



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**LUIS FELIPE LIMA GUIMARÃES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
*AMETRYN* EM AMOSTRAS DE ÁGUAS POR *QuEChERS*-CG-EM E POSTERIOR  
APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS**

**ARAGUAÍNA - TO**

**2023**

**LUIS FELIPE LIMA GUIMARÃES**

**Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de *Ametryn* em Amostras de Águas por *QuEChERS*-CG-EM e Posterior Aplicação em Amostras Reais**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Química da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Barbosa Alcântara

**ARAGUAÍNA - TO**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- G963d Guimarães, Luis Felipe Lima.  
Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de Ametryn em Amostras de Águas por QuEChERS-CG-EM e Posterior Aplicação em Amostras Reais. / Luis Felipe Lima Guimarães. – Araguaína, TO, 2023.  
77 f.  
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Química, 2023.  
Orientador: Daniel Barbosa Alcântara  
1. Pesticida. 2. QuEChERS adaptado. 3. Cromatografia. 4. Analito. I. Título  
CDD 540

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.


**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**LUIS FELIPE LIMA GUIMARÃES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
AMETRYN EM AMOSTRAS DE ÁGUAS POR *QuEChERS*-CG-EM E POSTERIOR  
APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS**


Aprovado em: 08/12/2023.

Esta monografia foi julgada adequada para a obtenção do título de Licenciado em Química,  
sendo aprovada em sua forma final pela banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **DANIEL BARBOSA ALCANTARA**  
Data: 17/12/2023 23:02:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

**Orientador: Prof. Dr. Daniel Barbosa Alcântara**  
**Universidade Federal do Norte do Tocantins**

Documento assinado digitalmente  
 **JOSEILSON ALVES DE PAIVA**  
Data: 19/12/2023 08:03:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva**  
**Universidade Federal do Norte do Tocantins**

Documento assinado digitalmente  
 **FLAMYS LENA DO NASCIMENTO SILVA**  
Data: 18/12/2023 18:28:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Flamys Lena do Nascimento Silva**  
**Universidade Federal do Norte do Tocantins**

Araguaína – TO, 08 de dezembro de 2023

## DEDICATÓRIA

O presente trabalho é dedicado à minha querida mamãe Fabiana Aparecida de Lima (*in memoriam*), que sempre me apoiou, nunca perdeu a fé nos meus sonhos e cuidou de mim até o último instante de sua vida. Sua lembrança me inspira e me faz persistir. Saudades eterna.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à minha mãe, por tudo que sempre fez por mim, todas as lutas e os incentivos, pois sem ela não estaria concluindo o curso de Licenciatura em Química na Universidade Federal do Norte do Tocantins, campus Araguaína (UFNT).

Ao Prof. Dr. Daniel Barbosa Alcântara, pela orientação, atenção, preocupação, incentivo e aconselhamentos durante todo esse período.

Agradeço também ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, financiado pelo CNPq, o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência, financiado pela CAPES, ao Programa Alvorecer – Química e o Programa de Educação Tutorial – Ciências Naturais (PETCNat), financiado pelo FNDE, dos quais fiz parte.

Agradeço ao grupo PETCNat por ter contribuído à minha formação inicial por meio da interdisciplinaridade entre os cursos de Física, Química e Biologia, aos momentos do cafezinho no PET e agradeço ao prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano pela oportunidade de ter feito parte dessa família.

A profa. Me. Josilâna Silva Nogueira, prof. Dr. Francisco das Chagas Dantas Lemos, prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva e a profa. Me. Luciane Jatobá Palmieri, que contribuíram muito para minha formação acadêmica e cidadã.

Aos professores do colegiado de Química, sem eles não seria possível o aprendizado com qualidade: Profa. Dra. Adriana Idalina Torcato de Oliveira, prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira, prof. Dr. Daniel Barbosa de Alcântara, prof. Dr. Edenilson dos Santos Nicolau, profa. Dra. Flamys Lena do Nascimento Silva, prof. Dr. Francisco das Chagas Dantas de Lemos, profa. Dra. Jane Darley Alves dos Santos, prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva, profa. Me. Josilâna Silva Nogueira, profa. Me. Luciane Jatobá Palmieri, profa. Dra. Renata Ferreira Lins da Silva e a profa. Dra. Verenna Barbosa Gomes, obrigado a todos.

Aos técnicos do laboratório de Química, Gilberto Conceição Amorim e Gildeth Pereira de Oliveira.

Agradeço às pessoas que sempre estiveram ao meu lado nesses últimos anos, em especial meus amigos(as) Arthur Lima de Arruda, Bianca Gomes Santos, Levy Rodrigues de Sousa, Lucas Emanuel Oliveira Sabino, Luis Vinicius Alencar Cunha, Margarida Rodrigues Macedo, Mateus Souza Silva, Talita Duarte Guimarães. Em destaque, ao meu grande amigo Paulo Vitor Gonçalves de Souza Oliveira e Ronilson Sousa Santos, que sempre me fizeram acreditar que posso chegar longe.

À minha noiva Brenda dos Santos Barbosa, que esteve presente comigo durante a jornada acadêmica, me incentivou, deu apoio e muito carinho. Obrigado, amor da minha vida, por aguentar tantas crises e estresses.

Aos meus irmãos Ana Julia de Lima Bezerra, Melissa de Lima Bezerra e Samuel de Lima Bezerra, que me encorajam a sempre ser uma pessoa melhor.

A coordenação do Laboratório de Cromatografia Gasosa (LabCrom) pela cessão do espaço laboratorial e o Laboratório de Análise de Traços (LAT) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela doação dos reagentes do *QuEChERS*, água MiliQ e o Padrão analítico do pesticida investigado.

Agradeço também á equipe do Monumento Natural das Árvores Fossilizadas pelo apoio na realização da coleta das amostras.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação, muitíssimo obrigado por tudo!

## RESUMO

O presente trabalho trata do desenvolvimento de métodos analíticos com a finalidade de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos é de suma importância para assegurar os limites máximos permitidos, visando a saúde humana. Entretanto, o monitoramento de resíduos de pesticidas em águas superficiais tem sido pouco explorado, pois apresenta desafios. A presença de interferentes e as baixas concentrações dos analitos demanda o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas. O método *QuEChERS* é um método de extração em fase sólida (s-SPE) usado para o preparo de amostras tem sido muito bem explorada em matriz de alimento, porém, pouco utilizada em matriz líquida. A aplicação de métodos para análise de insumos em água é de suma importância para controle ambiental e preservação da saúde humana. Assim, este trabalho aborda a otimização das condições cromatográficas para a determinação do pesticida *Ametryn* por CG-EM no modo *SCAN*. Inicialmente, as condições geraram ruído excessivo, levando a ajustes que resultaram em melhorias significativas. A mudança para o modo *SIM* aumentou a seletividade e a sensibilidade, destacando o *Ametryn*. A validação do método verificou a linearidade, com uma curva de calibração no solvente e na matriz, evidenciando uma boa linearidade. O efeito matriz foi analisado, revelando uma influência considerável na intensidade do sinal. Testes estatísticos confirmaram a significância da regressão linear e dos parâmetros de calibração. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados, apresentando uma maior sensibilidade na matriz. A precisão foi pelo método da repetitividade, avaliando o CV% e a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, demonstrando resultados dentro dos limites aceitáveis. A aplicação do método em amostras reais de água não revelou resíduos de *Ametryn*, mas identificou o composto 2,4-Di-tert-butylphenol, possivelmente um subproduto da degradação do herbicida organoclorado Pentaclorofenol. Este estudo contribui para o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes na detecção de pesticidas, abordando aspectos cruciais como seletividade, linearidade e efeitos da matriz, além de fornecer informações relevantes sobre subprodutos de degradação.

**Palavras-chave:** Pesticida. *QuEChERS* adaptado. Cromatografia. Analito.



## ***ABSTRACT***

The present work deals with the development of analytical methods for monitoring pesticide residues in food, which is of paramount importance to ensure compliance with permitted maximum limits and safeguard human health. However, the monitoring of pesticide residues in surface waters has been less explored due to various challenges. The presence of interferents and low analyte concentrations necessitates the development of increasingly sensitive and selective analytical techniques. The QuEChERS method, a solid-phase extraction (s-SPE) technique commonly used for sample preparation, has been extensively applied in food matrices but is less utilized in liquid matrices. The application of methods for analyzing water inputs is crucial for environmental control and human health preservation. This study focuses on optimizing chromatographic conditions for the determination of the pesticide Ametryn by GC-MS in SCAN mode. Initially, the conditions resulted in excessive noise, leading to adjustments that brought about significant improvements. Switching to the SIM mode increased selectivity and sensitivity, highlighting Ametryn. Method validation confirmed linearity, with a calibration curve in both solvent and matrix, demonstrating good linearity. Matrix effects were analyzed, revealing a considerable influence on signal intensity. Statistical tests confirmed the significance of linear regression and calibration parameters. Detection and quantification limits were determined, showing higher sensitivity in the matrix. Precision was assessed through repeatability using the CV%, and accuracy was evaluated through recovery tests, demonstrating results within acceptable limits. The method applied to real water samples did not reveal Ametryn residues but identified the compound 2,4-Di-tert-butylphenol, possibly a byproduct of the degradation of the organochlorine herbicide Pentachlorophenol. This study contributes to the development of efficient analytical methods for pesticide detection, addressing crucial aspects such as selectivity, linearity, and matrix effects, while also providing relevant information on degradation byproducts.

**Keywords:** Pesticide. Adapted QuEChERS. Chromatography. Analyte.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Determinantes para a contaminação do solo na zona não-saturada. ....	25
Figura 2 – Método <i>QuEChERS</i> original. ....	28
Figura 3 – a) Mapa dos Pontos de amostragem; b) Nascente (P1); c) Córrego (P2); d) Lago (P3) .....	39
Figura 4 – Ilustração do procedimento de extração da amostra pelo método <i>QuEChERS</i> adaptado. ....	41
Figura 5 – a) Agitador vortex; b) Extrato obtido; c) Aparelho MTD utilizado. ....	42
Figura 6 – CG/EM utilizado para o estudo. ....	43
Figura 7 – Ponto de amostragem da matriz de água superficial. ....	44
Figura 8 – Cromatograma com os parâmetros iniciais do padrão <i>Ametryn</i> a 3 mg L <sup>-1</sup> em MeOH obtido por CG-EM, modo <i>SCAN</i> de monitoramento e seu espectro de massas. ....	48
Figura 9 – Cromatograma com os parâmetros finais do padrão <i>Ametryn</i> a 3 mg L <sup>-1</sup> em MeOH obtido por CG-EM, modo <i>SCAN</i> de monitoramento, e seu espectro de massas. ....	49
Figura 10 – a) Cromatograma no modo <i>SCAN</i> ausente do AMT, b) Cromatograma no modo <i>SCAN</i> com adição do AMT. ....	50
Figura 11 – Espectro de massas com adição do AMT. ....	52
Figura 12 – Cromatograma no modo <i>SIM</i> do AMT. ....	53
Figura 13 – Curva de Calibração no Solvente. ....	54
Figura 14 – Verificação de <i>outliers</i> . ....	55
Figura 15 – Curva de Calibração no Extrato. ....	56
Figura 16 - Curvas de Calibração no Solvente e Matriz, com seus respectivos coeficientes de correlação, equação da reta e cálculo do EM. ....	57
Figura 17 – Adsorção dos pesticidas nos sítios ativos do <i>liner</i> . A) Analito injetado na ausência dos componentes da matriz. B) Pesticidas injetados com o extrato da matriz. ....	58
Figura 18 – Cromatograma no modo <i>SCAN</i> da amostra P1, em destaque é apresentado o pico relevante. ....	66
Figura 19 – Espectro de Massas do a) P1; b) P2 e c) P3. ....	67
Figura 20 – Estrutura do Pentaclorofenol. ....	68
Figura 21 – Estrutura do 2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol. ....	68
Figura 22 – Proposta de fragmentação para o íon 191 <i>m/z</i> . ....	69
Figura 23 – Proposta de fragmentação para o íon 41 <i>m/z</i> . ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos pesticidas em função da toxicidade aguda oral (DL50). .....	22
Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas, estrutura química, classe quanto a praga que combate, massa molecular, classificação toxicológica, IDA e grupo químico do <i>Ametryn</i> . ....	23
Tabela 3 – Exemplo do uso do método <i>QuEChERS</i> para a determinação de pesticidas. ....	30
Tabela 4 – Valores de Concentrações para as curvas analíticas. ....	45
Tabela 5 – Teste de linearidade e significância da curva analítica preparada na matriz, considerando um nível de significância de 95% para o valor de $F_{tab}$ e $t_{tab}$ . ....	61
Tabela 6 – Área do pico cromatográfico do AMT em cinco níveis de concentração ( $n = 3$ ) com seus respectivos desvios padrões e precisão em termos de CV%, no solvente. ....	63
Tabela 7 – Área do pico cromatográfico do AMT em cinco níveis de concentração com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos de CV%, na matriz. ....	64
Tabela 8 – Percentuais de recuperação do AMT em três níveis de fortificação ( $n = 5$ , intra-ensaio) com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos do CV. ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g} / \text{Kg}$	Microgramas por Quilograma
$\mu\text{g} / \text{L}$	Microgramas por Litro
ACN	Acetonitrila
AERU	Unidade de Pesquisa de Agricultura e Meio Ambiente
AMT	<i>Ametryn</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	Atrazina
CESTE	Consórcio Estreito Energia
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplado à Espectrometria de Massas
<i>clean up</i>	Partição e Limpeza
CV%	Coefficiente de Variação
d.i	Diâmetro Interno
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DF	Decompõe-se Antes de Ferver
DL <sub>50</sub>	Dose Letal para 50% da População Exposta
d-SPE	Extração Dispersiva em Fase Sólida
EM	Efeito Matriz
HCl	Ácido Clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IE	Íon Extraído
IQR	Intervalo Interquartil
Koc	Coefficiente de adsorção
Kow	Coefficiente de Partição Octanol-Água
LabCrom	Laboratório de Cromatografia
LD	Limite de Detecção
<i>liner</i>	Tubo de Vidro
L-Inf	Limite Inferior
LQ	Limite de Quantificação
L-Sup	Limite Superior
<i>m/z</i>	Massa/Carga
MeOH	Metanol

mg / Kg	Miligramas por Quilogramas
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio Anidro
MONAF	Monumento Natural das Árvores Fossilizadas do Estado do Tocantins
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
N° CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OIT	Organização Internacional do Trabalho
p.c	Peso Corpóreo.
PCP	Pentaclorofenol
PD	Ponto de Decomposição
PE	Ponto de Ebulição
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
PV	Pressão de Vapor
<i>QuEChERS</i>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
R	Coeficiente de Correlação Linear de Pearson
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
RSD%	Desvio Padrão Relativo
s	Desvio Padrão Absoluto
SCAN	<i>Full Scan</i>
<i>SIM</i>	<i>Selected Ion Monitoring</i>
TCP	2,4,6-Triclorofenol
TIC	Íons Totais
UC	Unidade de Conservação
UFNT	Universidade Federal do Norte do Tocantins

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Pesticidas.....</b>	<b>21</b>
3.1.1 <i>Ametryn</i> .....	22
<b>3.2 Presença de Pesticidas em Águas Naturais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Método <i>QuEChERS</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Validação do Método .....</b>	<b>31</b>
3.4.1 Efeito Matriz .....	31
3.4.2 Linearidade.....	31
3.4.3 Sensibilidade .....	32
3.4.3.1 <i>Limite de Detecção</i> .....	32
3.4.3.2 <i>Limite de Quantificação</i> .....	33
3.4.4 Seletividade .....	33
3.4.5 Exatidão.....	34
3.4.6 Precisão .....	35
3.4.7 Robustez.....	36
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Materiais e Reagentes .....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Materiais.....	37
4.1.2 Reagentes .....	37
<b>4.2 Amostragem .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Preparo das Soluções Padrão.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Procedimento de extração pelo método <i>QuEChERS</i> adaptado .....</b>	<b>40</b>

<b>4.5 Condições Cromatográficas .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 Validação da Metodologia Analítica .....</b>	<b>43</b>
4.6.1 Efeito Matriz .....	44
4.6.2 Seletividade .....	45
4.6.3 Linearidade.....	45
4.6.4 Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ) .....	46
4.6.5 Precisão .....	46
4.6.6 Exatidão.....	46
<b>4.7 Concentração em Amostras Reais.....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Análise cromatográfica por CG-EM.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Validação do Método .....</b>	<b>50</b>
5.2.1 Seletividade .....	50
5.2.2 Linearidade.....	53
5.2.3 Efeito Matriz .....	56
5.2.4 Teste de Validação da Análise de Regressão Linear e Significância dos Parâmetros de Calibração.....	59
5.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	62
5.2.6 Precisão e Exatidão por meio dos Ensaios de Recuperação.....	63
<b>5.3 Análise Qualitativa e Quantitativa de Amostras de Água .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura, conjunto de atividades de cultivo de plantas e criação de gados, surgiu na pré-história com a existência do ser humano, mais especificamente no período neolítico. Neste período, o homem não utilizava de meios técnicos para o cultivo de plantas, ele consumia e sobrevivia do que a própria natureza oferecia. Portanto, sua sobrevivência dependia da caça, coleta de grãos e frutas. Dessa forma eram nômades e viviam nas cavernas em grupos, em que os homens tinham como principais tarefas a caça e a pesca, enquanto as mulheres eram responsáveis pelo preparo dos alimentos e pela coleta de grãos e frutos (PEREIRA, 2013).

No decorrer da história, por volta do IV milênio a.C., oásis localizados pelo longo curso dos rios Tigre e Eufrates na Mesopotâmia, e do rio Nilo no Egito, formaram-se as primeiras civilizações urbanas por conta de seus enormes potenciais agrícolas. Na Mesopotâmia viveram os sumérios, acádios e assírios, enquanto no Egito os egípcios. As terras dessas regiões eram muito férteis, pois por conta das inundações recorrentes dos rios traziam para a terra o limo (matéria orgânica e água), que propicia a agricultura pois é um excelente fertilizante natural (ABIKO; ALMEIDA; BARREIROS, 1995).

Dessa forma, foram cultivados diversos cereais na região, como por exemplo o trigo, a aveia, o centeio, o arroz e o milho, além de plantas frutíferas como uvas, melões, mangas, laranjas e morangos, culminando em ótimas colheitas. Ademais, por conta do terreno aberto, as exportações e as notícias eram favorecidas, as quais facilitam a comunicação entre os povos (ABIKO; ALMEIDA; BARREIROS, 1995).

Ao passar dos anos, as técnicas agrícolas foram aprimoradas e as áreas de cultivo foram se ampliando cada vez mais. Em vista disso, a introdução de metais na construção de roda, do carro puxado pelos bois, o uso de burro de carga e as embarcações à vela e remo, proporcionou o desenvolvimento dessas regiões no ramo da agricultura e exportação (ABIKO; ALMEIDA; BARREIROS, 1995). Portanto, a partir do IV milênio, as cidades localizadas nas planícies aluviais do Egito começaram a ser o centro de uma nova economia, na qual houve o aumento agrícola e populacional, o mesmo não ocorreu na Europa por possuírem campos inférteis, não se desenvolvendo assim a agricultura (ABIKO; ALMEIDA; BARREIROS, 1995).

Até o ano de 1500 a visão de mundo dominante na Europa, e até mesmo no restante do mundo, era de uma agricultura de origem orgânica. A visão da agricultura mudou drasticamente



nos séculos XVI e XVII, substituindo-a pela noção do mundo da máquina, havendo mudanças revolucionárias, visões essas causadas por ideias científicas (PINOTTI; SANTOS, 2013).

Por volta de 1940 a 1970 houve a revolução verde, que a partir da comercialização rural, fertilização, irrigação e uso de insumos agrícolas, possibilitou o crescimento significativamente da produção de grãos em países desenvolvidos. Ela proporcionou mudanças no processo de produção agrícola, nos impactos dessas atividades sobre o meio ambiente e na saúde humana. As novas tecnologias, a maioria baseadas em extensivos de agentes químicos, foram disponibilizadas aos agricultores para o aumento da produtividade por meio do controle de doenças e da proteção contra pragas (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Esses insumos, conhecidos como pesticidas, empregados para o aumento da produtividade, são produtos químicos sintéticos utilizados em práticas agrícolas (plantações, produção, limpeza e preparo do solo) e não agrícolas (florestas primitivas e até mesmo outros ecossistemas como lagos e represas). A finalidade é matar insetos, larvas, fungos e outros organismos, facilitar o controle dos danos causados direta ou indiretamente, possibilitar o crescimento da vegetação rural e urbana e ainda manter o controle de algumas doenças e zoonoses (BRASIL, 2002; INCA, 2021).

No entanto, segundo a Organização Internacional do Trabalho (OIT), os pesticidas são responsáveis por 70.000 casos de intoxicações agudas e crônicas, levando inclusive à óbito, além de aproximadamente 7 milhões de casos não fatais de doenças agudas e crônicas a cada ano (INCA, 2021).

Infelizmente, desde 2008, o agronegócio brasileiro consome grandes quantidades de pesticidas, alguns com moléculas que não são mais utilizadas em outros países, mas podem ser encontradas no Brasil por meio de vendas ilegais. Além disso, dependendo do tipo de insumo utilizado, do tempo de exposição e até mesmo da quantidade absorvida pelo organismo, pode causar doenças (CARNEIRO *et al.*, 2015; INCA, 2021).

No Brasil, a prática de utilização de pesticidas e o controle de sua presença no ambiente são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Sua finalidade institucional é contribuir para a proteção da saúde das pessoas, por meio do controle sanitário da produção, consumo de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, incluindo o meio ambiente, processos, insumos e tecnologias à ela associados, controle dos pontos de entrada, aeroportos, zonas fronteiriças e alfandegárias (ANVISA, 2021).

Assim, para a determinação dos pesticidas no ambiente e seu controle, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos multirresíduos de insumos em diferentes matrizes. No entanto, por apresentarem baixas concentrações do analito na matriz, a complexidade das diferentes matrizes e suas propriedades químicas distintas, há a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra (CHEN *et al.*, 2008). Portanto, o principal objetivo do preparo de amostras é facilitar a extração, o enriquecimento dos analitos de interesse e remover o máximo de interferentes possíveis. Dessa forma, o preparo de amostras é de suma importância dentro de todo o processo analítico (CHEN *et al.*, 2008).

O primeiro método multirresíduo para a extração de pesticidas foi desenvolvido por volta de 1960 por Mill *et al.*, e durante os anos de 1990 houve um grande desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para a extração com a redução do volume do solvente utilizado (FRENICH *et al.*, 2005). Destes novos métodos de extração, podemos citar a Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), a qual tem sido empregada com frequência na etapa de purificação do extrato em amostras de alimentos (PICÓ *et al.*, 2007). Foram desenvolvidos nessa mesma época outros métodos com o objetivo de simplificação de etapas da extração, podemos citar como por exemplo, Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispercion, MSPD*) e Micro Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Micro Extraction, SPME*) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

Destaca-se também o método por Extração Sortiva em Barra Magnética (*Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE*), a Extração por Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction, SFE*), a Extração Acelerada por Solventes (*Pressurized Liquid Extraction, PLE*) e Extração Assistida por Micro-Ondas (*Micro-Wave Assisted Extraction, MAE*), tais métodos são exemplos de metodologias utilizadas para análises, os quais apresentam elevada eficiência (MENDIOLA *et al.*, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2005). No entanto, geralmente demandam grande investimento de instrumentação e apresentam aplicabilidade a um limitado número de pesticidas que podem ser extraídos sob determinadas condições. Assim, estes procedimentos de extração não são tão ideais para um método de multirresíduo (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

Portanto de acordo com Hercegová *et al.* (2007), um método multirresíduo utilizado para o preparo de amostras com finalidade de analisar diferentes pesticidas deve apresentar propriedades como recuperações próximas de 100%, remover possíveis interferentes da amostra, abranger maior número de analitos, possuir boa precisão e exatidão, baixo custo, ser robusto, possuir facilidade e segurança em todo processo de preparo de amostras.

Em vista disto, o método de extração *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (*QuEChERS*) é extensamente utilizado na análise de pesticidas. Em resumo, o processo possui duas etapas, primeiramente a extração com solvente e a partição das fases com sais, posteriormente, há a limpeza do extrato usando a extração dispersiva em fase sólida (d-SPE) (KIM *et al.*, 2019). Segundo os mesmos autores, ao se comparar a outros métodos, o *QuEChERS* se destaca por sua simplicidade e rapidez do procedimento, além de proporcionar excelente validação do método analítico, como por exemplo ótimos parâmetros de recuperação. Vale destacar que o *QuEChERS* possui boa compatibilidade com técnicas cromatográficas, sejam elas gasosas ou líquidas (KIM *et al.*, 2019).

Assim, de acordo com o Governo do Estado do Tocantins, a Lei Nº 1116 de dezembro de 1999 do Art. 2º tem como objetivo criar Unidades de Conservação (UC) específicas, na qual foi desenvolvido o Monumento Natural das Árvores Fossilizadas do Estado do Tocantins (MONAF), com a finalidade de proteger nascentes d'água e seus percursos, a fauna e a flora, de tal modo que possa garantir seus benefícios de forma sustentável e semelhante à conservação dos ecossistemas locais.

Contudo, a existência de assentamentos e reassentamentos do Consórcio Estreito Energia (CESTE), aos arredores do MONAF, possibilita a criação de gado em uma pequena quantidade e o cultivo de alimentos como hortaliças, feijão, mandioca, milho, farinha e frutas, podendo ocasionar a contaminação das águas subterrâneas e superficiais ao redor.

Os agricultores assentados têm como o principal objetivo o cultivo, para eles o plantio é o que os mantém, tanto fisicamente como financeiramente. Portanto, tomados por ideias fictícias para o enriquecimento e somando a falta de informação, a utilização de defensivos agrícolas pode ser constantemente utilizada (MIRANDA; OLIVEIRA, 2019).

Nesse contexto, surgiu a necessidade de investigar as concentrações do pesticida *Ametryn* (AMT) no Ribeirão Grotão (por se tratar de uma nascente) no município de Filadélfia – TO, dentro dos limites da UC – MONAF, visando as quantidades máximas permitidas em água conforme a Portaria de Consolidação GM/MS nº 888 do Diário Oficial da União de 2021, sendo este valor de 60 microgramas por litro ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar um método analítico para análise qualitativa e quantitativa do pesticida *Ametryn* (AMT) em água, por *QuEChERS* adaptado e Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM).

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Desenvolver e validar um método para análise do pesticida AMT por método *QuEChERS* adaptado e CG-EM;
- ❖ Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de água do Riacho Grotão, localizado no distrito de Bielândia – TO;
- ❖ Contribuir com resultados e comparar com os limites máximos permitidos pela literatura;
- ❖ Verificar possíveis contaminações por outros contaminantes emergentes.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Pesticidas

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), os pesticidas são conceituados como substâncias que possuem diferentes funções. Conforme seu modo de ação podem ser denominados de herbicidas (combate ervas daninhas), fungicidas (combate de fungos), inseticidas (combate à insetos), nematicidas (combate à microfauna do solo), moluscidas (moluscos), entre outros. Vale destacar que substâncias usadas como desfolhantes, dessecantes e inibidores de crescimento podem ser consideradas pesticidas (BRASIL, 1989).

De acordo com a Lei Federal 7.802, de 11 de julho de 1989, os pesticidas são produtos e agentes químicos, físicos e biológicos, nos quais são utilizados para a produção, armazenamento, pastagens, proteção de florestas e outros ecossistemas, hídricos e indústria, e tem como finalidade alterar a composição da flora e fauna, proporcionando a preservação das ações danosas de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

Esses insumos desenvolvem um papel fundamental na produtividade agrícola e têm como finalidade evitar perdas econômicas e escassez de alimentos. Embora sua grande importância no controle de pragas na agricultura, eles causam impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana (SHINOHARA *et al.*, 2017). Portanto, a comunidade científica busca determinar a existência desses insumos no meio ambiente e seus respectivos comportamentos em diferentes matrizes.

Os pesticidas possuem diversas maneiras de serem classificados, por seu modo de ação, sua estrutura química, seus efeitos causadores à saúde humana, sua toxicidade e outros. Sua classificação segundo o grau de toxicidade para o ser humano é extremamente importante, relacionando com a Dose Letal para 50% da população exposta (DL50) (SAVOY, 2011). Os efeitos prejudiciais causados por substâncias químicas em determinados organismos referentes a toxicidade são mensurados por parâmetros como os testes ecotoxicológicos baseados nas espécies de interesse, denominados de DL50, o qual representa a quantidade de um princípio ativo que está associado com a mortalidade de 50% da população testada após o contato ou ingestão do produto em um intervalo de 48 horas (BRASÍLIA, 2020).

Os efeitos à saúde humana atribuídos pelos insumos são amplamente investigados, estudos informam que a quantidade e duração de exposição, nível de exposição, a influência de fatores ambientais, temperatura, umidade e níveis de ventilação podem ocasionar problemas

respiratórios, pulmonares, reprodutivos, hormonais, neurológicos e de pele (AMOATEY *et al.*, 2020).

Assim, de acordo com o Art. 39 da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 294, de 29 de julho de 2019, tem-se as classificações dos defensivos agrícolas segundo a ANVISA mediante a sua toxicidade aguda: extremamente tóxicos (Classe I), altamente tóxicos (Classe II), moderadamente tóxicos (Classe III), pouco tóxicos (Classe IV), improvável de causar dano agudo (Classe V) e não classificados (Classe VI). As classificações dos pesticidas são esquematizadas na tabela 1 conforme a DL50 (ANVISA, 2019).

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos pesticidas em função da toxicidade aguda oral (DL50).

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL <sub>50</sub> / (mg/Kg p.c.)	Faixa Colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Vermelha
III	Moderadamente tóxico	Entre 50 e 300	Amarela
IV	Pouco tóxico	Entre 300 e 2000	Azul
V	Improvável de causar dano agudo	Entre 2000 e 5000	Azul
VI	Não classificado	> 5000	Verde

Fonte: ANVISA (2019), modificado pelo autor.

### 3.1.1 Ametryn

Os herbicidas são substâncias com variáveis princípios ativos, como por exemplo o Glifosato, Atrazina (ATZ), Paragat, Diuron e *Ametryn* (AMT), dentre outros, usados em todo o mundo para controle de ervas daninhas. Entretanto, estes compostos e seus produtos de degradação apresentam graus variados de conservação e estabilidade no ambiente, ao potencial

tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico, bem como efeitos nocivos nos sistemas endócrinos de organismos não-alvo, incluindo os seres humanos (SHATTAR *et al.*, 2017).

O herbicida *Ametryn* (AMT, 2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-3-1,3,5-triazina), membro da família química das triazinas, é um pesticida de ação sistêmica amplamente utilizado na prevenção pré e pós-emergência de ervas daninhas em plantações de milho, cana-de-açúcar, banana, café, abacaxi, algodão, citros, mandioca e uva (SZEWCZYK *et al.*, 2018; ANVISA, 2021).

Segundo a ANVISA (2021), o AMT é classificado como moderadamente tóxico (Classe III), apresentando toxicidade a peixes, grandes mamíferos e humanos. Portanto, devido a sua toxicidade, grau de conservação e estabilidade no ambiente, riscos à saúde humana e ambiental, o AMT é classificado como poluente químico com necessidade de monitoramento (JACOMINI *et al.*, 2009).

À luz destes eventos, podemos observar algumas informações relevantes referente ao AMT na tabela 2: as propriedades físico-químicas, grupo químico, estrutura química, classe quanto a natureza da praga combatida, classificação toxicológica e seu índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA), segundo a ANVISA (2021).

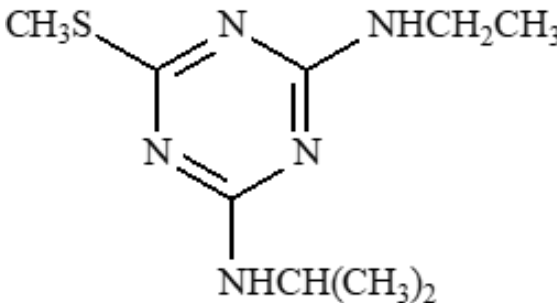
Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas, estrutura química, classe quanto a praga que combate, massa molecular, classificação toxicológica, IDA e grupo químico do *Ametryn*.

<b>Grupo Químico</b>	Triazina
<b>PE / °C</b>	337
<b>PD / °C</b>	-
<b>PV / mPa a 25 °C</b>	0,365
<b>Log Kow (pH = 7 a 20 °C)</b>	2,63

Fonte: Unidade de Pesquisa de Agricultura e Meio Ambiente (AERU) da Universidade de Hertfordshire.

\*(-) Não informado; DF: Decompõe-se antes de ferver; PD: Ponto de Decomposição; PE: Ponto de Ebulição; PV: Pressão de Vapor e Kow: Coeficiente de partição octanol-água.

Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas, estrutura química, classe quanto a praga que combate, massa molecular, classificação toxicológica, IDA e grupo químico do *Ametryn*.

<b>Estrutura química</b>	
<b>Massa Molar (g/mol)</b>	227,33
<b>Classe</b>	Herbicida
<b>Classificação toxicológica</b>	III
<b>IDA / (mg / Kg p.c)</b>	0,009

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2021), modificado pelo autor (2022).

IDA: Ingestão Diária Aceitável; p.c: Peso corpóreo.

Vale destacar, de acordo com *Pesticide Action Network – North America* (2023), que o AMT possui propriedades como meia vida aeróbia no solo de 37 dias, coeficiente de adsorção (Koc) de 245,0 e potencial contaminante de solo, águas subterrâneas e superficiais.

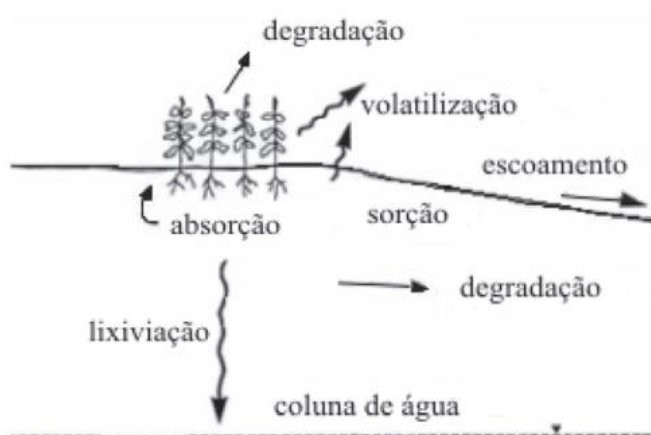
### 3.2 Presença de Pesticidas em Águas Naturais

Os recursos hídricos vêm sendo, ao longo dos anos, contaminados por substâncias químicas, trazendo assim grandes problemas referente ao suprimento de água potável. Isto torna-a mais cara e em menor quantidade, apontando zonas mais desenvolvidas como as principais contaminadoras, onde o uso de pesticidas é de maior abundância. Dessa forma, os recursos hídricos, o solo e os alimentos, podem ser monitorados através de programas, com o objetivo de minimizar a contaminação (VIGNA *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2012).



Em qualquer região os recursos hídricos estão incluídos, agindo nos processos biogeoquímicos, em águas superficiais ou até mesmo subterrâneas. A introdução de pesticidas ao meio ambiente tem como principal destino final os recursos hídricos. As principais formas de transporte pelos quais os pesticidas passam para o ambiente podem ser categorizadas por volatilização, degradação, lixiviação, sorção, absorção por plantas e escoamento (figura 1) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Figura 1 – Determinantes para a contaminação do solo na zona não-saturada.



Fonte: Ribeiro et al (2007).

A volatilização é a transferência dos pesticidas presentes no solo ou plantas para a atmosfera de forma gasosa, já a lixiviação é o processo de transportação dos insumos através do solo juntamente com a chuva, e por fim, o escoamento superficial corresponde pelo transporte desses defensivos agrícolas pela água que escoar na superfície, o qual poderá ter como seu destino final os corpos hídricos (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011).

Dessa forma, por qualquer um desses transportes, grande parte dos pesticidas tem como destino final as águas superficiais. Portanto, estudos têm sido feitos com o intuito de detectar tais compostos nesse tipo de matriz. Vale destacar o trabalho de Ribeiro *et al.* (2013), onde os pesquisadores avaliaram 16 compostos em águas superficiais na área da nascente degradada do Rio São Lourenço – MT. Dos pesticidas avaliados, detectaram carbendazim ( $12 \mu\text{g L}^{-1}$ ), acetamiprime ( $23,61 \mu\text{g L}^{-1}$ ), carbofurano ( $35,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ), epoxiconazol, piraclostrobim e tiaclororide.

Podemos citar também o estudo feito por Alves *et al.* (2010), que teve como foco analisar pesticidas organoclorados nos recursos hídricos de Goiás. Os mesmos analisaram 174 amostras de águas superficiais, correspondendo a 167 municípios. Pesticidas como aldrin, mirex, Dicloro-Difenil-Tricloroetano, lindano, clordano, hexaclorobenzeno, endrin, Dicloro-Difenil-Dicloroetano e metoxicloro foram encontrados nas amostras, em maior quantidade o aldrin e o mirex. Vale ressaltar que os autores destacam a proibição do uso de organoclorados e mesmo assim foram encontrados em grandes níveis nos recursos hídricos da região na qual foi o foco de análise.

Por fim, destaca-se os trabalhos de Jacomini *et al.* (2009) e Lewis *et al.* (2009), os quais analisaram amostras de águas superficiais perto de plantações de cana-de-açúcar. Os dois trabalhos detectaram o composto AMT a  $50 \text{ ng L}^{-1}$  e os autores evidenciam a contaminação do ecossistema por AMT devido ao seu uso nas atividades agrícolas, e uma vez que os resíduos do pesticida estejam introduzidos em águas residuárias, seu tratamento é extremamente difícil.

### 3.3 Método *QuEChERS*

O método *QuEChERS* foi apresentado em 2003 por Anastassiades *et al.* (2003), sendo amplamente utilizado para a determinação de pesticidas em amostras de alimentos. O método veio com a finalidade de minimizar os volumes de solventes utilizados nos métodos de extração.

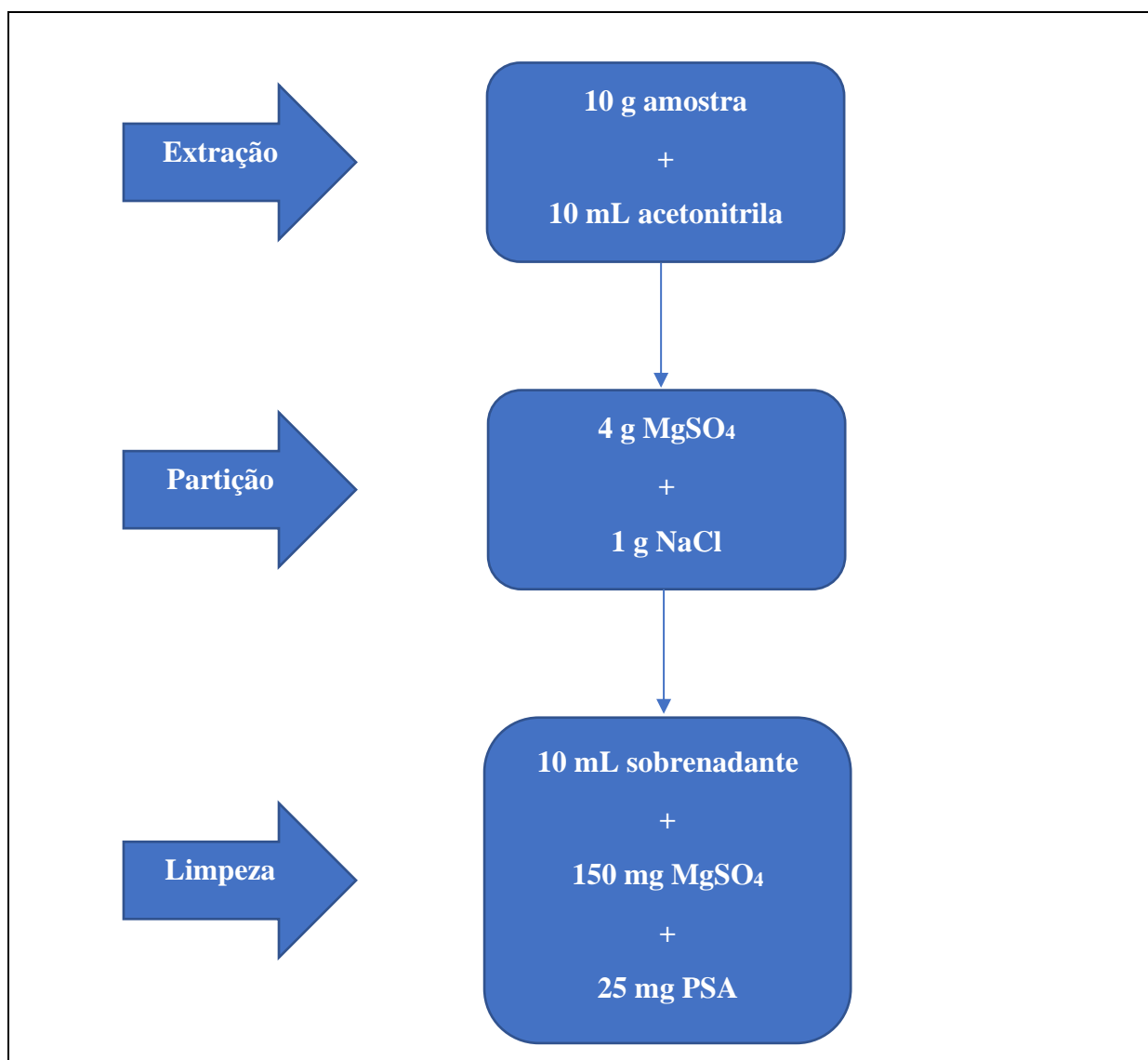
O método proposto por Anastassiades *et al.* (2003) é composto por apenas três etapas, são elas, extração, partição e limpeza (*clean up*). Assim como outros procedimentos de extração, há a utilização de solventes e agentes com a finalidade de clarificar, como sais e adsorventes, os quais interagem com a matriz clareando o analito e eliminando os interferentes.

Uma das prioridades fundamentais no desenvolvimento de um método de extração é a escolha do solvente a ser utilizado, que deve ser de forma adequada. Características como seletividade durante a extração, partição, limpeza apresentando poucos co-extrativos, a compatibilidade com técnicas cromatográficas e custeio baixo, devem ser consideradas (PRESTES *et al.*, 2009). Por apresentar tais características e além de ser miscível em água, a Acetonitrila (ACN) possui um amplo espectro de utilização, sendo um solvente que facilita a separação por *salting out* e é a escolhida como solvente de extração para o método *QuEChERS* (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; PERESTRELO *et al.*, 2019).

A adição de sais promove o efeito *salting out* na etapa de partição e sua utilização traz resultados no aumento de recuperação dos analitos polares, na adição de sais faz com que a solubilidade dos compostos na fase aquosa diminua, assim como a quantidade de água na fase orgânica. A adição de  $MgSO_4$  se dá pela sua capacidade e facilidade de remoção de água, quanto a outros sais. Vale ressaltar também que é altamente exotérmico, logo, há um aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante as duas primeiras etapas (extração e partição), fazendo com que a extração seja favorecida, tendo como foco os compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; PERESTRELO *et al.*, 2019).

A remoção de água residual e a etapa de *clean up* ocorrem simultaneamente pelo método de d-SPE. Esse método tem como finalidade a extração de co-extrativos da matriz, dentre eles ácidos graxos e outros compostos de caráter polar (PRESTES *et al.*, 2009; PERESTRELO *et al.*, 2019). Nessa última etapa é utilizada a *Primary Secondary Amine* (PSA), que consiste em grupamentos de amina primária e secundária, as quais possuem um efeito quelante elevado, afinidade e alta capacidade de remoção de ácidos orgânicos, ácidos graxos, açúcares e outros, utilizadas então para reduzir significativamente os efeitos de matriz (PRESTES *et al.*, 2009; PERESTRELO *et al.*, 2019).

Dessa forma, podemos observar o método original do *QuEChERS* proposto por Anastassiades *et al.* (2003), conforme a representação do esquema abaixo (Figura 2).

Figura 2 – Método *QuEChERS* original.

Fonte: Prestes *et al.* (2009), modificado pelo autor (2022).

Estudos envolvendo o método *QuEChERS* vêm sendo realizados em grande escala, com a finalidade de detectar pesticidas em matrizes de alimentos. Como é o caso do trabalho de Bedassa, Gure e Megersa (2015) que determinaram 6 pesticidas mutilasses em melancia, amostras de papaia e tomate.

Desde a elucidação do método *QuEChERS* original feita por Anastassiades *et al.* (2003), modificações têm sido realizadas para melhor performance, abrangendo a necessidade de cada amostra, bem como uma maior recuperação em matrizes com diferentes complexidades, assim como reduzir o efeito matriz (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Por conta de em casos específicos existirem problemas com a recuperação e em relação ao pH da amostra, modificações foram feitas. A primeira consiste na adição de citrato (PAYÁ *et al.*, 2007) e tampão acetato (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005) visando que o pH da solução ficasse entre 4 e 5, fazendo que assim, aumentasse a taxa de recuperação dos pesticidas que possuem sensibilidades entre ácido e base.

Uma segunda modificação do método ocorreu na fase de limpeza. Durante o d-SPE foi adicionado sílica C18, a mesma pode ser usada juntamente com PSA ou independente. Amostras com alto teor de lipídios interferem na recuperação, dessa forma, o uso da fase C18 era utilizado nessas condições, não afetando na recuperação dos pesticidas (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Apesar de sua reprodução em grande escala em matrizes sólidas para a quantificação de pesticidas, pouco é investigado e avaliado, até o presente momento, em análise de relevância ambiental, como por exemplo, águas superficiais ou subterrâneas. Pode-se destacar o trabalho de Brondi *et al.* (2011) que, utilizando o método *QuEChERS* e CG-EM para a quantificação de ATZ, fipronil e  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan em reservatórios de água destinadas ao abastecimento bovino, foi obtidos valores com precisão, exatidão e linearidade conforme os critérios propostos por órgãos regulamentadores. Após a validação do método, sua aplicação foi feita em amostras de águas e sedimentos, onde nenhum dos pesticidas analisados foram encontrados (BRONDI *et al.*, 2011).

Podemos observar na tabela 3 dados de alguns exemplos de aplicação do método *QuEChERS* conforme a literatura em diferentes matrizes.

Tabela 3 – Exemplo do uso do método *QuEChERS* para a determinação de pesticidas.

Compostos	Matriz	LD	LQ	RDS (%)	Método de detecção	Referência
8 pesticidas organofosforados	Sapoti	0,01-0,06 mg Kg <sup>-1</sup>	0,03-0,20 mg Kg <sup>-1</sup>	< 20	CG-EM	ALCÂNTA RA <i>et al.</i> , 2018
Protiofos, Oxadiargil e Gama-cialotrina	Água e Abacaxi	0,59-1,6 µg L <sup>-1</sup>	2-5,4 µg L <sup>-1</sup>	< 9	CG-EM	BUDAK <i>et al.</i> , 2020
216 pesticidas multiclasses e metabólitos	Solo	-	5-10	<17	CG-EM/EM	LOZOWIC KA; RUTKOW SKA; JANKOWS KA, 2017
14 pesticidas organoclorados	Açaí, Acerola, Goiaba e Graviola	0,85-4,97 µg Kg <sup>-1</sup>	2,83-16,58 µg Kg <sup>-1</sup>	69 a 110	CG-DCE	PAZ <i>et al.</i> , 2016
30 pesticidas	Leite	0,02-0,06 µg Kg <sup>-1</sup>	0,07-0,19 µg Kg <sup>-1</sup>	< 20	CL-DAD	REJCZAK; TUZIMSKI, 2017
Fenazaquina	Água e Tomate	0,05 ng mL <sup>-1</sup>	0,18 ng mL <sup>-1</sup>	3,4	CG-EM	TURAN, 2020

Fonte: Elaboração própria (2022).

\*(-) Não informado; ng/mL: nanogramas por mililitros; mg / Kg: miligramas por quilogramas; µg / Kg: microgramas por quilograma; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação e RDS: desvio padrão relativo.

### 3.4 Validação do Método

A validação de um método tem como objetivo garantir a confiabilidade dos resultados, com finalidade de atender exigências analíticas (ANVISA, 2003). Contudo, há a necessidade de fazer um planejamento referente a sua metodologia e respectivos objetivos a serem alcançados, antes mesmo da própria validação do método (INMETRO, 2020).

Quando se trata de confiabilidade dos resultados analíticos, deve-se observar diversos parâmetros para validar, dentre eles está o efeito matriz, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, seletividade, exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003; INMETRO, 2020).

#### 3.4.1 Efeito Matriz

O efeito matriz tem como finalidade analisar os analitos presentes na matriz, visando identificar os possíveis interferentes. É de suma importância sua verificação quando se trabalha com curva de calibração do analito em solvente, pois há a possibilidade da matriz interferir na pré-concentração, na extração, detenção ou separação do analito de interesse (ANVISA, 2017; MAPA, 2011).

Para a sua determinação, é necessário preparar uma curva de calibração do analito em solvente e no extrato da amostra, que deve ser isenta do analito, utilizando no mínimo cinco níveis de concentrações distintas em triplicada. Portanto, o efeito matriz é determinado através da comparação dos coeficientes angulares constituídos nas curvas de calibração do analito em solvente e com a matriz da amostra (ANVISA, 2017; MAPA, 2011).

#### 3.4.2 Linearidade

A linearidade representa a capacidade de um método analítico em prover os resultados obtidos diretamente proporcionais à concentração do analito em análise, dentro de um determinado intervalo (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

Para a análise dos resultados, deve-se proceder a partir de um gráfico, sendo a relação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração do analito, normalmente de acordo

com a equação da reta ( $y = a + bx$ ). Essa relação matemática, que determina a linearidade, pode ser expressa como uma reta chamada de curva analítica ou curva de calibração (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo os mesmos autores, para estabelecer a curva de calibração é necessário no mínimo cinco pontos com concentrações diferentes e que não incluem o zero na curva, por conta de possíveis importunos erros associados (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

### 3.4.3 Sensibilidade

#### 3.4.3.1 Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) é demonstrado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não obrigatoriamente quantificado com um valor exato (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

Em métodos não instrumentais, a determinação pode ser feita visualmente, no qual o LD é a menor quantidade que leva a uma mudança visualmente perceptível e que se difere do sinal analítico do ruído (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

Outra maneira de estimar o LD é por meio do método da relação sinal-ruído, que pode ser aplicado em análises que apresentam ruído na linha de base e é avaliado pela comparação de sinais analíticos obtidos para amostras contendo baixas concentrações do analito de interesse com o sinal do branco. Estima-se que, de certa forma, o valor aceitável seja uma relação sinal-ruído 3:1 ou 2:1 (RIBANI *et al.*, 2004).

E por fim, há como estimar o LD por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica. Dessa forma, para métodos cromatográficos e absorção atômica o LD pode ser estimado com base na relação de três vezes o sinal/ruído ou conforme a equação (1) (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

$$LD = \frac{\text{Desvio Padrão do Coeficiente Linear} \times 3}{\text{Inclinação da Curva de Calibração}} \quad (1)$$



### 3.4.3.2 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) é demonstrado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser quantificado com exatidão e precisão, sob condições experimentais estabelecidas. Assim como o LD, o LQ pode ser estimado utilizando os métodos visuais, a relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva de calibração (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

Por meio do método visual, o LQ é determinado mediante a análise de amostras contendo concentrações conhecidas do analito de interesse, correspondendo à menor concentração quantificada dentro dos parâmetros da precisão e exatidão do método (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

O método da relação sinal-ruído é utilizado para a determinação do LQ comparando o sinal analítico obtido de uma amostra contendo baixas concentrações do analito de interesse com uma amostra em branco, determinando assim a concentração mínima na qual a espécie de interesse pode ser quantificada com segurança. Geralmente, uma relação sinal-ruído de 10:1 é considerada aceitável (RIBANI *et al.*, 2004).

E por fim, podemos determiná-la baseando-se na curva analítica. Com os dados cromatográficos o LQ pode ser estimado com base na relação de dez vezes o sinal/ruído ou conforme a equação (2) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

$$LQ = \frac{\text{Desvio Padrão do Coeficiente Linear} \times 10}{\text{Inclinação da Curva de Calibração}} \quad (2)$$

### 3.4.4 Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método analítico tem de distinguir o analito alvo na presença de substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, as quais podem interferir nos resultados em amostras mais complexas. Tais substâncias podem afetar os resultados ou atuar como o próprio analito em questão, demonstrando sinais imprecisos dele. Dessa forma, a identidade do sinal do alvo de pesquisa deve ser confirmada, sendo necessário teste de identificação através da comparação de amostras isentas do analito de interesse e os resultados da amostra contendo-o. Assim, com o uso do espectrômetro de massas,

podemos comparar os resultados obtidos com o da biblioteca do aparelho (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

A espectrometria de massas é uma técnica na qual fornece o perfil de fragmentação de uma espécie química, sendo que cada fragmento possui uma relação massa/carga ( $m/z$ ), desde que apresentem carga elétrica diferente de zero. Esse equipamento apresenta características principais de altíssima sensibilidade, seletividade e exatidão (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Com os modos de análise presentes no espectrômetro de massas podemos analisar parâmetros específicos das amostras, como por exemplo o modo *selected ion monitoring (SIM)*, o qual é utilizado para monitoramento de um determinado íon (cátion) em espectrômetros de massas quadrupolo, esse modo é bastante empregado pois possui grande eficiência, sensibilidade e seletividade (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

#### 3.4.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre um determinado valor encontrado de um procedimento analítico e um valor que é aceito como verdadeiro ou de referência, ou seja, ela é determinada por meio da avaliação direta dos resultados obtidos com o valor verdadeiro, a exatidão está associada a erros aleatórios e sistemáticos do método analítico. Sua avaliação pode ser feita por meio de recursos de materiais certificados de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

Contudo, os ensaios de recuperação são utilizados quando pretende-se validar a exatidão e não há materiais certificados de referência (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). Ainda segundo os mesmos autores, podemos avaliar ela por meio da precisão, seletividade, linearidade e recuperação, a qual é calculada como porcentagem da quantidade média do analito em relação ao valor verdadeiro aceito em um determinado número de ensaios, normalmente trabalhada em triplicadas, conforme a equação (3) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.4.6 Precisão

Primeiramente, para a averiguação da confiabilidade de uma determinada análise é necessário analisar se a mesma se repete enquanto opera sequencialmente, essa operação de repetição é denominada de precisão (LEITE, 2008). Portanto, a precisão representa o grau de proximidade dos resultados obtidos em uma determinada série de amostragem da mesma amostra homogênea. Ela consiste em repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Geralmente a precisão é avaliada por meio do Desvio Padrão Absoluto ( $s$ ) de uma série de medições, conforme equação (4), no qual o  $X_i$  é o valor individual da medida,  $\bar{X}$  é a média aritmética e  $n$  é a quantidade de medidas (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

Outra expressão encontrada para a precisão é a estimativa do Desvio Padrão Relativo (RSD%), conhecido também na literatura por Coeficiente de Variação (CV%) (5) (RIBANI *et al.*, 2004). Normalmente para métodos que quantificam compostos em grandes quantidades, requerem um CV de 1 a 2 %, por outro lado, para métodos que analisam impurezas, é aceito CV de até 20%, a depender do grau de complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

$$RSD\% \text{ ou } CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (5)$$

A repetibilidade representa a concordância dos resultados a qual é realizada em uma mesma condição e em um breve intervalo de tempo, pelos mesmos instrumentos e o mesmo pesquisador (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

A precisão intermediária representa um conjunto de resultados de um mesmo laboratório, entretanto, diferente da repetibilidade, são obtidos em dias diferentes, pesquisadores diferentes e equipamentos diferentes (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

A reprodutibilidade expressa a concordância entre os resultados efetuados em uma mesma amostra obtidos de diferentes laboratórios, considerando a padronização de métodos analíticos (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

#### 3.4.7 Robustez

A robustez, também encontrada na literatura como susceptibilidade, é a capacidade que o resultado de um procedimento analítico tem em se manter inalterado, embora sejam feitas pequenas e deliberadas alterações nos parâmetros analíticos, demonstrando sua confiabilidade durante o uso normal (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). Assim, com os demais parâmetros discriminatórios, confirmando as condições analíticas, a robustez deve ser empregada como um alerta para as variações do método e não deve ser utilizada como um parâmetro de aprovação ou rejeição da condição analítica (LEITE, 2008).

Essas condições devem ser analisadas e controladas para que o método seja válido e, assim, possibilitar sua constante utilização (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

## 4. METODOLOGIA

A parte experimental deste trabalho foi realizada nas dependências dos Laboratórios do curso do colegiado de Química Licenciatura na Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), especificamente no Laboratório de Cromatografia (LabCrom). O analito de interesse foi investigado em locais de nascente, córrego e lago da UC – MONAF. Os procedimentos de coleta e preservação de amostra, preparo de amostra e quantificação são descritos neste tópico.

### 4.1 Materiais e Reagentes

#### 4.1.1 Materiais

- Becker de 100 mL;
- Frascos de penicilina de aproximados 10 mL;
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade 5 mL;
- Gás Hélio (White Martins) – Usado como fase móvel;
- Padrão analítico de AMT à 1000 mg L<sup>-1</sup> em metanol (SIGMA-Aldrich);
- Pipeta de Pasteur de plástico;
- Pipeta volumétrica de 50 a 1000 µL;
- Pipeta eletrônica de 20, 50, 200 e 1000 µL;
- Tubos para centrífuga do tipo Falcon, capacidade de 15 e 50 mL, fundo cônico, em plástico polipropileno.

#### 4.1.2 Reagentes

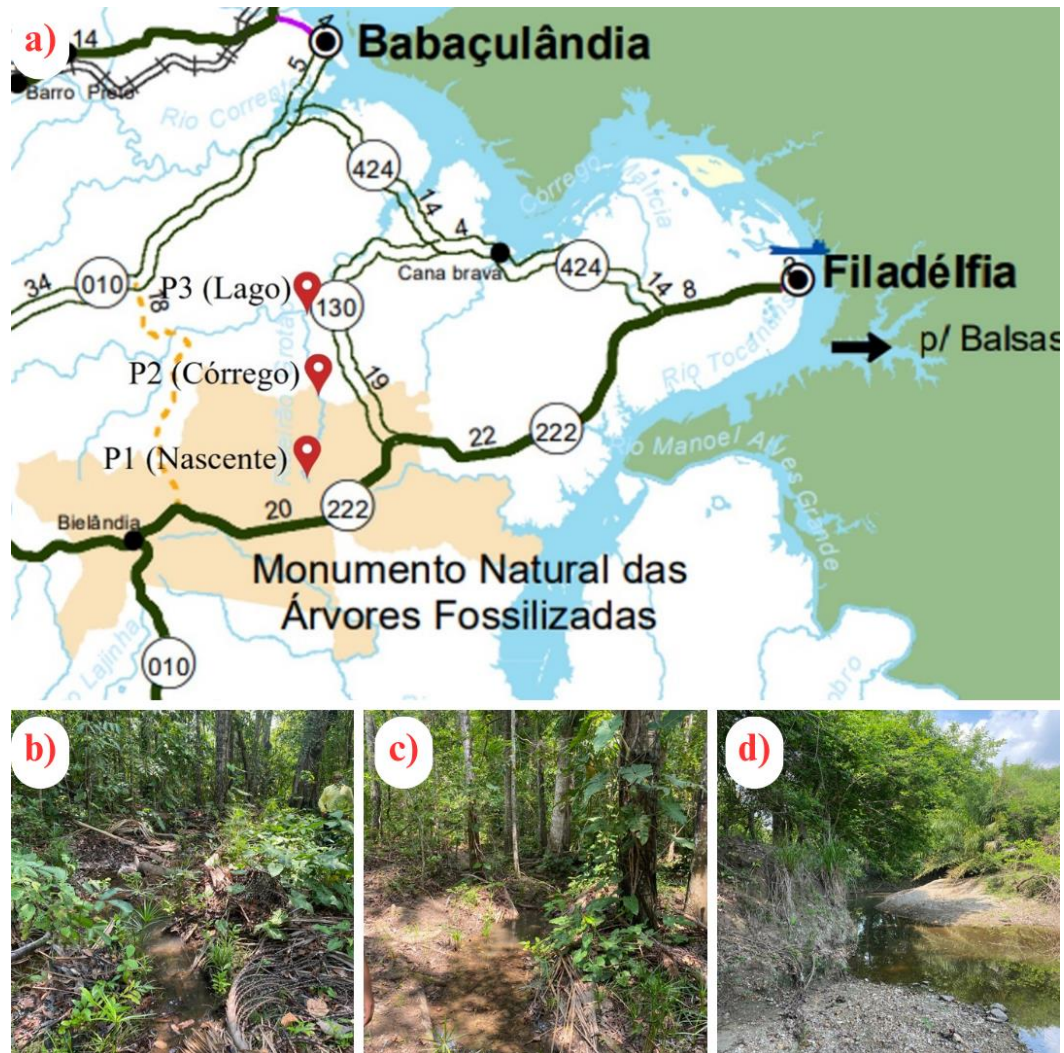
- Acetonitrila 99,9% grau UV/HPLC;
- Ácido clorídrico 37% P. A./ACS (NEON, 1000 mL);
- Água ultrapura, purificada em sistema Mili-Q UV3;
- Álcool metílico 85% P. A. (NEON, 3000 mL);
- Cloreto de sódio P. A. (NEON, 500g);
- Detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5);
- Sulfato de magnésio anidro P. A. (Vetec, 500g);

## 4.2 Amostragem

A finalidade deste trabalho é realizar análises qualitativas e quantitativas do AMT em amostras de água. Portanto, o método desenvolvido foi aplicado em três amostras coletadas no Ribeirão Grotão na cidade de Bielândia – TO, com coordenadas geográficas de -7.539704892159215 -47.795757675243905, abrangendo a Nascente (P1), Córrego (P2) e o Lago (P3), no dia 13 de novembro de 2023 às 9h e 50 min, 10h e 30 min e 11h e 10 min, respectivamente, evidenciados na figura 3.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar com capacidade para armazenar até 1,00 Litro (L). Todos os frascos foram previamente lavados em laboratório com detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5), com água destilada e água ultrapura (purificada em sistema Mili-Q). Por fim, foi adicionado 10 mL de Ácido Clorídrico (HCl) concentrado P.A a 37% para descontaminação, seguindo esses protocolos para a limpeza. Após a amostragem, os frascos foram selados com papel alumínio, tampados e acondicionados em caixa de isopor para transporte sob refrigeração.

Figura 3 – a) Mapa dos Pontos de amostragem; b) Nascente (P1); c) Córrego (P2); d) Lago (P3).



Fonte: Agência Tocantinense de Transporte e Obras (AGETO, 2020), modificado pelo autor (2023).

Posterior à coleta, a amostra foi imediatamente levada ao laboratório para dar início ao seu processo de preparo, conforme descrito no item 4.4.

### 4.3 Preparo das Soluções Padrão

Utilizando-se o padrão do pesticida AMT ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em MeOH) cedido pelo Laboratório de Análise de Traços da Universidade Federal do Ceará (LAT/UFC), foi preparado soluções estoque de  $10$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  por meio de diluição. O solvente utilizado para as diluições foi a solução de Metanol (MeOH) grau cromatográfico.

Posteriormente, foram preparadas, por diluição com o solvente MeOH e também com o extrato da própria matriz, soluções padrão nas concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ . Após o preparo, foram armazenadas em frascos de penicilina, etiquetadas, vedadas e resfriadas em uma temperatura de aproximadamente  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  até a análise instrumental.

Com as concentrações mencionadas, foram constituídas curvas de calibração no solvente (MeOH) e na matriz, ambas por padronização externa, para posterior verificação de possíveis componentes presentes na amostra que pudessem interferir no sinal referente ao pesticida de estudo, podendo este ser negativo ou positivo.

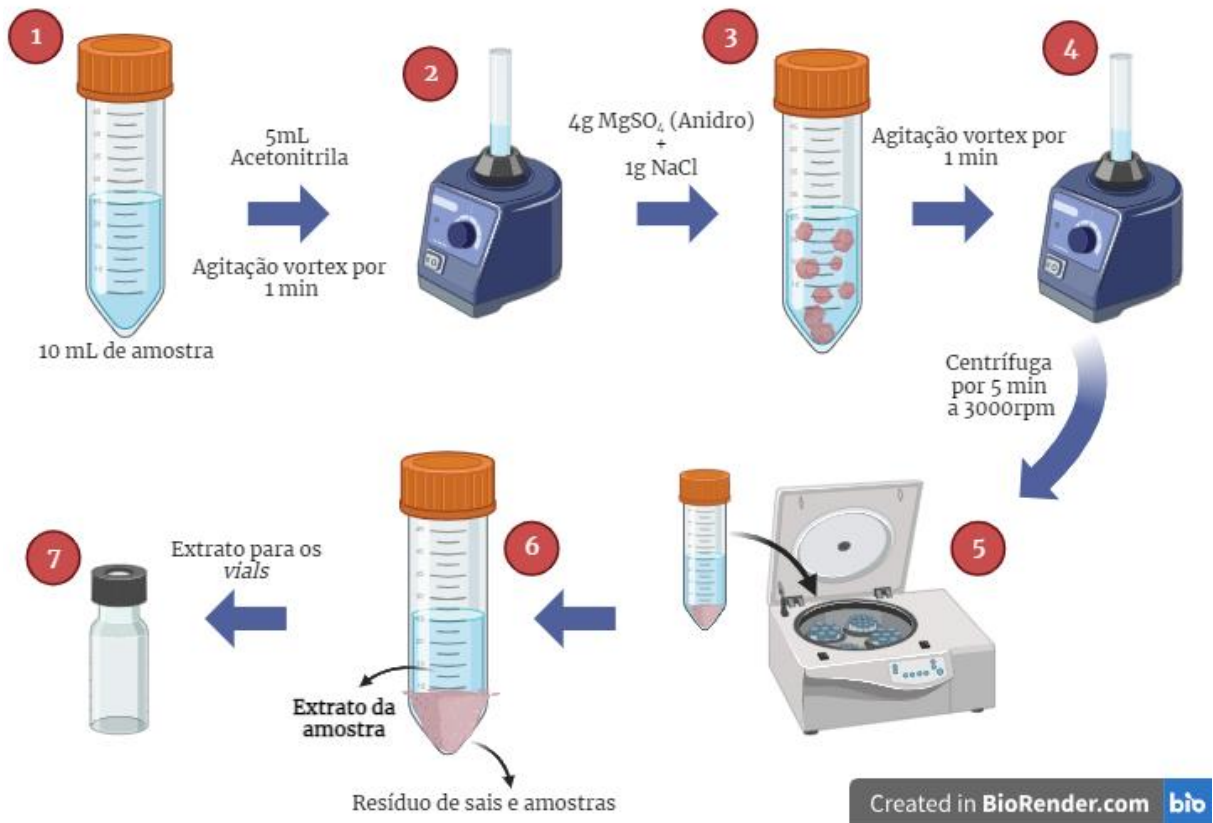
#### **4.4 Procedimento de extração pelo método *QuEChERS* adaptado**

Após a coleta das amostras, foi empregado o método *QuEChERS* adaptado para a análise de água e obtenção do extrato na matriz. Transferiu-se, então, 10 mL de cada amostra para um tubo Teflon com tampa rosqueada de 50 mL. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta volumétrica, foi adicionado 5 mL de ACN e, assim, com a ajuda do agitador Vortex Mixer VM-370, agitou-as até homogeneizá-las durante 1 minuto. Depois de homogeneizadas, adicionou-se 4 g do sal Sulfato de Magnésio anidro ( $\text{MgSO}_4$ ) e 1 g de Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ), levando-as para o agitador novamente durante 1 minuto.

Por fim, a amostra foi para a centrífuga MTD Plus durante 5 minutos a 3000 rpm, onde foi transferido 1,0 mL da fase sobrenadante do extrato para os *vials*, que foram datados e codificados para a análise cromatográfica, como esquematizado na figura 4.



Figura 4 – Ilustração do procedimento de extração da amostra pelo método *QuEChERS* adaptado.



Fonte: Elaboração própria, 2023. Utilizando o Softwer BIORENDER.

Após a coleta e transferência do extrato para os *vials*, armazenou-se o restante do sobrenadante da fase líquida do extrato em tubos de centrifuga de 15 mL e condicionou-o a uma temperatura de aproximadamente 10°C.

Figura 5 – a) Agitador vortex; b) Extrato obtido; c) Aparelho MTD utilizado.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

#### 4.5 Condições Cromatográficas

O método cromatográfico foi desenvolvido por meio do equipamento CG-EM/*Agilent Technologies* (modelo 7890B do CG e 5977B do EM). O gás de arraste utilizado foi o gás hélio (99,99%) na vazão de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ , coluna capilar HP5-MS da *Agilent* com dimensões de  $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i}$  (diâmetro interno) e  $0,25 \text{ }\mu\text{m}$  de espessura de filme da fase estacionária com composição 5% fenil e 95% polimetilsiloxano. O injetor foi operado no modo *splitless* (sem divisão de fluxo). O espectrômetro de massas operou no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV, com fonte de íons a  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  e a temperatura da linha de transferência de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  no modo *Full Scan (SCAN)* e *SIM*, monitorando o íon  $227 \text{ m/z}$  correspondente ao do fragmento de quantificação AMT e o íon  $44 \text{ m/z}$  correspondente a confirmação.

Parâmetros iniciais de trabalho. Inicialmente injetou-se  $1,0 \text{ }\mu\text{L}$  a amostra com a temperatura do injetor (TI) mantida a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e com a seguinte programação de temperatura:

temperatura inicial de 120 °C, seguindo com aquecimento de 15 °C/min até 200 °C, permanecendo por 2 minutos; aumentando a temperatura 10 °C/min até 250 °C por 1 minuto, totalizando uma corrida de 13 minutos e 33 segundos.

Parâmetros finais utilizado nas análises cromatográficas. Inicialmente injetou-se 1,0 µL de cada amostra com a TI mantida a 250 °C e com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial 50 °C (0 min) partindo para uma taxa de aquecimento de 20 °C/min até 250 °C, permanecendo por 1 minuto; aumentando a temperatura de 20 °C/min até 300 °C, permanecendo por 1 minuto, totalizando um tempo de corrida de 14 minutos e 30 segundos. Estas condições foram obtidas conforme os estudos de Alcântara *et al.* (2018).

Figura 6 – CG/EM utilizado para o estudo.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

#### 4.6 Validação da Metodologia Analítica

A metodologia de validação utilizada foi baseada em Ribani *et al.* (2004), segundo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166 (ANVISA, 2017) e o documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020).

#### 4.6.1 Efeito Matriz

Para a verificação do Efeito Matriz (EM), inicialmente foram coletadas águas superficiais para a curva na matriz no Rio Lontra, localizado na Avenida Via Lago na cidade de Araguaína-TO, no dia 2 de novembro de 2023 às 15 horas e 30 minutos. Podemos observar o local de coleta na figura 7.

Figura 7 – Ponto de amostragem da matriz de água superficial.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Posterior a coleta, a amostra foi imediatamente levada ao laboratório para dar início ao seu processo de preparo, conforme descrito no item 4.4, submetida a extração via método *QuEChERS* adaptado.

A avaliação da existência de EM foi realizada mediante a comparação dos coeficientes angulares obtidos pela curva de calibração no solvente e na matriz de água superficial, de acordo com a equação 6.

$$EM/\% = \frac{(b_m - b_s)}{b_s} \times 100 \quad (6)$$

Para o cálculo do EM deve-se considerar o coeficiente angular da curva na matriz ( $b_m$ ) e o coeficiente angular da curva no solvente ( $b_s$ ). De acordo com Alcântara *et al.* (2018), para que não seja considerado a existência de EM as relações devem ficar no intervalo de  $-20\% < EM < 20\%$ , caso contrário, determina-se que há efeito matriz e, portanto, para uma análise quantitativa deve-se utilizar a curva na matriz.

#### 4.6.2 Seletividade

Para o estudo da seletividade comparou-se os cromatogramas obtidos pela análise da matriz no modo *SCAN* e *SIM*. No modo *SIM*, monitorou-se o principal fragmento de quantificação (conhecido como pico base) e confirmação, íons 227 e 44  $m/z$ , respectivamente, correspondentes ao AMT e seu tempo de retenção. Foi avaliado também o espectro de massas dos cromatogramas.

#### 4.6.3 Linearidade

Para a análise da linearidade, preparou-se curvas de calibração no solvente e na matriz conforme o subitem 4.3. Cada ponto da curva analítica foi verificado em triplicada e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear.

Os pontos das curvas analíticas estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de Concentrações para as curvas analíticas.

Nível	Concentração ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )
1	100
2	150
3	250
4	500
5	1000

Fonte: Elaboração própria, 2023.

#### 4.6.4 Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Os dados para a obtenção dos LD's e LQ's foram obtidos por meio de injeções sucessivas, partindo da menor concentração até a maior concentração, as quais foram preparadas de acordo com o subitem 4.3. Dessa forma, com uma relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente, obtivemos os LD's e LQ's pelo método das diluições sucessivas.

#### 4.6.5 Precisão

A precisão deste trabalho foi avaliada por meio do método de precisão repetibilidade. Para a repetibilidade foram preparadas cinco amostras nas concentrações descritas no subitem 4.6.3, para a curva de calibração no solvente e na matriz, em triplicada, analisadas no mesmo dia, mesmo analista e no mesmo equipamento. Vale ressaltar que foi realizado a precisão intra-ensaio por meio do estudo da recuperação. A partir dos resultados obtidos, foram calculados os desvios padrão entre as replicadas e o CV%.

#### 4.6.6 Exatidão

Para os ensaios da recuperação foram realizadas fortificações das amostras de água em concentrações conhecidas do AMT por diluição a partir de cada uma delas, nas concentrações de 100, 500 e 1000  $\mu\text{g. L}^{-1}$ , em cinco replicadas, antes da execução da extração da amostra. Após o preparo, iniciou-se o processo de extração conforme o método *QuEChERS* adaptado (subitem 4.4).

Assim, a exatidão foi estimada pelo método de recuperação. De acordo com o INMETRO (2020), utilizou-se para o cálculo da recuperação em porcentagem (%) a equação 7.

$$R(\%) = \left( \frac{C_2 - C_1}{C_3} \right) \times 100\% \quad (7)$$

Em que:

$C_1$  = concentração obtida na amostra não fortificada (branco da amostra);

$C_2$  = concentração média do analito na amostra fortificada;

$C_3$  = concentração conhecida adicionada na amostra.

#### 4.7 Concentração em Amostras Reais

Como esquematizado na figura 4, representada no subitem 4.4, após a centrifugação é retirada uma alíquota do extrato e armazenada em um *vial* para a injeção cromatográfica desta solução. Portanto, conclui-se que a concentração do AMT adquirida após o tratamento dos dados, por meio da curva de calibração, é do extrato obtido na extração (*QuEChERS* adaptado) e não da amostra real.

Em posse da concentração do AMT presente no extrato, podemos utilizar a equação 8 para obtermos a concentração estimada do analito na amostra de água em  $\mu\text{g. L}^{-1}$ .

$$C_a = \frac{[C_{ext} (\mu\text{g. L}^{-1}) \times V_{ext} (L)]}{V_a (L)} = [\mu\text{g. L}^{-1}] \quad (8)$$

Onde:

$C_a$  = Concentração do analito na amostra;

$C_{ext}$  = Concentração do analito no extrato;

$V_a$  = Volume da amostra;

$V_{ext}$  = Volume do extrato.

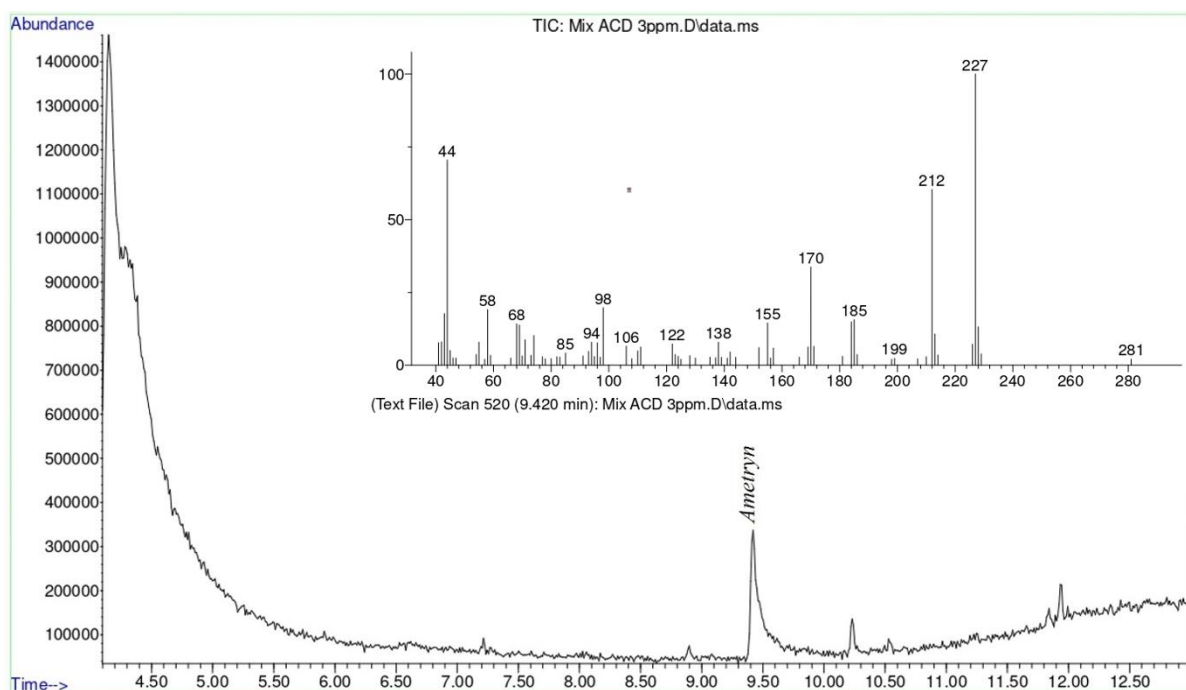


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise cromatográfica por CG-EM

Inicialmente foram feitas análises cromatográficas com os parâmetros iniciais, conforme descrito no subitem 4.5, afim de verificar melhores condições para o trabalho. Dessa forma, a figura 8 mostra o cromatograma e o espectro de massas para o AMT em uma solução de 3 mg L<sup>-1</sup> em MeOH, nestas condições iniciais.

Figura 8 – Cromatograma com os parâmetros iniciais do padrão *Ametryn* a 3 mg L<sup>-1</sup> em MeOH obtido por CG-EM, modo *SCAN* de monitoramento, e seu espectro de massas.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

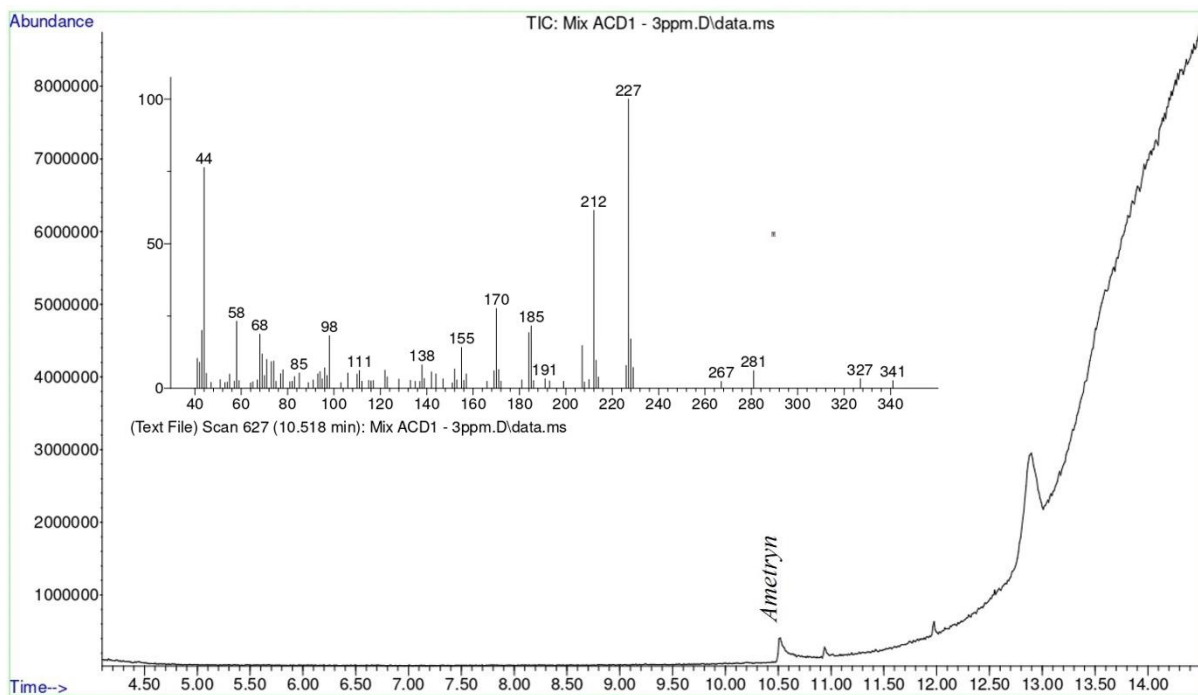
Podemos observar na figura 8 que foi obtido o pico referente ao AMT no tempo de retenção de 9 minutos e 49 segundos, no entanto foi desenvolvido novas condições cromatográficas para uma melhora na determinação do pesticida.

As condições finais descritas no subitem 4.5 para o sistema CG-EM permitiram uma resolução eficiente para o AMT. A figura 9 ilustra o perfil cromatográfico e o espectro de massas do insumo, sua eluição total ocorreu em um tempo de retenção de 10.518 min, foi observado um aumento na intensidade do pico utilizando uma temperatura final de 300 °C,



operando no modo SCAN. Essa melhora ocorreu por conta da temperatura final chegar a 300 °C e permanecer nela por alguns minutos, favorecendo a passagem do AMT para a fase móvel.

Figura 9 – Cromatograma com os parâmetros finais do padrão *Ametryn* a 3 mg L<sup>-1</sup> em MeOH obtido por CG-EM, modo *SCAN* de monitoramento, e seu espectro de massas.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Vale ressaltar que houve uma melhora referente a relação sinal ruído, ficando mais evidente o analito de interesse. Destaca-se também uma melhora significativa em relação à similaridade do espectro de massas obtido para os parâmetros finais, o qual inicialmente era de 94% (figura 8) e passou para 97,2% (figura 9) de acordo com a da biblioteca do aparelho, demonstrando que as condições otimizadas, com temperatura final de 300 °C (figura 9), foram as mais adequadas para a identificação e análise do analito de interesse.

## 5.2 Validação do Método

### 5.2.1 Seletividade

Antes das análises em amostras reais, corridas cromatográficas no modo *SCAN* foram realizadas para analisar os fragmentos para cada analito, em seguida utiliza-se o modo *SIM* e sua aplicação em amostras reais.

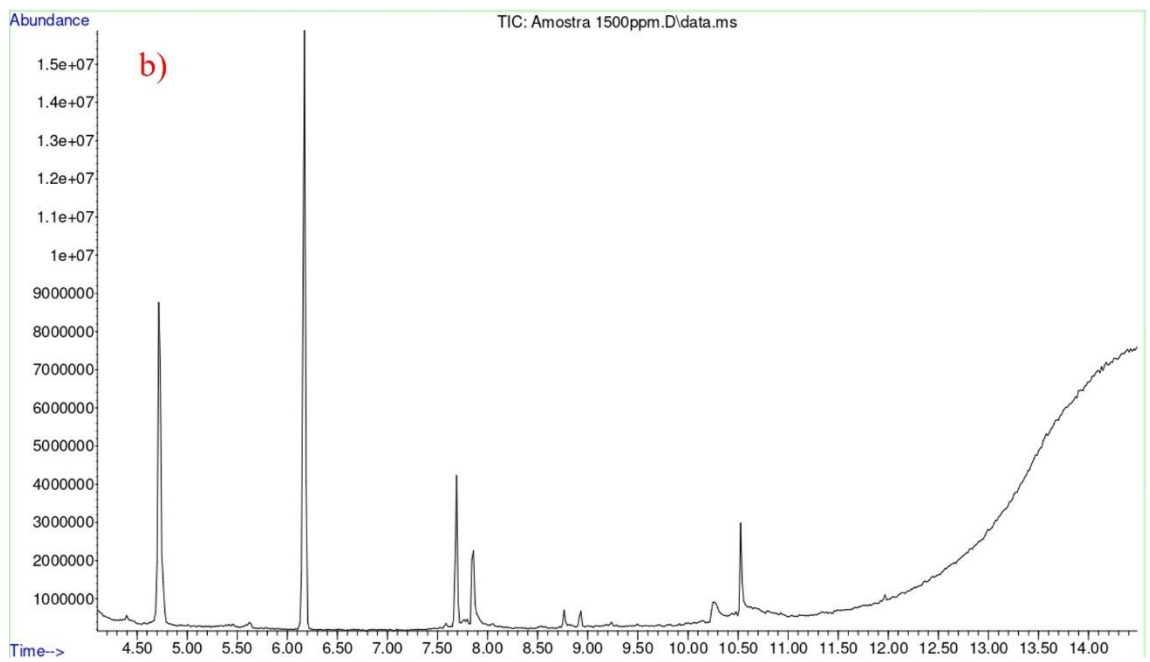
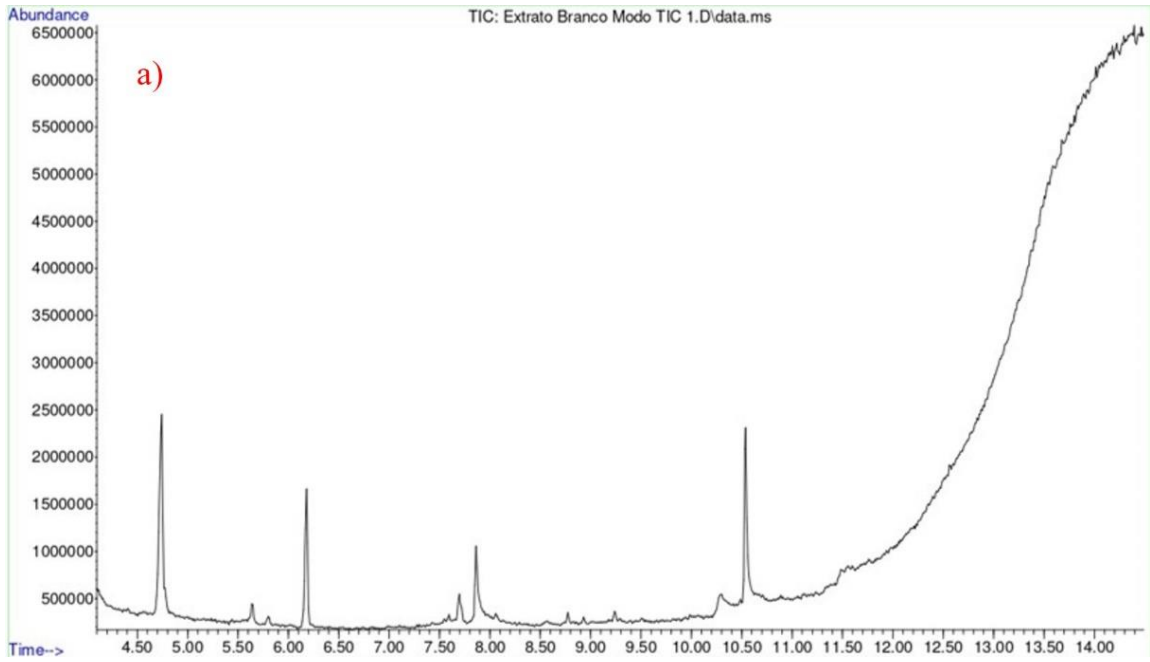
A utilização do espectrômetro de massas, permite evidenciar os cromatogramas para uma determinada razão  $m/z$  nos espectros de massas em função do tempo de retenção do composto de interesse, por meio do modo de monitoramento *SIM*, desde que seja selecionado o fragmento correto do espectro de massas do analito alvo (HARRIS, 2017)

O modo de monitoramento *SIM* permite evidentes melhorias na seletividade e sensibilidade do método analítico, obtendo-se cromatogramas mais simples e picos cromatográficos com melhores razões sinal/ruído. O ganho na sensibilidade ocorre devido ao fato do CG-EM priorizar a coleta de dados específicos ao fragmento  $m/z$  evidenciado (HARRIS, 2017).

De acordo com o INMETRO (2020), que descreve sobre validação de métodos analíticos, a seletividade para o AMT foi determinada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos no modo *SCAN* e *SIM*.

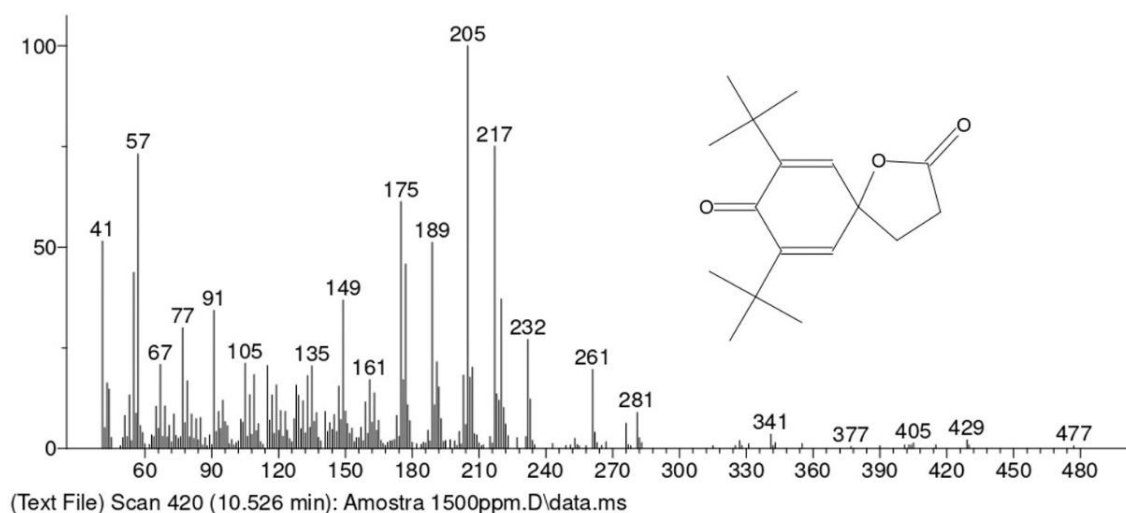
A fim de investigar a seletividade, comparamos os cromatogramas da matriz ausente do AMT com o que foi adicionado do pesticida alvo à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo possível observar que no tempo de retenção do herbicida seu pico de interesse estava oculto por componentes presentes na amostra, como observado na figura 10a e 10b. Vale destacar que os dois cromatogramas analisados apresentaram o mesmo composto no tempo de retenção do AMT (figura 11), 7,6-Di-tert-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-dione. Ressalta-se que o espectro de massas não possui os íons de quantificação e confirmação do analito alvo.

Figura 10 – a) Cromatograma no modo *SCAN* ausente do AMT, b) Cromatograma no modo *SCAN* com adição do AMT.



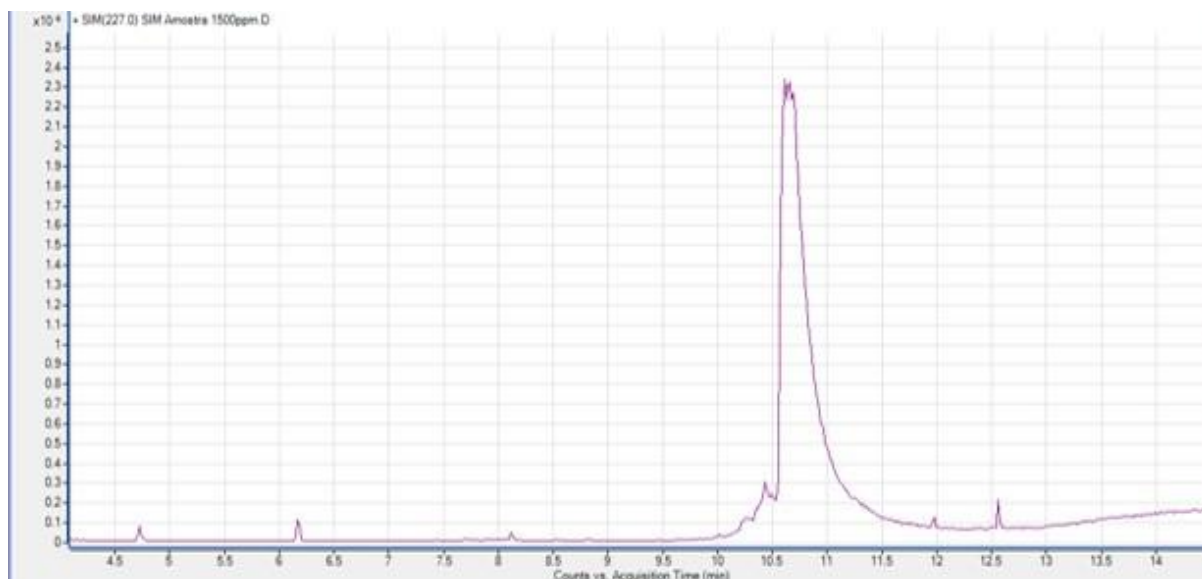
Fonte: Elaboração própria, 2023.

Figura 11 – Espectro de massas com adição do AMT.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

A figura 12 ilustra o ganho de seletividade, no modo *SIM*, para o analito alvo quando comparado ao modo de monitoramento *SCAN*. Desse modo, a figura 10b elucida que no modo *SCAN* o analito alvo não demonstra uma seletividade adequada, o qual há evidência de vários componentes da matriz que podem resultar em respostas “falso-positivo”. Entretanto, ao utilizarmos o modo de monitoramento *SIM*, o método apresenta maior seletividade para o analito, conforme a figura 12. Portanto, o modo *SIM* foi utilizado para as demais validações analíticas e monitoramento do AMT em amostras reais.

Figura 12 – Cromatograma no modo *SIM* do AMT.

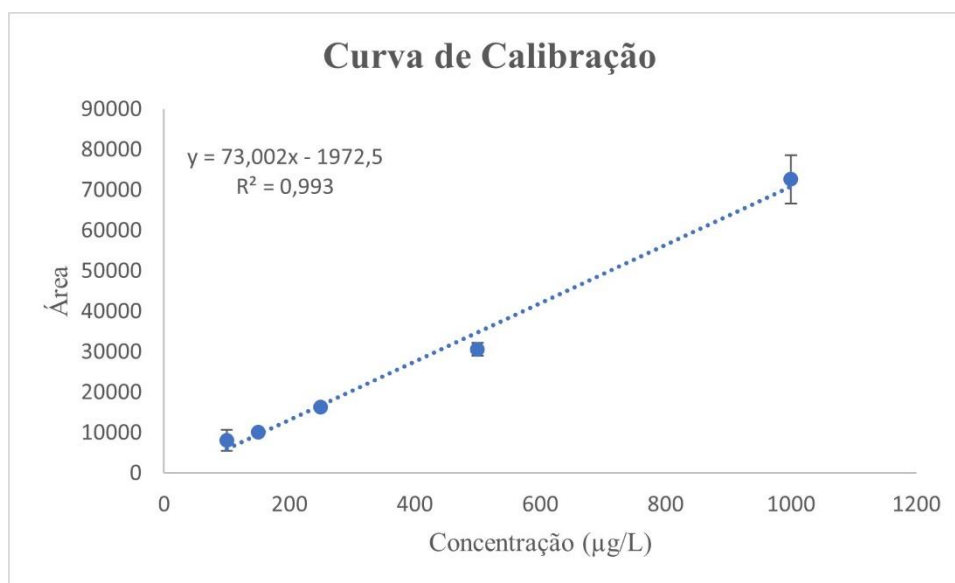
Fonte: Elaboração própria, 2023.

Para a verificação no modo *SIM*, recorreu-se ao fragmento referente ao íon de quantificação do analito alvo. Dessa forma, utilizou-se o fragmento de quantificação 227,0  $m/z$  e o 44  $m/z$  correspondentes a confirmação, no tempo de retenção 10 minutos e 45 segundos.

### 5.2.2 Linearidade

A validação da linearidade foi realizada com o intuito de garantir resultados confiáveis. Construiu-se, então, uma curva de calibração no solvente para determinar a capacidade do método desenvolvido em gerar respostas lineares. Foram preparadas soluções padrão do pesticida AMT em concentrações baixas progredindo até altas concentrações, conforme descrito no item 4.3. Posteriormente, foram analisadas pelas condições cromatográficas descritas no 4.5 por CG/EM. Assim, elaborou-se a primeira curva, a qual foi constituída com os cinco níveis de concentração (100,0; 150,0; 250,0; 500,0; 1000,0  $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) em triplicada a cada nível. A curva apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a  $R^2 = 0,993$  e uma equação linear,  $y = 73,002x - 1972,5$ . Podemos observá-la na figura 13.

Figura 13 – Curva de Calibração no Solvente.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Ao tirarmos a raiz quadrática do valor do coeficiente de determinação da curva de calibração, determinamos o valor do coeficiente de correlação linear de Pearson (R), obtendo assim um valor de  $R = 0,996$ , o que indica uma boa linearidade dos pontos plotados na curva. Portanto, o presente método, já validado, nas concentrações descritas, apresentou-se linear.

O R é um método estatístico utilizado para delimitar força, intensidade ou grau linear entre duas variáveis. Ele possui variações entre -1 e +1, na qual o sinal negativo e positivo indica a direção da correlação, enquanto o valor determina a magnitude. Assim, quanto mais próximo do valor  $R = 1$ , maior é a força de associação linear entre as variáveis (negativa ou positiva), e com um coeficiente  $R = 0$  não há relação linear (HARTWIG *et al.*, 2007).

Podemos observar que na figura 13 não é representado o ponto referente à concentração de  $1500 \mu\text{g. L}^{-1}$  visto que ele é um *outlier*. Com o intuito de verificar tal premissa, foram empregados métodos estatísticos para garantir que os resultados fossem obtidos em intervalos de confiança e possibilitar a retirada de *outliers*.

Os resultados que apresentam *outliers* podem comprometer as análises. Em resumo, a existência de valores discrepantes aumenta a variação dos dados, reduzem os testes estatísticos e produzem estimativas tendenciosas, além de observações errôneas referentes aos dados.

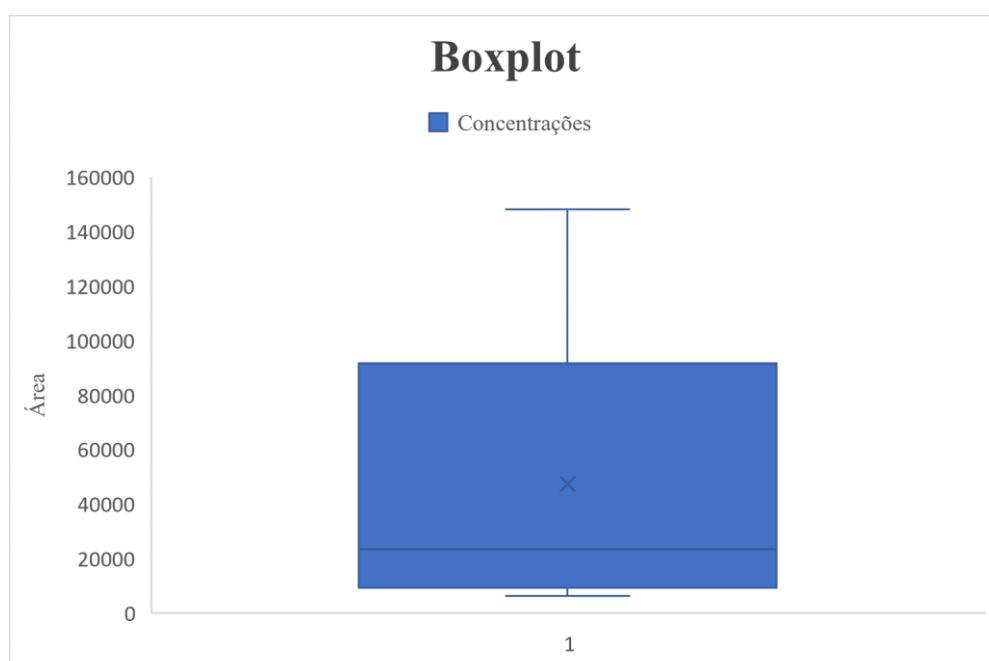
Portanto, para a obtenção de resultados mais confiáveis e imparciais esses valores discrepantes (*outliers*) devem ser verificados e tratados da melhor forma (YANG; BERNINE, 2016).

Em vista disto, o *Boxplot* é utilizado para identificar os *outliers*, indicando qualquer valor abaixo da diferença da média (M) vezes 1,5 do intervalo interquartil (IQR), denominado Limite Inferior ( $L\text{-Inf} = M - 1,5 \cdot IQR$ ) e acima da somatória da M vezes 1,5 do IQR, denominado Limite Superior ( $L\text{-Sup} = M + 1,5 \cdot IQR$ ) (YANG; BERNINE, 2016). Qualquer valor acima ou abaixo do L-Sup ou L-Inf é considerado *outliers*.

É notório que no *Boxplot* o dado que se remete ao sexto ponto não está representado dentro do limite máximo permitido do conjunto de dados. Outro fator a se observar é que esse valor está apresentando uma dispersão muito grande dos dados e ao calcular o L-Sup encontramos um valor de 146.925,3152, enquanto o valor da sexta concentração é 148.046,055, concluindo que, sim, ele é um *outlier*.

Por consequência de tal fator, foi necessário a retirada do sexto ponto de concentração ( $1500 \mu\text{g. L}^{-1}$ ) da curva de calibração por ser um outlier. Podemos observar sua comprovação na figura 14, a qual apresenta o *Boxplot* dos dados.

Figura 14 – Verificação de *outliers*.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

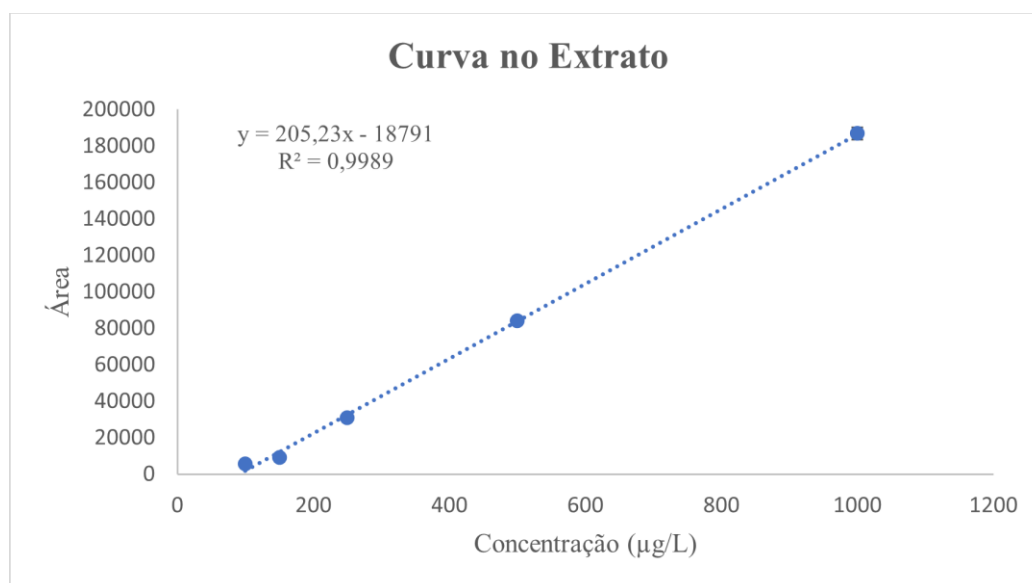
Em vista que obtivemos uma boa linearidade, continuamos com os parâmetros de validação do método descrito no subitem 3.4.

### 5.2.3 Efeito Matriz

Conforme a metodologia descrita neste trabalho, foi realizada uma curva de calibração no solvente e na matriz. A amostra foi coletada de acordo com o subitem 4.6.1 e preparada conforme o subitem 4.4. Posteriormente, foram analisadas nas condições cromatográficas descritas no 4.5 por CG/EM. Desta maneira, obtivemos a curva na matriz, a qual foi constituída com os cinco níveis de concentração descrito no subitem 4.6.3, em triplicada para cada nível.

Observa-se na figura 15 a curva de calibração na matriz. Posteriormente, a figura 16 representa a comparação das curvas no solvente e na matriz, incluindo o resultado do cálculo conforme a equação 6 (descrita no subitem 4.6.1) para a verificação do EM.

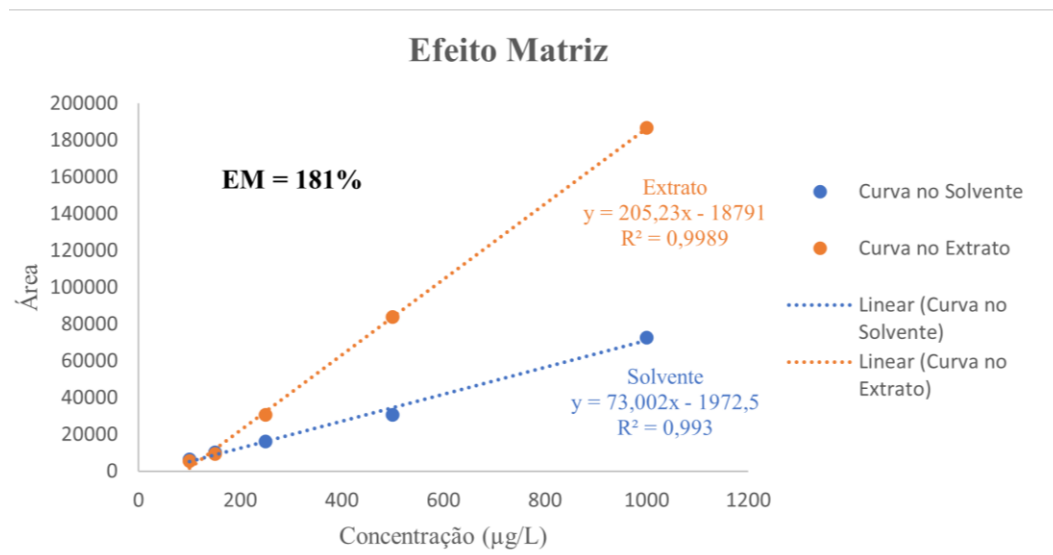
Figura 15 – Curva de Calibração no Extrato.



Fonte: Elaboração própria, 2023.



Figura 16 - Curvas de Calibração no Solvente e Matriz, com seus respectivos coeficientes de correlação, equação da reta e cálculo do EM.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Podemos observar na figura 15 que a curva na matriz apresentou coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,9989$  e uma equação linear igual a  $y = 205,23x - 18791$ . Ao tirarmos a raiz quadrática de  $R^2$ , para a determinação do valor de R, obtivemos um valor de  $R = 0,9994$ , apresentando assim uma ótima linearidade dos pontos plotados da curva na matriz.

No entanto, podemos perceber pelo cálculo do EM que a curva na matriz demonstrou uma influência considerável em relação à curva no solvente, apresentando EM positivo de 181%. As influências no EM são causadas por fatores que podem afetar diretamente os resultados, como a química do analito, a natureza da própria amostra, os níveis de concentração do pesticida em relação aos componentes da amostra e a cromatografia gasosa (CG) (SCHENCK; LEHOTAY, 2000).

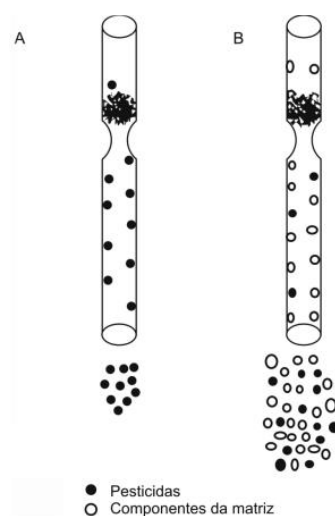
Conhecido também como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, os componentes presentes nas amostras permitem a interpretação de recuperações superiores a 100% para alguns pesticidas em análises calibradas com padrões externos em solventes puros. O aumento ou diminuição do EM surge devido a presença de sítios ativos no próprio CG, os quais interagem com os analitos (RAHMAN; ABD EL-ATY; SHIM, 2013).

Uma das técnicas mais comuns para injetar amostras em um sistema CG é uma injeção térmica (com ou sem *split/splitless*), em que a amostra é evaporada em um injetor aquecido após ser introduzida no sistema (PINHO *et al.*, 2009). Portanto, devido a essa técnica o EM é mais apto a acontecer em condições de alta temperatura. Os sítios ativos no tubo de vidro (*liner*) podem promover a adsorção dos analitos e até catalisar o processo de degradação térmica dos pesticidas (PINHO *et al.*, 2009).

Os sítios ativos mencionados são formados por grupos silanóis e metais potencialmente presentes na superfície do *liner*, também podem ser formados por meio de coextrativos não voláteis depositados na entrada do sistema cromatográfico durante análises repetidas (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000). Quando o analito é introduzido no sistema do CG por meio de uma solução padrão em solvente, os sítios ativos do *liner* ficam disponíveis para reter o analito, reduzindo assim a transferência do pesticida para a coluna e posteriormente para o detector (Figura 17A) (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000).

Quando os pesticidas são injetados na presença dos componentes da matriz, ou seja, quando soluções padrão são preparadas por meio do extrato da matriz, há competição entre componentes da amostra e analitos pelos sítios ativos do *liner*, permitindo que maior quantidade de pesticida seja transferida para a coluna e assim detectada com uma melhor intensidade (Figura 17B) (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; PINHO *et al.*, 2009).

Figura 17 – Adsorção dos pesticidas nos sítios ativos do *liner*. A) Analito injetado na ausência dos componentes da matriz. B) Pesticidas injetados com o extrato da matriz.



Esses sítios ativos interagem com a matriz de interesse mascarando ou intensificando o pico do analito. Atualmente é conhecido que analitos que contêm oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo e elementos semelhantes exibem um maior EM, interagindo rapidamente com esses sítios ativos (RAHMAN; ABD EL-ATY; SHIM, 2013).

Portanto, levando em consideração o fenômeno de adsorção dos pesticidas nos sítios do *liner*, o composto de estudo aumentou o valor do sinal quando utilizado o extrato da amostra como solvente, e, portanto, é necessário empregar a curva na matriz para a determinação do analito de interesse em análise de amostras reais, em vista do aumento da intensidade do sinal do AMT quando utilizado o extrato da matriz como solvente na diluição.

No entanto, apesar dos valores do R na matriz apresentarem-se muito próximos a 1, não devem ser o único parâmetro a ser utilizado como exclusivo e verdadeiro da linearidade da regressão, pois há possibilidades de haver erros aleatórios significantes em valor de R abaixo de 0,999. Portanto, assim, o próximo subitem irá retratar testes estatísticos com o intuito de verificar a significância da regressão linear dos parâmetros da curva.

#### 5.2.4 Teste de Validação da Análise de Regressão Linear e Significância dos Parâmetros de Calibração

Como visto anteriormente, foi considerado a aproximação de  $R^2$  a 1 para determinarmos uma boa faixa linear das curvas de calibração no solvente e na matriz. Além disso, vale destacar que foram feitos testes estatísticos para a verificação da regressão linear e dos parâmetros de calibração para a curva de calibração evidenciada para a quantificação dos analitos em amostras reais.

Para a verificação da regressão linear, foram realizados cálculos estatísticos de desvio padrão dos valores do coeficiente linear (a), angular (b) e dos desvios verticais, no eixo y, de acordo com as equações 9, 10 e 11, respectivamente.

$$S^2_a = \frac{S^2_y \sum(x^2_i)}{D} \quad (9)$$

$$S^2_b = \frac{S^2_y \times n}{D} \quad (10)$$

$$S^2_y = \frac{\sum(d^2_i)}{n - 2} \quad (11)$$

Onde:

$S_a$  = Desvio padrão do coeficiente linear;

$S_b$  = Desvio padrão do coeficiente angular;

$S_y$  = Desvio padrão no eixo y;

$x_i$  = Valores individuais de x;

$n$  = Número total de pontos da curva;

$d_i$  = Desvio vertical de cada ponto;

$D$  = Determinante, dado da seguinte forma:  $\begin{vmatrix} \sum(x^2_i) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix}$

Após a obtenção dos valores de  $S_a$ ,  $S_b$  e  $S_y$ , utilizou-se o teste “t de *student*” para os parâmetros de calibração e o teste F para a análise de regressão linear, por meio das seguintes equações:

$$t_{calc,b} = \frac{|b - 1|}{S_b}; t_{calc,a} = \frac{|a - 0|}{S_a}; F_{calc} = \frac{S_y/1}{\sum d_i/3} \quad (12)$$

O teste F foi utilizado para determinar a significância da regressão linear de dois desvios padrão, áreas obtidas em relação à concentração da curva de calibração. Se  $F_{\text{calculado}}$  for maior que  $F_{\text{tabelado}}$  (parâmetro tabelado no HARRIS, 2017, p. 129) para 95% de confiança e 3 graus de liberdade ( $GL = N - 2$ ), onde  $N = 5$ , sendo  $N$  o número de pontos das curvas, a regressão linear é significativa, caso contrário,  $F_{\text{tabelado}} > F_{\text{calculado}}$ , não há relação linear entre os eixos  $x$  e  $y$ , mesmo que se tenha um bom valor de  $R^2$  (HARRIS, 2017, p. 127 - 141).

Após a curva passar pelo teste F, o teste “*t Student*” foi avaliado a fim de verificar a significância estatística dos parâmetros obtidos do coeficiente angular e linear da curva de calibração. Portanto, por meio dos desvios padrão dos coeficientes angular e linear, foi possível obter o valor do  $t_{\text{calculado}}$ .

Entende-se que quando o  $t_{\text{calculado}}$  for maior do que  $t_{\text{tabelado}}$  com nível de confiança de 95% e  $GL = 3$ , o parâmetro é significativo e deve mantê-lo na equação da reta. Caso contrário, onde  $t_{\text{tabelado}}$  (parâmetro tabelado no HARRIS, 2017, p. 131-132) é maior do que o  $t_{\text{calculado}}$ , o mesmo será insignificante e, portanto, deverá ser excluído o coeficiente analisado (HARRIS, 2017).

Com isso, podemos observar na tabela 5 os valores referentes aos testes estatísticos descritos nas equações de 9 a 12 para o composto AMT.

Tabela 5 – Teste de linearidade e significância da curva analítica preparada na matriz, considerando um nível de significância de 95% para o valor de  $F_{\text{tab}}$  e  $t_{\text{tab}}$ .

<b>F calculado</b>		<b>F tabelado</b>		<b>Teste F</b>					
2682,2		9,28		Signif.					
<b>Coefficiente linear</b>				<b>Coefficiente angular</b>					
<b>a</b>	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>t<sub>tab</sub></b>	<b>Teste t</b>	<b>b</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>t<sub>tab</sub></b>	<b>Teste t</b>
205,226	3,96	51,79	3,182	Signif..	18790,8	2055,22	9,14	3,182	Signif.

Fonte: Elaboração própria, 2023. \* Signif.: significante.

Para a verificação da veracidade da curva de calibração, aplicou-se o teste F e o “*t de student*” utilizando as equações de 11 e 12, como descrito anteriormente. Foi aplicado somente

para a curva na matriz em vista que, como descrito no subitem 5.2.3, foi utilizada para a análise em amostras reais

Considerando que  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , podemos concluir que existe uma relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  que é significativa para AMT na matriz amostral. De modo geral, quando há uma regressão significativa, o valor  $F$  calculado será alto, conforme mostrado na tabela 8, pois a variação do valor  $y$  causada pela relação linear será maior que o residual (soma dos desvios ou soma dos erros).

Quanto ao teste “*t student*”, levou-se em consideração o valor dos desvios referentes aos parâmetros da equação da reta para o AMT, dessa forma, considerando os coeficientes lineares e angulares, calculado conforme a equação 9, 10 e 11.

Os resultados da análise estatística dos parâmetros da curva analítica na matriz (tabela 7) mostram que o coeficiente angular e o coeficiente linear são significativos, ou seja,  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ , possibilitando considerar o valor deste parâmetro. Portanto, para quantificar pesticidas em amostras reais, utilizou-se a equação da reta  $y = 205,23x - 18791$ .

### 5.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para a determinação dos LD's e LQ's, foi realizado por meio da razão da área do sinal obtido da amostra com a do branco. Dessa forma, é feito uma integração do sinal do AMT e do branco dado pelo cromatograma, no mesmo tempo de retenção do sinal do AMT, e por fim, feito o cálculo de obtenção dos LD's e LQ's, obedecendo a relação 3:1 e 10:1.

Por meio dos LQ's, foi estimado os valores dos LD's. Dessa forma, o LD no solvente foi estabelecido na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Por outro lado, a obtenção do LD na matriz de água superficial deu-se ainda menor, a qual estimou-se em  $18 \mu\text{g L}^{-1}$ . Ao analisarmos o LQ no solvente, foi estabelecido na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto o LQ na matriz foi de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Vale ressaltar que o composto AMT mostrou-se mais sensível na matriz de água superficial, apresentando baixos valores de LD e LQ em relação ao solvente, possivelmente devido ao EM positivo. Os valores de LD representam as menores concentrações do composto que o método é capaz de detectar, enquanto o LQ são as concentrações do composto que o método é capaz de quantificar com confiabilidade, ou seja, com exatidão e precisão.

Conforme já citado, de acordo com a legislação da União Europeia (2021), utilizada neste trabalho, o limite máximo permitido para ser encontrado em águas naturais é de 60 µg/L do AMT, valor esse que representa o LQ da curva analítica na matriz, a qual foi utilizada para a verificação do pesticida em amostras reais.

#### 5.2.6 Precisão e Exatidão por meio dos Ensaio de Recuperação

Conforme a metodologia deste trabalho, o método utilizado para validar a precisão foi por meio da repetibilidade, portanto, os resultados para as estimativas dos CV% do AMT no solvente estão expressos na tabela 8. De acordo com as normas do INMETRO (2020) e da *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General* (2015), para validação de métodos cromatográficos é permitido um valor máximo do CV%, os quais são, respectivamente, 15% e 20%.

Tabela 6 – Área do pico cromatográfico do AMT em cinco níveis de concentração (n = 3) com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos de CV%, no solvente.

<b>Concentração (µg. L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área ± Desvio Padrão</b>	<b>Precisão (CV%)</b>
100	8836,30 ± 2583,59	29,23
150	10862,84 ± 311,01	2,86
250	16967,96 ± 160,73	0,94
500	31296,32 ± 1565,78	5,00
1000	73038,28 ± 5512,28	7,54

Fonte: Elaboração própria, 2023.

Podemos observar que dos cinco pontos que constituem a curva de calibração no solvente, somente o de 100 µg. L<sup>-1</sup> não foi satisfatório, apresentando um valor acima do limite recomendado conforme a legislação brasileira e o limite europeu. O valor elevado e não preciso de seu CV% é por se tratar de uma concentração muito baixa.

Assim como para a curva no solvente, do mesmo modo foram preparadas cinco amostras para a matriz, nas mesmas concentrações, em triplicada, analisadas no mesmo dia, mesmo analista e no mesmo equipamento. A precisão da repetibilidade dos CV% do AMT na matriz,

expresso na tabela 9, mostra que os cinco pontos que constituem a curva estão dentro do limite recomendado conforme as legislações citadas.

Tabela 7 – Área do pico cromatográfico do AMT em cinco níveis de concentração com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos de CV%, na matriz.

<b>Concentração (µg. L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área ± Desvio Padrão</b>	<b>Precisão (CV%)</b>
100	16223,38 ± 564,87	3,48
150	19888,14 ± 507,67	2,55
250	41364,29 ± 1483,77	3,58
500	94550,56 ± 1580,53	1,67
1000	197394,94 ± 3297,95	1,67

Fonte: Elaboração própria, 2023.

Para calcular a recuperação deve-se adicionar uma quantidade conhecida do padrão à matriz, que pode ou não conter o analito em questão. Este procedimento é conhecido como fortificação ou dopagem (INMETRO, 2020). O cálculo para determinar a recuperação é realizado a partir da equação 7 descrita no subitem 4.6.6.

No entanto, caso a amostra esteja isenta do analito, a equação 7 pode ser formulada da seguinte maneira (equação 13), assumindo que o branco da amostra não contenha concentrações significativas do analito (ANVISA, 2017).

$$R(\%) = \left( \frac{C_2}{C_3} \right) \times 100\% \quad (13)$$

Os resultados dos percentuais recuperados do pesticida associados aos seus respectivos desvios padrão, apresentam-se na tabela 10. Vale destacar que ao comparar com os critérios de aceitação do INMETRO (2020), que estabelece recuperações entre 80 a 110% com desvio padrão aceitável de 20% para métodos multiresíduos, observa-se que o percentual da



recuperação mostrou uma boa exatidão, em vista que a média dos níveis de fortificação variou de 98,63% a 109,39%, que são resultados dentro dos limites aceitos pela legislação.

Tabela 8 – Percentuais de recuperação do AMT em três níveis de fortificação (n = 5, intra-ensaio) com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos do CV.

<b>Nível de fortificação (<math>\mu\text{g. L}^{-1}</math>)</b>	<b>Média das Concentrações na Amostra (<math>\mu\text{g. L}^{-1}</math>) <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV%</b>
100	109,39 $\pm$ 4,66	109,36	4,26
500	493,16 $\pm$ 46,43	98,63	9,41
1000	1034,60 $\pm$ 66,44	103,46	6,42

Fonte: Elaboração própria, 2023.

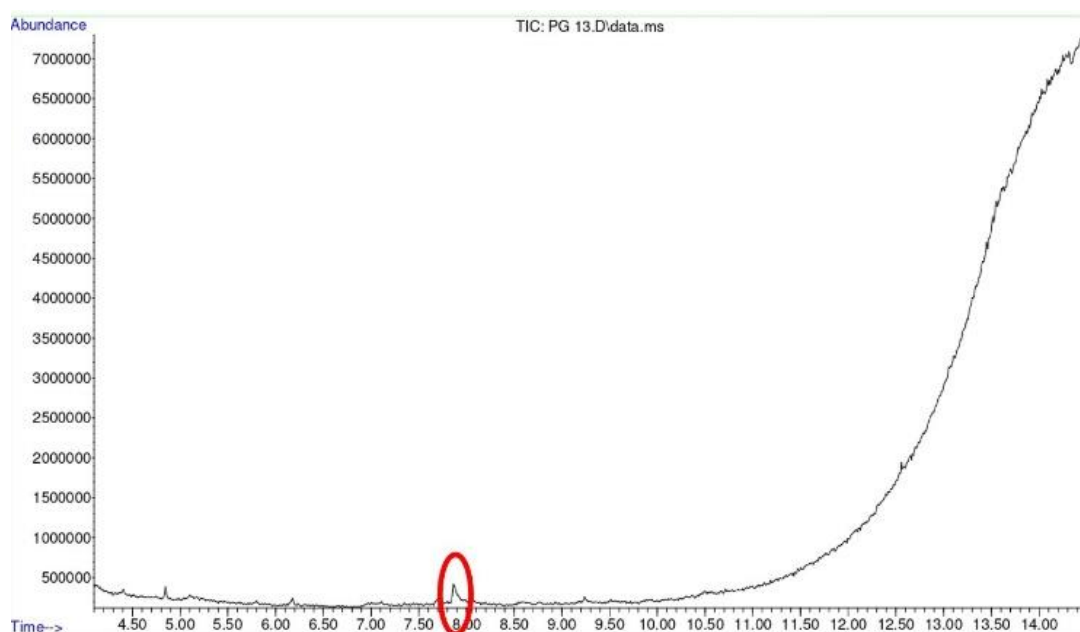
Dessa forma, é possível, por meio dos CVs/% da recuperação, observar que obtivemos uma boa precisão intra-ensaio em todos os três níveis de fortificação e que estão dentro do limite recomendado conforme as legislações citadas.

### 5.3 Análise Qualitativa e Quantitativa de Amostras de Água

O método, após desenvolvido e validado, foi aplicado em três amostras reais de águas oriundas de nascente, córrego e lago do Ribeirão Grotão (P1, P2 e P3) na cidade de Bielândia–TO, como descrito na seção 4.2.

De acordo com as análises realizadas, o pesticida em estudo não apresentou resíduos nas amostras P1, P2 e P3 no modo *SIM*. No entanto, ao fazer a análise no modo *SCAN* para a verificação qualitativa de outros possíveis contaminantes, todas as amostras (P1, P2 e P3) apresentaram em seus cromatogramas o mesmo pico no tempo de retenção 7.872 min, demonstrado na figura 18 para a amostra P1.

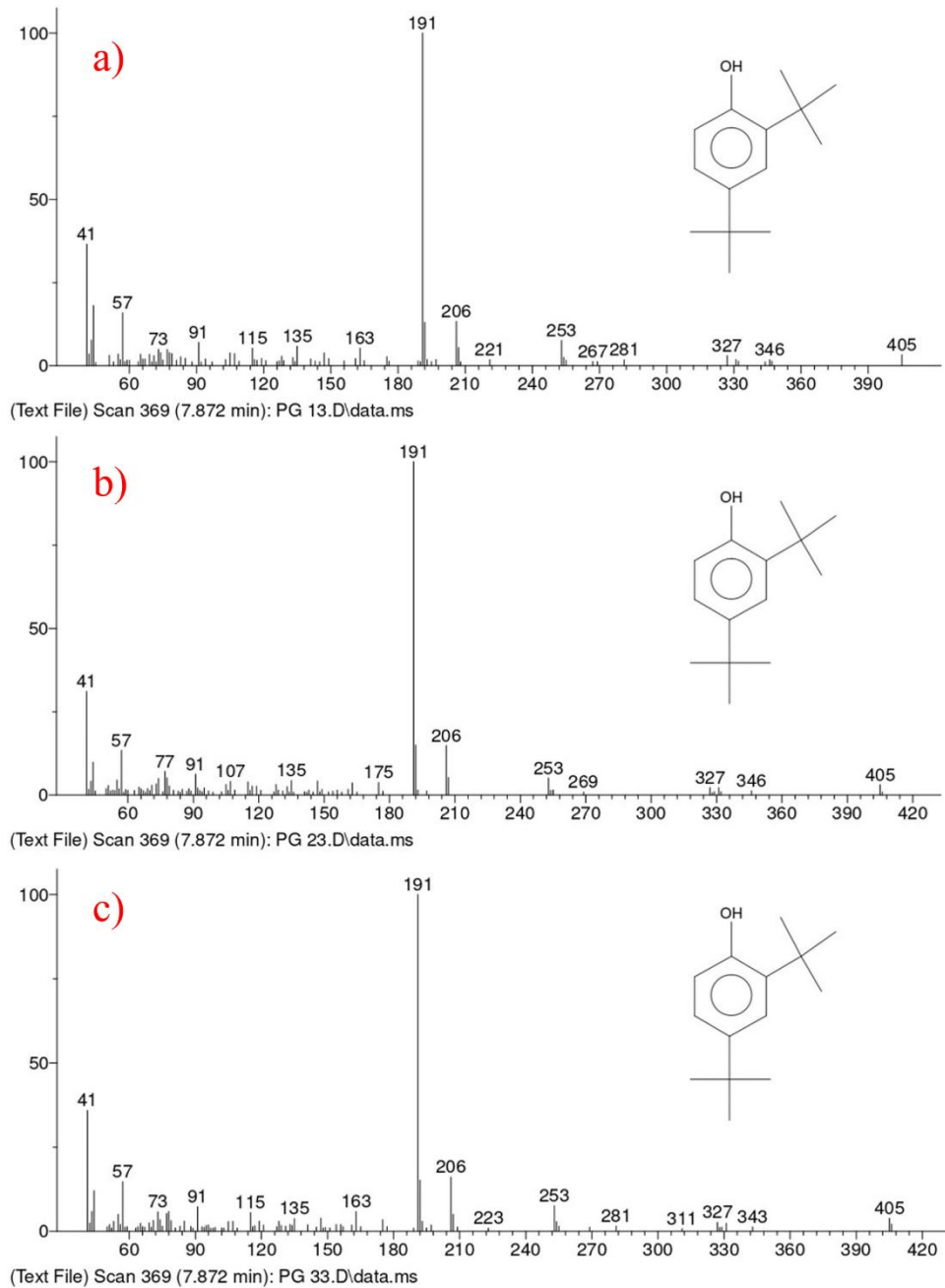
Figura 18 – Cromatograma no modo *SCAN* da amostra P1, em destaque é apresentado o pico relevante.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Dessa forma, verificamos os espectros de massas para esse pico, pois foi identificado nas três amostras no mesmo tempo de retenção. Assim, determinamos o composto proveniente deste sinal com a comparação do espectro obtido com a da biblioteca do aparelho. Ao comparar, obtivemos similaridade de 27.7% (P1), 34.6% (P2) e 49.6% (P3) com o 2,4-Di-*tert*-butylphenol, demonstrado na figura 19.

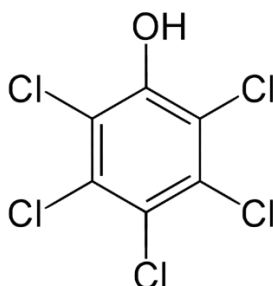
Figura 19 – Espectro de Massas do a) P1; b) P2 e c) P3.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

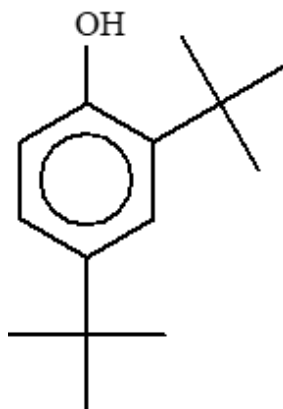
O resultado apresentado na figura 19 pode ser um subproduto proveniente de biodegradações do herbicida organoclorado Pentaclorofenol (PCP), popularmente conhecido como “pó da china”, o qual é reconhecido e utilizado pelas comunidades aos arredores do MONAF. Podemos observar sua estrutura na figura 20.

Figura 20 – Estrutura do Pentaclorofenol.



Fonte: Elaboração própria, 2023

Os clorofenóis são conhecidos por estarem entre os mais tóxicos e poluentes ambientais (ZAITSEV, 1995). De acordo com Leontievsky *et al.* (2001), foi comprovado que o PCP é biodegradável e uma de suas possíveis degradações é o 2,4,6-Triclorofenol (TCP). De acordo com Moraes (2022), foi indicado em seu trabalho que o 2,4-Di-*tert*-butylphenol é um subproduto da degradação do TCP, justificando o nosso possível composto presente na amostra. Podemos observar a estrutura do 2,4-Di-*tert*-butylphenol na figura 21.

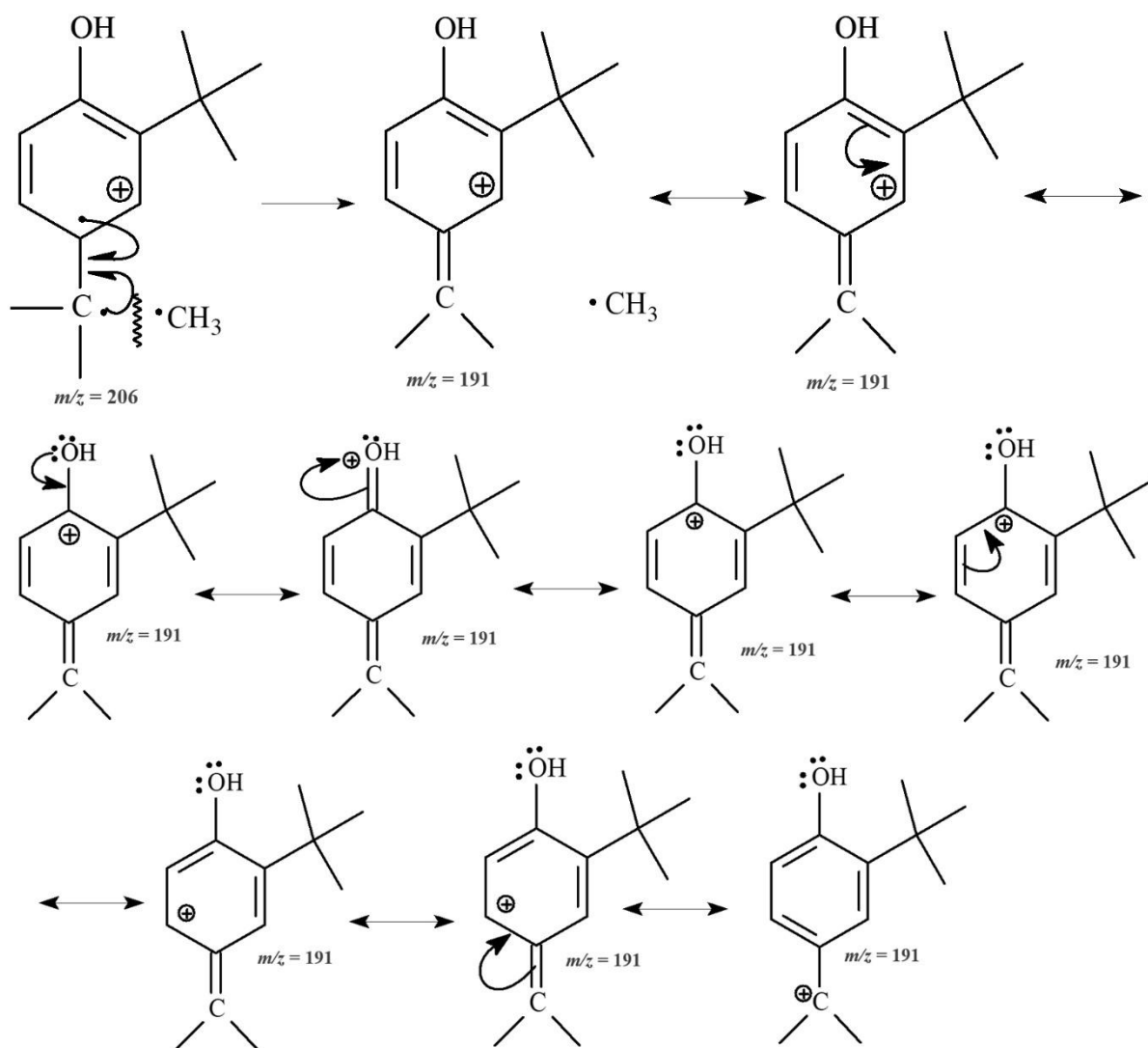
Figura 21 – Estrutura do 2,4-Di-*tert*-butylphenol.

Fonte: Elaboração própria, 2023.

Ao observarmos o espectro de massas representado na figura 19, o íon de 191  $m/z$  detectado apresentou intensidade de 100%, a qual tem sua origem por meio de uma clivagem homolítica perdendo um radical metila (15  $m/z$ ) a partir do íon molecular ( $M^+$  206). É

observado também a movimentação de pares de elétrons, demonstrando que a estrutura de maior abundância relativa apresenta maior número de estruturas de ressonância, como podemos observar na proposta de fragmentação na figura 22.

Figura 22 – Proposta de fragmentação para o íon 191  $m/z$ .



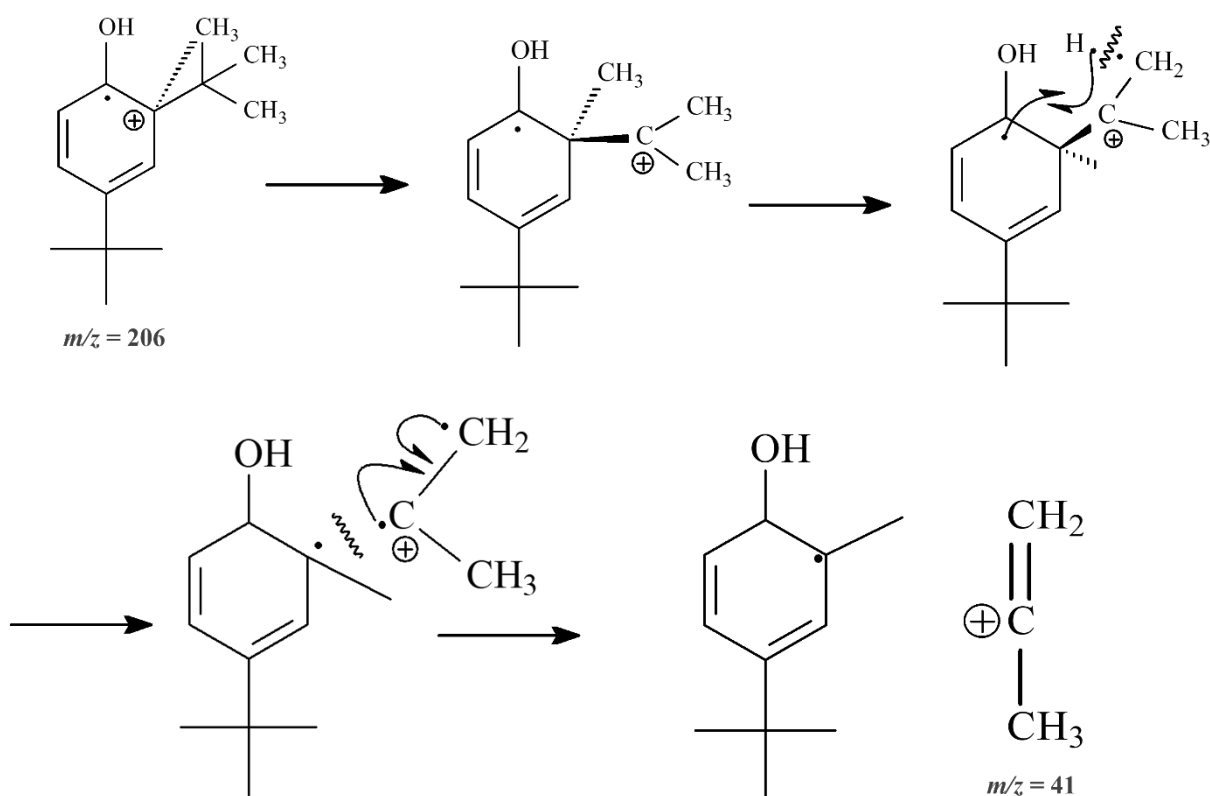
Fonte: Elaboração própria, 2023.

Vale ressaltar que o íon 191  $m/z$  apresentou maior intensidade devido a presença de seis grupos metil para possíveis saídas. Destaca-se também que o íon possui estabilização por ressonância direcionada à formação de carbocátions secundários e terciário, favorecendo a formação do íon 191  $m/z$ .

A teoria de ressonância acontece sempre quando moléculas, íons catiônico ou aniônico tiverem formas de ser representados por duas ou mais estruturas de Lewis que diferem uma da outra pelas posições dos elétrons (SOLOMONS, 2018).

Ao observarmos a formação do íon 41  $m/z$ , inicialmente tem-se o íon com uma hibridização  $sp^2$  e logo após o rearranjo de uma metila ele passa a ter uma hibridização  $sp^3$ , formando um carbocátion terciário. Posteriormente, o radical do anel aromático reage com o hidrogênio e, por fim, temos uma clivagem homolítica do íon formando um componente radicalar. Após isso, o radical do  $CH_2$  emparelha-se com o elétron do  $C_{zero}$  carregado positivamente, formando o íon de 41  $m/z$ , o qual foi detectado pelo espectrômetro de massas. Podemos observar a proposta de fragmentação na figura 23.

Figura 23 – Proposta de fragmentação para o íon 41  $m/z$ .



Fonte: Elaboração própria, 2023.

## 6. CONCLUSÃO

O preparo de amostras utilizando o método *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* adaptado apresentou desempenho analítico eficaz para a determinação do pesticida *Ametryn* em amostras de águas subterrânea e superficial, usando a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com o sistema quadrupolo no modo *SIM*.

Os parâmetros da validação de métodos analíticos provaram confiabilidade dos resultados para a análise do pesticida em estudo em amostras de águas, proporcionando uma ótima linearidade ( $R^2 = 0,9989$ ), exatidão (recuperação entre 98% e 109%) e precisão ( $CV\% < 8\%$ ), com valores de LQ variando de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  (matriz) a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (solvente).

Destaca-se que a curva de calibração na matriz se mostrou mais satisfatória para a verificação do *Ametryn*, utilizando-a para a detecção e quantificação do pesticida alvo. Dessa forma, o método validado foi aplicado em três amostras reais de águas (nascente, córrego e lago), as quais não apresentaram resíduos do herbicida *Ametryn*. Embora isso, foi verificado a presença do 2,4-Di-tert-butylphenol, um subproduto fruto da degradação do pesticida organoclorado Pentaclorofenol.

Vale ressaltar que compostos organoclorados não são autorizados no Brasil, logo, banidos pela ANVISA. Dessa forma, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 164 de 18 de agosto do ano de 2006, o Pentaclorofenol e seus sais são proibidos, devido sua toxicidade para animais e humanos, persistência no meio ambiente, por ser um interferente endócrino, sua toxicidade hepática e renal.

Portanto, conclui-se que o método desenvolvido e validado é adequado para a detecção e quantificação de resíduos do herbicida *Ametryn* com exatidão e precisão em amostras reais de águas e pode ser aplicado em análises de rotina para fins de monitoramento em locais que apresentam uma possível aplicação desta substância, podendo até auxiliar os órgãos competentes nas atividades de fiscalização.

## REFERÊNCIAS

ABIKO, A. K.; ALMEIDA, M. A. P.; BARREIROS, M. A. F. *Urbanismo: História e Desenvolvimento*. São Paulo: **Epusp**, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta pública nº 1027 de 11 de março de 2021, publicada no D.O.U de 17 março de 2021. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6243353/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N+1027+GGTOX.pdf/42006f98-70c0-47c6-991a-1bc2f78391e4>. Acesso em: 07 jul. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 164**, 18 de agosto de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 166**, 25 de julho de 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 294**, 29 de julho de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Quem somos**, 12 de julho de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/agencia-nacional-de-vigilancia-sanitaria>. Acesso: 26/07/2023.

ALCÂNTARA, D. B. *et al.* Organophosphorus pesticide in sapidilla (manilkara zapota) fruit. **Article**, v. 29, n. 10, p. 2180-2188, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20180094.

ALVES, M. I. R. *et al.* Avaliação da contaminação por pesticidas organoclorados em recursos hídricos do estado do Goiás. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, n. 1, p. 67-74, 2010.

AMOATEY, P. *et al.* Occupational exposure to pesticides and associated health effects among greenhouse farm Workers. **Environ Sci Pollut Res**, v. 27, p. 22251-22270, 2020. DOI: 10.1007/s11356-020-08754-9.

ANASTASSIADES M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC Internatinal**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, JANUSZ. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1 out. 1990. DOI: doi:10.1021/ac00218a019.

BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. Modified QuEChERS method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit samples utilizing high-performance liquid chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 2020-2027, 2015. DOI: 10.1007/s12161-014-0081-7.

BUDAK, T. B.; AYYILDIZ, M. F.; CHORMEY, D. S.; BAKIRDERE, S. Combination of vortex assisted binary solvent microextraction and QuEChERS for the determination of



prothiofos, oxadiargyl, and gamma-cyhalothrin in water and pineapple samples by gas chromatography mass spectrometry. **Environ Monit Assess**, n. 273, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1007/s10661-020-8209-2.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**, Brasil, 2002.

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

BRASIL. Manual de Avaliação de Riscos Ambientais de Agrotóxicos para Abelhas. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA**, p. 114, 2020.

BRASIL. Portaria de Consolidação GM/MS Nº 888 de 4 de maio de 2021. Anexo XX – Procedimento de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, 2021.

BRONDI, S. H. G. *et al.* Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 18– 22, 2011. DOI: 10.1007/s00128-010-0176-9.

CARNEIRO, F. F. *et al.* Segurança Alimentar e nutricional e saúde. Parte 1. In CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* (org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CHEN, Y. *et al.* Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191–219, mar. 2008. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.026.

EL-DEEN, A. K.; SHIMIZU, K. Modified  $\mu$ -QuEChERS coupled to diethyl carbonate-based liquid microextraction for PAHs determination in coffee, tea, and water prior to GC–MS analysis: An insight to reducing the impact of caffeine on the GC–MS measurement. **Journal of Chromatography B**, v. 1171, p. 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122555.

FRENICH, A. G. *et al.* Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC–MS/MS and LC–MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 7-8, p. 1106–1118, 3 nov. 2005. DOI: 10.1007/s00216-005-0139-x.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. *et al.* Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.012

HARTWIG, I. *et al.* Estimativa de coeficientes de correlação e trilha em gerações segregantes de trigo hexaplóide. **Bragantia**, v. 66, n. 2, p. 203–218, 2007. DOI: 10.1590/S0006-87052007000200004.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticides residues in food and biotic matrices. **J. Chromatogr. A**, v.1000, p. 181-197, 2000. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01145-X.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, ed. 9, p. 127 – 141, 2017.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 54–73, jun. 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.008.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Application. **John Wiley**, 3<sup>a</sup> ed., 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. Rio de Janeiro: **INCA**, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**, 2020.

JACOMINI *et al.* Determination of Ametryn in River Water, River Sediment and Bivalve Mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Soc.*, vol. 20, n. 1, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000100018>.

JÚNIOR, R. P. S.; PAZ, R. B. S. Método Analítico Multirresíduos para Determinação de Agrotóxicos e seus Produtos de Degradação em Águas Superficiais. Dourados,MS: **Embrapa Agropecuária Oeste**, p. 13, 2020.

KIM, L.; LEE, D; CHO, H-K; CHOI, S-D; Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663–1683, 1 jun. 2007. DOI: 10.1007/s00216-007-1348-2.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 9, p. 615–629, 2005.

Lei nº 1116, de 9 de dezembro de 1999. **Criar a unidade de conservação específica**. Publicado no Diário Oficial nº 869. Palmas, Tocantins, p. 1-4, 1999.

LEONTIEVSKY, A. A. *et al.* Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 85–91, 1 out. 2001. DOI: 10.1007/s002530100756.

LEWIS, S. E. *et al.* Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 8-9, p. 2470–2484, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.03.006.

LOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; JANKOWSKA, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-resíduos pesticide analysis in

soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7124-7138, 2017. DOI: 10.1007/s11356-016-8334-1.

LEITE, F. Validação em análise química. **Editora Átomo**, 5 ed., v. L552, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de avaliação e controle de qualidade analítica: Fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários**. Brasília, ed. 1, p. 10-46, 2011.

MARTÍNEZ, R. C. *et al.* Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1, p. 1–17, 30 set. 2005. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.072.

MARTINI, L. F. D. *et al.* Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1715-1721, 2012.

MENDES, A. T.; JUNIOR, J. C. Z. Caracterização do regime pluviométrico do município de Araguaína. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 34, p. 449-458, 2019. DOI: 10.1590/0102-7786344056.

MENDIOLA, J. A. *et al.* Use of compressed fluids for sample preparation: **Food applications**. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 234–246, jun. 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.046.

MIRANDA, C.; OLIVEIRA, R. M. Utilização de agrotóxicos no assentamento três pontes, município de Perolândia (GO): fatores de risco à saúde. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 368-378, 2019. DOI: 10.15359/rgac.63-2.14.

MORAES, M. A. R. **Bactérias associadas à esponja *Hymeniacidon heliophila*: papel fisiológico e aplicação na biotecnologia**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Mestrado em Ciências). São Paulo, 2022.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. p. 263-304, 2011.

PAYÁ, P. *et al.* Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697–1714, 2007. DOI: 10.1007/s00216-007-1610-7.

PAZ, M. *et al.* Application of the QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in Brazilian fruit pulps by GC-ECD. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 48-58, 2016. DOI: 10.1080/03601234.2016.1229450.

PEREIRA, F. H. F. Agricultura geral, origem e evolução da agricultura. **Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar**, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, 2013.

PERESTRELO, R. *et al.* QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.036.

- PICÓ, Y. *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 117–131, 10 mar. 2007. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.10.010.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, vol. 31, n° 4, 987-995, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400030.
- PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013.
- PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- RAHNMAN, M. M.; ABD EL-ATY, A. M.; SHIM, J.H. Matrix enhancement effect: a blessing or a 447 curse for gas chromatography? **Analytica Chimica Acta**, 801, 14–21, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.09.005.
- REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO<sub>2</sub>-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 217, p. 225–233, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.095.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.
- RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.
- RIBEIRO, A. C. *et al.* Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 284-290, 2013.
- RIBEIRO, M. L. *et al.* Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.
- SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Proteção Ambiental**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 91-92, 2011.
- SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce matrix enhancement effect in gas chromatography analysis of pesticide residue in food? **J. Chromatogr A.**, v. 868, p. 51-61, 2000. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01137-1.
- SHATTAR, S. F. A.; ZAKARIA, N. A.; FOO, K. Y. Utilization of montmorillonite as a refining solution for the treatment of ametryn, a second generation of pesticide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 4, p. 3235–3242, 2017. DOI: 10.1016/j.jece.2017.06.031.

SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. **John Wiley & Sons, INC**, 7<sup>a</sup> ed., p. 1, 2005.

SHINOHARA, N. K. S.; PADILHA, M. S. F.; OLIVEIRA, F. H. P. C.; CABRAL, J. V. B. Insegurança alimentar no uso indiscriminado de agrotóxicos. **Artigo**, v. 31, n° 266/267, p. 17-21, 2017.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 12 ed., v. 1, 2018.

SZEWCZYK, R.; KUŚMIERSKA, A.; BERNAT, P. Ametryn removal by *Metarhizium brunneum*: Biodegradation pathway proposal and metabolic background revealed. **Chemosphere**, v. 190, p. 174–183, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.011.

TURAN, N. B.; MALTEPE, E.; CHORMEY, D. S.; BARKIRDERE, S. Determination of fenazaquin in water and tomato matrices by GC-MS after a combined QuEChERS and switchable solvent liquid phase microextraction. **Environ Monit Assess**, n. 72, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1007/s10661-019-8061-4.

VIGNA, C. R. M.; MORAIS, L. S. R.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on sílica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. **J. Chromatogr. A**, v. 1114, p. 211-215, 2006.

YANG, S.; BERDINE, G. Outliers. **The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles**, v. 4, n. 13, 2016. DOI: 10.12746/swrccc2016.0413.178.

ZAITSEV, G. M. *et al.* Utilization of Halogenated Benzenes, Phenols, and Benzoates by *Rhodococcus opacus* GM-14. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4191–4201, 1995.