4 -	Esquema de distribuição dos alvos artificiais de algodão sobre o EPI do aplicador de pesticidas. Apenas o amostrador número 7 está localizado nas costas do aplicador, os demais estão na parte frontal do EPI.....	55
Figura 5 -	a) Trator agrícola Massey Ferguson modelo 4275; b) Pulverizador Jacto modelo Arbus 1500.....	56
Figura 6 -	Cromatogramas comparativos: (a) Cromatograma do padrão em ACN. (b) Cromatograma do branco da matriz de alvo artificial de algodão com perfume	62
Figura 7 -	Cromatogramas comparativos dos alvos artificiais de algodão: (a) Cromatograma do branco da matriz sem perfume. (b) Cromatograma do branco da matriz com perfume.....	63
Figura 8 -	Fotos reais das amostras: (a) Amostras de absorvente como chegaram ao laboratório (b) Identificação numérica dos alvos feita com caneta de tinta permanente azul. (c) Extrato bruto das amostras com coloração azul devido a tinta da identificação numérica	64
Figura 9 -	Superfícies de resposta para avaliação das interações no delineamento fatorial, obtidas com STATISTICA® (n = 16), com média quadrada dos resíduos 0,3407 e coeficiente de determinação 0,74878. (a) Superfície de resposta do fluxo versus fase móvel com temperatura da coluna em 40 °C; (b) Superfície de resposta do fluxo versus temperatura da coluna com fase móvel 1 com uma razão água:ACN de 35:65; (c) Superfície de resposta da temperatura da coluna versus fase móvel com fluxo de 1,0 mL/min	67
Figura 10 -	Cromatograma obtido aplicando o método final para a determinação de fenitrothion por HPLC-DAD. a) Cromatograma para o branco da matriz; b) cromatograma para 10,33 mg/L de solução padrão	

	de fenitroion (8,621 min) adicionado à matriz e espectro UV-VIS do analito	69
Figura 11 -	Caracterização e classificação de resíduos sólidos segundo a NBR 10004/2004.....	78
Figura 12 -	Principais fenômenos envolvidos no comportamento dos pesticidas no meio ambiente	82
Figura 13 -	Esquema de fortificação das amostras de resíduos de diatomáceas, águas residuais e hexano.....	98
Figura 14 -	Esquema de extração das amostras de águas residuais através da microextração líquida proposta pelo método USEPA 3511.....	99
Figura 15 -	Esquema de extração das amostras de resíduos de diatomáceas através da extração por ultrassom proposta pelo método USEPA 3550c.....	100
Figura 16 -	Cromatogramas dos brancos de extração de a) água residual extraída com DCM; b) água residual extraída com hexano; c) resíduo de diatomácea extraída com DCM e d) resíduo de diatomácea extraída com hexano.....	105
Figura 17 -	Cromatogramas da fortificação dos analitos em concentração de 200 µg L ⁻¹ sobre as matrizes em estudo a) solvente hexano; b) matriz água; c) matriz diatomácea. Ordem de eluição dos analitos: 1) α-HCH, 2) β-HCH, 3) δ-HCH, 4) γ-HCH, 5) heptacloro, 6) aldrin, 7) heptacloro-epóxido, 8) trans-clordano, 9) cis-clordano, 10) p,p'-DDE, 11) endrin, 12) β-endosulfan, 13) p,p'-DDD, 14) endrin aldeído, 15) endosulfan sulfato, 16) p,p'-DDT, 17) endrin cetona, 18) metoxicloro	108

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Coefficiente de variação	49
Equação 2 -	Porcentagem de recuperação segundo a ANVISA	50
Equação 3 -	Porcentagem de recuperação segundo o INMETRO	50
Equação 4 -	Limite de detecção segundo a ANVISA	51
Equação 5 -	Limite de detecção segundo o INMETRO	52
Equação 6 -	Limite de quantificação segundo a ANVISA	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Locais de depósito de pesticida sobre macacões de aplicadores	32
Quadro 2 -	Produtos fitofarmacêuticos e riscos de manipulação associados	34
Quadro 3 -	Utilização de EPIs de acordo com a classificação toxicológica inscrita no rótulo dos produtos e as fases de manipulação	35
Quadro 4 -	Classificação dos tipos de ensaio de validação	47
Quadro 5 -	Resumo dos tipos de resíduos em função do padrão estabelecido pela Norma Técnica NBR 10004/2004	76
Quadro 6 -	Fórmulas estruturais dos pesticidas	83
Quadro 7 -	Metodologias de extração e análise de pesticidas em amostras ambientais	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores reais e codificados para fatores de 2 ³ planejamento fatorial	58
Tabela 2 -	Valores reais para experimentos do 2 ³ projeto fatorial	58
Tabela 3 -	Valores obtidos através do planejamento fatorial 2 ³ para o efeito dos coeficientes, erro padrão, teste t e valor p.....	66
Tabela 4 -	Limite máximo de concentração de pesticidas no extrato obtido por ensaio de lixiviação segundo a NBR 10004/2004.....	79
Tabela 5 -	Lista de valores orientadores para a qualidade do solo (mg kg ⁻¹)	80
Tabela 6 -	Fragmentos de íons e limites de quantificação	93
Tabela 7 -	Fragmentos de massa para identificação dos analitos	107
Tabela 8 -	Coefficientes de correlação obtidos por calibração externa com hexano e calibração por adição de padrão sobre as matrizes de águas residuais e resíduos de diatomáceas.....	110
Tabela 9 -	Valores de CV obtidos para avaliação da precisão intra-dia e intermediária e percentuais de recuperação para avaliação da exatidão do método desenvolvido.....	112
Tabela 10-	Limites de detecção e quantificação para duas faixas de calibração de acordo com os parâmetros estabelecidos por ANVISA (2003)	114

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN - Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSI (do inglês, *British International Institution*) – Instituição Internacional Britânica
CDS (do inglês, *Chromatography Data System*) – Sistema de Dados Cromatográficos
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CFR (do inglês, *Code of Federal Regulations*) – Código de Regulamentos Federais
CIPAC (do inglês, *Collaborative International Pesticides Analytical Council*) – Conselho Analítico Colaborativo Internacional de Pesticidas
CM - Concentração média determinada
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM (do inglês, *Certified Reference Materials*) – Material de Referência Certificado
CV - Coeficiente de variação
DAD (do inglês, *Diode Array Detector*) – Detector de Arranjo de Diodos
DCM - Diclorometano
DIN (do alemão, *Deutsches Institut für Normung*) – Instituto Alemão de Normalização
DPa - Desvio padrão amostral
EPIs - Equipamentos de Proteção Individual
GC-AED (do inglês, *Gas Chromatography with Atomic Emission Detector*) – Cromatografia a Gás com Detector de Emissão Atômica
GC- μ ECD (do inglês, *Gas Chromatography with Micro Electron Capture Detector*) - Cromatografia a Gás com Detector de Micro Captura de Elétrons
GC-ECD (do inglês, *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*) - Cromatografia a Gás com Detector de Captura de Elétrons
GC-FID (do inglês, *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*) - Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chama
GC-FPD (do inglês, *Gas Chromatography with Flame Photometric Detector*) – Cromatografia a Gás com Detector de Fotométrico de Chama
GC/MS (do inglês, *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*) – Cromatografia a Gás com Detector de Espectrometria em Massa
GC-NPD (do inglês, *Gas Chromatography with Nitrogen- Phosphorous Detector*) - Cromatografia a Gás com Detector de Nitrogênio-Fósforo

HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-DAD (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

HPLC-UV (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector*) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

HWLT (do inglês, *Hazardous Waste Land Treatment*) - Unidade de Tratamento de Solos com Resíduos Perigosos

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IC - Inclinação

ICH (do inglês, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) – Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO (do inglês, *International Standards Organization*) – Organização Internacional de Padrões

IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LARES - Laboratório de Análises de Resíduos

LC-UV/PAD (do inglês, *Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector and Photodiode Array Detector*) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta e Detector de Arranjo de Fotodiodos

LOD (do inglês, *Limited of Detection*) – Limite de Detecção

LOQ (do inglês, *Liquid of Quantification*) – Limite de Quantificação

MAE (do inglês, *Microwave Assisted Extraction*) - Extração Assistida por Micro-ondas

NBR - Norma Brasileira

OC - Organoclorados

OECD (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) - Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OF - Organofosforados

PDMS - polidimetilsiloxano

PLE - (do inglês *Pressured Liquid Extraction*) - Extração por Líquido Pressurizado

PSA (do inglês *Primary-secondary amine*) - Amina Primária-secundária
PSWE (do inglês, *Pressurized Subcritical Water Extraction*) - Extração por Água Subcrítica Pressurizada
QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe*) - Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro
r Coeficiente de Correlação
 r^2 Coeficiente de Determinação
RSD (do inglês, *Relative Standard Deviation*) - Desvio Padrão Relativo
SBSE (do inglês *Stir Bar Sortive Extraction*) - Extração por Sorção em Barra Magnética
SBWE (do inglês, *Subcritical Water Extraction*) - Extração por Água Subcrítica
SD (do inglês, *Standard Deviation*) - Desvio Padrão
SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) - Monitoramento de Íon Singular
Spi (do inglês, *Standard Deviation of Intermediate Precision*) - Desvio Padrão da Precisão Intermediária
Si (do inglês, *Intermediate Precision*) - Precisão Intermediária
SIT Secretaria de Inspeção do Trabalho
SPME (do inglês, *Solid Phase Microextraction*) – Microextração em Fase Sólida
SW (do inglês, *Solid Waste*) – Resíduo Sólido
TIC - (do inglês, *Total Ion Chromatogram*) – Cromatograma de Íons Totais
USEPA (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*) - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
WHO (do inglês, *World Health Organization*) - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	27
CAPÍTULO I - ALVOS ARTIFICIAIS DE ALGODÃO COMO TÉCNICA DE AMOSTRAGEM PARA AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DE TRATORES CABINADOS DURANTE A PULVERIZAÇÃO DE LAVOURAS COM FENITROTION.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 REVISÃO	31
2.1 APLICAÇÃO DE PESTICIDAS E CONTAMINAÇÃO HUMANA.....	31
2.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL E COLETIVA.....	33
2.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE TRABALHADORES DURANTE MANIPULAÇÃO DE PESTICIDAS.....	37
2.4 TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ALVOS ARTIFICIAIS DE ALGODÃO.....	37
2.5 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	43
2.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	45
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1 MATERIAIS.....	54
4.1.1 Alvos artificiais de algodão.....	54
4.1.2 Reagentes e soluções.....	54
4.2 MÉTODOS	54
4.2.1 Experimento de exposição.....	54
4.2.2 Limpeza de vidraria.....	57
4.2.3 Otimização do preparo de amostra.....	57
4.2.4 Estratégia de otimização das condições de análise.....	58
4.2.5 Determinação analítica – adaptado do Método USEPA 8321b.....	59
4.2.6 Parâmetros analíticos de mérito.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	61
5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS DO HPLC-DAD.....	64
5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	70
5.4 APLICAÇÃO ANALÍTICA.....	71

6 CONCLUSÕES.....	72
7 PERSPECTIVAS.....	73
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA PETROLÍFERA	74
1 INTRODUÇÃO.....	74
2 REVISÃO.....	75
2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS: CONCEITOS.....	75
2.2 CLASSIFICAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS.....	77
2.3 PESTICIDAS: AÇÃO E CONTAMINAÇÃO DO MEIO AMBIENTE.....	81
2.4 METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS.....	85
2.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	94
3 OBJETIVOS.....	95
3.1 OBJETIVO GERAL.....	95
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	95
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
4.1 MATERIAIS.....	96
4.1.1 Reagentes, padrões e soluções.....	96
4.2 MÉTODOS.....	96
4.2.1 Limpeza de vidraria.....	96
4.2.2 Amostras.....	96
4.2.3 Construção das curvas de calibração.....	97
4.2.4 Fortificação de amostras.....	97
4.2.5 Microextração líquida.....	98
4.2.6 Extração por ultrassom.....	99
4.2.7 Determinação analítica via GC/MS.....	101
4.2.8 Parâmetros analíticos de mérito	101
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	104
5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS DO GC/MS.....	106
5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	109
6 CONCLUSÕES.....	115
PERSPECTIVAS.....	117

JUSTIFICATIVA

Ao longo de anos de estudos científicos ligados a saúde de agricultores e consumidores e ao meio ambiente percebeu-se o potencial tóxico e bioacumulativo dos pesticidas. Uma série deles já foi proibida em vários países, mas ainda é possível detectar alguns deles em diferentes amostras ambientais, seja pelo uso ilegal dessas substâncias ainda nos dias atuais, ou pela estabilidade de alguns desses compostos, fazendo com que permaneçam presentes no meio ambiente, se bioacumulando, mesmo após vários anos da suspensão de sua aplicação.

Este trabalho abrange diferentes avaliações de pesticidas. O primeiro capítulo versa sobre o uso de pesticidas em lavouras nos dias atuais, tendo como alvo central a avaliação de um trator agrícola com cabine selada usado como equipamento de proteção durante a aplicação dos defensivos agrícolas. Este estudo foi desenvolvido com o uso de alvos artificiais de algodão para amostragem da contaminação do ar no interior da cabine e planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de análise cromatográfica do agrotóxico fenitrothion na matriz. A cromatografia líquida foi a técnica escolhida para a determinação do organofosforado por ser mais indicado para compostos menos estáveis e sem necessidade de derivatização.

O segundo capítulo trata da determinação de pesticidas presentes em resíduos sólidos advindos da indústria petrolífera procedentes de lagoas de estabilização e produção de biodiesel, a fim de avaliar possíveis contaminações, visando ações preventivas para o descarte dos materiais. A classificação das amostras foi avaliada através do desenvolvimento das metodologias de extração e análise propostas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), de acordo com a Norma Brasileira de Resíduos Sólidos – NBR 10004/2004, sobre matrizes de águas residuais e diatomáceas advindas da indústria petrolífera.

Ambos estudos objetivaram o desenvolvimento de metodologias recomendadas pela NBR 10004 a fim de determinar pesticidas em amostras complexas com o mínimo de etapas de preparo de amostras e alta frequência analítica.

CAPÍTULO I - ALVOS ARTIFICIAIS DE ALGODÃO COMO TÉCNICA DE AMOSTRAGEM PARA AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DE TRATORES CABINADOS DURANTE A PULVERIZAÇÃO DE LAVOURAS COM FENITROTION

1 INTRODUÇÃO

Diante do crescimento da população mundial, deparou-se com a grande necessidade de alimentar os povos, motivando assim a criação de vários pesticidas e seu amplo uso no meio agrícola para evitar as perdas de produtos no campo e, conseqüentemente, aumentar a produtividade. (SANCHES, 2003; BRASIL, 2013).

Conforme Campos (1995), o pesticida, também chamado de agrotóxico tem origem etimológica no grego *agros*, que significa campo e *toxikon*, que significa veneno. Os pesticidas abrangem os produtos de natureza tóxica usados nos meios agrossilvopastoris.

Incluem-se, sob essa denominação, todas as substâncias tóxicas sintéticas ou naturais, de origem química (orgânica e inorgânica), ou biológica, usadas para o combate a pragas, patógenos e ervas invasoras de culturas agrícolas, hortícolas, silvícolas e pastoris (forrageiras e pastagens), no campo ou sob armazenamento; os agentes patogênicos e parasitários externos de animais domésticos; os vetores e hospedeiros de organismos que provocam doenças, irritações e danos no homem, nos animais domésticos e nas culturas; e os organismos, animais e vegetais, que causam incômodos ao homem e aos seus animais domésticos e interferem com atividades industriais, de comércio, de transporte, de mineração, de geração e transmissão de eletricidade etc., bem como danificam propriedades ou objetos de uso pessoal (CAMPOS, 1995, p. 86).

Pesticidas são diariamente lançados sobre diferentes tipos de culturas como forma de prevenção contra a ação danosa de pragas. A toxicidade destas substâncias atrelada ao uso inadvertido destes compostos é fonte de contaminações de alta periculosidade para o meio ambiente, mas também para o agricultor que aplica o produto e para os

consumidores de produtos hortifrúti, o que pode acarretar diversos males à sua saúde (BRASIL, 2013).

O uso de substâncias tóxicas contra pragas em lavouras permanece até os dias de hoje, sendo que, pela legislação brasileira, tais substâncias são chamadas de agrotóxicos e classificadas como inseticidas, fungicidas e herbicidas (BRASIL, 2013).

Conforme o Ministério da Agricultura (BRASIL, 2013, p. --):

O Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo. Em decorrência da significativa importância, tanto em relação à sua toxicidade quando à escala de uso no Brasil, os pesticidas possuem uma ampla cobertura legal no Brasil, com um grande número de normas legais. O referencial legal mais importante é a Lei nº 7802/89, que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02.

A referida Lei, de 11 de julho de 1989, foi a primeira regulamentação brasileira sobre pesticidas, revisada em 2002 ela aborda sobre pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de pesticidas, seus componentes e afins, além de outras providências (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002).

Vários são os riscos para aqueles que trabalham em atividades agrícolas, seja no manuseio de máquinas e ferramentas pesadas, na exposição a doenças transmissíveis por animais, ou na exposição a produtos químicos perigosos, entre outros. Além disso, os investimentos em capacitação dos trabalhadores na prevenção desses riscos são considerados baixos (FILIPE, 2011). Essa capacitação, seja para os pequenos produtores, seja para os trabalhadores rurais de grandes empresas, minimiza os riscos à saúde do aplicador de agrotóxico, ao meio ambiente que o cerca, além de aumentar a produtividade e a qualidade dos produtos hortifrutigranjeiros (SENAR, 2005).

Uma das principais formas de prevenção contra os riscos agrícolas, no que diz respeito à aplicação de pesticidas nos mais diferentes tipos de cultivos, é a utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) conforme previsto na Norma Regulamentadora NR 6 de 08 de junho de 1978, atualizada em 2015. Esta norma descreve o uso de alguns

equipamentos específicos para a proteção contra respingos, gases, vapores ou materiais particulados de produtos químicos, deixando sob responsabilidade do empregador a aquisição e/ou substituição de equipamentos adequados de acordo com órgão nacional de segurança e saúde no trabalho, bem como a exigência de uso, e a capacitação quanto ao uso, conservação e armazenamento dos mesmos. Aos trabalhadores cabe a responsabilidade de uso consciente para a finalidade destinada, a conservação e armazenamento adequados, e a comunicação ao empregador quanto a necessidade de substituição de qualquer equipamento impróprio.

Uma segunda norma regulamentadora, NR 31, de março de 2005 e atualizada em 2013, apresenta de forma geral vários requisitos de segurança e saúde para o trabalho rural, dentre as quais trata da manipulação de pesticidas, exposição e capacitação de trabalhadores, e deveres atribuídos ao empregador e ao trabalhador rural, além de tratar superficialmente das condições de segurança no uso de tratores agrícolas, mais frequentemente utilizados com pulverizadores tracionados para minimizar o tempo de aplicação dos pesticidas, bem como promover uma diminuição da exposição direta dos trabalhadores.

O presente trabalho surgiu como uma demanda de pesquisa para o Departamento de Agronomia da UFSC, a fim de avaliar o grau de exposição à que manipuladores de tratores agrícolas cabinados estavam expostos durante a aplicação de pesticidas em um cultivo de maçã no meio oeste catarinense. A pesquisa consistiu da determinação de fenitrothion em absorventes íntimos de uso diário, denominados cientificamente como um tipo de alvo artificial de algodão, utilizado na amostragem do analito alvo da determinação.

2 REVISÃO

2.1 APLICAÇÃO DE PESTICIDAS E CONTAMINAÇÃO HUMANA

Apesar do consenso social de que os pesticidas são prejudiciais a diferentes camadas da biosfera, sua necessidade em prol da alta produtividade ainda é preponderante. O que se busca é o equilíbrio entre o uso racional, minimizando o aparecimento de pragas e ao mesmo tempo a contaminação de solo, água e seres vivos (CUNHA; MINGUELA 2011).

A aplicação de agrotóxico por pulverização assistida por ar ocorre de forma mais eficiente e menos prejudicial ao ambiente de acordo com algumas características do cultivo e de condições ambientais. Dentre as características do cultivo estão o porte da cultura (estágio de crescimento) colabora para definir o volume de calda aplicado por área, e o tipo de solo avalia a existência de torrões ou restos de cultura que afetam a eficiência do defensivo agrícola. Dentre as condições ambientais pode-se destacar a temperatura na hora da aplicação deve ser amena para evitar perdas do produto por evaporação ou ainda efeitos fitotóxicos, o vento fraco a levemente moderado evita a deriva da calda pulverizada para locais inapropriados, e a umidade baixa favorece o desempenho do produto. Além disso, os tipos de bicos e taxas de pulverização utilizadas colaboram na minimização da deriva da calda e aumentam a uniformidade de distribuição (SENAR, 2005; ENDALEW *et al*, 2010; ZHAO 2014).

As técnicas de aplicação de pesticidas que se utilizam na pulverização hidráulica são as mais empregadas no campo, devido à sua versatilidade no que diz respeito aos diferentes tipos de aplicadores e às extensões de plantações em que são utilizados. O mais simples é o chamado pulverizador costal, principalmente utilizado em áreas de pequeno porte. Dentre os mais sofisticados estão os pulverizadores de barra autopropelidos, que varrem extensões maiores (CUNHA; MINGUELA 2011).

Na pulverização hidráulica, independentemente da técnica de aplicação, os bicos de pulverização são os componentes mais importantes para a qualidade e segurança da aplicação. O domínio na hora da aplicação do produto garante um alcance uniforme com maior exatidão, minimizando perdas sobre o meio ambiente. Este domínio, porém, está sujeito a outros fatores ambientais que colaboram para a deriva do produto sobre outros tipos de cultivos, aumentando a contaminação de outros alimentos, além da água e solo, e do trabalhador rural (CUNHA; MINGUELA 2011).

Para o aplicador de pesticidas são consideradas três vias de exposição ao defensivo agrícola. A absorção oral e por inalação são menos comuns nas condições típicas de trabalho no campo, porém, a exposição transdérmica é mais corriqueira e bastante importante do ponto de vista toxicológico (HUGHES *et al*, 2008).

Em pesquisa realizada com diversos tipos de pulverizadores de pesticidas em diferentes culturas com o uso de vários equipamentos, Santos (2010) faz a avaliação qualitativa da exposição dos aplicadores, conforme Quadro 1.

Quadro 1 – Locais de depósito de pesticida sobre macacões de aplicadores.

Tipo de pulverização	Partes mais atingidas
Pulverizador com barra manual	Tórax, abdômen, braços e pernas.
Pulverizadores de barra	Todas as partes do corpo exceto nas costas, tórax e abdômen.
Turbo atomizador	Todas as partes do macacão, principalmente os ombros, a nuca e a cabeça.
Pulverizador tipo pistola	Pouca deposição sobre o macacão do tratorista
Pulverizador costal manual	Médias e grandes deposições, principalmente sobre as pernas, tórax, abdômen e coxas.

Fonte: Adaptado de Santos (2010, p. --).

Santos (2010) avaliou a exposição dos trabalhadores que aplicavam pesticidas em algumas culturas e que se utilizavam de ferramentas para pulverizá-las, como o pulverizador retro barra ao trator usado em batatas e algodão, e o tratorizado com jato lançado por pistola (*citrus*), sendo que os aplicadores usavam macacões brancos 100% algodão. Na cultura de algodão houve deposição em todas as partes do corpo. Na de batata, somente as costas, o tórax e o abdômen não tiveram deposição. Já na cultura de laranja (*citrus*), foi verificada pouca deposição sobre o macacão do tratorista. A conclusão foi que existe a necessidade do desenvolvimento EPIs realmente seguros, confortáveis e adequados às diversas culturas e aos diferentes equipamentos a serem utilizados.

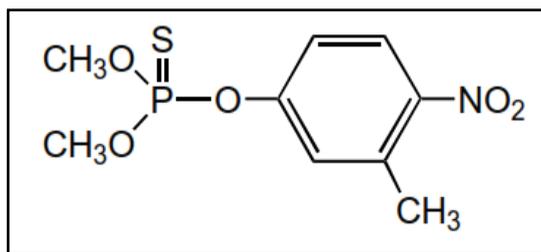
De acordo com a Organização Mundial de Saúde em 2010 (WHO) o fenitrothion é um inseticida utilizado na agricultura, horticultura, silvicultura contra insetos mastigadores e sugadores em culturas de arroz,

cereais, frutas, legumes, algodão e grãos armazenados; e na saúde pública contra moscas, mosquitos e baratas.

O fenitroton, de nome O,O-dimetil O-4-nitro-m-tolil fosforotioato segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é apresentado comercialmente como um óleo amarelo pálido a castanho amarelado e odor característico fraco. É um inseticida organofosforados (Figura 1) de baixa solubilidade em água e sofre degradação rápida por fotólise e hidrólise básica (WHO, 2010).

Seu ponto de degradação a 210 °C colabora para sua determinação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), de acordo com o método 4602 do Conselho Analítico Colaborativo Internacional de Pesticidas (CIPAC) criado por Yasushi Asada (CIPAC, 2009; WHO, 2010).

Figura 1 - Estrutura molecular do Fenitroton.



Fonte: WHO (2010, p. 6)

A contaminação por fenitroton (Figura 1) pode gerar desde uma leve sensibilização até irritação mais aguda, porém não apresenta perfil mutagênico ou carcinogênico representativos aos seres humanos, apesar de ser um inibidor da acetilcolinesterase. Além disso, o composto pode ser considerado não persistente em solo e sem risco negligenciável a culturas ou águas subterrâneas (WHO, 2010).

2.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL E COLETIVA

Apesar da evolução nas condições de trabalho rural e na introdução de novas técnicas que tem transformado o trabalho dos agricultores, o perigo para a segurança e a saúde destes profissionais ainda está atrelado aos conhecimentos tradicionais já obsoletos e a falta de conhecimento dos novos e graves riscos. A prevenção se inicia na avaliação dos riscos e na escolha de medidas preventivas (TEIXEIRA, 2014).

No Quadro 2 estão resumidas algumas situações frequentes durante a manipulação dos pesticidas e os riscos associados às ações.

Quadro 2 - Produtos fitofarmacêuticos e riscos de manipulação associados.

Tipo de pesticida	Risco primário	Risco secundário
Concentrados solúveis	Mãos ++++	Inalação +
Emulsões concentradas	Mãos ++++	Inalação +
Suspensões concentradas e aquosas	Mãos +++	
Suspensão de cápsulas	Mãos +++	
Emulsões (em óleo ou aquosa)	Mãos +++	
Pós polvilháveis	Mãos ++++	Inalação ++
Pós molháveis (ou dispersíveis/óleo)	Mãos ++++	Inalação +
Pós molháveis ou sacos hidrossolúveis	Mãos 0/+	Inalação 0
Granulados	Mãos +	Inalação +
Granulados solúveis	Mãos ++	Inalação +
Tabletes	Mãos 0/+	Inalação 0

Legenda:

Riscos: ++++ importante +++ médio ++ pequeno 0 praticamente nulo.

Fonte: Adaptado de Teixeira (2014, p. 6-7).

A escolha do tipo de pesticida e a adequação aos potenciais riscos descritos no Quadro 2 devem iniciar pela consulta técnica sobre o tipo de produto específico para o cultivo, bem como dose, forma e frequência de aplicação e métodos e equipamentos a serem utilizados (TEIXEIRA, 2014).

Além disso, os riscos listados no Quadro 2 são minimizados quando da utilização de EPIs adequados à manipulação destes produtos. Estes equipamentos devem estar em boas condições de uso e serem lavados após seu uso (internamente e externamente). Dentre os equipamentos encontram-se os protetores oculares para substâncias tóxicas e/ou irritantes; os protetores para nariz e boca para evitar inalação de gases ou poeiras, com substituição dos filtros segundo recomendação do fabricante; protetores para as mãos para a manipulação de produtos tóxicos em concentrações elevadas, lembrando de lavar bem as mãos após término do trabalho. Para o corpo é necessária proteção específica para manipulação de pesticidas; e protetores para os pés para uso durante a manipulação do produto e em contatos posteriores com as plantas tratadas. O quadro 3 ilustra quais os EPIs necessários para cada tipo de produto e uso (TEIXEIRA, 2014).

Quadro 3: Utilização de EPIs de acordo com a classificação toxicológica inscrita no rótulo dos produtos e as fases de manipulação.

Classificação toxicológica inscrita no rótulo dos produtos	Fases do trabalho				Manipulação de utensílios e embalagens vazias; Contato com material após uso
	Preparo	Utilização			
		Líquidos	Granulados ou pó	Fumos ou vapores	
MUITO TÓXICO 	 Botas de borracha, fato de protecção, capuz e óculos de protecção	 Botas de borracha, fato de protecção, óculos, luvas, protecção respiratória	 Fato de protecção, capuz, óculos, protecção respiratória, luvas c/ canhão	 Fato de protecção, capuz, óculos, protecção respiratória, luvas c/ canhão	Fato de protecção, capuz, luvas.
TÓXICO 	 Fato de protecção, capuz, protecção da cara, luvas	 Fato de protecção, óculos, protecção respiratória	 Fato de protecção, óculos, protecção respiratória, luvas c/ canhão	 Fato de protecção, óculos, luvas c/ canhão	Fato de protecção, luvas.
NOCIVO 	 Fato de protecção, capuz, protecção da cara, luvas	 Fato de protecção, capuz, protecção da cara, luvas	 Fato de protecção, capuz, protecção das vias respiratória, luvas c/ canhão e óculos	 Fato de protecção, capuz, óculos e luvas c/ canhão	Fato de protecção, luvas.
CORROSIVO 	 Fato de protecção, botas, capuz, protecção da cara e luvas	 Fato de protecção, botas, luvas	 Fato de protecção, óculos, protecção respiratória, luvas c/ canhão	 Fato de protecção, capuz, óculos, luvas c/ canhão	Fato de protecção, botas, capuz, luvas.

Fonte: Adaptado de Teixeira (2014, p. 10).

A utilização de EPIs, conforme apresentado no Quadro 3, são imprescindíveis para a segurança do trabalhador rural. Outra fonte de proteção é a utilização de tratores cabinados.

A produção de tratores no Brasil teve início na década de 60 e foi progressivamente substituindo o trabalho manual e à tração animal. O trator agrícola é uma importante fonte de potência da zona rural, sendo significativa para o avanço tecnológico do sistema de produção de alimentos, mas também para a economia energética e operacional (MONTEIRO, 2010).

Conforme Filipe (2011) existem algumas regras básicas para prevenção de riscos profissionais no setor de agricultura, sendo que uma delas diz respeito ao uso de tratores, os quais deverão estar equipados com arco, quadro ou cabine, como mostrado na Figura 2.

Figura 2: Estruturas de segurança em tratores



Fonte: Filipe (2011, p. 13).

Dentre os modelos apresentados na Figura 2, o trator equipado com cabine na tomada de potência (motor que proporciona potência ao trator e demais equipamentos agrícolas acoplados a ele) proporciona ao operador maior proteção aos agentes ambientais, bem como aos ruídos e fumaça do escapamento do veículo, e ainda uma vedação eficaz contra partículas dos defensivos agrícolas utilizados nas plantações (MONTEIRO, 2010).

Existem regras estabelecidas para o mercado de máquinas e equipamentos de segurança, com prescrições mínimas para utilização de equipamentos de trabalho, sendo que para os tratores agrícolas e florestais existem legislações específicas (FILIPE, 2011). Uma das normas de segurança e saúde foi a estabelecida pela Secretaria de Inspeção do Trabalho (SIT), conhecida como Norma Regulamentadora 31, onde define a necessidade de instalação de proteção na parte superior e lateral da tomada de potência de tratores agrícolas (MTE, 2013). A SIT é responsável pela definição, coordenação, orientação e implementação da política nacional em segurança e saúde no trabalho rural, bem como de ações preventivas, além de executar a fiscalização, através das Delegacias Regionais do Trabalho.

Apesar disso, tratores cabinados de fábrica não são totalmente seguros. Mesmo com a vedação recomendada, os níveis de contaminação por partículas podem exceder as recomendações de segurança. Tratores cabinados fora de fábrica podem ser ainda menos eficazes nesta vedação, sendo importante estudar e avaliar o nível de proteção da mesma, a fim

de não piorar a exposição dos operadores durante a aplicação dos defensivos agrícolas no campo (MONTEIRO, 2010).

2.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE TRABALHADORES DURANTE MANIPULAÇÃO DE PESTICIDAS

É consenso geral que o uso de EPIs e outros equipamentos de proteção podem reduzir drasticamente a exposição de agricultores durante a aplicação de pesticidas. Os níveis de exposição a que são submetidos os trabalhadores rurais, porém, devem ser avaliados, a fim de se determinarem possíveis riscos de contaminação. Essa avaliação pode ser feita empregando diferentes métodos de amostragem e análise durante aplicações reais (TSAKIRAKIS, 2014).

Esta estimativa da exposição dérmica pode ser feita analisando as deposições de pesticidas após a pulverização. O método consiste na recuperação e detecção de substâncias sobre o alvo estudado, alvos artificiais depositados sobre o alvo ou equipamentos específicos de amostragem. A avaliação pode ser feita através de dois tipos de procedimentos. No método indireto, se utiliza o monitoramento de fluidos biológicos através de análises da atividade da enzima colinesterase no sangue após a exposição ao agrotóxico. Já no método direto, também conhecido como dosimetria passiva, se utiliza mecanismos de coleta do material tóxico para determinar o grau de exposição (CHAIM; CASTRO; GALVÃO, 2001).

Em função das diversas contaminações possíveis por pesticidas, estudiosos elaboram análises em tecidos de algodão ou similares. A determinação destes compostos em nível traço geralmente é realizada por técnicas cromatográficas utilizando-se diferentes tipos de detectores, porém são necessárias etapas preliminares como amostragem, extração e limpeza a fim de alcançar os níveis de concentração e remover possíveis interferências antes da análise (D'ARCHIVIO *et al*, 2007; ZHU *et al*, 2009; CAI *et al*, 2013).

2.4 TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ALVOS ARTIFICIAIS DE ALGODÃO

O preparo de amostra consiste de etapas como extração, pré-concentração e/ou eliminação de interferentes. Esta é uma das partes mais importante no processo de disponibilização dos analitos para determinação analítica. Esta etapa do preparo de amostra contabiliza cerca de dois terços do tempo total da análise dos compostos e pode ser

considerada como fonte primária de erros, sendo importante a escolha da melhor metodologia diante das características da amostra. Assim, ao longo das últimas décadas uma série de técnicas de preparo de amostras vem sendo desenvolvida e melhorada (RAMOS, 2012).

Um dos métodos mais antigos e básicos de preparo de amostra é a extração dos analitos presentes em uma matriz para um solvente. Esse processo visa a retirada dos analitos em grande proporção, com o mínimo de espécies interferentes possível (SMITH, 2003).

Algumas agências desenvolvem metodologias dentro de planejamento específicos, a fim de proporcionar maior qualidade das análises e segurança nos resultados. Conforme o compêndio de resíduos sólidos (SW-846) da USEPA, é possível escolher o procedimento a ser aplicado de acordo com as características da amostra, dentre elas o estado físico da amostra. Esta escolha leva em consideração, principalmente, a quantidade de analito, sendo que, de forma geral, as análises descritas neste manual são desenvolvidas para análises-traço (< 1000 ppm) (USEPA, 2007a).

Segundo Ramos (2012), o processo de extração é aprimorado quando ocorre com a aplicação de uma energia auxiliar como a energia mecânica de uma fonte ultrassônica. A extração auxiliada por ultrassom é relativamente nova (cerca de 20 anos), mas já é citada como um método rápido, barato e eficiente na extração de diversos compostos orgânicos, como os pesticidas, em quantidades traço e em diferentes matrizes sólidas (VAGI *et al*, 2007; RAMOS, 2012; USEPA, 2007a, USEPA, 2007b).

Este tipo de extração utiliza o princípio da sonicação, geralmente através de banhos ultrassônicos, para gerar um microambiente de temperatura e pressão elevadas que aceleram o transporte dos analitos presentes na matriz para o solvente. A utilização de frequências maiores que 20 Hz que atravessam a matéria e geram uma pressão negativa forma bolhas ou cavidades em um processo conhecido por cavitação. Apesar de mais utilizados, os banhos possuem o inconveniente de terem a energia mecânica distribuída não uniformemente, fazendo com que a cavitação ocorra mais fortemente próximo a fonte ultrassônica que em outras regiões do equipamento (RAMOS, 2012).

Isto pode ser contornado pela avaliação do equipamento e utilização dos sistemas de extração localizados em ambientes específicos próximos as fontes de energia. Além disso, Ramos (2012) sugere que o solvente de um sistema fechado seja movimentado para evitar compactação da amostra. Após o tempo de sonicação desejado, o extrato orgânico é coletado e transferido para outro frasco e submetido a próxima etapa do procedimento analítico.

Ao longo dos anos as metodologias de análise de pesticidas foram se aperfeiçoando e as técnicas analíticas foram sendo também aplicadas na avaliação de equipamentos de proteção. As primeiras avaliações de equipamentos de proteção descritas na literatura foram no início da década de 90. Gilbert e Bell (1990) se utilizaram de *spray* e jato de calda agrotóxica para avaliar costuras, fechos, revestimentos, sobreposições e aberturas de macacões e conjuntos (calças com blusas), a fim de determinar o grau de permeação das confecções em material permeável e impermeável ao ar (materiais revestidos ou películas poliméricas). Para tecidos permeáveis o teste da Organização Internacional de Padrões (ISO) 6530 exige uma repelência de 95% da calda após sua aplicação forçada (10 mL em 4 s), com o tecido suportado em uma calha inclinada a 45°. Para tecidos impermeáveis a avaliação foi feita pelo método BSI 4724 da Instituição Internacional Britânica (BSI), que consiste na medição do tempo de ruptura da calda mantida contra a superfície do tecido. O tempo de ruptura classifica o equipamento de proteção pessoal como: 12 minutos - proteção emergencial (retirar assim que possível); 12 minutos a 2 horas - proteção curta (lavar/limpar imediatamente); 2 horas a 6 horas - proteção de rotina (lavar/limpar no fim da operação); mais que 6 horas - proteção para longos prazos de exposição contínua (lavar/limpar ao fim do dia).

Uma metodologia usada por Keeble, Correll e Ehrich (1993) para avaliar luvas de proteção utilizou um modelo *in vitro* para determinação da inibição da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforados. A exposição aos compostos foi avaliada por 4 horas na pele sem qualquer proteção, comparada com a proteção de luvas de diferentes materiais. Análises espectrofotométricas foram procedidas sobre fibroblastos diluídos e incubados com acetilcolinesterase e seu substrato acetilcolina.

Cano *et al* (2000) estabeleceram uma metodologia analítica baseada em Cromatografia a Gás com Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD) para averiguar a exposição de pesticidas, entre eles o fenitroton, em macacões e luvas usadas por aplicadores e assistentes. O Limite de Detecção (LOD) dessa substância foi de 8,8 ng mL⁻¹ e a taxa de recuperação esteve entre 88 % e 101,6 %. Ficou evidenciado que a exposição se deu principalmente nas partes mais baixas do corpo.

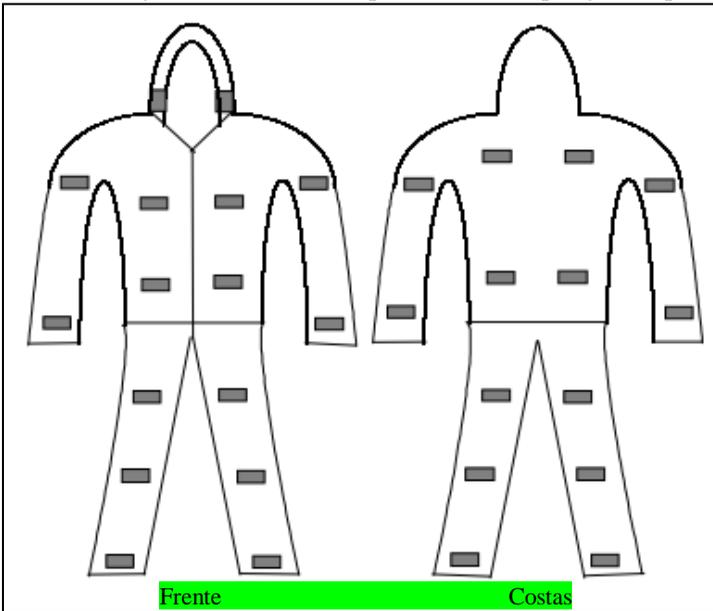
A fim de analisar as deposições no corpo do aplicador, Machado Neto (1990 apud CHAIM; CASTRO; GALVÃO, 2001) utilizou-se de absorvente higiênico Carefree® como alvo artificial e obteve melhores resultados em comparação com alvos de papel de alfacelulose pura, tradicionalmente utilizados, que apresentaram alguns inconvenientes durante a utilização. Já a pesquisa de Chaim, Castro e Galvão (2001), se

utilizou de alvos artificiais feitos de papel do tipo mata-borrão, sendo uma opção simples e de baixo custo, podendo ser facilmente adaptada ao estudo de recuperação dos pesticidas. Os autores confirmam que:

A maioria dos pesquisadores tem preferido utilizar-se de substratos artificiais para coleta das gotas, porque nem sempre é possível extrair o traçador de alvos naturais. Não existem alvos artificiais padrão, pois estes variam conforme o tipo de traçador utilizado, o método analítico empregado e, sobretudo, a finalidade dos resultados (CHAIM; CASTRO; GALVÃO, 2001, p. 150).

Os cartões de mata-borrão foram grampeados na roupa de proteção do aplicador, nas partes anterior e posterior do corpo, conforme Figura 3.

Figura 3: Distribuição de alvos artificiais para estudo de exposição de aplicadores



Fonte: Adaptado de Chaim, Castro e Galvão (2001, p. 152).

Os autores concluíram que a técnica de amostragem usando papel mata-borrão distribuída conforme apresentado na Figura 3 é adequada para qualificar e quantificar o grau de exposição dos aplicadores em ensaios de curta duração. Foi possível verificar que mais de 70 % da

deposição de agrotóxico concentrou-se nas regiões das coxas, pernas e tornozelos dos aplicadores, sendo que o grau de exposição variou conforme o porte das plantas (CHAIM; CASTRO; GALVÃO, 2001).

Bernard *et al* (2008) descrevem a extração de pesticidas em compressas de gaze usando Extração por Líquido Pressurizado (PLE) com acetato de etila. O extrato teve seu volume reduzido para 0,5 mL a 35 °C. O padrão interno foi adicionado e o extrato foi avolumado para 1 mL com acetato de etila, seguido de análise por Cromatografia a Gás com Detector de Micro Captura de Elétrons (CG- μ ECD).

Zhu *et al* (2009), cujo estudo foi realizado através Microextração em Fase Sólida (SPME) e Cromatografia a Gás com Detector de Espectrometria de Massa (GC/MS) para a determinação de dezoito pesticidas organofosforados em amostras têxteis, concluíram que o método foi considerado rápido e sensível, além da melhoria de vários parâmetros como revestimento da fibra, extração, tempo de dessorção, temperatura, pH e salinidade. Desta maneira, o método apresentou boa linearidade, baixos limites de detecção e de boa repetibilidade. Com um bom percentual de recuperação, o método foi considerado de potencial aplicabilidade para a análise de rotina.

O estudo de Tsakirakis *et al* (2011) foi sobre os níveis de exposição do operador durante aplicações de iscas de inseticida (substâncias atrativas para o inseto, associadas à inseticidas) em olivais, onde foi desenvolvido e validado um método analítico através de GC-NPD, onde os aplicadores usavam macacões com 50% algodão e 50% poliéster tratado (A) e 100% algodão (B). Os pesquisadores concluíram que ambos os macacões possuíam proteção satisfatória, porém o macacão A tinha uma proteção maior (TSAKIRAKIS, 2011).

Para a extração de pesticidas organofosforados em tecidos de algodão, Hu *et al* (2012) utilizaram 4 g de amostras cortadas em pedaços de 25 mm², sendo embebidas em 10 mL da solução simulada de pesticidas. A mistura foi dissolvida por agitação ultrassônica e seu pH ajustado com HCl ou NaOH. Em seguida, o extrato foi submetido à extração por SPME e analisado por GC/MS.

Outro estudo baseado no método SPME e GC/MS foi realizado por Cai *et al* (2013) para a determinação de dez pesticidas organoclorados em produtos têxteis ecológicos, entre eles o aldrin, endrin e DDT. Os limites de detecção variaram entre 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dieltrin) para 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ (aldrin) e as recuperações relativas ficaram entre 70,0% e 112,6%. O método também foi considerado rápido e sensível, com otimização do revestimento da fibra, da extração, do tempo de dessorção e temperatura,

do pH e da salinidade, apresentando boa linearidade de largura, baixos limites de detecção e de boa repetibilidade.

Nos estudos de Leme *et al* (2014) foram utilizados absorventes sobre o EPI do trabalho rural, a fim de avaliar a vestimenta utilizada durante a aplicação do agrotóxico malation para controle do *Aedes aegypti*. Ao fim da aplicação, os absorventes foram coletados, identificados e submetidos a extração por agitação mecânica, para posterior análise via Cromatografia a Gás com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID). A penetração do agrotóxico no equipamento de proteção foi calculada pela porcentagem de penetração do produto através de cem vezes a razão da concentração interna pela concentração externa, e a capacidade de retenção dada por cem menos a porcentagem de penetração. Cerca de 80 % das amostras apresentaram contaminações com malationa, sendo que as amostras de maior porcentagem do produto foram encontradas na cabeça, no antebraço esquerdo e no antebraço direito, respectivamente.

De acordo com a USEPA, no compêndio SW-846, a cromatografia possibilita a separação de analitos semivoláteis e não voláteis, através de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência respectivamente, sendo propostos para determinação de pesticidas, como por exemplo para os organofosforados, os métodos 8321 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Ultravioleta (HPLC-UV), 8270 (GC/MS), além do método 8085 por Cromatografia a Gás com Detector de Emissão Atômica (GC-AED) e o método 8141 Cromatografia a Gás com Detector de Fotometria em Chama (GC-FPD) (USEPA, 2003; USEPA, 2007a).

A cromatografia líquida pode ser uma alternativa satisfatória para determinação de compostos menos estáveis como o organofosforados fenitrothion, sem a necessidade de derivatização prévia a análise via GC. A técnica é bastante versátil e possibilita determinações de pesticidas de forma rápida, precisa e sensível, com alta resolução espectral dos compostos presentes na matriz. A detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos permite ainda a captação de espectros de absorção a cada segundo, facilitando a verificação da pureza dos picos, bem como a confirmação dos compostos (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; CALDAS *et al*, 2011).

O método 8321B via HPLC-UV, protocolado pela USEPA, pode ser aplicado à determinação de compostos não voláteis ou semivoláteis que são extraídos por solvente, e passíveis de análise por HPLC acoplado a detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos, utilizando eluição por gradiente em fase reversa. Em casos de co-eluição, a detecção UV

por DAD pode proporcionar uma resolução dos picos em comprimentos de onda distintos, como 254 nm e 280 nm, facilitando a obtenção dos resultados para a quantificação (USEPA, 2003; USEPA, 2007d).

A determinação por HPLC de pesticidas em matrizes ambientais pode por vezes apresentar separações complexas e sobreposições de picos, sendo necessário em muitos casos a aplicação de métodos quimiométricos para avaliação das condições de análise (RODRIGUEZ-CUESTA, 2005; YU *et al*, 2013).

2.5 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

Atualmente, com o avanço científico, as pesquisas têm produzido ainda mais dados e informações que devem ser explorados para geração de resultados confiáveis. A utilização de ferramentas estatísticas contribui com grande importância para o planejamento de experimentos, promovendo a obtenção máxima de informações relevantes com o mínimo de experimentos necessários e, por consequência, diminuição de tempo e custos (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008). “A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos” (MARINHO; CASTRO, 2005)

Os planejamentos de experimentos podem otimizar variáveis de duas maneiras. A otimização univariada consome mais tempo por analisar uma variável por vez e não é suficiente para avaliar as possíveis interações entre as variáveis que afetam os resultados finais. Já na utilização de sistemas de análise multivariada a otimização das variáveis é obtida de forma mais rápida e completa. Dentre diferentes possibilidades de planejamentos experimentais, o planejamento fatorial se sobressai por possibilitar esta avaliação simultânea com o mínimo de experimentos. (CUNICO *et al*, 2008).

O primeiro passo para a implantação de um planejamento fatorial é o delineamento do tipo de experimento que será procedido. Para isso, é necessário inicialmente entender qual o problema será avaliado e as possíveis hipóteses de resposta. Isto contribuirá para a escolha dos fatores de uma análise fatorial, ou seja, as variáveis independentes do sistema que serão modificadas no estudo para avaliar o efeito sobre o resultado final (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008).

Na sequência, outro passo muito importante para uma análise bem estruturada é compreender qual o tipo de resultado é necessário para descrever as alterações no seu sistema. Isto consiste na escolha do tipo de experimento que será procedido, bem como qual será a resposta analítica

a ser medida durante o estudo. Com isso, é possível escolher as unidades de observação de cada variável independente, bem como os níveis em que cada uma será avaliada e suas combinações. Os níveis mais usados nos ensaios estatísticos são o nível mínimo (-) e o nível máximo (+) (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008).

Por fim, cada análise deve ser procedida aleatoriamente, utilizando um conjunto de níveis das variáveis independentes, definido de acordo com o planejamento, e as respostas analíticas da variável dependente, organizadas de forma a propiciar medidas de precisão dos resultados, bem como a interpretação dos mesmos (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008).

A descrição estatística de um planejamento é dada por n^k , sendo k o número de fatores, e n o número de níveis. Assim, para uma avaliação das variáveis do sistema em dois níveis temos o planejamento com 2^k experimentos, ou seja, para três fatores serão necessários 8 experimentos para proceder um planejamento fatorial completo. Se o número de níveis for diferente entre os fatores, o número de experimentos é dado pela multiplicação dos níveis de cada fator. Caso os ensaios sejam repetidos, é possível também estimar o erro experimental atribuído ao planejamento (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008).

As variações da resposta do sistema com as mudanças nos níveis dos fatores é o que possibilita a análise dos efeitos gerados no sistema estudado e de suas interações, proporcionando a descrição de sistemas através de expressões matemáticas que facilitam a elaboração de conclusões qualitativas (MARINHO; CASTRO, 2005; CUNICO *et al*, 2008).

Alguns estudos apresentam o uso de planejamentos experimentais para avaliação das melhores condições de análises cromatográficas em análises multiresiduais ou matriz complexas. Na avaliação de Soodi, Garshasbi e Eskandari (2012) foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 para estimar as melhores condições de tempo de retenção e resolução analítica para determinação de quatro pesticidas organofosforados via HPLC-UV. O experimento foi planejado para avaliar a interação de três fatores: pH da fase móvel, percentual de acetonitrila (ACN) no eluente e velocidade do fluxo do eluente. O estudo foi efetuado em dois níveis para cada fator, sendo pH 2,5 e 7, teor de ACN em 50 e 70 % e fluxo em 0,7 e 1,3 mL min⁻¹, e o planejamento foi executado em triplicata, somando um total de 24 experimentos. Os resultados demonstraram que apenas o pH não apresentou influência sobre o tempo de retenção e a resolução dos picos; já a velocidade do fluxo e o teor de ACN na fase móvel apresentaram efeitos significativos

na variação do tempo de retenção, bem como na resolução dos analitos, sendo que a condição ótima foi definida em 60 % de ACN e fluxo da fase móvel em 1 mL min⁻¹.

Outro estudo semelhante foi procedido por Ouertani, Atrache e Hamida (2016) para determinação de seis carbamatos via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD). O planejamento utilizado também foi o fatorial completo 2³ para definição da melhor condição analítica do fluxo do eluente, nos níveis 0,6 e 1,4 mL min⁻¹, teor de ACN na fase móvel, nos níveis 60 e 90 %, e temperatura da coluna, nos níveis 22 e 35 °C. Os resultados demonstraram que a temperatura da coluna não apresentou efeito significativo sobre a resposta analítica; já o teor de ACN na fase móvel e a velocidade do fluxo somam um efeito superior a 90 % no resultado das análises. Além disso, todas as interações dos fatores mostraram efeito não significativo sobre a resolução dos analitos. As condições ótimas de análise foram fluxo de 1 mL min⁻¹, teor de ACN em 67 % da fase móvel e temperatura da coluna em 28,5 °C.

Além da avaliação dos parâmetros cromatográficos na separação dos analitos, a literatura traz alguns outros estudos para a determinação das condições ótimas de extração de pesticidas em diferentes matrizes, como o trabalho de Amadori *et al* (2013) que utilizou um planejamento fatorial 2³ para determinação da melhor condição de extração da atrazina e dois metabólitos por agitação para comparação com a extração por ultrassom e posterior determinação via HPLC-DAD. Em 2014, Colombo, Yariwake e Lanza utilizaram um planejamento fracionário 2²⁻⁵ aplicando o *software* Minitab (Minitab Inc, USA) para determinação da condição ótima de extração do piretróide esfenvalerato e seus intermediários utilizando a extração com sorção em barra magnética e determinação via Cromatografia Líquida com Detecção via Ultravioleta e Arranjo de Fotodiodo (LC-UV/PAD). Por fim, Tan, Low e Awoniran (2015) avaliaram diferentes métodos quimiométricos para a otimização das condições de extração de resíduos de pesticidas em água via SPME para posterior determinação por GC/MS. No artigo, os autores trazem um *review* de diferentes técnicas de análise estatística e avaliações de resultados quimiométricos que contribuem para resultados analíticos de maior qualidade.

2.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

A validação analítica é uma avaliação experimental, universalmente conhecida, pelo qual um método analítico é submetido, a

fim de que se estime a eficiência da rotina do laboratório, certificando-se que este atende com confiança a qualidade de aferição exigida às aplicações analíticas a que foi proposto (IUPAC, 2002; ANVISA, 2003; ICH, 2005; OECD, 2007; INMETRO, 2011).

Alguns órgãos reguladores e organizações no Brasil e no mundo discutem e estabelecem documentos oficiais com os parâmetros a serem avaliados durante o processo de validação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) são os reguladores do processo de validação no Brasil. Os parâmetros listados pelo INMETRO estão contidos no documento DOQ-CGCRE-008/2011 – orientação sobre validação de métodos analíticos, enquanto que as orientações da ANVISA estão dispostas pela Resolução 899/2003 no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003; RIBANI *et al*, 2004; INMETRO, 2011).

Além destes, órgãos reguladores em todo o mundo estabelecem critérios em diferentes países, como a IUPAC, que projetou um guia com as diretrizes harmonizadas para validação de métodos de análise em um único laboratório, publicado pela Sociedade Real de Químicos do Reino Unido (Royal Society); e também o Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), que apresenta uma discussão sobre os parâmetros a serem avaliados durante a validação de procedimentos analíticos na União Europeia, Japão e Estados Unidos, a fim de superar as diferenças existentes entre os vários compêndios destes locais. Há ainda aqueles documentos que estabelecem orientações para áreas específicas, como a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), que fornece, no documento ENV/JM/MONO(2007)17, parâmetros harmonizados para avaliação de métodos analíticos voltados à análise de resíduos de pesticidas (IUPAC, 2002; ICH, 2005; OECD, 2007).

O processo de validação pode ocorrer de forma completa, também chamado de *full validation*, que se utiliza de estudos colaborativos entre laboratórios e com materiais-teste para avaliar a performance de protocolos de análise que sejam extensivamente utilizados em um grande número de laboratórios. Outra forma de validação é a validação em laboratório, também conhecida como *in house validation*, a qual possui passos que devem ser executados dentro de um único laboratório nas etapas preliminares do desenvolvimento de um método, para avaliar a performance de um método já definido ou ainda para avaliar a viabilidade de um estudo colaborativo para uma validação completa (IUPAC, 2002; RIBANI *et al*, 2004).

A validação deve ainda considerar o objetivo do processo, a fim de identificar quais os parâmetros devem ser avaliados em cada situação. Para ambos os órgãos reguladores do Brasil a classificação é feita em quatro tipos de ensaios, conforme apresentado no Quadro 4.

Quadro 4: Classificação dos tipos de ensaio de validação.

Classe	ANVISA	INMETRO
1	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas	Qualitativo
2	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas	Determinação de elementos em maior teor*
3	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)	Análise de elementos menores ou traços**
4	Testes de identificação	Propriedades físicas

* Concentração maior entre 1 e 100 %

** Concentração menor entre 0,01 e 1 % e traços inferior a 0,01 %

Fonte: ANVISA (2003, p. 3); INMETRO (2011, p. 4).

De acordo com o Quadro 4, a determinação de pesticidas em nível traço está classificada como classe 1 para a ANVISA e classe 3 para o INMETRO. Para ANVISA (2003), os parâmetros de validação estipulados são especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Para o INMETRO (2011), os testes a serem procedidos são basicamente os mesmos, mas ganham outros nomes como seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, recuperação ou tendência, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ANVISA, 2003; RIBANI *et al*, 2004; INMETRO, 2011). Já no exterior, o ICH é o mais semelhante às diretrizes brasileiras, sendo que só não é necessária a apresentação da robustez. Para a OECD (2007), além da robustez, não é preciso demonstrar o intervalo estudado. Por fim, para o IUPAC (2002), um método desenvolvido no laboratório deve avaliar a linearidade, a precisão, a tendência (sobre a matriz) e a robustez do método (IUPAC, 2002; ICH, 2005; OECD, 2007).

A descrição dos parâmetros de validação será feita de acordo com a comparação das diretrizes brasileiras, além do determinado pelo IUPAC (2002) e pela OECD (2007).

A seletividade, também chamada de especificidade, é a capacidade que o método tem em promover a análise quantitativa precisa dos analitos na presença de compostos interferentes da matriz, como outros

ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Sua avaliação em análises quantitativas pode ser feita confrontando a matriz isenta e a matriz adicionada com a substância de interesse (IUPAC, 2002; ANVISA, 2003; OECD, 2007; INMETRO, 2011). Para a ANVISA e o INMETRO, quando não for possível avaliar os interferentes, se pode analisar as amostras através de um segundo procedimento bem caracterizado, seja ele outra técnica, outro método ou outras variações das condições instrumentais. ANVISA (2003) ainda lembra a importância de demonstrar a pureza de picos em análises cromatográficas, utilizando detectores, como arranjo de diodos ou espectrômetro de massa, que contribuem para a confirmação da determinação inequívoca do analito em avaliação.

O parâmetro linearidade enfatiza a qualidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudada dentro de uma faixa de aplicação, ou seja, até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa linear dinâmica do instrumento (ANVISA, 2003; OECD, 2007; INMETRO, 2011). Para o IUPAC (2002), devem ser avaliadas, no mínimo, seis concentrações de calibração. Além disso, as concentrações usadas na calibração devem ser uniformemente espaçadas em uma faixa de concentração de interesse que abranja de 0-150 % das concentrações prováveis de serem encontradas nas amostras. Segundo a ANVISA (2003) e o INMETRO (2011), a recomendação é que a linearidade seja obtida por, no mínimo, cinco concentrações diferentes, utilizando padronização externa ou interna.

Na padronização interna, além das concentrações diferentes, também usadas na calibração externa, é adicionada às soluções-padrão uma mesma quantidade de um padrão interno, um composto quimicamente semelhante ao analito, mas não existente na solução em estudo. Para ambas as calibrações a avaliação da linearidade deve ser procedida no mínimo em duplicata e, preferencialmente, em triplicata, em ordem randômica. A expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito na amostra real é obtida pela relação entre área ou altura do pico, e a massa ou concentração do analito. Caso não haja relação linear na calibração, uma transformação matemática deve ser procedida, a fim de permitir a linearidade do método e o cálculo de concentrações reais pela expressão matemática (ANVISA, 2003; OECD, 2007; INMETRO, 2011). Para a ANVISA (2003), este cálculo é possível quando o coeficiente de correlação (r) da curva linear for superior a 0,99. Uma outra avaliação proposta pelo IUPAC (2002), feita através de medidas de linearidade, é a determinação do efeito de matriz feita pela

comparação da calibração externa com a adição de padrão sobre a matriz nas mesmas concentrações e na mesma faixa da calibração externa.

Através do procedimento de avaliação da linearidade, é possível também determinar a faixa linear dinâmica ou a faixa de trabalho, que é definida como a faixa de concentrações do analito, no qual o método pode ser aplicado com exatidão, precisão e linearidade adequadas. Sua determinação é apresentada de forma diferenciada nos guias de validação. Para a ANVISA (2003), a faixa é estipulada a partir de uma concentração teórica teste e extrapolada para 80 a 120 % deste valor. Para o IUPAC (2002), a avaliação também é feita a partir de um ou dois níveis de concentração e extrapolados para a escala de concentração teste. Para o INMETRO (2011), são necessárias três etapas com sete replicatas cada. Na primeira, escolhe-se uma faixa preliminar para ser testada, sendo que a concentração mais esperada para a amostra deve, se possível, estar no meio da faixa de trabalho. Na segunda avaliação, define-se a faixa linear e confirma-se a linearidade do método. Por fim, na terceira etapa, determina-se o limite de quantificação do método como o menor valor da faixa de trabalho.

Outro parâmetro que avalia a qualidade dos resultados analíticos é a precisão. De acordo com a ANVISA (2003) e o IUPAC (2002), ela avalia a proximidade entre medidas independentes obtidas através de amostragem múltipla de uma mesma amostra e analisadas sobre condições estipuladas. Seu valor é obtido pelo Desvio Padrão Relativo (RSD), também conhecido como Coeficiente de Variação (CV) através da relação entre o Desvio Padrão (SD) e a Concentração Média determinada (CM) apresentado pela Equação 1.

$$CV (\%) = \frac{DP}{CM} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

A estimativa da precisão pode ser avaliada através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo esta última aplicada a validações completas que se utilizam de ensaios interlaboratoriais, não sendo aplicadas neste estudo. A repetibilidade, também chamada de precisão intracorrída, consiste na concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com mesmo laboratório, instrumento, analista, procedimento de medição e sob as mesmas condições de trabalho. As análises podem ser procedidas utilizando padrões, materiais de referência ou brancos das amostras em

no mínimo três concentrações analisadas em triplicata ou seis determinações da concentração teste. Já a precisão intermediária, ou precisão intercorridas, avalia, de acordo com a ISO 5725-3, a variabilidade dos resultados em um laboratório através da concordância dos resultados analisados em mesmo laboratório e método, mas definindo uma ou mais variações como equipamentos, dias e/ou analistas diferentes. Para a ANVISA os valores de coeficiente de variação em ambas avaliações de precisão não devem superar 5 % (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Além da precisão, a proximidade dos valores pode ser avaliada também em relação à um valor verdadeiro. Esta avaliação é conceituada como exatidão de um método analítico e pode ser feita por ensaios de recuperação que determinam a porcentagem de um analito em um material de referência certificado (CRM) ou ainda pela recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada sobre a matriz isenta ou sobre a matriz completa (IUPAC, 2002; ANVISA, 2003; OECD, 2007; INMETRO, 2011). Segundo a ANVISA (2003), ela deve ser verificada logo após o estabelecimento da linearidade, faixa linear e seletividade, utilizando um mínimo de três níveis de concentração analisados em triplicata. Seu valor é obtido através da medida de recuperação que avalia a porcentagem da razão entre a concentração média experimental pela concentração teórica, conforme apresentado na Equação 2.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

Para o INMETRO (2011) e a IUPAC (2002), a avaliação da recuperação pode ser feita de forma ligeiramente diferente, conforme apresentado na Equação 3.

$$\text{Recuperação} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

De acordo com a Equação 3 do INMETRO, C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada, e C_3 é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Outro parâmetro incluído na análise de desempenho analítico, requerido principalmente para análises em baixos níveis de analito, refere-se ao LOD, que é indicado pela ANVISA (2003) e OECD (2007) como menor concentração do analito presente em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou distinguida com confiança do zero.

Apesar de parecer uma medida simples, a avaliação do limite de detecção está associada a alguns problemas e divergências científicas quanto a avaliações de precisão próximo à concentração zero, a necessidade de um grande número de análises para minimizar variações aleatórias e tendências por fatores operacionais. Além disso, há uma variedade de definições diferentes, bem como o questionamento da hipótese de normalidade em baixas concentrações. Para tanto, a IUPAC sugere que se admita uma definição simplificada que sirva de guia para o método implementado (IUPAC, 2002).

Conforme a ANVISA (2003), o limite de detecção deve ser determinado através de soluções de concentrações decrescentes, sobre a matriz em estudo, próximas ao suposto limite de quantificação e analisadas em triplicata. Para métodos cromatográficos, esta estimativa é determinada por três vezes a relação do Desvio Padrão Amostral (DP_a) do intercepto pela Inclinação (IC) da regressão linear da curva de calibração, conforme apresentado na Equação 4.

$$LOD = \frac{3 \cdot DP_a}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

De acordo com o INMETRO (2011), a estimativa do limite de detecção deve ser feita experimentalmente, sobre a matriz, com aplicação de parâmetros estatísticos. Para a instituição, um número elevado de replicatas de uma mesma concentração pode superestimar o valor do limite. Assim, é proposto que se utilize um mínimo de sete replicatas de uma mesma adição de analito sobre a matriz, com concentração próximo ao mínimo detectável. Consequentemente, o número de graus de liberdade para o cálculo estatístico será de seis e o valor de *t* da distribuição de *Student* 3,143 para uma análise com 95 % de confiança. Finalmente, o limite de detecção será determinado por 3,143 vezes o DP_a, conforme a Equação 5.

$$LOD = 3,143.DP_a \quad \text{Equação 5}$$

De forma semelhante ao LOD, o Limite de Quantificação (LOQ), também expressa a menor concentração do analito de interesse, porém neste caso se admite que essa concentração possa determinada inequivocamente com precisão e exatidão aceitáveis. Para o INMETRO, este parâmetro pode também ser denominado Limite de Determinação (ANVISA, 2003; OECD, 2007; INMETRO 2011). De acordo com ANVISA (2003), o limite pode ser estabelecido pela avaliação de soluções com concentrações decrescentes até a menor determinável, de acordo com a Equação 6.

$$LOQ = \frac{10.DP_a}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Além do apresentado na Equação 6, o guia da ANVISA sugere ainda a determinação deste limite através da avaliação do ruído da linha base apresentada nas análises, e considera-se o LOQ como dez vezes esse valor. A IUPAC (2002) chama a atenção para divergências também no cálculo deste limite e conclui que é preferível avaliar a incerteza da medição e comparar com os critérios estabelecidos para o método.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para determinação de Fenitrotion por HPLC-DAD em alvos artificiais de algodão utilizados para amostragem na avaliação da contaminação da contaminação no interior de uma cabine de trator agrícola após pulverização em pomares de maçã.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia por HPLC-DAD para a determinação de fenitrotion em nível traço;
- Otimizar condições cromatográficas de temperatura da coluna cromatográfica, composição e fluxo da fase móvel para determinação de fenitrotion em alvos artificiais de algodão, através de planejamento fatorial;
- Desenvolver extração ultrassônica proposta pela SW-846 da USEPA à alvos artificiais de algodão;
- Avaliar parâmetros de mérito da metodologia cromatográfica desenvolvida;
- Quantificar e analisar os teores das amostras reais em alvos artificiais de algodão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Alvos artificiais de algodão

O alvo artificial de algodão utilizado neste trabalho foi o absorvente íntimo Carefree[®] com perfume. Este material foi obtido em comércio local pelos agrônomos responsáveis pela coleta do material em campo e foram fixados no trator agrícola e no EPI (novo) do operador do trator, conforme descrição posterior, para proceder o teste em campo. Para conduzir os ensaios de avaliação da matriz, foram adquiridos em comércio local o mesmo material usado em campo.

4.1.2 Reagentes e soluções

Os solventes e reagentes que foram utilizados neste trabalho são de alto grau de pureza, assegurando a não contaminação das amostras e melhorando, assim, a qualidade e a confiabilidade dos resultados.

O padrão analítico de fenitrothion PESTANAL[®] (Sigma Aldrich, Brasil) utilizado na calibração analítica do método foi pesado e diluído em ACN até a concentração da solução estoque (1000 mg L⁻¹) e armazenado em recipientes de vidro âmbar, devidamente vedados com batoques de polietileno e acondicionados em refrigerador à temperatura de -16 °C.

4.2 MÉTODOS

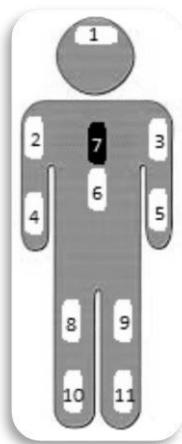
4.2.1 Experimento de exposição

Para simular a exposição dos operadores de tratores durante a aplicação do fenitrothion no cultivo de maçãs, os alvos artificiais de algodão foram fixados no interior de uma cabine de trator e nas roupas utilizadas pelos operadores como equipamento de proteção individual (BAUER, 2015).

O EPI utilizado no experimento era novo, confeccionado especificamente para a aplicação de pesticidas e tinha o selo de qualidade (Quepia). A roupa consistia de calças, casaco de mangas compridas, botas de borrachas, protetor de cabeça e pescoço, capacete, luvas de nitrila e um respirador. O operador do trator já estava dentro da cabine, devidamente protegido e com os alvos artificiais fixados quando o pesticida foi

adicionado ao tanque de pulverização. Os alvos foram distribuídos no operador do trator da seguinte forma: um sobre o capuz do EPI, um em cada braço, um em cada antebraço, um no peito, um nas costas, um em cada coxa e um em cada panturrilha, totalizando 11 coletores, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4: Esquema de distribuição dos alvos artificiais de algodão sobre o EPI do aplicador de pesticidas. Apenas o amostrador número 7 está localizado nas costas do aplicador, os demais estão na parte frontal do EPI.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

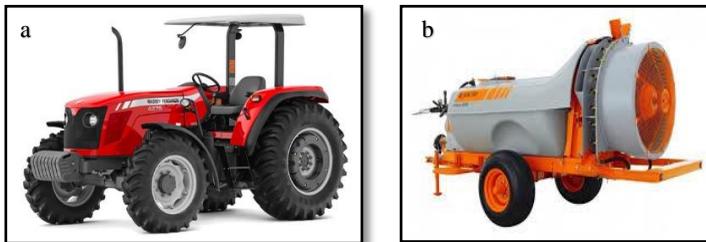
Além dos amostradores fixados no EPI do aplicador conforme apresentado na Figura 4, no interior do trator foram fixados alvos artificiais nas janelas superiores e inferiores de ambos os lados da cabine, nas janelas traseiras superior e inferior (orifícios de ventilação) e dois no chão próximos aos pés do operador do trator. A aplicação do produto durou cerca de 40 minutos e, no final do processo, os alvos foram identificados, recolhidos e armazenados em recipientes de plástico (BAUER, 2015).

A calda agrotóxica utilizada no estudo foi preparada com concentração de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de Sumithion 500 EC (BAUER, 2015). De acordo com as informações do produto (ADAPAR), o Sumithion 500 EC é um inseticida organofosforado que forma uma emulsão em água, com fenitrotion como ingrediente ativo a uma concentração de 500 g.L^{-1} . Este pesticida atua sobre as pragas através do contato direto, da ingestão e da penetração no solo e é utilizado na pulverização aérea ou terrestre para o

controle de pragas como a mariposa-oriental (*Grapholita molesta*) e a mosca-do-fruto sul-americana (*Anastrepha fraterculus*) em pomares de maçã. As doses recomendadas pelo fabricante são, respectivamente, 150 mL e 200 mL de produto comercial em 100 L de água na presença das pragas, com um máximo de duas pulverizações no mesmo ciclo de cultura.

O trator utilizado na experiência foi um Massey Ferguson (modelo 4275 com tração 4x2), equipado com cabine fabricada por uma empresa local. Na parte traseira do trator foi acoplado um pulverizador Jacto (modelo Arbus 1500), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5: a) Trator agrícola Massey Ferguson modelo 4275; b) Pulverizador Jacto modelo Arbus 1500



Fonte: a) Massey Ferguson (2017, p. --); b) Jacto (2017, p. --)

O trator da Figura 5a foi conduzido na primeira marcha a 540 rpm, mantendo velocidade de $5,8 \text{ km h}^{-1}$. O pulverizador (Figura 5b) equipado com bicos de pulverização de cerâmica, novos, de jato modelo cone oco promoveu uma pulverização com fluxo de calda de $1,25 \text{ L min}^{-1}$ e volume de 900 L ha^{-1} (BAUER, 2015).

Os experimentos de campo foram realizados em dois dias consecutivos, na região centro-oeste de Santa Catarina. De acordo com dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), não houve precipitação registrada para o período do teste, mas a umidade relativa foi alta (média de 72 %). A faixa de temperatura foi de mínima de $13,6 \text{ }^\circ\text{C}$ e máxima de $26,6 \text{ }^\circ\text{C}$, com velocidades de vento intermédias de 4 m.s^{-1} .

Após o teste os alvos artificiais foram coletados, numerados com caneta de tinta permanente azul e foram acondicionados dentro de sacos plásticos de polietileno e conduzidos ao Laboratório de Análises de Resíduos (LARES) da Universidade Federal de Santa Catarina (USFC), onde foram acondicionados em refrigerador à temperatura de $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ até análise.

4.2.2 Limpeza de vidraria

Para o procedimento de extração e determinação do pesticida fenitrotion em alvos artificiais de algodão, foram utilizadas vidrarias limpas, conforme descrito no compêndio SW-846 da USEPA. As vidrarias previamente limpas por procedimento interno eram mergulhadas em solução de peróxido de hidrogênio, para destruição de vestígios de compostos orgânicos, seguidas de lavagem com água quente, para remover quaisquer contaminante mais profundo. Na sequência, as mesmas foram lavadas com água ultrapura (18,0 MΩcm), obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore® - Bedford, MA, USA), para remover íons metálicos presentes na água de lavagem e, por fim, com etanol grau HPLC – Espectroscópico (Vetec, Brasil), para remover vestígios finais de materiais orgânicos e a água. Antes do uso, as vidrarias foram higienizadas com ACN grau UV/HPLC – Espectroscópico (Vetec, Brasil), utilizada como solvente de trabalho.

4.2.3 Otimização do preparo de amostra

O fenitrotion foi extraído em sistema de banho ultrassônico Callmex, modelo UltraCleaner 1400. Foi desenvolvido um método, baseado no procedimento da USEPA 3550C, para os alvos artificiais de algodão. Os solventes metanol e ACN foram escolhidos de acordo com estudos prévios e proposta do método USEPA, e testados para avaliar a eficiência de extração. Para iniciar o procedimento cada amostra (aproximadamente 2 g) foi dobrada ao meio, para minimizar a exposição do adesivo, cortada em pequenos pedaços de cerca de 1 cm² e colocados em um béquer de 50 mL. Após a adição de 30 mL de ACN, o frasco foi transferido para o banho de ultrassom e mantido durante 10 minutos. O extrato foi filtrado através de um papel Whatman n^o 41, para um balão de fundo redondo de 100 mL, e a extração foi repetida por mais duas vezes, com o mesmo volume de ACN. Os extratos foram todos coletados no mesmo balão de fundo redondo de 250 mL e, ao final da terceira etapa, o béquer utilizado para extração foi lavado com 10 mL de ACN, para retirar os resíduos do extrato e também foi adicionado no balão de fundo redondo. O extrato total foi concentrado em evaporador rotativo Fisaton, transferido para um frasco de vidro de 1,5 mL e totalmente seco, sob fluxo de gás nitrogênio comprimido, pureza > 90 % (White Martins, Brasil). Finalmente, o extrato foi redissolvido em 1 mL de ACN e 20 µL foram injetados no sistema de HPLC-DAD.

4.2.4 Estratégia de otimização das condições de análise

A definição das condições analíticas para a determinação de fenitroion foi verificada com auxílio de um planejamento experimental. Foram avaliadas: fase móvel, consistindo de água:ACN nas proporções de 35:65 (1) e 65:35 (2), temperatura da coluna de 30 °C e 40 °C, e taxa de fluxo de 1,0 e 1,5 mL min⁻¹. Para este estudo, foi utilizado um delineamento experimental do tipo 2³, composto por três fatores e avaliado em dois níveis cada fator, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores reais e codificados para fatores de 2³ planejamento fatorial

Níveis	Fase móvel (Água:ACN)	Temp. Coluna (°C)	Fluxo (mL min ⁻¹)
Baixo	1 (-1)	30 (-1)	1.0 (-1)
Alto	2 (+1)	40 (+1)	1.5 (+1)

Fonte: Elaborada pela autora (2016)

O delineamento experimental apresentado na Tabela 1 gerou oito experimentos com todas as correlações possíveis das variáveis, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores reais para experimentos do 2³ projeto fatorial

Experimentos	Fase móvel (Água:ACN)	Temp. Coluna (°C)	Fluxo (mL min ⁻¹)
1	1	30	1,0
2	2	30	1,0
3	1	40	1,0
4	2	40	1,0
5	1	30	1,5
6	2	30	1,5
7	1	40	1,5
8	2	40	1,5

Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Este planejamento foi aplicado para obtenção das respostas de máximo para sensibilidade do analito, com avaliação conjunta do menor tempo de eluição.

4.2.5 Determinação analítica – adaptado do Método USEPA 8321b

A análise de pesticidas foi realizada em um HPLC-DAD, modelo 1260 Infinity da Agilent Technologies, equipado com bomba quaternária, modelo G1311B e injetor manual, modelo G1328C com loop de 20 μ L e pressão máxima de 600 bar. A separação cromatográfica ocorreu numa coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Agilent (150 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m) a 40 °C. A eluição em gradiente foi realizada com diferentes razões de mistura dos solventes água (A) e ACN (B) (% A:% B v:v) e um fluxo constante de 1,0 mL/min. A eluição iniciou com a mistura de solventes numa proporção de 50:50 durante os primeiros 8 minutos. Entre 8-12 minutos, a proporção utilizada foi de 35:65, seguida de 5:95. Após 20 minutos, a mistura solvente foi retornada para a razão inicial. Para o detector equipado com arranjo de diodos, modelo G4212B foram selecionados três comprimentos de onda de trabalho (200, 236 e 270 nm), de acordo com a absorção máxima do analito fenitrotion e possíveis interferências. O software utilizado para a coleta e processamento dos dados foi o OpenLAB Chromatography Data System (CDS) ChemStation Edition, modelo M8301AA.

4.2.6 Parâmetros analíticos de mérito

A avaliação da qualidade do método de extração empregado foi baseada em procedimentos padronizados de classificação de resíduos como a norma NBR 10004 e o método de extração USEPA 3550C.

Para o método cromatográfico foi realizado um desenho experimental previamente descrito para obtenção das melhores condições de determinação do fenitrotion na matriz artificial de algodão por HPLC-DAD. O método final foi avaliado com base em alguns parâmetros descritos pela ANVISA (2003) e pelo INMETRO (2011), como seletividade, linearidade, precisão, LOD, LOQ e exatidão.

→Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi estudada pela comparação da matriz isenta do analito de interesse e pela matriz enriquecida com o mesmo. Além disso, como forma de confirmação, o método por HPLC-DAD permitiu a detecção do fenitrotion em diferentes comprimentos de onda, bem como a avaliação da pureza do pico do analito.

→ Linearidade e faixa linear dinâmica

A estimativa da linearidade foi procedida por calibração externa de cinco níveis de concentração, como determinado pela ANVISA (2003) e pelo INMETRO (2011), e avaliada pelo coeficiente de correlação (r) da regressão linear. Além disso, foi executada uma calibração com adição de padrão sobre a matriz, de forma semelhante à calibração externa, conforme descrito pelo IUPAC (2002), para avaliação do efeito de matriz, através da comparação dos coeficientes de correlação de ambas as curvas.

A faixa linear dinâmica, conforme sugerido pelo INMETRO (2011), foi estabelecida inicialmente pelo teste da faixa preliminar e, na sequência, pela avaliação da linearidade do método, conforme descrito anteriormente.

→ Precisão intermediária

A precisão foi avaliada em nível intermediário e expressa pelo CV, sendo analisada pela triplicata de três níveis de concentração, em soluções padrão e amostras idênticas. Os ensaios foram efetuados sob a mesma metodologia, porém em dias diferentes e por analistas diferentes.

→ Exatidão

Estudada através de ensaios de recuperação, utilizando adição de padrão sobre a matriz isenta do analito. O ensaio utilizou fortificação da matriz em três réplicas autênticas de três níveis distintos e avaliou as porcentagens de substância recuperada, após a extração e determinação analítica. O cálculo foi procedido de acordo com o recomendado pela ANVISA (2003), como apresentado na Equação 2.

→ Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A determinação dos valores de LOD e LOQ é um assunto bastante controverso dentre os guias dos órgãos reguladores nacionais e internacionais. Assumiu-se, para este trabalho, a avaliação proposta pela ANVISA (2003), que consiste na análise em triplicata de três níveis de concentração próximos ao suposto LOQ, com estimativa da razão do desvio padrão do intercepto pela inclinação da regressão linear. Este valor é multiplicado por três para a obtenção do LOD, e por dez para a obtenção do LOQ.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

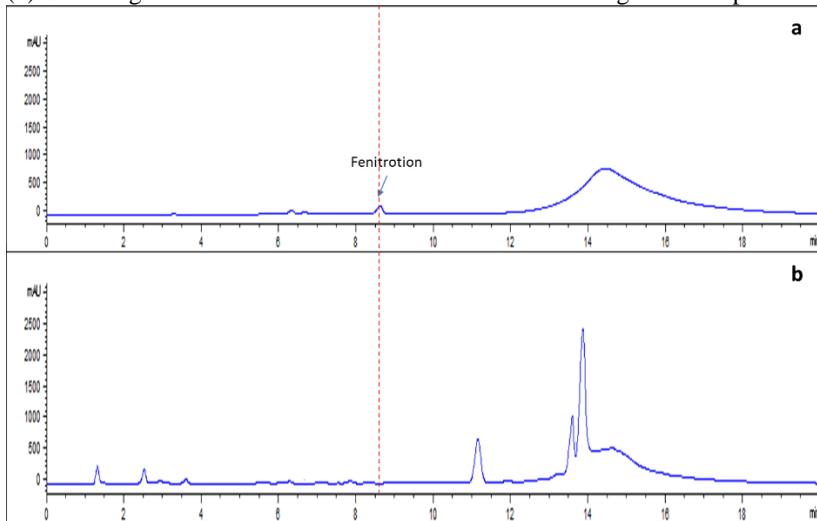
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

A extração do fenitrotion nos alvos artificiais de algodão foi procedida de acordo com o método oficial USEPA 3550C de extração por ultrassom. Foram selecionados, para avaliação da eficiência de extração, solventes miscíveis com água, compatíveis com o sistema de HPLC-DAD, conforme descrito no método oficial USEPA 8321B. Além disso, a escolha dos solventes de extração foi baseada em métodos previamente descritos para extrações de luvas de algodão (KEEBLE; CORREL; EHRICH, 1993; TSAKIRAKIS, 2014), devido à similaridade entre essas matrizes e os alvos de algodão utilizados neste estudo e também dois métodos descritos para a extração ultrassônica de fenitrotion em outras matrizes (MAYER-HELM, 2009; GONZÁLEZ-CURBELO, 2013).

Dentre os solventes em avaliação, o metanol e a ACN apresentam toxicidade inferior aos demais solventes orgânicos, e foram testados para a extração do pesticida organofosforado. Verificou-se que o metanol produziu um extrato bruto com maior teor e variedade de interferentes, dificultando a análise posterior. Além disso, o metanol foi menos eficiente como solvente extrator em comparação com a acetonitrila, apresentando resultados dos ensaios de recuperação de fenitrotion da matriz abaixo de 90 %. A ACN apresentou maior eficiência de extração nos testes de recuperação de fenitrotion e facilitou o processo analítico, devido à sua compatibilidade com o eluente utilizado na cromatografia líquida para a determinação do agrotóxico.

Apesar da alta eficiência da acetonitrila na extração do fenitrotion, muitos problemas de interferência foram encontrados, devido a escolha da matriz usada no experimento de exposição simulada ao fenitrotion. As matrizes foram adquiridas em comércio local pela equipe que efetuou as análises em campo. A primeira dificuldade encontrada foi a alta complexidade apresentada pela matriz, conforme mostra a Figura 6b, se comparada com a análise do padrão, Figura 6a.

Figura 6 - Cromatogramas comparativos: (a) Cromatograma do padrão em ACN. (b) Cromatograma do branco da matriz de alvô artificial de algodão com perfume.

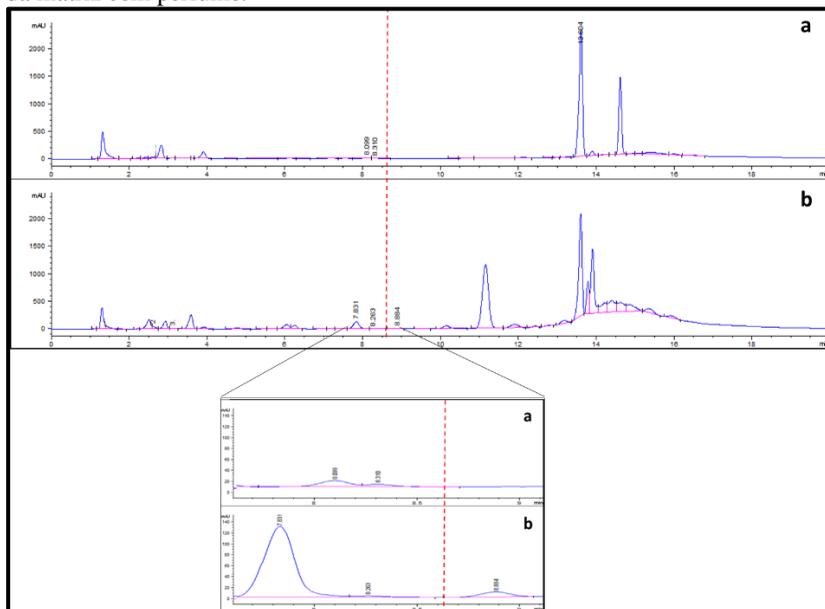


Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Como é possível visualizar na Figura 6, a matriz apresenta vários picos de compostos interferentes em diferentes intensidades, o que dificulta a determinação do analito na matriz, já que este elui em 8,621 minutos e, se presente nas amostras reais, estará em concentrações traço, enquanto que as substâncias intrínsecas da matriz estarão em quantidades muito superiores.

Outra fonte de contaminação foi sua aquisição com perfume em sua composição, gerando mais picos de substâncias, como apresentado no cromatograma da Figura 7, que podem interferir na determinação do fenitroton ao longo do cromatograma.

Figura 7 - Cromatogramas comparativos dos alvos artificiais de algodão: (a) Cromatograma do branco da matriz sem perfume. (b) Cromatograma do branco da matriz com perfume.

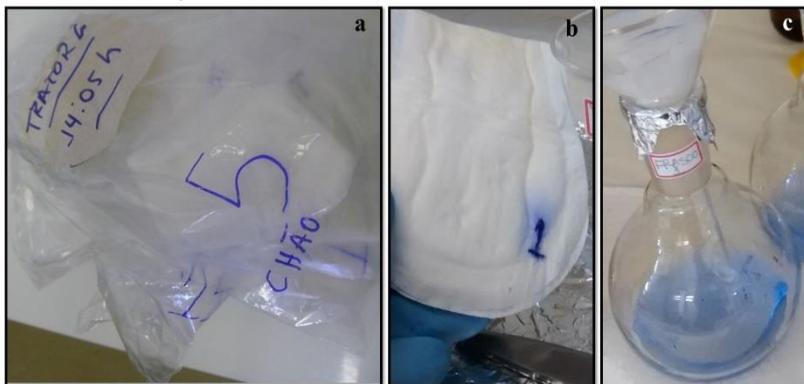


Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Os cromatogramas da Figura 7 confirmam que a presença de perfume colabora para a geração de mais picos interferentes, aumentando a fonte de erros durante a análise cromatográfica.

Algumas outras possibilidades de interferentes analíticos podem ser atribuídas ao uso de embalagens plásticas para armazenar as amostras logo após o experimento em campo, conforme apresentado na Figura 8a, pois seu uso pode ser uma fonte importante de contaminação. Segundo o Capítulo 4 do compêndio SW-846, a utilização de materiais plásticos pode promover a contaminação das amostras por ésteres de ftalatos e outros hidrocarbonetos presentes nessas embalagens. Além disso, os absorventes íntimos utilizados como alvos artificiais de algodão produziram extratos com um tom esbranquiçado, devido a dissolução da cola presente na parte inferior da matriz. Por fim, as amostras foram identificadas numericamente com caneta de tinta permanente azul, como mostra a Figura 8b, produzindo extratos brutos de coloração azulada, Figura 8c.

Figura 8 - Fotos reais das amostras: (a) Amostras de absorvente como chegaram ao laboratório (b) Identificação numérica dos alvos feita com caneta de tinta permanente azul. (c) Extrato bruto das amostras com coloração azul devido a tinta da identificação numérica.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Na impossibilidade de separar a parte de algodão da cola presente no absorvente, os problemas apresentados na Figura 8 foi minimizados efetuando a dobragem de cada amostra de absorvente ao meio, antes da extração, para diminuir a exposição do adesivo. Uma etapa de limpeza com filtração em papel Whatman nº 41 foi utilizada para remover impurezas maiores sem comprometer a determinação do fenitrotion em quantidade traço. Além disso, entre os procedimentos de extração, foram procedidas limpezas de vidraria com procedimentos oficiais, para minimizar a permanência de contaminantes entre a primeira, segunda e terceira etapas de extração por ultrassom.

5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS DO HPLC-DAD

Visto as dificuldades encontradas no processo de extração, devido à complexidade da matriz usada no estudo, o método por HPLC foi cuidadosamente desenvolvido, particularmente nos casos em que não há referências disponíveis na literatura para aplicação na matriz estudada, e que a análise será destinada à concentrações analíticas em nível traço. A análise do branco da matriz, efetuada no processo de extração, forneceu dados qualitativos essenciais nos estágios iniciais do desenvolvimento da metodologia de análise. Uma avaliação cuidadosa dos parâmetros

cromatográficos foi necessária para otimizar a separação e reduzir a interferência a partir dos sinais da matriz.

A avaliação de alguns parâmetros do método foi realizada para identificar as melhores condições para o analito. Um dos parâmetros-chave na análise por HPLC é a solubilidade dos analitos na fase móvel. A seleção de um eluente apropriado, bem como as condições de análise, promovem uma melhoria na interação entre o analito e a fase estacionária, contribuindo principalmente para a formação de picos mais simétricos, e, por consequência, para a resolução analítica, visto a complexidade da matriz em análise.

Neste sentido, foi aplicado um desenho experimental para selecionar a melhor composição da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel. Os parâmetros foram escolhidos com base em sugestões apresentadas pelo método USEPA, além de outros estudos descritos na literatura (MAYER-HELM, 2009; FU, 2009). Os solventes orgânicos misturados com água formam um bom eluente para utilização como fase móvel na determinação de fenitrothion e outros pesticidas organofosforados através de HPLC-UV. Os ensaios cromatográficos preliminares com misturas de acetonitrila e água mostraram uma boa resolução entre picos. Por isso, neste plano experimental, foram avaliadas as fases móveis consistindo de água: acetonitrila nas proporções de 35:65 (1) e 65:35 (2). A temperatura da coluna e o fluxo da fase móvel também podem afetar a resolução e o tempo de análise. A fim de minimizar o tempo de análise de um único pesticida em uma matriz complexa, avaliou-se o plano usando os maiores índices de fluxo e temperaturas de coluna relatados na literatura. Foram estudadas velocidades de fluxo de 1,0 e 1,5 mL min⁻¹ e foram testadas as temperaturas das colunas de 30 °C e 40 °C para averiguar as alterações na viscosidade e eluição da fase móvel.

Este estudo foi efetuado para estimar os níveis dos fatores para a obtenção da melhor sensibilidade e resolução do analito com seus interferentes, e foi executado através do delineamento experimental do tipo 2³, composto por três fatores, avaliados em dois níveis cada, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2, possibilitando todas as correlações possíveis das variáveis através de oito determinações analíticas feitas em duplicata. Através da Tabela 3 é possível avaliar o planejamento aplicado de acordo com o efeito causado pelos parâmetros sobre a resposta analítica, bem como o valor de erro padrão e o valor da significância de cada um dos efeitos e suas interações, descritos através do valor p.

Tabela 3 – Valores obtidos através do planejamento fatorial 2^3 para o efeito dos coeficientes, erro padrão, teste t e valor p.

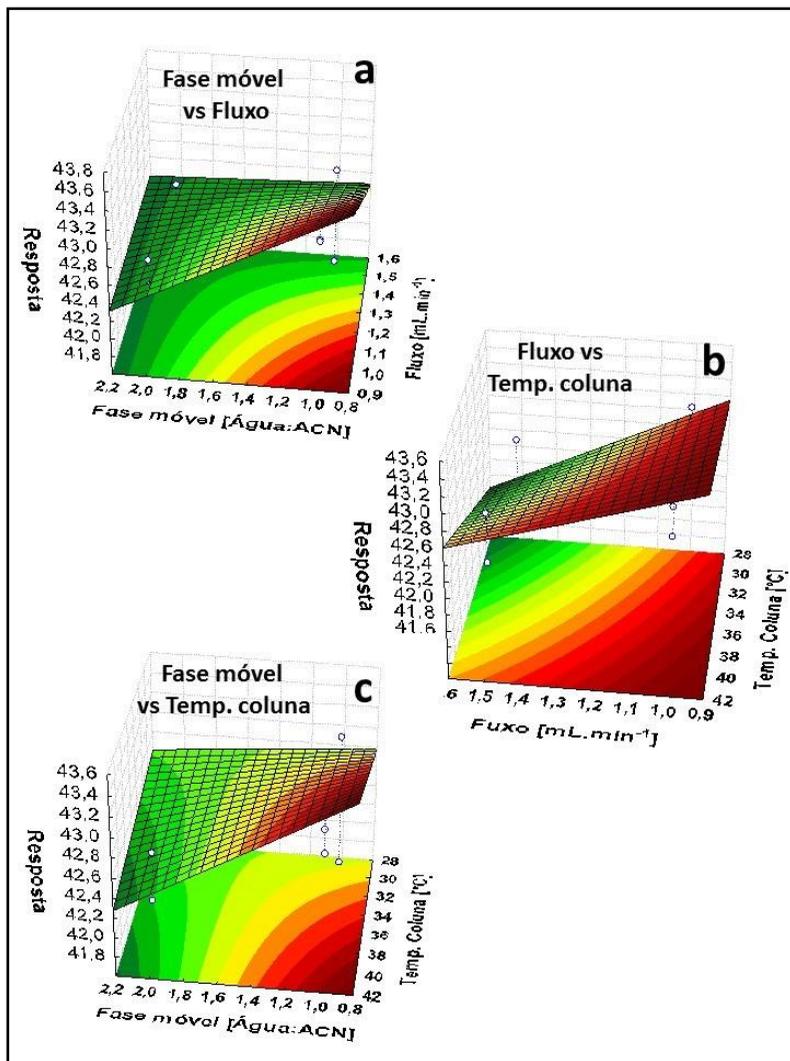
Fatores	Efeito	Erro	Teste t	Valor-p
Média/intercepto	42,55	0,2064	206,2	0,003088
1: Fase móvel	-0,2076	0,4128	-0,5028	0,03703
2: Temperatura coluna	0,2545	0,4128	0,6166	0,6482
3: Fluxo	-0,4796	0,4128	-1,1618	0,4524
1 por 2	-0,2669	0,4128	-0,6466	0,6346
1 por 3	0,2901	0,4128	0,7028	0,6100
2 por 3	0,1206	0,4128	0,2923	0,8190

Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Os valores estimados pelo planejamento fatorial apresentados na Tabela 3 demonstram que apenas a fase móvel apresenta $p < 0,05$, proporcionando um efeito significativo sobre a resposta analítica. Seu efeito possui resultado negativo, o que evidencia que uma mudança na proporção água:ACN da fase móvel 1 (35:65) para a fase móvel 2 (65:35) possui efeito negativo sobre o resultado esperado.

Os demais fatores e suas interações apresentaram valor sem efeito significativos para a resposta analítica que foi avaliada neste planejamento, mas ainda assim foram avaliados através das representações gráficas das superfícies de resposta, como ilustrado pela Figura 9, a fim de estimar visualmente as melhores condições analíticas para aplicação do método com obtenção dos melhores resultados de resolução entre o analito e os interferentes, bem como o menor tempo de análise.

Figura 9 - Superfícies de resposta para avaliação das interações no delineamento fatorial, obtidas com STATISTICA® (n = 16), com média quadrada dos resíduos 0,3407 e coeficiente de determinação 0,74878. (A) Superfície de resposta do fluxo versus fase móvel com temperatura da coluna em 40 °C; (B) Superfície de resposta do fluxo versus temperatura da coluna com fase móvel 1 com uma razão água: acetonitrila de 35:65; (C) Superfície de resposta da temperatura da coluna versus fase móvel com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

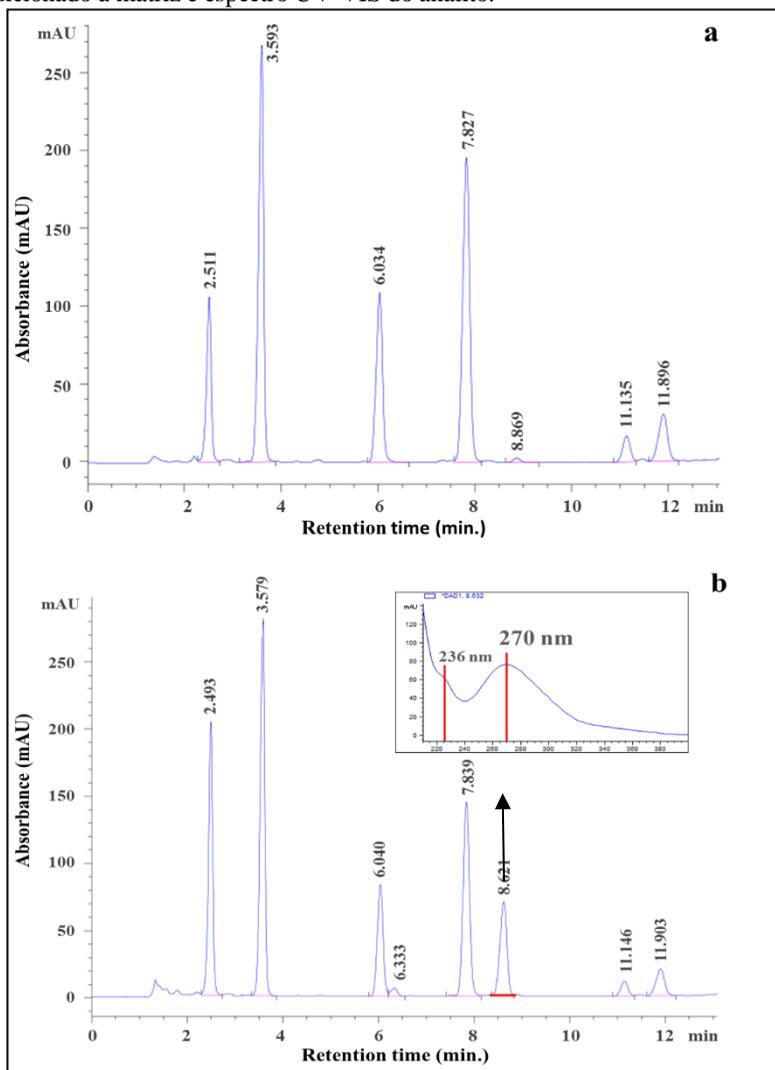


Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Com base nas superfícies de resposta para a interação dos três fatores (Figura 9), foi possível verificar as melhores condições para a determinação cromatográfica de fenitrothion em alvos artificiais de algodão. Os resultados combinados destes gráficos mostram que a melhor condição foi alcançada com a fase móvel 1 com razão de 35:65 (água:ACN), temperatura da coluna de 40 °C e taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O modelo apresentou uma média quadrada dos resíduos de 0,3407 e um coeficiente de determinação de 0,74878, o que representa que o ajuste foi adequado para explicar os dados avaliados.

Apesar da otimização da fase móvel na proporção de 35:65 (água:ACN), a eluição final foi realizada com um gradiente, a fim de diminuir o tempo total de análise, além de efetuar limpeza da coluna na própria análise. Utilizou-se, inicialmente, uma proporção de fase móvel de 50:50 por 8 minutos, de 8 a 12 minutos a eluição foi procedida com a proporção 35:65 ajustada no planejamento, com eluição do fenitrothion em 8,621 min. como mostrado no cromatograma da Figura 10. Na sequência, procedeu-se a diminuição da polaridade até a proporção de 5:95 (água:ACN) para limpeza da coluna.

Figura 10 - Cromatograma obtido aplicando o método final para a determinação de fenitroton por HPLC-DAD. a) Cromatograma para o branco da matriz; b) cromatograma para 10,33 mg L⁻¹ de solução padrão de fenitroton (8,621 min) adicionado à matriz e espectro UV-VIS do analito.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Os cromatogramas da Figura 10 apresentam a comparação entre o branco da matriz (Figura 10a) e a matriz adicionada de 10,33 mg.L⁻¹ de

fenitrothion (Figura 10b). O método cromatográfico final mostrou que o planejamento fatorial contribuiu para uma boa sensibilidade e resolução entre os sinais do fenitrothion e dos compostos da matriz. Com as condições cromatográficas estabelecidas, foi realizada a avaliação do método proposto de acordo com os critérios de validação analítica.

5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

A avaliação do método foi estudada de acordo com os parâmetros de validação descritos pela ANVISA e pelo INMETRO sobre o método cromatográfico final. Foram analisados seletividade, linearidade, precisão, recuperação, e os limites de detecção e quantificação.

A seletividade pode ser verificada na Figura 10, que mostra uma comparação entre o branco (um novo absorvente higiênico com alguns microlitros de ACN, Figura 10a) e um novo absorvente higiênico adicionado de um volume de solução padrão do analito (Figura 10b). Foi possível confirmar, através do teste de pureza de picos, disponível pelo DAD, que no mesmo tempo de retenção não existe coeluição de compostos interferentes que prejudiquem sua determinação inequívoca.

A linearidade do método foi aferida através da calibração externa em solução e também com a calibração externa sobre a matriz. Na calibração em solução foram avaliados cinco níveis de concentração em triplicata, na faixa de 0,29 a 2,59 mg kg⁻¹. Para esta calibração obteve-se uma inclinação de 26,42 e um intercepto de -0,6544. A calibração sobre a matriz foi efetuada também em triplicata na faixa de 0,50 a 2,01 mg kg⁻¹. Para esta calibração obteve-se uma inclinação de 119,1 e um intercepto de -10,42.

A comparação entre as curvas de calibração em solução e sobre a matriz revelou diferenças nos coeficientes de inclinação. Isto significa que há uma mudança significativa nas determinações de fenitrothion realizadas em solução e sobre a matriz. Devido esta diferença, a técnica de calibração sobre a matriz foi escolhida para a determinação do fenitrothion nas amostras. O coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9886 e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9943, indicando que o intervalo estudado possui linearidade adequada.

A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes e por analistas diferentes, sob a determinação da triplicata de três níveis de concentração sobre a matriz. Os valores de desvio padrão relativo obtidos ficaram entre 0,17 e 3,41 %, dentro do limite de 5 % estabelecido pela ANVISA (2003), demonstrando que o método é preciso para aplicação

por analistas diferentes e em diferentes dias, quando aplicado no mesmo equipamento e sob as mesmas condições de análise.

Para avaliar a exatidão do método foram aplicados testes de recuperação do analito adicionado sobre a matriz isenta do composto. Estes testes foram realizados em triplicata para três níveis de concentração e foram calculados por cem vezes a razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica. Os resultados variaram entre 95 e 104 %, indicando que a matriz é adequada para o estudo com fenitroton, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (2003).

Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados de acordo com o proposto pela ANVISA (2003), com a análise em triplicata de três níveis de concentração próximos ao suposto LOQ. Estes valores foram calculados a partir da razão entre o desvio padrão da intercepção com o eixo y e a inclinação da curva de calibração. A razão foi então multiplicada por três, para obtenção do LOD ($0,18 \text{ mg kg}^{-1}$) e por dez, para LOQ ($0,50 \text{ mg kg}^{-1}$).

5.4 APLICAÇÃO ANALÍTICA

Foram analisados 2 lotes de 19 amostras cada obtidas em campo durante dois dias consecutivos de aplicação do experimento de exposição, para determinação de fenitroton em alvos artificiais de algodão no interior de um trator agrícolas cabinado, durante pulverização real em pomares de maçã na região centro-oeste de Santa Catarina.

As amostras foram afixadas em todo o vestuário utilizado como equipamento de proteção individual e no interior da cabine do trator agrícola, antes da pulverização do agrotóxico, conforme descrição no item 1.4.2.1. A análise quantitativa indicou que não foi detectado fenitroton nas amostras acima do limite de detecção do método ($0,18 \text{ mg kg}^{-1}$).

6 CONCLUSÕES

O fenitrothion foi utilizado como marcador para avaliar o nível de exposição de agricultores em tratores agrícolas com cabines seladas, durante a aplicação real de agrotóxico no campo.

A etapa de extração ultrassônica através do método USEPA 3550c foi adequada, apesar de algumas dificuldades relacionadas aos alvos artificiais de algodão utilizados pelos agrônomos como método de amostragem no estudo.

Ainda assim, a aplicação de um planejamento experimental baseado em parâmetros propostos pela metodologia USEPA 8321b estabeleceu boas condições de eluição para a determinação da concentração de analito na matriz, sem comprometer a determinação em quantidades traço. A resposta máxima foi obtida utilizando a composição em fase móvel de 35:65 (água: acetonitrila), temperatura da coluna em 40 °C e taxa de fluxo de fase móvel de 1,0 mL min⁻¹.

O método final foi avaliado com base em critérios de validação propostos pela ANVISA e demonstrou-se seletivo, através da comparação da matriz isenta e adicionada do composto de interesse, com verificação da pureza do pico do analito por DAD. A determinação do fenitrothion nas amostras foi efetuada a partir da adição de padrão sobre a matriz, devido efeito da matriz sobre a calibração. A calibração apresentou valores adequados de linearidade, precisão e exatidão, demonstrando a capacidade da matriz em gerar dados com confiança. O método foi capaz de detectar o fenitrothion sobre a matriz a partir de 0,18 mg kg⁻¹ e foi possível quantificar o analito nos alvos artificiais a partir da concentração de 0,50 mg kg⁻¹.

As análises das amostras de alvos artificiais de algodão utilizados no experimento de exposição simulada de fenitrothion no campo não apresentaram valores de fenitrothion acima do limite de detecção do método. Através desse resultado pode-se chegar a duas possíveis conclusões. Ou a cabine selada do trator agrícola realmente minimizou a exposição do operador aos pesticidas, minimizando a exposição do operador do trator agrícola e consequentemente a adsorção do pesticida nos alvos artificiais de algodão, ou esta metodologia de amostragem usada pela equipe agrônoma não possibilitou a determinação eficaz do fenitrothion no interior da cabine do trator.

7 PERSPECTIVAS

O estudo tem como possibilidade de avaliação futura a aplicação da dosimetria passiva como metodologia de amostragem para avaliação do nível de exposição de operadores de trator agrícola em materiais absorventes que contenham menores níveis de interferentes, como o próprio fato de proteção de algodão, utilizado como EPI ou o papel mata borrão, apresentados em outros estudos na literatura.

Além disso, a determinação de níveis traço de diferentes pesticidas podem ser avaliadas através de outros métodos de extração que sejam exaustivos, somados a análises em outros sistemas cromatográficos que atinjam limites de detecção ainda menores.

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA PETROLÍFERA

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda no uso de petróleo e seus derivados vem contribuindo para o crescimento do setor, e conseqüentemente a expansão da geração de efluentes e resíduos sólidos industriais. Segundo Braga *et al* (2002) dentre os principais tipos de resíduos gerados pela indústria petrolífera estão, água e areia captadas junto com o petróleo, e contaminadas por óleo cru, resíduos de perfuração como cascalhos e fluidos, borras de fundo de tanque, solos contaminados por derrames de óleo, e uma série de outros resíduos associados a prática de captação, transporte e armazenamento de petróleo.

Além disso, outros setores da indústria petrolífera, como a fabricação de biodiesel, geram outras formas de resíduos, não diretamente ligadas ao petróleo. Este é o caso da terra diatomácea utilizadas como meio filtrante durante os processos de fabricação e purificação do biodiesel e que se torna resíduo passível de caracterização antes da disposição final (DIAS, 2008; TEMOTEO *et al*, 2016).

A diversidade de substâncias potencialmente tóxicas presentes nesses resíduos requer o acompanhamento por profissionais na busca de caracterização e de soluções para o material a ser descartado, minimizando os prejuízos ambientais e sociais. De acordo com Francisco e França (2007) a incineração é recomendada para resíduos perigosos que não podem ser reciclados, reduzidos ou dispostos em aterro industrial de forma segura. Suas principais vantagens são a rápida destruição da matéria a temperaturas superiores a 1000 °C, sob condições controladas, e a diminuição de volume, o que descarta a necessidade de transporte e disposição final do resíduo restante. O processo, porém, é bastante oneroso e de difícil controle na emissão de poluentes atmosféricos, sendo necessária a determinação adequada dos contaminantes existentes no resíduo para sua aplicação segura.

2 REVISÃO

2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS: CONCEITOS

Conforme a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004), os resíduos sólidos são definidos como aqueles que se encontram tanto no estado sólido quanto no semissólido, podendo ter procedência industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Além disso ela completa:

Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis em face à melhor tecnologia disponível (ABNT, 2004, p. 1).

De acordo com Braga *et al* (2002) a indústria petrolífera apresenta suas atividades em diversas etapas desde a extração do produto bruto até seu beneficiamento em diversos produtos. Cada uma destas etapas é responsável pela geração de efluentes e resíduos sólidos que devem ser tratados e/ou descartados. Esses resíduos caracterizam uma fonte de contaminação significativa devido à falta de legislação específica, além de outros fatores importantes como a quantidade de resíduos gerada, a insuficiência de tecnologias eficazes para o tratamento e/ou disposição final de baixo custo (FRANCISCO; FRANÇA, 2007).

Para Santos (2013) a perfuração nas unidades marítimas é a etapa que gera a maior quantidade de resíduos, especialmente os caracterizados como perigosos. Dentre os principais resíduos gerados durante todo o processo de captação podemos destacar, a água produzida e contaminada com óleo cru, os resíduos de perfuração como fluidos e detritos de solo (argilas, areias e cascalhos), além de borras de fundo de tanque de tratamento de água (BRAGA, 2002; FRANCISCO; FRANÇA, 2007; SANTOS, 2013).

Nas bases de apoio terrestre são onde ocorre o desembarque de todos os resíduos gerados nas unidades marítimas e nas embarcações de apoio, e onde são armazenados os produtos químicos utilizados durante a perfuração. Além disso, essas bases servem de suporte para as operações

de limpeza dos compartimentos das embarcações utilizadas na condução destes produtos e dos resíduos gerados. Após o desembarque esses resíduos devem ser pesados e encaminhados para classificação para posterior tratamento e/ou disposição final (SANTOS, 2013).

De acordo com Santos (2013) esta classificação deve ser procedida conforme estabelecido na padronização dos programas ambientais do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através do Projeto de Controle da Poluição estabelecido pela Nota atualizada CGPEG/DILIC/IBAMA N° 01/11. Esta Nota Técnica estabelece a necessidade de avaliação quantitativa dos resíduos gerados, sejam eles armazenados ou destinados à tratamento ou descarte, bem como as formas de tratamento e rejeite aplicados, e as metas para minimização da geração e disposição eficiente dos resíduos, principalmente durante a perfuração.

Estas diretrizes devem ter como resultado final um relatório específico elaborado em períodos pré-definidos de acordo com a atividade executada. Os dados apresentados neste relatório classificam os resíduos mais frequentes quanto, a unidade geradora (marítima, embarcações ou bases de apoio), a nomenclatura preestabelecida pelo órgão ambiental conforme tipo de resíduo, apresentados na Quadro 5, Classificação segundo estabelecido pela Norma Técnica NBR 10004/2004 e, por fim, quantificação em kg de cada tipo de resíduo gerado (SANTOS, 2013).

Quadro 5 - Resumo dos tipos de resíduos em função do padrão estabelecido pela Norma Técnica NBR 10004/2004.

Tipologia do resíduo	Classificação NBR 10004/2004
Resíduos oleosos	Classe I (Resíduos perigosos)
Resíduos contaminados	
Tambor contaminado	
Lâmpada fluorescente	
Pilhas e baterias	
Resíduo infectocontagioso	
Cartucho de impressão	
Fluido de perfuração	
Recicláveis (papel, plástico, madeira, vidro, metal não contaminado, lata de alumínio, óleo de cozinha e Tetra Pak) Não recicláveis: Lixo comum não reciclável	

Fonte: Adaptado de Santos (2013, p. 3).

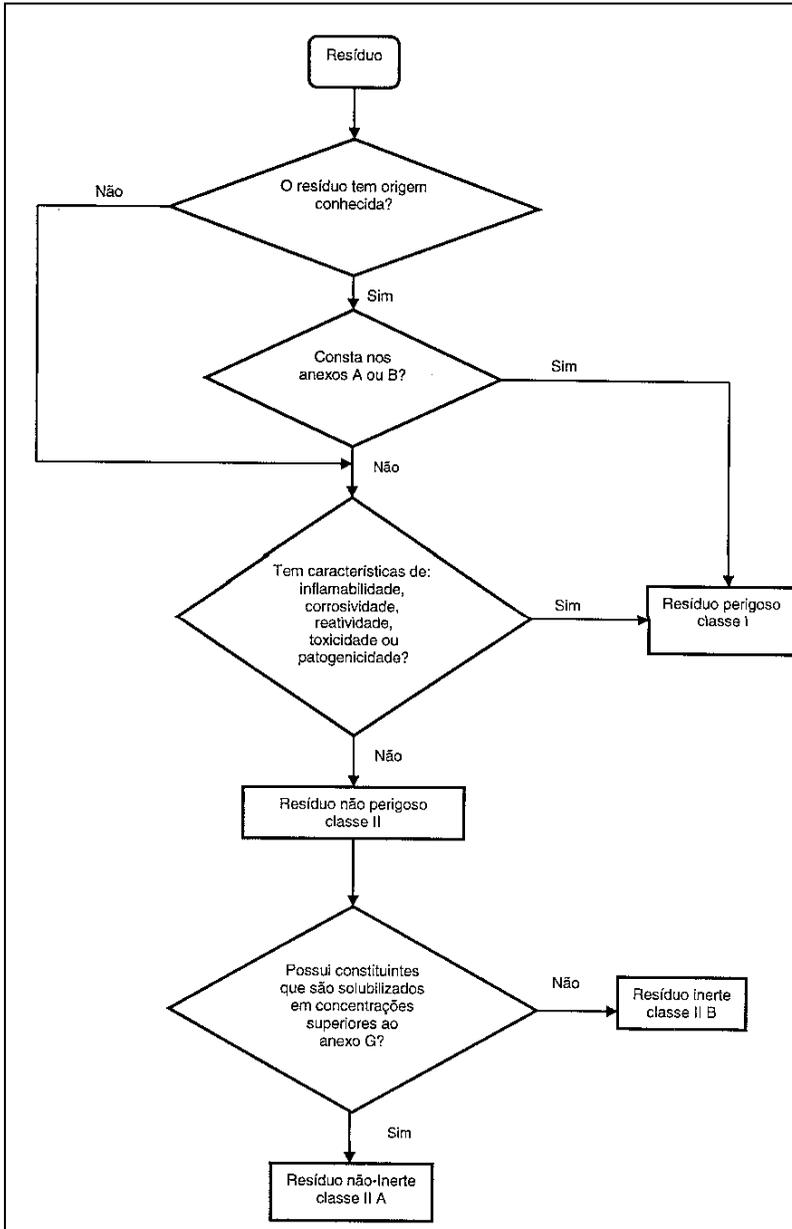
A classificação dos resíduos dispostos no Quadro 5 devem ser caracterizados de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Norma Brasileira NBR 10004/2004 que padroniza, em nível nacional, a classificação de resíduos sólidos.

2.2 CLASSIFICAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

A ABNT, através da Norma Brasileira NBR 10004 válida a partir de 30 de novembro de 2004, traz subsídios para gerenciamento de resíduos sólidos. Esta Norma teve como base o Código de Regulamentos Federais (CFR) – *Title 40 – Protection of Environmental – Part 260-265 – Hazardous Waste Management* que deu início a USEPA em 1970, além da USEPA-SW 846 - *Test methods for evaluating Solid Waste – Physical/chemical methods*, e outras normas vigentes na época (ABNT, 2004).

A classificação de resíduos sólidos abrange a identificação do processo que lhes deu origem e suas características, sendo que seus elementos são comparados com listas de resíduos e substâncias e seus respectivos impactos à saúde e ao meio ambiente. A classificação é feita quanto ao risco à saúde pública e ao meio ambiente, conforme Figura 11 (ABNT, 2004).

Figura 11 - Caracterização e classificação de resíduos sólidos segundo a NBR 10004/2004.



Fonte: ABNT (2004, p. vi).

De acordo com a ABNT (2004), os resíduos sólidos são classificados em dois grupos: perigosos e não perigosos, e este último em não inerte e inerte, isto é, resíduos classe I – Perigosos; resíduos classe II – Não perigosos; resíduos classe II A – Não inertes; e resíduos classe II B – Inertes. Para tanto, as análises químicas são realizadas usando os métodos USEPA – SW 846, última edição e os métodos nacionais equivalentes elaborados pela ABNT, quando disponíveis.

Além da classificação, a NBR 10004:2004 estabelece também os códigos para identificação dos resíduos de acordo com as suas características. Assim, os códigos D005 a D052 que dizem respeito aos resíduos perigosos quanto à sua toxicidade (avaliado pelo ensaio de lixiviação – ABNT NBR 10005), conforme mostra a Tabela 4, a qual traz os limites máximos de alguns pesticidas nesses extratos lixiviados.

Tabela 4 – Limite máximo de concentração de pesticidas no extrato obtido por ensaio de lixiviação segundo a NBR 10004/2004.

Parâmetro	Código de identificação	Limite máximo no lixiviado (mg L ⁻¹)	CAS – <i>Chemical Abstract Substance</i>
Aldrin + dieldrin	D014	0,003	309-00-2; 60-57-1
DDT (p,p’DDT+p,p’DDD+p,p’DDE)	D015	0,02	57-74-9
Endrin	D018	0,06	72-20-8
Lindano (γ -HCH)	D022	0,2	58-89-9

Fonte: Adaptado de ABNT (2004, p. 73).

Já os códigos P e U, descritos na mesma norma, são dados às substâncias que conferem periculosidade aos resíduos. Como exemplo, têm-se as substâncias DDT (U061) e Lindano ou γ -HCH (U129), as quais são consideradas substâncias tóxicas; e Aldrin (P004) e Endrin (P051), consideradas substâncias agudamente tóxicas (ABNT, 2004).

Outros órgãos brasileiros que prescrevem normas para avaliação da toxicidade de resíduos sólidos em geral são o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Quando a CETESB desenvolveu o projeto para estabelecimento dos valores orientadores para o Estado de São Paulo, teve como base então uma lista de valores genéricos orientadores para solos e águas subterrâneas desenvolvida pela Holanda e aceita mundialmente, como a conhecida Lista Holandesa. Já para o

CONAMA, a interpretação dos valores encontrados baseou-se em metodologias que atendiam às especificações descritas em normas reconhecidas internacionalmente, que incluíam a edição mais recente dos métodos publicados pela USEPA; pela ISO e pelo Instituto Alemão de Normalização (DIN) (BRASIL, 2009; CASARINI, 2001).

As referidas instituições montaram suas resoluções e relatórios, respectivamente, acerca de valores orientadores, que são concentrações de substâncias químicas que fornecem indicações quanto à qualidade e alterações do solo, conforme Tabela 5 (BRASIL, 2009; CASARINI, 2001). Tal estimativa é bastante importante para avaliação da qualidade do solo em locais de escavação, onde o solo retirado deve ser caracterizado para proceder a disposição final correta.

Tabela 5 - Lista de valores orientadores para a qualidade do solo (mg kg⁻¹)

Normas/ Substâncias		Aldrin	Endrin	DDT	Lindano
Solo CONAMA	Referência	na*	na*	na*	na*
	Prevenção	0,015	0,001	0,010	0,001
	Investigação industrial	0,03	2,5	5	1,5
Solo CETESB	Referência	0,00125	0,00375	0,0025	0,00125
	Alerta	-	-	-	-
	Intervenção industrial	5	5	5	5

*na - não se aplica para substâncias orgânicas.

Fonte: Adaptado de Brasil (2009, p. 14) e Casarini (2001, p. 23-24).

O CONAMA define que o **valor de referência** é a concentração de determinada substância que define a qualidade natural do solo, sendo determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de amostras de diversos tipos de solos. O **valor de prevenção** é a concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais. O **valor de investigação industrial** é a concentração de determinada substância no solo acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizado (BRASIL, 2009).

Para a CETESB, o **valor de referência** indica o limite de qualidade para um solo considerado limpo a ser utilizado em ações de prevenção da poluição do solo e no controle de áreas contaminadas. O **valor de alerta** indica uma possibilidade de alteração da qualidade natural dos solos, sendo utilizado em caráter preventivo. Já o **valor de intervenção industrial** indica o limite de contaminação do solo acima do qual existe risco potencial à saúde humana, e será utilizado em caráter corretivo (CASARINI, 2001).

O CONAMA estabelece ainda as classes de qualidade do solo, de acordo com as concentrações de substâncias químicas: Classe 1 - solos com concentrações menores ou iguais ao valor de referência; Classe 2 - solos com concentrações de pelo menos uma substância química maior do que o valor de referência e menor ou igual ao valor de prevenção; Classe 3 - solos com concentrações de pelo menos uma substância química maior que o valor de prevenção e menor ou igual ao valor de investigação; e Classe 4 - solos com concentrações de pelo menos uma substância maior que o valor de investigação (BRASIL, 2009).

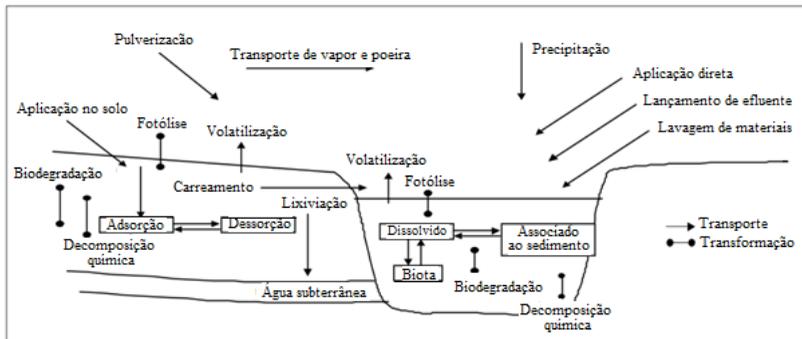
Neste contexto, cabe ressaltar que quando manejado, o solo precisa passar por um programa de tratamento antes de ser feita sua devida disposição final na natureza, garantindo assim a não lixiviação de contaminantes no solo em concentrações inaceitáveis, bem como de águas subterrâneas e cadeia alimentar, além da incineração inadequada emitindo à atmosfera poluentes; entre outros. O solo precisa primeiramente ser analisado através de métodos adequados, a fim de fornecer dados necessários para a implantação de Unidade de Tratamento de Solos com Resíduos Perigosos (HWLT), conforme observado pela USEPA (1986) e Francisco e França (2007).

2.3 PESTICIDAS: AÇÃO E CONTAMINAÇÃO DO MEIO AMBIENTE

Quando em contato com o meio ambiente os pesticidas têm como finalidade alterar a composição da flora ou fauna, preservando-a da ação danosa de seres nocivos. O comportamento destes compostos é considerado muito complexo devido o deslocamento físico o meio ambiente e a transformação química e biológica destes compostos nos diferentes ambientes e organismos, haja visto que esses processos modificam suas estruturas e propriedades (Campos 1995).

Devido ao comportamento complexo dos pesticidas, ocorrem vários fenômenos simultâneos quando estes entram em contato com o meio ambiente, conforme apresenta a Figura 12.

Figura 12 - Principais fenômenos envolvidos no comportamento dos pesticidas no meio ambiente



Fonte: Sanches *et al* (2003, p. 57).

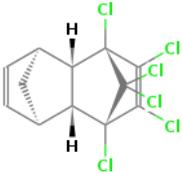
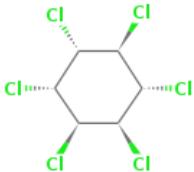
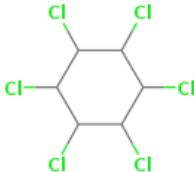
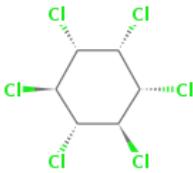
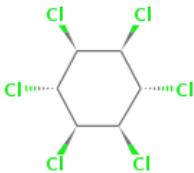
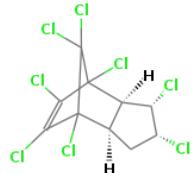
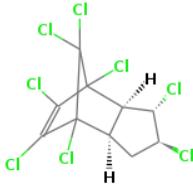
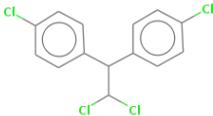
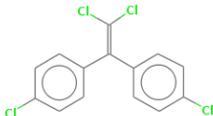
Quando aplicados no solo, os pesticidas podem ser carreados para os ambientes aquáticos superficiais ou degradados por meios químicos, fotólise ou ação de microrganismos, conforme Figura 12. Algumas moléculas com baixa taxa de degradação podem permanecer no ambiente adsorvidas no solo. Parte delas podem ser dessorvidas e sofrer lixiviação pela água da chuva e atingir os lençóis subterrâneos. Nos ambientes aquáticos, podem estar dissolvidos na água, adsorvido ao sedimento ou interagindo físico-quimicamente com a biota marinha. Ao serem volatilizados dos ambientes aquáticos ou terrestres ou ainda pulverizados em cultivos os pesticidas podem ser transportados por muitos quilômetros, atingindo áreas muito distantes da região de aplicação (SANCHES *et al*, 2003; BRASIL, 2013).

Dentre os vários tipos de pesticidas Sanches (2003) enfatiza os organoclorados (OC). Eles surgiram comercialmente na década de 40 e foram muito utilizados na agricultura e no combate ao mosquito da malária, principalmente na Segunda Guerra Mundial, onde o DDT era usado para prevenir as epidemias de tifo. Esses pesticidas causam danos ao meio ambiente e aos seres vivos pela grande estabilidade física e química e por permanecer no meio ambiente por longo tempo. Conforme Flores *et al* (2004), os pesticidas clorados podem penetrar no organismo através da pele, do aparelho digestivo e respiratório, sendo que nos seres humanos estes atuam basicamente no sistema nervoso central e no sistema

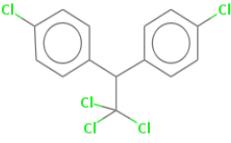
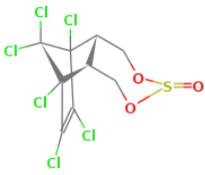
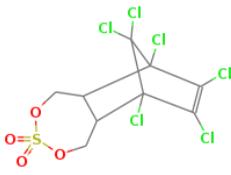
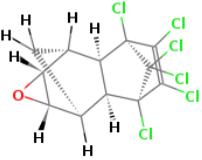
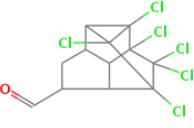
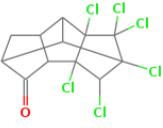
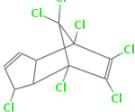
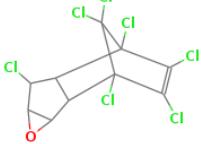
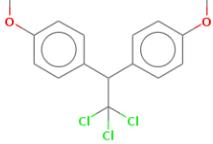
de defesa do organismo, causando lesões hepáticas e renais. Alguns produtos desse grupo lesam o cérebro, outros, os músculos do coração, a medula óssea, o córtex da suprarrenal, o DNA, entre outros.

No Quadro 6 são apresentadas algumas das estruturas químicas dos pesticidas investigados em resíduos sólidos conforme recomendação da Norma Técnica NBR 10004/2004, além de alguns outros que também foram analisados neste estudo.

Quadro 6 - Fórmulas estruturais dos pesticidas

 <p>Aldrin 309-00-2</p>	 <p>α-BCH 319-84-6</p>	 <p>β-BCH 319-85-7</p>
 <p>δ-BCH 319-86-8</p>	 <p>γ-BHC 58-89-9</p>	 <p>Cis-clordano 5103-71-9</p>
 <p>Trans-clordano 5103-74-2</p>	 <p>pp-DDD 72-54-8</p>	 <p>pp-DDE 72-55-9</p>

Quadro 6 - Continuação

 <p>pp-DDT 50-29-3</p>	 <p>Endosulfan II Beta 19670-15-6</p>	 <p>Endosulfan sulfato 1031-07-8</p>
 <p>Endrin 72-20-8</p>	 <p>Endrin aldeído 7421-93-4</p>	 <p>Endrin Cetona 53494-70-5</p>
 <p>Heptacloro 76-44-8</p>	 <p>Heptacloro epóxido 1024-57-3</p>	 <p>Metoxicloro 72-43-5</p>

Fonte: Adaptado de NIST (2016, p. --).

Devido a toxicidade e permanência no meio ambiente vários destes compostos já foram proibidos em diferentes países. Os Estados Unidos, através da USEPA, vetaram o uso do DDT, aldrin, heptacloro e clordano, na década de 70. Portugal proibiu aldrin, clordano, dieldrin, DDT, BHC, entre outros, em 1988. Já o Brasil proibiu a comercialização, distribuição e uso desses produtos em 1985 (FLORES, 2004).

Esta proibição em diversos países devido a toxicidade desses compostos reforça a necessidade de técnicas eficazes para a determinação destes compostos em diferentes matrizes ambientais a fim de gerar dados representativos sobre a matriz em estudo quanto aos riscos à saúde da população, os danos aos ecossistemas, a toxicidade das substâncias químicas presentes, os processos industriais geradores, entre outros fatores (BRANDÃO *et al*, 2011).

2.4 METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM RESÍDUOS SÓLIDOS

A determinação de pesticidas em solo e em outros resíduos sólidos depende diretamente da composição do analito, bem como de suas propriedades físico-químicas, modificando suas interações com os analitos, tornando-os mais ou menos disponíveis à determinação.

Fatoki e Awofolu (2003) conduziram a análise de água e solo através do sistema separação e detecção GC-ECD. Foram feitos três procedimentos de extração. Para a extração líquido-líquido foram preparadas soluções-padrão por dissolução dos pesticidas em hexano (1000 mg L^{-1}). O método MAE (Extração assistida por micro-ondas, do inglês, *Microwave Assisted Extraction*) foi procedido em amostras de sedimento secas, peneiradas e enriquecidas com as soluções padrões de OCs e extraídas por micro-ondas em hexano, diclorometano (DCM) e petróleo. Para a extração Soxhlet teve sua fortificação feita de forma semelhante ao MAE e submetida a análise cromatográfica.

No mesmo ano Richter *et al* (2003) utilizaram 200 g de solo que foram enriquecidos com 10 mg kg^{-1} de pesticidas em acetona. As amostras foram armazenadas por 60 dias em temperatura ambiente. Alíquotas de 300 mg foram extraídas via Extração por Água Subcrítica (SBWE) bombeada em fluxo de 2 mL por minuto, seguida de extração líquido-líquido com DCM e análise posterior por GC/MS.

Rodil e Popp (2006) utilizaram 200 g de solo enriquecido na faixa de 25 a $155 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada composto em acetona. O solvente foi evaporado a temperatura ambiente e homogeneizado. Alíquota de 10 g da amostra foi submetida à Extração por Água Subcrítica Pressurizada (PSWE) utilizando um extrator de solvente acelerado com uma solução água-acetonitrila (75:25, v/v) a $130 \text{ } ^\circ\text{C}$ com 100 bar de pressão. O extrato bruto final foi submetido a Extração por Sorção em Barra Magnética (SBSE), com a barra coberta por uma camada de polidimetilsiloxano (PDMS). Após a extração a barra foi seca com tecido e levada ao tubo de termo dessorção para posterior análise via CG/MS.

Já Vagi *et al* (2007) utilizaram sedimentos marinhos secos em ar, peneirados com tamanho inferior a 2 mm, homogeneizados e armazenados a temperatura ambiente até a fortificação. Esta foi procedida com a adição de 1 mL da mistura dos padrões de pesticidas em 1 g de sedimento seco. Após 24 horas o sedimento foi levado à extração ultrassônica pela aplicação do método USEPA 3550 em quatro replicatas com 10 mL de solvente. Em seguida o extrato foi centrifugado em 3500

rpm, rota-evaporado até próximo à secura e redissolvido em 1 mL de n-hexano, e em seguida, submetido a análise por GC-ECD.

Rashid *et al* (2010) utilizaram método QuEChERS (Rápido, fácil, barato, eficiente, robusto, seguro) para extração de pesticidas presentes em 5 g de solo peneirado e enriquecido. Na sequência, foram adicionados 10 mL de acetona e a suspensão foi agitada até a sua homogeneização. O solo foi seco em temperatura ambiente por 4 dias. O método QuEChERS foi executado com dois procedimentos semelhantes, sendo que um deles teve uma etapa de hidratação com 10 mL de água e o outro com 10 mL de uma solução aquosa a 1,0 M de Na₂-EDTA, ambos por 30 minutos em alíquotas de 5 g de solo. A estas alíquotas foram adicionadas 10 mL de ACN mais ácido acético (99:1, v/v) e levadas à agitação em vórtex por 30 segundos. Na sequência, foram adicionados 4 g de MgSO₄ e 1,7 g de NaAc.3H₂O. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos para posterior análise por GC/MS.

Camino-Sánchez *et al* (2011) analisaram amostras de sedimento marinho, as quais foram previamente limpas com ácido clorídrico e armazenados sob refrigeração a 4 °C. As amostras foram liofilizadas por 48 h e peneiradas a 2 mm. Alíquotas de 10 g foram extraídas em metanol via Extração por Líquido Pressurizado (PLE) a 1000 psi. O extrato bruto foi avolumado em 50 mL. Uma alíquota de 10 mL deste extrato foi adicionada a 200 mL de água deionizada e novamente extraída utilizando SBSE com agitação a 500 rpm. Após 12 horas, foram adicionados 60 g de NaCl e agitado por mais 12 horas. Por fim, a barra é lavada com água deionizada, seca em tecido e introduzida no tubo de dessorção para posterior análise via GC/MS/MS com dessorção térmica.

Rouvière *et al* (2012) também fez uso da extração dos analitos por QuEChERS utilizando o método clássico com solvente ACN e o método modificado usando DCM. Alíquotas de 5 g de solo foram enriquecidas com 1 mg kg⁻¹ e extraídas solução salina de MgSO₄, NaCl, citrato de sódio desidratado e citrato de di-sódio sesquihidratado. A mistura foi agitada vigorosamente, centrifugada e 5 mL do sobrenadante foi purificado com PSA (Amina primária-secundária) e MgSO₄ para posterior análise por GC/MS.

O Quadro 7 traz uma pequena revisão de literatura sobre pesquisas realizadas pelos autores citados, com algumas matrizes de resíduos sólidos onde foram encontradas substâncias agrotóxicas.

Quadro 7 - Metodologias de extração e análise de pesticidas em amostras ambientais .

Análito	Matriz	Técnica de extração	% Recuperação	Técnica de separação e detecção	LOD	Referência (*)
α -BCH			99,08 a 103,42			
β -BCH			86,72 a 100,2			
δ -BCH			97,04 a 103,22			
Aldrin	Água	LLE com diclorometano	81,43 a 88,57		na**	
4,4'-DDD			74,34 a 87,24			
4,4'-DDT			69,45 a 91,39			
Endrin			88,22 a 94,7			
Endosulfan I			73,32 a 84,06			
Heptacloro			86,31 a 92,27			
α -BCH			92,94 a 102,06			
β -BCH			76,9 a 90,14			
δ -BCH			88,63 a 96,31			
Aldrin			86,43 a 94,13			
4,4'-DDD		Soxhlet	75,64 a 87,98	GC-ECD		Fatoki, Awofolu, 2003
4,4'-DDT			69,59 a 81,91			
Endrin			81,57 a 93,75			
Endosulfan I			76,21 a 89,03			
Heptacloro			89,35 a 95,95			
α -BCH	Sedimentos		94,31 a 102,75		na**	
β -BCH			78,57 a 96,77			
δ -BCH			90,03 a 99,39			
Aldrin			85,94 a 98,18			
4,4'-DDD		MAE	68,42 a 90,26			
4,4'-DDT			69,29 a 100,41			
Endrin			82,99 a 98,77			
Endosulfan I			66,03 a 89,63			
Heptacloro			86,44 a 99,12			

(*) Fonte (***) não apresentou

Análito	Matriz	Técnica de extração	% Recuperação	Técnica de separação e detecção	LOD	Referência (*)
4,4'-DDT			65,8		6,0 µg/kg	
Aldrin			78,3		7,4 µg/kg	
Endrin	Solo	SBWE	96,7	GC-MS	137,1 µg/kg	Richier et al, 2003
Heptacloro			96,7		19,3 µg/kg	
Lindano			72		36,2 µg/kg	
Metoxicloro			86,7		3,2 µg/kg	
α-BCH			81,7 a 92,9		0,233 ng/g	
β-BCH			94,4 a 105,8		1,000 ng/g	
δBCH			77,2 a 83,8		2,211 ng/g	
γ-BHC			82,8 a 97,4		1,317 ng/g	
Aldrin			73,6 a 93,2		0,041 ng/g	
4,4'-DDD			84,3 a 105,9		0,322 ng/g	
4,4'-DDE			106,1 a 109,7		0,039 ng/g	
4,4'-DDT	Solo	PSWE	111,6 a 137,4	GC-MS	0,304 ng/g	Rodit, Popp, 2006
Endosulfan I		SBSE	51,5 a 68,7		1,855 ng/g	
Endosulfan II			70,4 a 85,6		3,042 ng/g	
Endrin			45,7 a 71,7		0,199 ng/g	
Endrin aldeído			58,9 a 83,9		2,563 ng/g	
Heptacloro			-23,2 a 34,2		4,775 ng/g	
Heptacloro epóxido			60,2 a 77,4		0,014 ng/g	

Análito	Matriz	Técnica de extração	% Recuperação	Técnica de separação e deteção	LOD	Referência (*)
α -BCH			103 a 120,22		0,2 ng/g	
β -BCH			89,75 a 117,67		0,2 ng/g	
δ -BCH			80,52 a 103,84		0,3 ng/g	
γ -BHC			97,26 a 123,28		0,2 ng/g	
Aldrin			100,1 a 127,42		0,1 ng/g	
4,4'-DDD			80,07 a 108,87		0,1 ng/g	
4,4'-DDE			86,49 a 108,19		0,3 ng/g	
4,4'-DDT			92,04 a 116,76		0,1 ng/g	
Endosulfan I		USE	86,16 a 107,62	GC-ECD	0,1 ng/g	Vagi et al, 2007
Endosulfan II			92,03 a 105,09		0,5 ng/g	
Endosulfan sulfato			78,71 a 111,29		0,4 ng/g	
Endrin			87 a 109,16		0,1 ng/g	
Endrin aldeído			95,41 a 120,49		0,5 ng/g	
Endrin cetona			90,99 a 114,35		0,1 ng/g	
Heptaclore epóxido			89,83 a 110,19		0,1 ng/g	
Metóxícloro			89,43 a 106,67		1,0 ng/g	
α -BCH			66 a 74		0,3 μ g/kg	
β -BCH			76 a 84		0,5 μ g/kg	
γ -BHC			64 a 84		0,3 μ g/kg	
Aldrin			70 a 88		0,1 μ g/kg	
Cis-clordano			68 a 76		0,3 μ g/kg	
Trans-clordano			65 a 77		0,3 μ g/kg	
4,4'-DDD			63 a 89	GC-MS/MS	0,3 μ g/kg	Rashid et al. 2010
4,4'-DDE			52 a 84		0,3 μ g/kg	
4,4'-DDT			58 a 92		0,3 μ g/kg	
Endosulfan I			68 a 78		0,4 μ g/kg	
Endosulfan II	Solo	QuEChERS	71 a 81		0,2 μ g/kg	
Endosulfan sulfato			84 a 90		0,3 μ g/kg	

Análito	Matriz	Técnica de extracción	% Recuperación	Técnica de separación e detección	LOD	Referencia (*)
Endrin			71 a 81		0,7 µg/kg	
Heptacloro	Solo	QuEChERS	56 a 82	GC-MS/MS	0,2 µg/kg	Rasheed et al, 2010
Heptacloro epóxido			71 a 81		0,2 µg/kg	
α-BCH			91		0,007 ng/g	
β-BCH			86		0,007 ng/g	
δ-BCH			98		0,008 ng/g	
γ-BHC			88		0,001 ng/g	
Aldrin			89		0,006 ng/g	
Cis-clordano			93		0,003 ng/g	
Trans-clordano			90		0,001 ng/g	
4,4'-DDD			94		0,002 ng/g	
4,4'-DDE			86		0,004 ng/g	
4,4'-DDT	Sedimentos marinhos	PLE + SBSSE	83	GC-MS/MS	0,002 ng/g	Camino-Sánchez et al, 2011
Endosulfan I			87		0,007 ng/g	
Endosulfan II			84		0,004 ng/g	
Endosulfan sulfato			91		0,002 ng/g	
Endrin			88		0,005 ng/g	
Endrin aldeído			72		0,008 ng/g	
Endrin cetona			83		0,003 ng/g	
Heptacloro			90		0,003 ng/g	
Heptacloro epóxido			95		0,000 ng/g	
Metoxicloro			99		0,003 ng/g	
α-BCH			76,5 a 94,9		61,8 µg/kg	
β-BCH			79,5 a 104,5		109,1 µg/kg	
δ-BCH	Solo	QuEChERS	67,8 a 106,6	GC-MS	115,4 µg/kg	Rouvière et al, 2012
γ-BHC			78,3 a 86,3		80,4 µg/kg	

(*) Fonte

Informações básicas da classificação prévia dos resíduos sólidos colaboram para que se decidam as técnicas, equipamentos e metodologias de coleta e preservação das amostras, bem como os locais e tempo de amostragem e a seleção de parâmetros a serem analisados, possibilitando construir-se um planejamento de amostragem apropriado (BRANDÃO *et al*, 2011).

A amostragem é considerada como um fator crítico em todo o processo analítico; na verdade é frequentemente o ponto mais frágil do processo e necessita de cuidado especial. A preocupação com a real influência da coleta nos resultados tem sido cada vez maior, dentre outros motivos, em consequência dos processos de acreditação dos ensaios na NBR ISO/IEC 17.025 (BRANDÃO *et al*, 2011, p. 75).

O transporte da amostra do local de coleta até o laboratório de análise deve garantir a manutenção da temperatura da amostra. A mesma deve ser avaliada no momento da chegada ao laboratório e a análise deve acontecer o mais breve possível. Porém, as amostras, com prazo de validade mais longo, devem ser armazenadas em câmara fria ou geladeira até o momento do ensaio (BRANDÃO *et al*, 2011).

Para iniciar a análise deve-se proceder a extração dos analitos presentes nas amostras, a fim de torná-los disponíveis para determinação. Esta etapa é uma das partes mais importante no processo de preparo de amostra e contabiliza cerca de dois terços do tempo total da análise dos compostos. O procedimento pode ser considerado a fonte primária de erros, sendo importante a escolha da melhor metodologia diante das características da amostra. Assim, ao longo das últimas décadas uma série de técnicas de preparo de amostras vem sendo desenvolvidas e melhoradas (RAMOS, 2012).

O compêndio SW-846 da USEPA auxilia na escolha do procedimento conforme as características da amostra estudada. O método é proposto para análises-traço (<1000 ppm), porém pode ser ajustado para aplicação em outras faixas de trabalho, com a devida avaliação do método e respectivos ajustes, principalmente no tamanho da amostra, no volume de injeção, na diluição e concentração das amostras, e na eliminação das etapas de concentração prescritas para análises-traço (USEPA, 2007a).

Diante das diferentes classes de matrizes, o capítulo 2 do SW-846 especifica algumas metodologias de extração para matrizes sólidas. Dentre elas, tem-se a extração Soxhlet (método 3540, 3541 e 3542);

extração com fluido pressurizado (método 3545); extração por fluido supercrítico (método 3560); extração por fluido supercrítico seletivo para organoclorados (método de 3562); extração por micro-ondas (método 3546); e extração por ultrassom (método 3550) (USEPA, 2007a).

A técnica convencional de extração por Soxhlet se tornou menos usual para rotina em função do consumo de grandes volumes de amostras e solventes orgânicos, do custo elevado e de difícil automação. Além disso, a técnica podem ser laboriosas no que diz respeito à formação de emulsões, condicionamento de colunas ou preparo de todo o aparato necessário para implementação da técnica (CALDAS *et al.*, 2011; RAMOS, 2012; RODIL; POPP, 2006). Outras técnicas como extração com fluido pressurizado, extração por fluido supercrítico e extração por micro-ondas requerem equipamentos específicos disponíveis em laboratório para aplicação rotineira.

Especificamente sobre o método 3550, extração por ultrassom, vale ressaltar que este é considerado rápido e aplicável nas extrações de compostos semivoláteis e não voláteis presentes em matrizes sólidas. Para uma extração mais eficiente, este método é dividido em um procedimento específico para baixas concentrações com teores individuais inferiores ou iguais a 20 mg kg^{-1} , e um método destinado a extração de compostos com concentrações individuais superiores a 20 mg kg^{-1} (USEPA, 2007a, USEPA, 2007b).

A fim de maximizar a eficiência de extração por ultrassom, é essencial que o método seja conduzido de acordo com as especificações da Agência, utilizando uma extração em triplicata com o solvente adequado. O solvente é escolhido de acordo com os analitos de interesse, sendo necessário avaliar sua eficiência de extração, particularmente essencial para analitos em concentrações inferiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta eficiência pode ser avaliada através da adição de uma solução *spiking* nos solventes teste que tenham os pesticidas aldrin e lindano na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e 4,4'-DDT e endrin na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (USEPA, 2007a, USEPA, 2007b). Alguns compostos podem necessitar um tratamento diferenciado na etapa de extração, como no caso do endrin, o qual pode sofrer decomposição em condições alcalinas, sendo necessário que sua extração seja neutra (USEPA, 2007c).

Para matrizes de resíduos industriais não sólidas, tais como águas residuais de estações de tratamento, consideradas resíduos sólidos de acordo com a NBR 10004/2004, um método que possibilita a extração de compostos semivoláteis em água é o método 3511 que descreve a extração de compostos orgânicos em água por microextração. Semelhante ao método de extração líquido-líquido, a proposta deste método é a uma

extração líquida em microescala, minimizando o tamanho da amostra e o consumo de solventes e resíduos de análise gerados (USEPA, 2002).

O compêndio USEPA abrange também a escolha das técnicas de separação de analitos semivoláteis por cromatografia gasosa (geralmente por coluna capilar), e não voláteis por cromatografia líquida de alta eficiência (geralmente por mecanismo de partição). Assim, a norma SW-846 traz uma seleção de métodos para determinação de analitos orgânicos, sendo que para pesticidas organoclorados como aldrin, 4,4'-DDT e endrin, têm-se os métodos 8081 (GC-ECD), 8085 (GC-AED) e 8270 (GC/MS).

A determinação por GC/MS, método 8270D, é citada como técnica confirmatória e aplicável à análise de compostos orgânicos semivoláteis neutros, ácidos ou básicos, sem derivatização, como os pesticidas presentes em diferentes matrizes como os solos ou resíduos sólidos. Na determinação pelo modo SIM (Monitoramento de Íon Seleccionado) utilizam-se fragmentos de íons para identificação dos analitos detectados espectrometricamente, conforme descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Fragmentos de íons e limites de quantificação.

ANALITO	FRAGMENTOS DE ÍONS* (<i>m/z</i>)	
	Primários	Secundários
4,4'-DDT	235	165, 237
Aldrin	66	220, 263
Captana	79	77, 117, 119, 149
Endrin	263	81, 82
Metil paration	109	79, 93, 125, 263

* Dados representativos para uma coluna analítica tipo DB-5

Fonte: Adaptado de USEPA (2007e, p. 32-43).

A detecção por espectrômetro de massa no modo SIM é aceitável para aplicações que necessitem limites de quantificação inferiores à faixa de espectro de massa por impacto de elétrons. A identificação dos analitos dispostos na Tabela 6 é feita pela comparação de seu espectro de massa com o espectro de impacto de elétrons do padrão, obtido pela Biblioteca EPA/NIST de acordo com os fragmentos de íons. Já a quantificação é obtida pela comparação do maior íon relativo (pico base) de um padrão interno usado para a curva de calibração, sendo o íon primário usado para a quantificação e o íon secundário para a confirmação do composto (USEPA, 2007c).

As condições analíticas escolhidas para as metodologias devem ter seu desempenho evidenciado para os compostos de interesse, sendo possível, se necessário, modificar algumas condições analíticas, a fim de otimizar o processo de separação dos mesmos. Essas otimizações promovem mudanças no tempo de retenção dos analitos durante a separação, sendo necessária a avaliação dos parâmetros analíticos, tais como a resolução entre os padrões e resposta ao detector, de forma a avaliar sua sensibilidade, precisão e exatidão. Antes de iniciar a aplicação do método às amostras, deve-se avaliar a faixa de recuperação obtida para a matriz estudada, demonstrando a sensibilidade do método para os analitos avaliados. (USEPA, 2003).

2.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

O processo de validação analítica consiste de uma avaliação do método analítico, a fim de que se certifique a qualidade e a confiabilidade dos dados obtidos, conforme descrito com maior ênfase no Capítulo 1.

Os parâmetros analisados neste capítulo, forma também embasados nas regulações estabelecidas pelos órgãos brasileiros, ANVISA (Resolução 899/2003) e INMETRO (DOQ-CGCRE-008/2011) e serão aplicados para os parâmetros seletividade, linearidade e faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de metodologias de preparo de amostras e análise de pesticidas de acordo com a Norma Brasileira (NBR 10004/2004) para classificação de resíduos sólidos provenientes da indústria petrolífera a fim de esclarecer sua composição para disposição final dos rejeitos, por parte da indústria, de forma segura ao meio ambiente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método por GC/MS proposto pela SW-846 da USEPA no método 8270D para a determinação de pesticidas segundo a NBR 10004/2004;
- Desenvolver metodologia de microextração líquida proposta pela SW-846 da USEPA no método 3511 para amostras residuais líquidas;
- Desenvolver metodologia de extração por ultrassom proposta pela SW-846 da USEPA no método 3550C para amostras residuais sólidas;
- Aplicar metodologia cromatográfica à extratos de terra diatomáceas obtidos por extração ultrassônica e de águas residuais obtidos por microextração líquida;
- Avaliar parâmetros de mérito da metodologia cromatográfica para análise de extratos de amostras líquidas de águas residuais e sólidas de terra diatomácea;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes, padrões e soluções

Os solventes e reagentes que foram utilizados neste trabalho possuem alto grau de pureza, assegurando a não contaminação das amostras e melhorando assim a qualidade e confiabilidade dos resultados.

O padrão analítico ERS_013, foi adquirido da Sigma Aldrich, contendo os analitos aldrin, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, γ -HCH, cis-clordano, trans-clordano, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, dieldrin, endosulfan I (α), endosulfan (β), endosulfan sulfato, endrin, endrin aldeído, endrin cetona, heptacloro, heptacloro-2,3-exo-epóxido e metoxicloro, na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dissolvidos em hexano:tolueno (1:1, v/v).

A solução padrão estoque utilizada na calibração analítica do método foi preparada com hexano 95%, grau HPLC/Spectro (Tedia, Brasil) e armazenados em recipientes de vidro âmbar, devidamente vedados com batoques de polietileno e acondicionados em refrigerador à temperatura de -4 °C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Limpeza de vidraria

O procedimento utilizado para limpeza da vidraria está de acordo com o proposto no capítulo 4 do SW-846, conforme descrito no primeiro capítulo deste trabalho.

4.2.2 Amostras

A indústria da exploração e beneficiamento do petróleo gera uma diversidade de tipos de resíduos. A fim de contemplar dois tipos distintos de matrizes foram escolhidos modelos de amostras líquidas e sólidas como possíveis exemplos de resíduos industriais do setor petrolífero.

As águas residuais de sistemas de lagoa de estabilização foram utilizadas como modelo de calibração de amostras líquidas, enquanto que resíduos de terra diatomáceas, utilizados como material filtrante na fabricação e purificação do biodiesel, foram utilizados como modelo de calibração de amostras sólidas.

Todas as amostras foram cedidas pela Petrobras, em frascos de vidro ou embalagens plásticas e mantidas sob refrigeração a 4 °C até a análise.

4.2.3 Construção das curvas de calibração

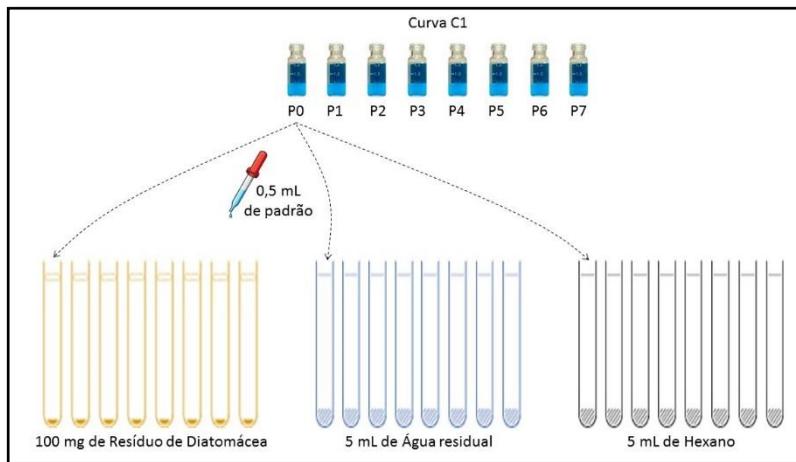
Devido a aquisição de padrão analítico com a mistura de padrões de pesticidas em concentração fixa de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi necessária a construção de curvas de calibração em diferentes faixas lineares para adequação às faixas de estudo requeridas pela Norma Brasileira NBR 10004/2004. Para isso, foram construídas duas curvas de calibração identificadas como C1, com sete pontos na faixa de trabalho de 0,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação dos analitos aldrin, heptacloro e heptacloro hepóxido, e C2, com sete pontos na faixa de trabalho de 10 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para avaliação dos analitos cis-clordano, trans-clordano, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT e endrin.

4.2.4 Fortificação de amostras

Os ensaios de fortificação foram efetuados em amostras de água residual e resíduos de diatomáceas e comparados com a fortificação sobre o solvente hexano. Essas fortificações foram efetuadas de forma semelhante sobre o hexano, a água residual, os resíduos de diatomáceas, sendo que nestes foram descartados folhas, galhos e pedras antes do início do procedimento de fortificação.

Para cada série de extrações foram pesados aproximadamente 100 mg de diatomáceas em um conjunto de dezesseis tubos de vidro de 15 mL e 5,0 mL de hexano ou água residual em outros dois conjuntos de dezesseis tubos de vidro de 15 mL. A cada um dos frascos de cada conjunto foram adicionados 0,5 mL da mistura de padrão analítico. Aos oito primeiros de cada conjunto foram adicionados os pontos da C1, conforme ilustrado pelo esquema da Figura 13.

Figura 13 – Esquema de fortificação das amostras de resíduos de diatomáceas, águas residuais e hexano.



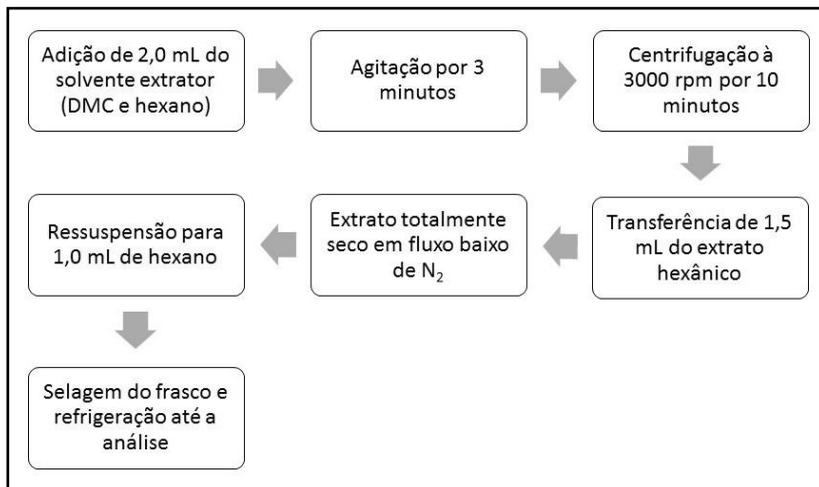
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

O mesmo esquema da Figura 13 foi repetido com os oito frascos seguintes para os pontos da C2. Na sequência todos os frascos foram agitados e deixados na capela para promover interação da solução com as matrizes em estudo. O hexano e as matrizes de água residual ficaram por 6 dias no processo de fortificação e as matrizes de diatomáceas por 7 dias, a fim de maximizar a interação dos pesticidas com as matrizes.

4.2.5 Microextração líquida

Os pesticidas das amostras de água residual fortificadas foram obtidos através de uma extração líquido-líquido miniaturizada, conforme proposta do método USEPA 3511 de 2002. Os frascos que sofreram diminuição no volume de água residual tiveram seu volume corrigido para 5,0 mL com água ultrapura (18,0 MΩcm), obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore® - Bedford, MA, USA), a fim de garantir a proporção dos analitos na calibração sobre a matriz. Neste procedimento foram testados como solvente extrator o DMC e o hexano, ambos com grau HPLC/Spectro (Tedia, Brasil), conforme descrito no esquema da Figura 14.

Figura 14 – Esquema de extração das amostras de águas residuais através da microextração líquida proposta pelo método USEPA 3511.



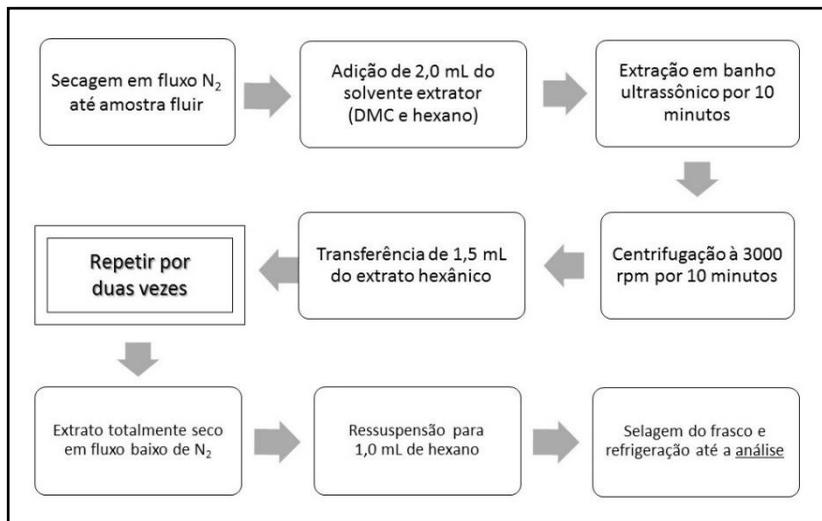
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Conforme ilustrado pelo esquema da Figura 14, a cada frasco de amostra de água residual foram adicionados, com uma pipeta volumétrica, 2,0 mL do solvente extrator. Os frascos foram então fechados e agitados por 3 minutos, e na sequência foram levados a centrifugação em centrífuga BVG – Budapesti Vegyipari Gèpgyàr, à 3000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, com auxílio de uma seringa cromatográfica de 5 mL, foram transferidos 1,5 mL da fração sobrenadante de extrato hexânico para um frasco de vidro de 2,0 mL. O extrato foi seco em fluxo baixo de gás nitrogênio até sua totalidade e ressuspenso em 1,0 mL de hexano. O extrato foi selado com parafilme e levado à refrigeração até a hora da análise.

4.2.6 Extração por ultrassom

As amostras de resíduos de diatomáceas foram submetidas à extração por ultrassom proposta pelo método USEPA 3550C. Inicialmente as amostras ainda úmidas após a fortificação foram secas em fluxo baixo de nitrogênio até livre fluxo da mistura, segundo ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – Esquema de extração das amostras de resíduos de diatomáceas através da extração por ultrassom proposta pelo método USEPA 3550c.



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

A extração por ultrassom apresentada pela ilustração da Figura 15 também foi avaliada com os solventes extratores DMC e hexano. A cada um dos frascos de amostra de diatomáceas previamente fortificados foram adicionados 2 mL de solvente extrator, seguido de extração em banho ultrassônico Callmex, modelo UltraCleaner 1400 por 10 minutos. A fase sólida foi então decantada em centrífuga à média rotação (3000 rpm). Após a centrifugação da amostra, foram transferidos 1,5 mL do extrato orgânico para um frasco de vidro de 2,0 mL, com auxílio de uma seringa cromatográfica de 5 mL. A extração foi repetida por duas vezes, com volumes de 2,0 mL de solvente limpo e transferência de 2,0 mL para o frasco de vidro. A cada etapa de extração o extrato transferido para o frasco de vidro foi seco em fluxo baixo de gás nitrogênio comprimido, pureza > 90% (White Martins, Brasil). No último ciclo de extração a amostra foi completamente seca, com posterior resuspensão em 1,0 mL de hexano limpo. O extrato foi selado com parafilme e levado à refrigeração a hora da análise no dia seguinte.

4.2.7 Determinação analítica via GC/MS

O método de determinação dos pesticidas foi desenvolvido para análise por GC/MS segundo proposto pelo método USEPA 8270D. As análises por cromatografia gasosa foram executadas em dois cromatógrafos gasosos, um Perkin Elmer, modelo Clarus 680, equipado com injetor *Split/Splitless*, analisador de massas do tipo quadrupolo, modelo Clarus SQ 8S com ionização de elétrons e bomba difusora de 75 L s⁻¹; e outro Agilent Technologies, modelo 7890, equipado com espectrômetro de massa do tipo quadrupolo 5975 com ionização de elétrons e bomba difusora.

Em ambos os equipamentos o injetor *Split/Splitless* foi operado no modo *splitless*, sob a temperatura de 225 °C, com injeções de 1 µL. A separação dos analitos foi efetuada em coluna de PDMS com 5% de grupos fenil, com 25 mm de diâmetro interno e 25 µm de espessura de filme, com fluxo de gás hélio de 1,0 mL min⁻¹. Para a separação foi utilizado gradiente de temperatura com início em 60 °C, taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹ até 160 °C, seguido de uma segunda taxa de aquecimento de 2,2 °C min⁻¹ até 250 °C, e uma última taxa de 30 °C min⁻¹ até 290 °C, com isoterma de 1 minutos, totalizando 44,5 minutos de análise.

A detecção foi procedida em espectrômetro de massas quadrupolo, com temperatura de interface em 250 °C, temperatura da fonte em 200 e ionização por impacto de elétrons a 70 eV. O analisador permaneceu inoperante nos primeiros 5 minutos para a saída do solvente e depois foi operado até o final da análise. A faixa de massa/carga analisada foi de 90 a 400 m/z procedidas no modo *full scan* e também no SIM. Os softwares utilizados para aquisição dos dados foram o TurboMass da Perkin Elmer e o Chemstation da Agilent Technologies.

4.2.8 Parâmetros analíticos de mérito

As metodologias analíticas aplicadas à determinação de pesticidas em diferentes matrizes foram avaliadas de acordo com alguns parâmetros, que segundo ANVISA e INMETRO determinam a qualidade dos dados obtidos por cada metodologia. Estas metodologias foram estudadas estatisticamente para aprofundar a compreensão dos termos estabelecidos.

→ Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi testada pela comparação das matrizes isentas das substâncias de interesse e pela matriz enriquecida com elas. A determinação dos analitos por espectrometria de massa no modo SIM possibilita também a confirmação dos picos sem a presença de interferentes, contribuindo para a confirmação da seletividade do método.

→ Linearidade e faixa linear dinâmica

A calibração do método foi executada em duas faixas lineares de calibração externa em solução e também sobre as matrizes em estudo. Ambas as curvas foram construídas através da correlação entre sete níveis de concentração das espécies e seus respectivos sinais analíticos, conforme prescrito por ANVISA (2003) e IMETRO (2011). Através da aplicação da regressão linear foram obtidos os coeficientes de regressão linear e angular, bem como o coeficiente de correlação do método (r) que foram comparados para os dois tipos de calibração.

O estabelecimento da faixa linear dinâmica foi obtido através do sugerido pelo INMETRO através da avaliação preliminar de uma faixa sobre a matriz com adequação dos limites e confirmação da linearidade na faixa estabelecida.

→ Precisão

A precisão foi estipulada em dois níveis, repetitividade e precisão intermediária, e expressa pelo RSD ou CV.

- Repetitividade

Para estabelecer a repetitividade ou precisão intraensaio do método, foram avaliadas vinte e uma preparações em um mesmo dia, abrangendo os limites do método, sendo sete níveis com três preparações de cada nível, com a devida avaliação do desvio padrão relativo.

- Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pela triplicata de três níveis de concentração que cubram os limites do método, em soluções padrão e ambas as matrizes. Os ensaios foram efetuados em dias diferentes e por analistas diferentes, porém sob a mesma metodologia.

→ Exatidão

A exatidão do método foi estudada através de ensaios de recuperação utilizando adição de padrão sobre as matrizes isentas dos analitos. O ensaio utilizou fortificação das matrizes em duas réplicas autênticas de sete níveis distintos e avaliou as porcentagens de substância recuperada, após a extração e determinação analítica. O cálculo foi procedido de acordo com o recomendado por ANVISA (2003), como apresentado na Equação 2

→ Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para a delimitação do LOD do método foram utilizados os parâmetros da curva analítica, segundo proposta de ANVISA (2003). O valor obtido da razão entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular da equação da curva. Esta razão foi multiplicada por um fator de três para o LOD e para obtenção do LOQ a relação foi multiplicada por um fator de dez.

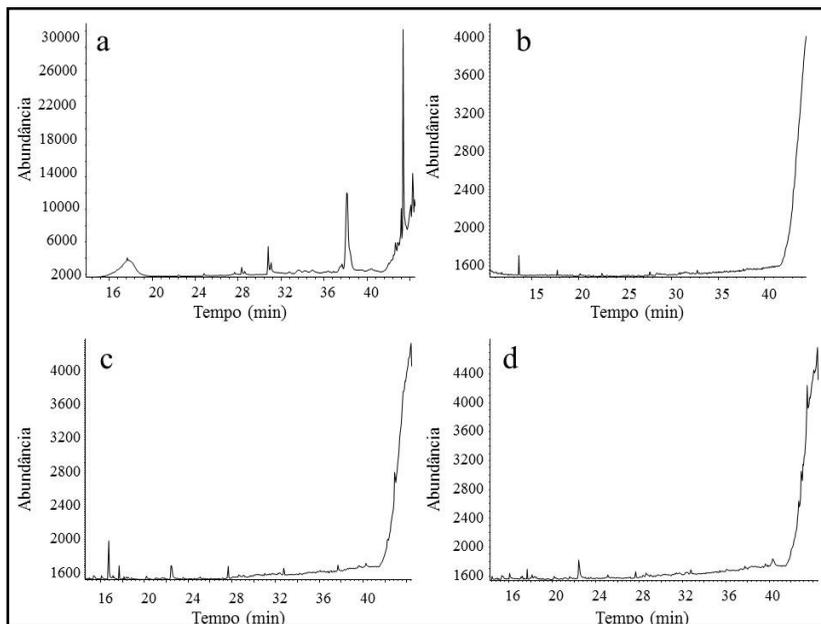
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

As metodologias de extração utilizadas neste trabalho foram embasadas nos métodos USEPA 3511 e 3550C e adaptadas às matrizes de resíduos em estudo na presença dos pesticidas organoclorados apresentados no Quadro 6. Para ambos os procedimentos foram testados os solventes de extração DCM e hexano. O DCM foi avaliado por ser sugeridos ambas metodologias de extração da USEPA e também o mais descrito como solvente extrator nas diferentes técnicas de extração de pesticidas organoclorados descritas na literatura e citadas neste trabalho. O hexano também possui descrição no método 3550 e na literatura científica estudada como bom solvente extrator destes compostos, além de ser um dos solventes presentes na solução padrão estoque adquirida e também por ser um solvente disponível em estoque no laboratório de trabalho.

A avaliação da eficiência do solvente como extrator foi procedida em duas etapas. Na primeira avaliação os solventes foram comparados de acordo com o número de picos interferentes obtidos visualmente nos extratos brutos obtidos dos brancos das matrizes, conforme apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Cromatogramas dos brancos de extração de a) água residual extraída com DCM; b) água residual extraída com hexano; c) resíduo de diatomácea extraída com DCM e d) resíduo de diatomácea extraída com hexano.



Fonte: Elaborado pela autora (2016)

Através de análise visual da Figura 16 é possível perceber que o hexano (Figura 16b e 16d) minimizou a extração de compostos que podem vir a prejudicar a quantificação dos analitos, apresentando extratos com menor índice de interferentes para ambos brancos das matrizes de água e diatomáceas em relação ao solvente DCM.

Uma segunda avaliação foi efetuada de forma quantitativa, utilizando ensaios de recuperação com processos de fortificação mais prolongados, simulando a orientação de avaliação de métodos analíticos para resíduos de pesticidas sugerida por OECD (2007). Para isso a fortificação das amostras foi procedida seis e sete dias antes das extrações e análises de água e diatomáceas, respectivamente. Confirmando o resultado visual das análises dos brancos, o hexano apresentou-se com maiores faixas percentuais de recuperação dos analitos em ambas matrizes, com valores entre 83 e 113 % para água e 60 a 132 % para diatomácea, sendo o escolhido para solvente extrator em ambos os procedimentos de extração aplicados.

5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS DO GC/MS

Para proceder a otimização dos parâmetros operacionais tanto da análise cromatográfica quanto do detector de espectrometria em massa foi efetuada uma pesquisa na literatura científica disponível para a determinação de organoclorados por cromatógrafos gasosos com detecção por quadrupolo, seguida de ajustes para obtenção do melhor sinal obtido em termos de resolução cromatográfica, sensibilidade e tempo total de análise para os analitos em estudo.

Para o cromatógrafo buscou-se a temperatura do injetor que possibilitasse a volatilização dos compostos, sem promoção de escape dos mais voláteis como os não aromáticos hexaclorociclohexanos. Para a separação analítica foram testados gradientes de aquecimento que possibilitassem a eluição ordenada dos compostos mais voláteis aos menos voláteis de forma a obter a melhor resolução cromatográfica. Por fim, utilizou-se uma temperatura mais elevada para promover uma rápida limpeza da coluna para a análise posterior.

A detecção dos pesticidas foi realizada inicialmente no modo Cromatograma de Íons Totais (TIC) para avaliação do método cromatográfico e das matrizes das amostras de resíduos. Posteriormente a aplicação da determinação espectrométrica em modo SIM, conforme os fragmentos listados na Tabela 7, colaborou para a identificação dos tempos de retenção de cada composto, com confirmação através de comparação com espectros da biblioteca NIST, disponível no equipamento.

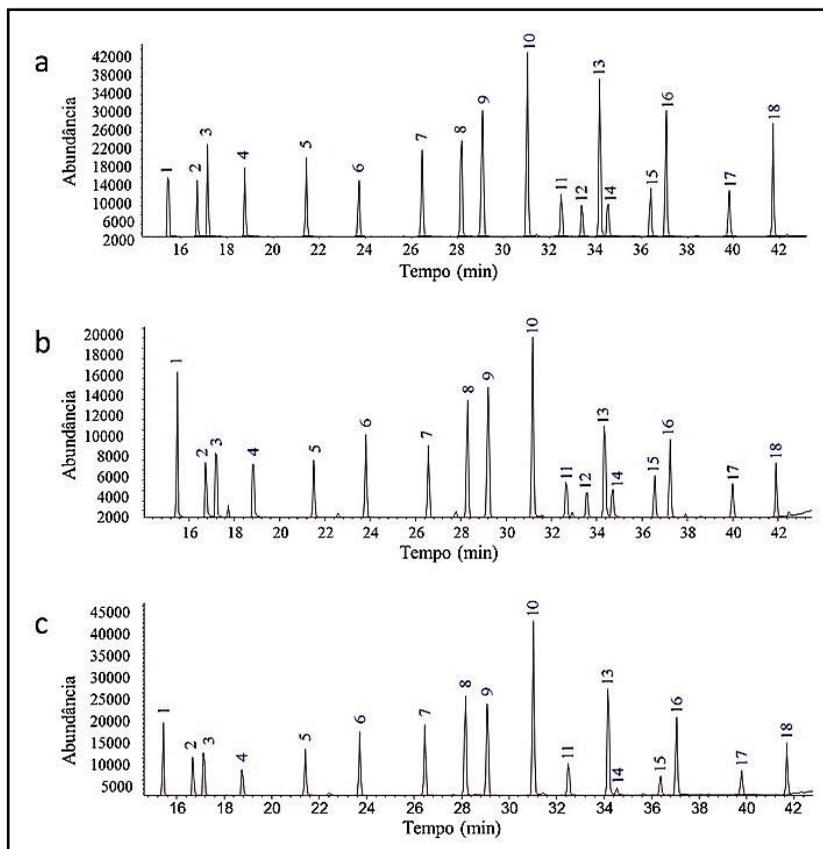
Tabela 7 - Fragmentos de massa para identificação dos analitos.

ANALITOS	FRAGMENTOS (<i>m/z</i>)
Aldrin	263, 66, 79
α -HCH	219, 183, 181, 109
β -HCH	181, 183, 219, 109
δ -HCH	181, 183, 109, 219
γ -HCH	181, 183, 219, 109
cis-Clordano	373, 375, 237, 272
trans-Clordano	373, 375, 272, 237
p,p'-DDD	235, 237, 165, 81
p,p'-DDE	246, 318, 176
p,p'-DDT	235, 237, 165, 176, 246
β -endosulfan	195, 237, 241
Endosulfan sulfato	272, 274, 237, 227
Endrin	263, 67, 81
Endrin aldeído	67, 250, 248, 173
Endrin cetona	317, 315, 67, 250
Heptacloro	272, 274, 100, 237
Heptacloro epóxido	353, 355, 81
Metoxicloro	227

Fonte: Biblioteca NIST (2015, p --).

A análise cromatográfica dos 18 analitos foi executada em metodologia com tempo inferior a 42 min, com a identificação dos analitos conforme fragmentos descritos na Tabela 7, sendo procedida na solução padrão em hexano e nos extratos hexânico das matrizes de resíduos, conforme apresentado nos cromatogramas da Figura 17.

Figura 17 - Cromatogramas da fortificação dos analitos em concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobre as matrizes em estudo. a) solvente hexano; b) matriz água; c) matriz diatomácea. Ordem de eluição dos analitos: 1) α -HCH, 2) β -HCH, 3) δ -HCH, 4) γ -HCH, 5) heptacloro, 6) aldrin, 7) heptacloro-epóxido, 8) trans-clordano, 9) cis-clordano, 10) p,p'-DDE, 11) endrin, 12) β -endossulfan, 13) p,p'-DDD, 14) endrin aldeído, 15) endossulfan sulfato, 16) p,p'-DDT, 17) endrin cetona, 18) metoxicloro.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

De acordo com a Figura 17 é possível perceber que dos 20 analitos presentes no padrão ERS_013 dois não foram identificados nos extratos, são eles o dieldrin e o α -endossulfan. A falta de sinal para ambos os compostos pode estar associada a suas reatividades. O α -endossulfan se hidrolisa espontaneamente para formar o dióxido de enxofre e seu

respectivo diol. Isto contribui para a degradação do dieldrin que reage vigorosamente com ácido sulfúrico e possivelmente também com seu nucleófilo conjugado (CHEMICAL BOOK, 2016).

Os demais analitos não sofreram alterações em seus tempos de eluição da solução padrão para os extratos da fortificação sobre água ou diatomácea, com exceção do β -endosulfan que não foi detectado nas amostras de diatomácea por uma possível degradação durante a etapa de fortificação conforme delineado na descrição química do β -endosulfan em Chemical Book (2016).

5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Após a identificação dos analitos foi executado o processo de avaliação da metodologia com estudo dos parâmetros de mérito descritos por ANVISA (2003) e INMETRO (2011), tais como seletividade, linearidade, precisão, LOD, LOQ e exatidão.

A seletividade do método desenvolvido foi estudada através da comparação da análise do branco das matrizes, conforme apresentado nos cromatogramas da água e diatomácea respectivamente nas Figuras 11b e 11d, e as mesmas adicionadas dos padrões de pesticidas, conforme demonstra as Figuras 12b e 12c, também para as matrizes água e diatomácea respectivamente. A confirmação através da avaliação dos cromatogramas no modo TIC e no modo SIM possibilitou uma comparação mais aprofundada dos sinais obtidos pelas matrizes e pelos analitos, concluindo que não há coeluição de interferentes provenientes das matrizes que dificultem o processo de determinação dos pesticidas em ambas matrizes.

A linearidade do método foi avaliada pela aplicação de metodologia de calibração externa e comparada com a adição de padrão sobre as matrizes, ambas com sete níveis de concentração. Conforme descrito na seção 2.4.2.3, a concentração fixa dos analitos no padrão adquirido culminou na construção de duas faixas lineares de calibração, já que os analitos alvos da classificação de resíduos proposta pela Norma NBR 10004 requer avaliação de analitos com concentrações de ordens de grandeza bastante diferentes como é o caso da soma das concentrações de aldrin e dieldrin com limites de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ e o γ -HCH ou lindano com limites de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. A tentativa de proceder apenas uma curva de faixa linear dinâmica mais extensa não foi possível devido desvio da linearidade.

As curvas de calibração C1 e C2 apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 para todos os analitos da calibração externa, indicando que a determinação dos pesticidas apresenta correlação entre as concentrações analisadas e os sinais obtidos pelas áreas cromatográficas e assim pode ser efetuada de forma linear de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (2003). As análises das curvas C1 e C2 para as matrizes água e diatomáceas apresentaram menor linearidade quando comparada com as curvas em solução, conforme apresentado na Tabela 8. Isto já era esperado pois as matrizes podem afetar a determinação dos analitos pelo efeito de matriz que pode provocar aumento ou diminuição nas áreas cromatográficas obtidas.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação obtidos por calibração externa com hexano e calibração por adição de padrão sobre as matrizes de águas residuais e resíduos de diatomáceas.

Analitos	Matrizes	Curva C1			Curva C2		
		Hexano	Água	Diatomácea	Hexano	Água	Diatomácea
Aldrin		0,9999	0,9789	0,9961	0,9997	0,9680	0,9972
Cis-clordano		1,0000	0,9802	0,9715	0,9997	0,9893	0,9961
Trans-clordano		0,9998	0,9810	0,9911	0,9996	0,9910	0,9669
DDD		0,9993	0,9991	0,9908	0,9980	0,9884	0,6356
DDE		0,9995	0,9950	0,9700	0,9994	0,9669	0,8932
DDT		0,9995	0,9962	0,9854	0,9980	0,9912	0,9933
Endosulfan II		0,9993	0,9969	nd*	0,9993	0,9750	nd*
Endo sulfato		0,9932	0,9769	0,9573	0,9981	0,9854	0,9958
Endrin		0,9998	0,9928	0,9717	0,9989	0,9905	0,5277
Endrin aldeído		0,9975	0,9966	0,7493	0,9992	0,9929	0,9970
Endrin Cetona		0,9993	0,9983	0,9565	0,9989	0,9752	0,9903
α-HCH		0,9995	0,9959	0,9010	0,9993	0,9796	0,9957
β-HCH		0,9996	0,9930	0,8686	0,9994	0,9963	0,9995
δ-HCH		0,9997	0,9927	0,9832	0,9995	0,9871	0,9929
γ-HCH		0,9995	0,9915	0,9742	0,9992	0,9888	0,9980
Heptacloro		0,9999	0,9634	0,9872	0,9994	0,9982	0,9934
Hepta epóxido		1,0000	0,9912	0,9876	0,9993	0,9949	0,9918
Metoxicloro		0,9986	0,9921	0,9277	0,9974	0,9862	1,0000

*nd: não detectado

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

De forma resumida a Tabela 8 demonstra que o método não apresentou linearidade adequada para a determinação deste conjunto de analitos sobre as matrizes água e diatomáceas em ambas as curvas de calibração. A obtenção destes valores pode ter sofrido algumas alterações devido às condições cromatográficas da coluna analítica do equipamento, uma vez que o instrumento utilizado possui uso comum a outros grupos de estudo com análise de extratos vegetais e análises de produtos de reação orgânica sem concentração definida. Várias limpezas foram efetuadas na coluna cromatográfica antes do início das análises de cada uma das curvas, mas ainda assim alguns compostos analisados anteriormente podem ter se ligado irreversivelmente a coluna dificultando a correlação dos sinais obtidos cromatograficamente com as concentrações analisadas.

A comparação dos coeficientes angulares entre a calibração externa e a adição de padrão para cada um dos analitos para ambas as curvas de calibração demonstrou a diferença em ambos os tipos de calibração. A conclusão inicial revela a necessidade de aplicação da metodologia sobre a matriz durante a determinação dos analitos, porém diante do acima exposto, as curvas sobre a matriz apresentaram-se fora de qualquer parâmetro estabelecido pelos órgãos reguladores e devem ser reavaliados para possibilitar determinações seguras sobre as matrizes estudadas. Assim, optou-se pela calibração externa.

Para a avaliação da precisão intra-dia e intermediária, bem como a exatidão do método desenvolvido foram avaliadas as curvas em solução em ambas as faixas lineares estudadas, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de CV obtidos para avaliação da precisão intra-dia e intermediária e percentuais de recuperação para avaliação da exatidão do método desenvolvido.

Análitos	Matrizes	CV intra-dia		CV intermediário		Recuperação (%)	
		Curva C1	Curva C2	Curva C1	Curva C2	Curva C1	Curva C2
Aldrin		8,554	7,392	33,42	29,39	99,79	103,7
Cis-clordano		8,319	7,614	27,08	25,51	99,84	103,2
Trans-clordano		8,112	8,263	28,56	25,27	101,2	103,0
DDD		11,79	7,414	31,88	23,51	102,3	108,9
DDE		10,07	7,769	30,99	26,09	102,5	104,4
DDT		7,798	7,120	26,49	20,57	102,5	108,7
Endosulfan II		11,47	6,753	32,35	25,26	98,91	105,6
Endo sulfato		10,86	9,601	28,76	28,13	103,0	108,4
Endrin		11,39	6,148	25,51	22,96	100,9	106,4
Endrin aldeído		10,58	8,775	31,83	28,69	99,14	105,6
Endrin Cetona		13,05	7,501	31,92	22,96	101,3	106,8
α -HCH		10,92	6,255	32,89	30,48	101,8	103,5
β -HCH		13,50	7,761	33,01	28,31	99,41	105,3
δ -HCH		9,002	7,120	26,49	23,78	101,1	103,7
γ -HCH		13,30	7,830	29,88	27,72	102,3	105,3
Heptacloro		11,80	7,537	23,59	18,15	99,39	105,5
Hepta epóxido		11,12	7,919	24,82	21,48	100,3	105,5
Metoxicloro		11,63	6,988	27,96	18,96	103,7	109,8

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Os valores de precisão intra-dia apresentados na Tabela 9 foram obtidos em um intervalo inferior a vinte e quatro horas, utilizando o mesmo equipamento analítico, sendo executada pelo mesmo analista. Foram analisados os coeficientes de variação para uma triplicata de sete pontos de concentrações crescentes. Para a precisão intermediária do método a avaliação foi efetuada no mesmo equipamento, porém sob manipulação de analistas diferentes, em dias diferentes. Para este teste foram analisados os coeficientes de variação para uma quadruplicata de sete pontos de concentrações crescentes.

Para ambos testes de precisão os valores de CV ultrapassam os limites de 5 % estabelecidos pela ANVISA como valor aceito de variação entre os resultados. Podemos então concluir que o método não apresenta precisão adequada. Isto pode estar relacionado a diferentes causas, como a variabilidade da coluna cromatográfica devido ao uso de diferentes grupos de estudo conforme descrito na linearidade, além de uma possível necessidade de um procedimento maior de limpeza da coluna por

aquecimento ou corte de um pedaço inicial da mesma para minimização dos efeitos de interferentes ligados à coluna, ou ainda a uma real variabilidade do método para sua aplicação em dias diferentes. Avaliando ambos estudos de precisão demonstra-se que o método apresenta valores com menor variação quando as análises são realizadas no menor espaço de tempo possível.

A avaliação da exatidão do método foi procedida através de ensaios de recuperação dos analitos adicionados sobre hexano e extraídos após seis dias de fortificação. Os resultados foram obtidos por cem vezes a razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica da triplicata de sete concentrações, em duas faixas lineares, conforme os valores descritos na Tabela 9. Estes valores indicam que a recuperação sobre o hexano é favorável à análise dos pesticidas, com baixa discrepância dos resultados obtidos.

Para avaliação dos limites de detecção e quantificação por calibração externa foi utilizada metodologia proposta por ANVISA (2003), com a análise em quadruplicata de sete níveis de concentração próximos ao suposto LOQ de ambas as faixas lineares estudadas. Estes valores foram calculados a partir da razão entre o desvio padrão da intercepção com o eixo y e a inclinação da curva de calibração. Esta razão deve ser multiplicada por três para obtenção do LOD e por dez para LOQ. Os limites de detecção e quantificação foram estimados para as curvas C1 e C2, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Limites de detecção e quantificação para duas faixas de calibração de acordo com os parâmetros estabelecidos por ANVISA (2003).

Parâmetros Análitos	Curva C1		Curva C2	
	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Aldrin	0,360	1,20	5,17	17,2
A-HCH	0,446	1,49	5,77	19,2
B-HCH	0,262	0,874	5,03	16,8
δ-HCH	0,350	1,17	6,13	20,4
γ-HCH	0,651	2,17	6,52	21,7
Cis-Clordano	0,343	1,14	4,82	16,1
Trans-Clordano	0,339	1,13	5,33	17,8
P,p'-DDD	0,538	1,79	2,70	8,99
P,p'-DDE	0,468	1,56	4,66	15,5
P,p'-DDT	0,389	1,30	8,21	27,4
B-endosulfan	1,094	3,65	2,48	8,27
Endosulfan sulfato	0,521	1,74	5,28	17,6
Endrin	0,667	2,22	3,90	13,0
Endrin aldeído	0,454	1,51	3,92	13,1
Endrin cetona	0,608	2,03	5,01	16,7
Heptacloro	0,487	1,62	7,68	25,6
Heptacloro epóxido	0,281	0,935	3,30	11,0
Metoxicloro	0,699	2,33	15,7	52,5

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Os valores de limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 10 possibilitam a determinação analítica dos pesticidas estudados dentro dos limites estipulados pela norma brasileira de classificação de resíduos sólidos, NBR 10004.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo geral a adequação de metodologias propostas pela Norma Brasileira de classificação de resíduos sólidos (NBR 10004/2004) para preparo de amostras e determinação de pesticidas em matrizes de resíduos da indústria petrolífera. Como a indústria de petróleo gera diferentes tipos de resíduos sólidos para classificação, as metodologias de extração e determinação propostas pelo compêndio SW-846 foram ajustadas para aplicação à dezoito pesticidas, na sua maioria organoclorados, sob matrizes de água residual e diatomáceas, a fim de utilizar ambas como modelos de amostras líquidas e sólidas, respectivamente. Para aplicação às amostras líquidas optou-se pela metodologia de microextração líquida proposta pela SW-846 da USEPA no método 3511, enquanto que para amostras sólidas foi utilizada a metodologia de extração por ultrassom proposta pela SW-846 da USEPA no método 3550C. Para ambos os métodos foram testados os solventes DCM e hexano. Este último apresentou cromatogramas do branco com menores índices de interferência, além de maiores taxas de recuperação para ensaios preliminares sobre as matrizes de água residual e diatomáceas. O desenvolvimento do método cromatográfico por GC/MS também seguiu recomendações dispostas na NBR 10004/2004, sendo ajustada a metodologia proposta pela SW-846 da USEPA no método 8270D, com gradiente de aquecimento favorecendo a eluição ordenada dos dezoito analitos com a maior resolução e tempo de análise inferior a 42 minutos. A avaliação da metodologia cromatográfica ajustada apresentou valores satisfatórios para a calibração externa, com seletividade dos analitos comprovada pela aplicação do método cromatográfico pelo modo SIM, com determinação do tempo de retenção de cada analito confirmado pelas quebras apresentadas e comparadas com a tabela NIST. A linearidade do método apresentou correlação ideal ($r > 0,99$) para a calibração externa em ambas as faixas lineares de todos os analitos estudados. A precisão do método foi avaliada em dois níveis, sendo que o método apresentou desvio da repetibilidade adequada com coeficiente de variação que variaram entre 7,80 e 13,50 % para a curva C1 e entre 6,15 e 8,78 % para a curva C2. Já a precisão intermediária, procedida com uma semana de diferença do teste de repetibilidade, apresentou valores com maior variação, sendo os valores de CV para as curvas C1 e C2 respectivamente 23,6 a 33,0 %, e 19,0 a 30,5 %, demonstrando uma baixa precisão intermediária do método. Os estudos de recuperação sobre a fortificação de soluções de hexano apresentou boa recuperação, como esperado, com valores que variaram entre 94,4 e 103,7

% para a curva C1, enquanto que na C2 a faixa de recuperação ficou entre 103 a 109,8 %. Os limites de quantificação e determinação obtidos para a calibração externa demonstraram a capacidade do método de determinar os analitos estudados dentro dos limites estipulados pela norma brasileira de classificação de resíduos sólidos, NBR 10004/2004.

Por fim, a calibração dos analitos sobre a matriz não foi concluída com êxito por apresentar valores de linearidade, precisão e exatidão muito discrepantes, demonstrando a ineficácia do método para a aplicação sobre as matrizes de água residual e diatomáceas. Estas matrizes são mais propensas a variações de resultados quando comparadas com soluções padrão devido a possível existência de efeitos de matriz que podem causar aumento ou diminuição da determinação dos compostos. Além disso, o desenvolvimento do método para determinações de pesticidas em nível traço, utilizando equipamento multiusuário, pode ser dificultada pela possível contaminação da coluna cromatográfica.

Ainda assim, o método aplicado sobre as soluções padrão apresentou bons resultados cromatográficos e pode ser reavaliado sobre essas e outras matrizes para gerar dados mais representativos.

7 PERSPECTIVAS

O método desenvolvido tem possibilidades de apresentar resultados melhores se reavaliada sobre uma coluna cromatográfica nova atrelado ao uso da calibração com a presença de um padrão interno que corrija as flutuações do método.

Além disso, o método pode ser averiguado sobre uma diversidade de matrizes advindas da indústria petrolífera, visando garantir resultados mais representativos sobre a classificação dessas matrizes de acordo com a norma de classificação de resíduos sólidos (NBR 10004/2004).

Esta mesma norma não preconiza a avaliação de pesticidas utilizados nos dias atuais, mas o método pode ser aplicado a outras classes destes compostos a fim de ampliar a investigação dos compostos presentes nos resíduos analisados e garantir mais segurança ambiental na disposição final desses rejeitos.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004.

AMADORI, M. *et al.* Extraction Method for the Determination of Atrazine, Deethylatrazine, and Deisopropylatrazine in Agricultural Soil Using Factorial Design. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 24, n. 3, p. 483-491, Sociedade Brasileira de Química, 2013.

ANDRADE, J. A.; JARDIM, F. A.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, P, 17-43. São Paulo, 2010.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”.

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>.

Acesso em: 23 jan. 2014.

BAUER, F. C. *et al.* Eficácia de cabines adaptadas na proteção dos operadores de tratores em aplicações de pesticidas na cultura da macieira. **XLIV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**. São Pedro/SP, set./2015

BERNARD, C. E, at al. Sampling household surfaces for pesticide residues: comparison between a press sampler and solvent-moistened wipes. **Science of the Total Environment**, v. 389, p. 514-521, Elsevier, 2008.

BRAGA, F. S. *et al.* Caracterização ambiental dos resíduos oleosos provenientes das atividades de exploração e produção de óleo e gás no norte do estado do Espírito Santo. **VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Vitória/ ES, set.2002.

BRANDÃO, Carlos Jesus *et al* (orgs.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

BRASIL. **Lei nº 7.802**, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de pesticidas, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 jul. 1989.

Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074compilado.htm>. Acesso em: 4 abr. 2013.

BRASIL. **Decreto nº 4.074**, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de pesticidas, seus componentes e afins, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 04 jan. 2002.

Disponível em: <

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=515>>.

Acesso em: 24 fev. 2017.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da União, Brasília/DF, 30 dez. 2009. Disponível em:

<<file:///C:/Users/Ro/Downloads/Brasil%202009%20CONAMA%20-%20VALORES%20ORIENTADORES.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Segurança química:** pesticidas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

CAI, Jin'an *et al.* Determination of organochlorine pesticides in textiles using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 280-284. Editora Elsevier, 2013.

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

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J. *et al.* Validation of a GC–MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction. **Chemosphere**, v. 84, p. 869–881. Elsevier, 2011.

CAMPOS, Humberto de. **Enciclopédia agrícola brasileira**. v. 1. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1995. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=B031Rayt6tcC&pg=PA86&dq=AGROT%C3%93XICO&hl=pt-BR&sa=X&ei=5uyMUv7mJYqEkQeAt4DoCA&ved=0CDYQ6AEwAQ#v=onepage&q=AGROT%C3%93XICO&f=false>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

CANO, M. L. C. *et al.* Gas chromatographic method and whole body dosimetry for assessing dermal exposure of greenhouse applicators to chlorpyrifos-methyl and fenitrothion. **Analytica Chimica Acta**, v. 423, p. 127-136. Elsevier, 2000.

CASARINI, D. C. P. *et al.* **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2001.

CHAIM, A.; CASTRO, V. L. S. S.; GALVÃO, J. A. H. Método para monitorar a contaminação de aplicadores de pesticidas na cultura de tomate. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 11, p. 149-158, jan./dez. 2001.

CHEMICAL BOOK. Product chemical properties: Organochlorine pesticides. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/171219.htm>. Acesso em: 15 nov. 2016.

CIPAC. Collaborative International Pesticides Analytical Council.

CIPAC 035: Fenitrothion, 2009. Disponível em:

<cipac.org/images/members-area/documents/0035.doc>. Acesso em: 15 nov. 2016.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; LANZAB, M. R. V. Análise dos produtos de degradação do esfenvalerato por SBSE/CLAE-UV/DAD utilizando planejamento fatorial fracionário. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 535-539, 2014.

CUNHA, J. P. A. R.; MINGUELA, J. V. Manual de aplicação de produtos fitossanitários. Viçosa/MG: Aprenda Fácil, 2011.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.9, n.1, p. 23-32 Jan. - Jun./2008.

D'ARCHIVIO, A. A. *et al.* Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 71, p. 25–30, Elsevier, 2007.

DIAS, T. Para a pureza do biodiesel. **Revista Meio Filtrante**. p. 1-8, 2008. Disponível em:

<<http://www.meiofiltrante.com.br/materias.asp?action=detalhe&id=425>> Acesso em: 24 fev. 2017.

ENDALEW, A. M. *et al.* A new integrated CFD modelling approach towards air-assisted orchard spraying - Part II: Validation for different sprayer types. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 71, p. 137-147, Elsevier, 2010.

FATOKI, O. S.; AWOFOLU, R. O. Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 225–236. Elsevier, 2003.

FILIPE, Cláudia. **Segurança, higiene e saúde no trabalho agrícola**: informação e divulgação de prevenção. Coimbra: CNA - Confederação

Nacional da Agricultura, 2011. Disponível em: <<http://www.cna.pt/dossiers/dossiercampanhaseguranca/materiais/brochura.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

FLORES, A. V. *et al.* Organoclorados: um problema de saúde pública. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. VII, n. 2 jul./dez. 2004.

FRANCISCO, J. L; FRANÇA, K. C. **Dossiê técnico**: métodos de tratamento de resíduos de petróleo. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro – REDETEC, Dez., 2007.

FU, L. *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 289–295, Elsevier, 2009.

GILBERT, A. J.; BELL, G. J. Test methods and criteria for selection of types of coveralls suitable for certain operations involving handling or applying pesticides. **Journal of Occupational Accidents**, v. 11, p. 255-268, Elsevier, 1990.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A. *et al.* Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, 2013.

HU, X. *et al.* Determination of organophosphorus pesticides in ecological textiles by solid-phase microextraction with a siloxane-modified polyurethane acrylic resin fiber. **Analytica Chimica Acta**, n. 736, p. 62-68. Elsevier, 2012.

HUGHES, E. A. *et al.* Potential dermal exposure to deltamethrin and risk assessment for manual sprayers: influence of crop type. **Science of the Total Environment**, v. 391, p. 34-40, Elsevier, 2008).

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures text and methodology Q2 (R1). Current Step 4 version (Complementary

Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005). Disponível em:
<file:///C:/Users/Ro/Downloads/%23ICH%20-%20Validation%20of%20analytical%20procedures.pdf>. Acesso em: 27 set 2016.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Coordenação Geral de Acreditação. Revisão 04 - Jul/2011. Disponível em:
<http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2014.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

JACTO. **Produto:** ARBUS 1500. 2017. Disponível em:
<<http://www.jacto.com.br/pt/produto/detalhes/276/arbus-1500>> Acesso em: 24 fev. 2017.

KEEBLE, V. B; CORRELL, L.; EHRICH, M.
Evaluation of knit glove fabrics as barriers to dermal absorption of organophosphorus insecticides using an in vitro test system. **Toxicology**, v. 81, p. 195–203, Elsevier, 1993.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 195–228. Elsevier, 2007.

LEME, T. S. *et al.* Avaliação da vestimenta utilizada como equipamento de proteção individual pelos aplicadores de malationa no controle da dengue em São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 30 (3):567-576, mar, 2014.

MACFARLANE, E. *et al.* Dermal Exposure Associated with Occupational End Use of Pesticides and the Role of Protective Measures. **Safety and Health at Work**, v. 4, p. 136-141, Elsevier, 2013.

MARINHO, M. R, M; CASTRO, W. B. Planejamento Fatorial: uma ferramenta poderosa. **XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia**. De 12-15 set. Campina Grande/PB, 2005. Disponível em: <file:///C:/Users/Ro/Downloads/@@2005%20Marinho%20-%20PLANEJAMENTO%20FATORIAL%20UMA%20FERRAMENTA%20PODEROSA%20para%20pesquisadores.pdf>. Acesso em: 27 set 2016.

MAYER-HELM, B. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8953-8959, Elsevier, 2009.

MASSEY FERGUSON. **Produto**: Série MF 4200. 2017. Disponível em: <<http://www.massey.com.br/produtos/tratores/serie-mf-4200>> Acesso em: 24 fev. 2017.

MONTEIRO, L. A. (Org.) **Prevenção de acidentes com tratores agrícolas e florestais**. Botucatu: Diagrama, 2010. Disponível em: <https://drive.google.com/drive/folders/0B_nC3EKek-G6bmcxNI85c3prNIU>. Acesso em: 03 set 2016.

MTE. Ministério do Trabalho e Emprego. Segurança e saúde no trabalho na agricultura, pecuária silvicultura, exploração florestal e aquicultura. **Norma Regulamentadora 6**. Portaria MTE n.º 505, de 16 de abril de 2015. Disponível em: <<http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR6.pdf>>. Acesso em: 24 fev 2017.

MTE. Ministério do Trabalho e Emprego. Segurança e saúde no trabalho na agricultura, pecuária silvicultura, exploração florestal e aquicultura. **Norma Regulamentadora 31**. Portaria MTE n.º 1.896, de 09 de dezembro de 2013. Disponível em: <[http://acesso.mte.gov.br/data/files/8A7C816A4295EFDF0143067D95BD746A/NR-31%20\(atualizada%202013\).pdf](http://acesso.mte.gov.br/data/files/8A7C816A4295EFDF0143067D95BD746A/NR-31%20(atualizada%202013).pdf)>. Acesso em: 06 ago 2016

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Livro de química na web**: base de dados de referência padrão do NIST número 69. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Environment Directorate. Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, **ENV/JM/MONO(2007)17**. Paris, Aug/ 2007.

OUERTANI, R.; ATRACHE, L. L.; HAMIDA, N. B. Chemometrically assisted optimization and validation of reversed phase liquid chromatography method for the analysis of carbamates pesticides. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 154, p. 38-44, Elsevier, 2016.

RAMOS, Lourdes. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1221, p. 84–98. Elsevier, 2012.

RASHID, A. *et al.* Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2933–2939. Elsevier, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHTER, P. *et al.* Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 994, p. 169–177. Elsevier, 2003.

RODIL, R.; POPP, P. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, p. 82-90. Elsevier, 2006.

RODRIGUEZ-CUESTA, M. J. *et al.* Development and validation of a method for determining pesticides in groundwater from complex overlapped HPLC signals and multivariate curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 251-260. Elsevier, 2005.

ROUVIÈRE, F. *et al.* Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. **Talanta**, v. 93, p. 336-344. Elsevier, 2012.

SANCHES, Sérgio Marcos *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba, v. 13, p. 53-58, jan. /dez. 2003.

SANTOS, Heraldo Nelson Guimarães. Avaliação qualitativa da exposição dos aplicadores aos pesticidas em diversas culturas e equipamentos. **62ª Reunião Anual da SBPC**, 2010. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/1046.htm>>. Acesso: em: 28 jul. 2013.

SANTOS, G. B. Gerenciamento de resíduos de indústria petrolífera e produção de petróleo: atendimento ao requisito de licenciamento ambiental no Brasil. **Revista Gestão Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v. 1, n. 2, p. 23-35, out. 2012/mar.2013.

SENAR. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Administração. **Trabalhador na aplicação de pesticidas: aplicação de pesticidas com pulverizador turboatomizador** São Paulo: SENAR, 2005.

SMITH, R. M. Before the injection: modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, Elsevier, 2003.

SOODI, M.; GARSHASBI, A.; ESKANDARI, S. Development a HPLC method for simultaneous determination of Azinphose methyl, Diazinon, Phosalone and Chlorpyrifos residues in fruit. **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, v. 1(4), p. 79-87. JPHS, 2012.

TAN, G. H.; LOW, K. H.; AWONIRAN, A. Use of SPME and chemometrics in method development for food and environmental analysis of pesticide residues. **Chemical Science Journal**, v. 6, p. 4, 2015.

TEIXEIRA, Filomena. **Utilização de Pesticidas Agrícolas**. Lisboa: ACT, 2014.

TEMOTEO, R *et al.* Terra de diatomácea como método alternativo para a purificação do biodiesel. **XXI COBEQ: Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2016. Disponível em: <<https://proceedings.galoa.com.br/cobeq/cobeq-2016/trabalhos/terra-de-diatomacea-como-metodo-alternativo-de-purificacao-de-biodiesel?lang=pt-br>> Acesso em: 24 fev. 2017.

TSAKIRAKIS, A. *et al.* Determination of operator exposure levels to insecticide during bait applications in olive trees: study of coverall performance and duration of application. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, n. 214, p. 71-78, Elsevier, 2011.

TSAKIRAKIS, A. N. *et al.*, Dermal & inhalation exposure of operators during fungicide application in vineyards. Evaluation of coverall performance. **Science of the Total Environment**, n. 470-471, p. 282-289, Elsevier, 2014.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846**: Chapter twelve: land treatment monitoring. Revisão: 0. Setembro 1986. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/chap12.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2013.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846**: Method 3511: Organic Compounds in water by microextractin. Revisão: 0. Nov./2002. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3511.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2013.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846**: Method 8000C: determinative chromatographic separations. Revisão: 3. Mar./2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8000c.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2013.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846**: Chapter two: choosing the correct procedure.

Revisão: 4. Fev./ 2007a. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/chap2.pdf>>.

Acesso em: 08 maio 2013

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846:** Method 3550C: ultrasonic extraction.

Revisão: 3. Fevereiro 2007b. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>>.

Acesso em: 18 maio 2013.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846:** Method 8270D: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Revisão: 4. Fevereiro 2007c. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>>.

Acesso em: 10 maio 2013.

USEPA. Office of Solid Waste United State Environment Protection Agency. **Solid waste 846:** Method 8321B: solvent-extractable

nonvolatile compounds by high-performance liquid

chromatography/thermospray/mass spectrometry (HPLC/TS/MS) or

ultraviolet (UV) detection. Revisão: 2. Fevereiro 2007d. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8321b.pdf>>.

Acesso em: 10 maio 2013.

VAGI, M. C. *et al.* Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using solvent extraction followed by GC/ECD. **Desalination**, v. 210, p. 146–156. Elsevier, 2007.

WHO. World Health Organization. **Specificatios for public health pesticides:** fenitrothion emulsifiable concentrate. WHO, p.12-15, Jan.

2010. Disponível em: <[file:///C:/Users/Ro/Downloads/WHO%20-](file:///C:/Users/Ro/Downloads/WHO%20-%20Fenitrothion.pdf)

[%20Fenitrothion.pdf](file:///C:/Users/Ro/Downloads/WHO%20-%20Fenitrothion.pdf)>. Acesso em: 27 set 2016

YU, Y. *et al.* Chromatographic background drift correction coupled with parallel factor analysis to resolve coelution problems in three-dimensional chromatographic data: Quantification of eleven antibiotics in tap water samples by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector

Journal of Chromatography A, v. 1302, p. 72-80. Elsevier, 2013.

ZHAO, H. *et al.* Effects of sprayers and nozzles on spray drift and terminal residues of imidacloprid on wheat. **Crop Protection**, v. 60, p. 78-82. Elsevier, 2014.

ZHU, F. *et al.* Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorus pesticides in textiles by gas chromatography with mass spectrometry.

Analytica Chimica Acta, v. 650, p. 202–206. Elsevier, 2009.