

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS E
FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO
QuEChERS, EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE) E
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)**

Natalí da Silva Schio*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE(A) EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador(a): Profº. Drº. Pedro Sérgio Fadini
Coorientador: Profº. Drº. Marcel Okamoto Tanaka

* bolsista Capes

São Carlos - SP
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natalí da Silva Schio, realizada em 24/11/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini (UFSCar)

Profa. Dra. Leila Jorge Patrizzi (SAAE)

Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que tornaram possível mais essa conquista na minha vida.

Ao professor Dr. Pedro Sérgio Fadini, que me orientou durante a realização dessa pesquisa, apontando-me o melhor caminho.

Ao professor Dr. Marcel Okamoto Tanaka, que também participou com orientações importantes.

À professora Dra. Roberta Cerasi Urban, que me ajudou na coleta de material e com quem eu troquei ideias enriquecedoras sobre essa pesquisa.

Ao Guilherme Martins Grosseli, que me ajudou muito com a parte técnica dessa pesquisa.

Ao Lucas Ximenes Araújo, com quem eu compartilhei minhas dúvidas e aflições.

A todos os colegas de laboratório, que proporcionaram um saudável convívio.

Por fim, agradeço ao INCTAA (CNPq 465768/2018-8 e FAPESP 2014/50951-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de Financiamento 001).

LISTA DE SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS - Solubilidade em água

GC/ECD - Cromatografia a gás acoplada ao detector de captura de elétrons

GC-MS - Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

CI - Carbono inorgânico

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT - Carbono Orgânico Total

CRM - Material de Referência Certificado

CT - Carbono Total

CV - Coeficiente de Variação

DL₅₀ - Dose letal

DPR - Desvio Padrão Relativo

d-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva (do inglês *dispersive-SPE*)

EM - Efeito Matriz

FM - Fórmula Molecular

Koc - Coeficiente de sorção no solo

LD_m - Limite de detecção do método

LLE - Extração Líquido-Líquido

LQ_m - Limite de quantificação do método

OD - Oxigênio Dissolvido

POP - Poluentes Orgânicos Persistentes

Pow - Coeficiente de Partição octanol-água

PSA - Amina Primária Secundária (do inglês *primary secondary amine*)

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e safe*)

RPM - Rotações por minuto

SBHRF - Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão

SBHRQ - Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo

SPE - Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)

UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada espectrometria de massas em modo *tandem* (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography -mass spectrometry tandem mass spectrometry*).

VMP - Valores Máximos Permitidos

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1-Classificação da toxicidade dos pesticidas de acordo com efeitos causados à saúde humana.	8
TABELA 3.2-Fórmulas estruturais, tipo, solubilidade em água (SA) em mg L ⁻¹ a 20 °C, fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow, Coeficiente de sorção no solo (Koc) em mL g ⁻¹ * e dose letal em mamíferos (DL ₅₀) em mg kg ⁻¹	9
TABELA 3.3 - Classificação dos pesticidas pelos parâmetros das características físico-químicas.....	12
TABELA 3.4 – Classes terapêuticas e princípios ativos que as compõem.	14
TABELA 3.5 - Fórmulas estruturais, classe terapêutica (C.T), solubilidade em água (SA) em mg mL ⁻¹ , fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow.	16
TABELA 3.6 - Breve apresentação das possibilidades de uso do método QuEChERS.	20
TABELA 3.7 - Exemplos de solventes adequados e inadequados para uso em LLE.	23
TABELA 3.8- Esquema para seleção de sorvente e solvente de eluição para extração de analitos com massas molares inferiores a 2000 daltons.	26
TABELA 3.9- Valores de %CV aceitáveis em função da concentração dos analitos, independente da natureza do analito, da matriz e do método utilizado.	35
TABELA 3.10- Valores das porcentagens de recuperação aceitáveis em função da concentração dos analitos, independente da natureza do analito, da matriz e do método utilizado.	37
TABELA 4.1 - Programação do forno cromatográfico usada na determinação de pesticidas organoclorados.	44
TABELA 4.2 - Fórmulas estruturais, solubilidade em água (SA) em mol L ⁻¹ , fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow.	45
TABELA 4.3- Tempos de retenção (Tr) obtidos para os analitos a partir da técnica de GC-MS.	45
TABELA 4.4- Gradiente utilizado para a eluição dos compostos.	46
TABELA 4.5- Voltagem do cone, energia de colisão e transições monitoradas na determinação dos analitos usando o espectrômetro de massas.	47
TABELA 5.1- Valores dos coeficientes de variação (%CV) e porcentagens de recuperação (%Rec) dos analitos, em três níveis de fortificação, com 0,3 L de amostra.....	54
TABELA 5.2- Parâmetros da curva analítica pelo método de adição padrão, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os pesticidas estudados em amostras sólidas, fortificadas em dois níveis.	57

TABELA 5.3- Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em $\mu\text{g Kg}^{-1}$, para o método de extração aplicado às amostras sólidas.....	59
TABELA 5.4-Parâmetros da curva analítica pelo método de adição padrão, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os pesticidas estudados em amostras de água, fortificadas em três níveis diferentes.	60
TABELA 5.5-Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em ng L^{-1} , para o método de extração de pesticidas organoclorados aplicado às amostras de água.	62
TABELA 5.6- Parâmetros da curva analítica pelo método padronização externa, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os fármacos estudados em amostras de água, fortificadas em $10 \mu\text{g L}^{-1}$	63
TABELA 5.7-Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em ng L^{-1} , para o método de extração de fármacos aplicado às amostras de água.....	64
TABELA 5.8- Valores obtidos na avaliação dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletas em diferentes períodos na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão e na Sub-Bacia do Rio Quilombo.	66
TABELA 5.9 - Valores Máximos Permitidos (MVP) para pesticidas organoclorados em água doce, de acordo com as classes.....	68
TABELA 5.10 -Valores Máximos Permitidos (MVP) para pesticidas organoclorados em solo e sedimento.....	68
TABELA 5.11- Valores das concentrações de fármacos determinadas nas amostras de água coletadas nas Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão e na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo.....	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1- Localização da Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão.	4
Figura 3.2- Localização da Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo.	6
FIGURA 3.3- Gráfico da representação do faturamento do mercado farmacêutico brasileiro, em bilhões de reais, no período de 2005 até 2018.	14
FIGURA 3.4 - Representação esquemática das etapas o método <i>QuEChERS</i> original.....	18
FIGURA 3.5 - Representação esquemática da extração de analitos de amostras aquosas utilizando LLE.....	22
FIGURA 3.6 - Cartucho (A) e aparato (B) necessário para a execução da SPE.25	
FIGURA 3.7- Representação esquemática das etapas envolvidas na SPE.....	27
FIGURA 4.1-Localização dos pontos de coleta de amostra no município de São Carlos.....	39
FIGURA 4.2- Representação do sistema usado para filtrar as amostras de água.	40
Figura 4.3- Representação do processo de percolação das amostras de água pelos cartuchos (A) e da etapa de secagem dos cartuchos usando o manifold (B).	51
Figura 5.1-Cromatograma obtido com a injeção de uma solução mix de analitos (25 µg L ⁻¹) e uma solução de padrão interno (IS - 25 µg L ⁻¹), ambas preparadas em hexano.....	52
FIGURA 5.2- Comparação entre os cromatogramas obtidos com o padrão mix de pesticidas 25 µg L ⁻¹ (A) e os brancos analíticos das amostras de solo (B), sedimento (C) e água (D).	55
FIGURA 5.3- Efeito de matriz, em porcentagem, calculado para todos os analitos em amostras sólidas.	58
FIGURA 5.4- Efeito de matriz, em porcentagem, calculado para todos os analitos em amostras de água.	61
Figura 5.5- Localização dos pontos de coleta das amostras nas Sub-Bacias Hidrográficas do Ribeirão Feijão (P1-P4) e do Rio Quilombo (P5-P8).	65

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS E FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO *QuEChERS*, EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE) E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A presença de contaminantes orgânicos xenobióticos em corpos hídricos, onde chegam a partir do lançamento de efluentes tratados ou não, tem gerado preocupações quanto a impactos relacionados à riqueza e biodiversidade da vida aquática e à saúde humana. Considerando a possibilidade da presença crescente, persistência e pseudo-persistência de pesticidas e fármacos no ambiente, e possíveis efeitos deletérios decorrentes, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método multiresíduo usando *QuEChERS* e Extração Líquido-Líquido (LLE), para determinação dos compostos organoclorados Aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, endossulfan (α e β), endossulfan sulfato, 4,4'-DDE, dieldrin, endrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, endrin aldeído, metoxicloro e hexaclorociclohexano (α -BHC, β -BHC, γ -BHC e δ -BHC) em solo, sedimento e água superficial, utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) e Extração em Fase Sólida (SPE) para a quantificação de fármacos (Carbamazepina, Atenolol, Propranolol, CBZ-DiOH, Cafeína, Naproxeno, Ibuprofeno, 2-Hidroxicarbamazepina, Estrona, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, Paracetamol, 2-Hidroxi-ibuprofeno e Diclofenaco) em águas superficiais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC-MS/MS), em amostras coletadas nas regiões das Sub-Bacias Hidrográficas do Ribeirão do Feijão e do Rio Quilombo, no município de São Carlos, SP. Os métodos propostos para a determinação de organoclorados se mostraram válidos para todas as matrizes. Para as amostras sólidas, as porcentagens de recuperação (%Rec) dos analitos variaram entre 50% e 117%, com coeficientes de variação (CV) inferiores a 19% e coeficientes de correlação linear (R^2) superiores a 0,98, para todos os analitos. Na avaliação de efeito matriz (EM) foram obtidos efeitos

entre -8,73% e 585,35% para o α -BHC e para o endrin, respectivamente. Os limites de detecção (LD_m) ficaram entre $0,759 \mu\text{g Kg}^{-1}$, para o 4,4'-DDD, e $2,144 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para o endosulfan sulfato, enquanto os limites de quantificação (LQ_m) variaram entre $2,528 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e $7,147 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para os mesmos analitos. Para as amostras de água, as %Rec variaram de 40% até 144%, com CV inferiores a 24% para 16 dos analitos estudados. Todos os R^2 obtidos foram superiores a 0,99. O LD_m variou de $1,641 \text{ ng L}^{-1}$ até $4,433 \text{ ng L}^{-1}$, enquanto o LQ_m ficou entre $5,473 \text{ ng L}^{-1}$ e $14,779 \text{ ng L}^{-1}$ para o α -BHC e endosulfan sulfato, respectivamente. O efeito matriz (EM) foi de -13,73% para o α -BHC até 393,43% para o endrin. Com relação à determinação de fármacos em água, as %Rec ficaram entre 93% e 120%, com CV inferiores a 10% e R^2 superiores a 0,98 para todos os analitos estudados. Sobre os valores dos LD_m e LQ_m , o primeiro variou de $2,885 \text{ ng L}^{-1}$ para o ibuprofeno até $5,293 \text{ ng L}^{-1}$ para 17- β -estradiol, enquanto o segundo variou entre $9,618 \text{ ng L}^{-1}$ e $17,642 \text{ ng L}^{-1}$, para os mesmos analitos. Em relação as amostras coletadas, as análises feitas para a determinação dos organoclorados apresentaram resultados abaixo do limite de detecção. Este comportamento foi observado para todas as 3 matrizes, em todas as coletas realizadas. Nas análises para a determinação dos fármacos, foram observadas a presença de 10 analitos. A cafeína foi encontrada em todas as amostras, com concentrações de 105,2, 54,9, 52,3 e $184,4 \text{ ng L}^{-1}$. Os demais analitos determinados foram: atenolol (52,8, 28,3 e $17,2 \text{ ng L}^{-1}$), carbamazepina (22,8, 17,6 e $36,2 \text{ ng L}^{-1}$), propranolol (28,5, 63,9 e $78,4 \text{ ng L}^{-1}$), ibuprofeno (53,9 e $10,9 \text{ ng L}^{-1}$) e diclofenaco (13,4, 42,7 e $22,0 \text{ ng L}^{-1}$). Este trabalho está permitindo a elaboração de um importante cenário da qualidade das águas dos mananciais superficiais da cidade de São Carlos, buscando a identificação de valores de referência das primeiras décadas do século XXI, que possam ser utilizados em estudos e balizamentos de políticas públicas voltados à preservação ambiental da área e especialmente dos recursos hídricos.

Palavras-chave: Organoclorados, fármacos, QuEChERS, LLE, SPE.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES AND DRUGS IN ENVIRONMENTAL MATRICES USING QuEChERS, LIQUID-LIQUID EXTRACTION (LLE) AND SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)

The presence of xenobiotic organic contaminants in water bodies, where arrive from releases of treated or untreated effluent, has raised concerns about impacts related to the richness and biodiversity of aquatic life and human health. Considering the possibility of the increasing presence, persistence, and pseudo-persistence of pesticide and drugs in the environment and possible deleterious effect resulting from it, the objective of this work was to develop and to validate a multi-residue method using QuEChERS and Liquid-Liquid Extraction (LLE), for determination of organochlorine compounds (Aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide, endosulfan (α and β), endosulfan sulfate, 4,4'-DEE, dieldrin, endrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, endrin aldehyde, Methoxychlor and hexachlorocyclohexane (α -BHC, β -BHC, γ -BHC e δ -BHC)) in soil, sediment, and freshwater, with gas chromatography-tandem electron capture detector (GC/ECD) and Solid Phase Extraction (SPE) for drugs quantification (Carbamazepine, Atenolol, Propranolol, CBZ-DiOH, Caffeine, Naproxen, Ibuprofen, 2-Hydroxycarbamazepine, Estrone, 17- β -estradiol, 17- α -ethinylestradiol, Paracetamol, 2-Hydroxy-ibuprofen and Diclofenac) in freshwater using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), in the collected sample in the regions of Hydrographic Sub-Basin of Ribeirão do Feijão and Hydrographic Sub-Basin of Rio Quilombo, in São Carlos, SP. The proposed method for organochlorine compounds determination was valid for all matrices. For solid samples, the analyte recoveries (%Rec) were between 50% and 117%, with a coefficient of variation (%CV) below 19 and linear correlation coefficient (R^2) greater than 0.98, for all analytes. The value of matrix effect (ME) was between -8.73% for α -

BHC and 585.35% for endrin. The limit of detection (LOD) was $0.759 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for 4,4'-DDD and $2.144 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for endosulfan sulfate, and the limit of quantification (LOQ) was between $2.528 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $7.147 \mu\text{g Kg}^{-1}$, for the same analytes. The %Rec was between 40% and 144% for the freshwater sample, with %CV below 24 for 16 analytes analyzed. All R^2 was greater than 0.99. The LOD ranged from 1.641 ng L^{-1} for α -BHC to 4.433 ng L^{-1} for endosulfan sulfate, while the LOQ was 5.473 ng L^{-1} and 14.779 ng L^{-1} for the same analytes. The ME was -13.73% for α -BHC and 393.43% for endrin. Regarding the determination of drugs in freshwater, the %Rec ranges from 93% to 120%, with %CV below ten and R^2 greater than 0.98 for all analytes. The values of LOD ranged from 2.885 ng L^{-1} for ibuprofen to 5.293 ng L^{-1} for 17- β -estradiol, while the values of LOQ ranged from 9.618 ng L^{-1} to 17.642 ng L^{-1} , for the same analytes. Regarding collected samples, the analysis performed to the determination of organochlorine compounds showed results below LOD. This was observed for the three matrices in all collect performed. In the analysis for drugs determination, the presence of ten analytes was observed. The caffeine was in all analyzed samples, with concentrations 105.2, 54.9, 52.3, and 184.4 ng L^{-1} . The other analytes determined were atenolol (52.8, 28.3 and 17.2 ng L^{-1}), carbamazepine (22.8, 17.6 and 36.2 ng L^{-1}), propranolol (28.5, 63.9 and 78.4 ng L^{-1}), ibuprofen (53.9 and 10.9 ng L^{-1}), diclofenac (13.4, 42.7 and 22.0 ng L^{-1}). This work contributes to the elaboration of an important scenario of water quality of surface water source of the city São Carlos, which can support public policies for the preservation of the quality of the environment and human health through the development of public policies that inhibit economically predatory initiatives that are harmful to the environment.

Keywords: Organochlorines, drugs, QuEChERS, LLE, SPE.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	OBJETIVO GERAL.....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	A SUB-BACIA DO RIBEIRÃO FEIJÃO	4
3.2	A SUB-BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO QUILOMBO.....	5
3.3	PESTICIDAS	7
3.3.1	Características dos pesticidas estudados	8
3.4	FÁRMACOS	13
3.4.1	Características dos fármacos estudados	15
3.5	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	17
3.5.1	QuEChERS.....	18
3.5.2	Extração Líquido-Líquido (LLE).....	21
3.5.3	Extração em fase sólida (SPE)	25
3.6	MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO	29
3.6.1	Método de adição padrão	29
3.6.2	Método da calibração por padrões externo	30
3.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODO	30
3.7.1	Tipos de validação de método.....	31
3.7.2	Parâmetros avaliados no processo de validação	32
3.7.2.1	Seletividade.....	32
3.7.2.2	Linearidade	33

3.7.2.3	Efeito Matriz	33
3.7.2.4	Precisão	34
3.7.2.5	Exatidão	36
3.7.2.6	Limite de detecção e de quantificação.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Período de amostragem	39
4.2	Coleta e Condicionamento das amostras.....	39
4.3	Limpeza de vidrarias.....	41
4.4	Solventes, padrões primários, sais, adsorventes usados e Membranas e cartuchos	41
4.5	Instrumentação.....	42
4.6	Preparo das soluções padrão	43
4.7	Condições cromatográficas e avaliação dos parâmetros instrumentais.....	44
4.7.1	Condições de operação do GC-ECD.....	44
4.7.2	– Condições de operação do UPLC- MS/MS	46
4.8	Procedimento de preparo das amostras sólidas para determinação de pesticidas.....	48
4.8.1	etapa <i>clean-up</i> do método <i>QuEChERS</i>	48
4.8.2	- Concentração dos extratos	48
4.9	Procedimento de preparo das amostras de água para determinação de pesticidas.....	49
4.10	Procedimento de preparo de amostras para determinação de fármacos..	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Condições cromatográficas e parâmetros instrumentais	51
5.1.1	Condições operacionais do GC-ECD.....	51

5.2	Ajustes nas etapas dos métodos de extração	52
5.2.1	O método <i>QuEChERS</i>	53
5.2.2	O método LLE.....	53
5.2	Validação de método	54
5.2.1	Validação dos métodos para determinação de pesticidas organoclorados	54
5.2.2	Validação dos métodos para determinação de fármacos em amostras de água.....	62
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO	64
5.3.1	Pontos de coleta de amostras.....	64
5.3.2	Caracterização das áreas de estudo	66
6	CONCLUSÃO.....	71
7	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a questão da contaminação ambiental tem sido amplamente discutida, devido, principalmente, à preocupação com os possíveis impactos causados, tanto na saúde humana quanto no meio ambiente, pela presença, em efluentes de esgoto e ambientes aquáticos, de compostos orgânicos xenobióticos, que por definição, são aqueles estranhos a um organismo ou sistema biológico, tais como: elementos químicos potencialmente tóxicos, popularmente conhecidos como metais pesados, aditivos alimentares, fármacos e pesticidas,¹ sendo os dois últimos objetos de estudo deste trabalho.

Por possuírem um longo período de permanência no ambiente, alguns pesticidas, como os organoclorados, são considerados Poluentes Orgânicos Persistentes (POP's).² No Brasil, os primeiros registros do uso desta classe de produtos datam de 1946. Com o surgimento das indústrias de formulação em 1948, impulsionada pela demanda decorrente da ocorrência de diversas pragas nas principais culturas do país.³ Entretanto, em 1985 estes compostos tiveram sua comercialização, distribuição e uso, destinados a agricultura, proibidos pela Portaria nº 329, de 2 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura.⁴

A contaminação ambiental não se dá exclusivamente pelas atividades agrícolas e industriais, mas também por resíduos domésticos, destacando-se aqui a classe dos fármacos, uma vez que, após a ingestão terapêutica, mais de 70% da dosagem dos fármacos é excretada em 24 horas pelo organismo, 10% como compostos originais e 60% como metabólitos.⁵

Embora a concentração de fármacos encontradas em matrizes ambientais, como em águas superficiais, seja baixa, em valores de concentração consideradas subterapêuticas, pouco se conhece sobre os efeitos adversos que uma exposição prolongada e recorrente à estes compostos pode causar, tanto para a saúde humana quanto para a vida aquática.^{6; 7}

A possibilidade de contaminação ambiental por fármacos é bastante concreta, pois mesmos nos casos de algumas moléculas que podem ter rápida degradação, existe a emissão contínua, o que caracteriza a pseudo persistência dos mesmos. No caso dos pesticidas organoclorados, apesar de muitos terem o seu uso proibido em todo território nacional, os mesmos são considerados persistentes, por isso é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos, preferencialmente de fácil execução, para determinação destes compostos, nas diversas matrizes ambientais de interesse, mesmo que em baixas concentrações.

Para a realização deste trabalho foi escolhida uma área relativamente preservada e que representa um importante Manancial para o abastecimento do município de São Carlos-SP: a Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão, onde foram selecionados 4 pontos distintos para a coleta das amostras de solo, sedimento e água.

Para fins de comparação dos resultados obtidos com as amostras coletadas na SBHRF, e avaliação de cenários futuros, foi feita a caracterização de uma área da Sub-Bacia do Rio Quilombo (SBHRQ), também no município de São Carlos.

Outras informações sobre as áreas de estudos selecionadas, os analitos monitorados, os métodos de preparo de amostras e de quantificação dos analitos estão discutidos no decorrer deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método multirresíduo, utilizando *QuEChERS* e Extração Líquido-Líquido (LLE), para determinação dos pesticidas Aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido (hept. epóxido), endosulfan (α e β), endossulfan sulfato (end. Sulfato), diclorodifenildicloroetileno (4,4'-DEE), dieldrin, endrin, diclorodifenildicloroetano (4,4'-DDD), diclorodifeniltricloroetano (4,4'-DDT), endrin aldeído, metoxicloro e hexaclorociclohexano (α -BHC, β -BHC, γ -BHC e δ -BHC) em amostras de solo e sedimento e água, com determinação por cromatográfica gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) e determinar cafeína, atenolol, carbamazepina, propranolol, 2-hidroxicarbamazepina, CBZ-DiOH, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, estona, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, paracetamol e 2-Hidroxi ibuprofeno, como indicadores da presença de fármacos em águas superficiais utilizando Extração em Fase Sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC-MS/MS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

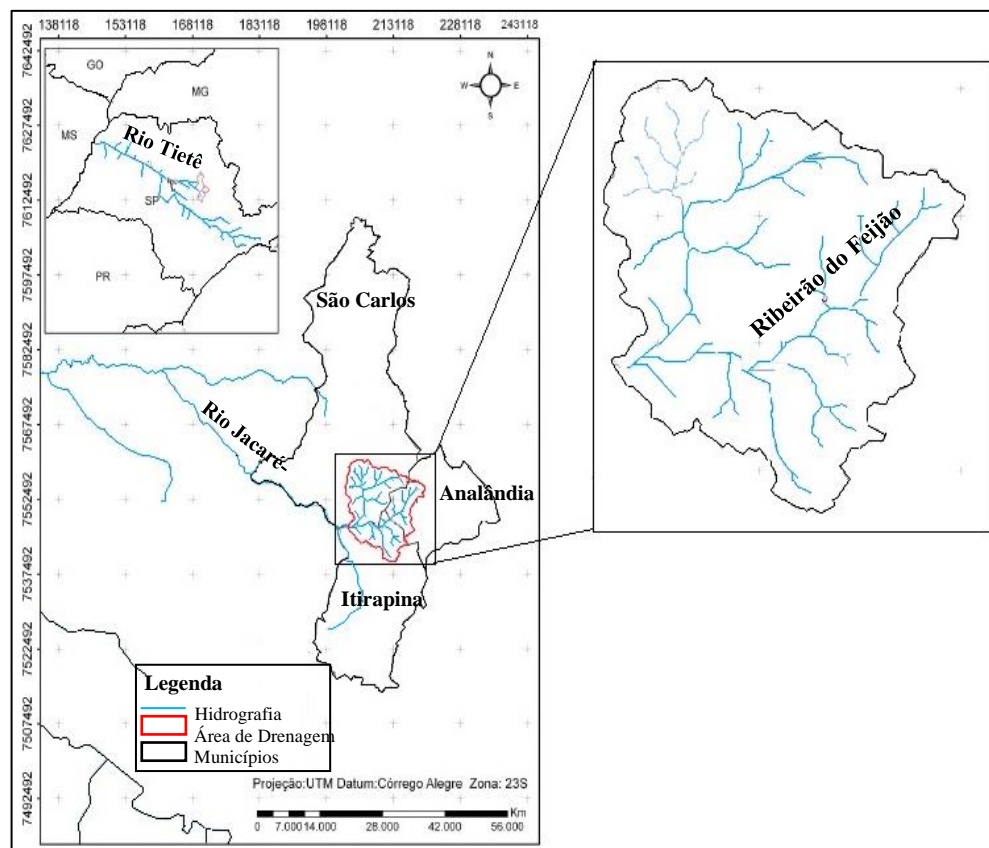
- Adaptar a etapa de extração para o preparo das amostras de solo, sedimento e água;
- Validar o método desenvolvido, em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação instrumentais e do método;
- Avaliar o efeito da matriz por meio da comparação das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e no extrato da matriz de solo e sedimento;
- Aplicar o método proposto às amostras coletadas nas áreas de estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A SUB-BACIA DO RIBEIRÃO FEIJÃO

Localizada na região centro-oeste do Estado de São Paulo, entre os paralelos 47°93'06"- 47°76'95" W e 22°16'63"- 22°07'19" S de latitude, com aproximadamente 222 Km² de extensão, a Sub-bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão (SBHRF) faz divisa com os municípios de São Carlos, Analândia e Itirapina (Figura 3.1) e engloba três principais rios (Rio Tietê, Rio Jacaré-Guaçu e Rio Jacaré Pepira), além de outros importantes cursos de água, como: o Córrego do Monjolino, o Córrego São João ou São José, o Córrego do Pinhal, o Córrego dos Macacos ou do Condo, o Ribeirão da Laranja Azeda ou Jacaré, o Córrego do Quebra Canela e o Córrego do Feijão. ^{8; 9; 10; 11}

FIGURA 3.1- Localização da Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão.



Fonte: OLIVEIRA, J.A (2011)¹². Adaptado

Por possuir características como boa qualidade de água e boa vazão, o Ribeirão Feijão é considerado um manancial de grande importância para São Carlos, fornecendo aproximadamente 35% da água potável para o município. Este rio está situado na Área de Proteção Ambiental Corumbataí, regulamentada pela Lei Estadual 20.960 de 1983, que visa proteger os ecossistemas aquáticos e terrestres da região central do Estado de São Paulo.¹³

A Sub-bacia do Ribeirão Feijão encontra-se em áreas de formação geológicas de afloramento de rochas paleozoicas, mesozoicas e cenozoicas. Seu clima é, de acordo com a classificação climática de Köppen, do tipo Cwa, descrito como subtropical de inverno seco e verão quente,¹⁰ e a vegetação é formada por florestas semidecíduas e ripariana, o cerrado e o cerrado.⁸

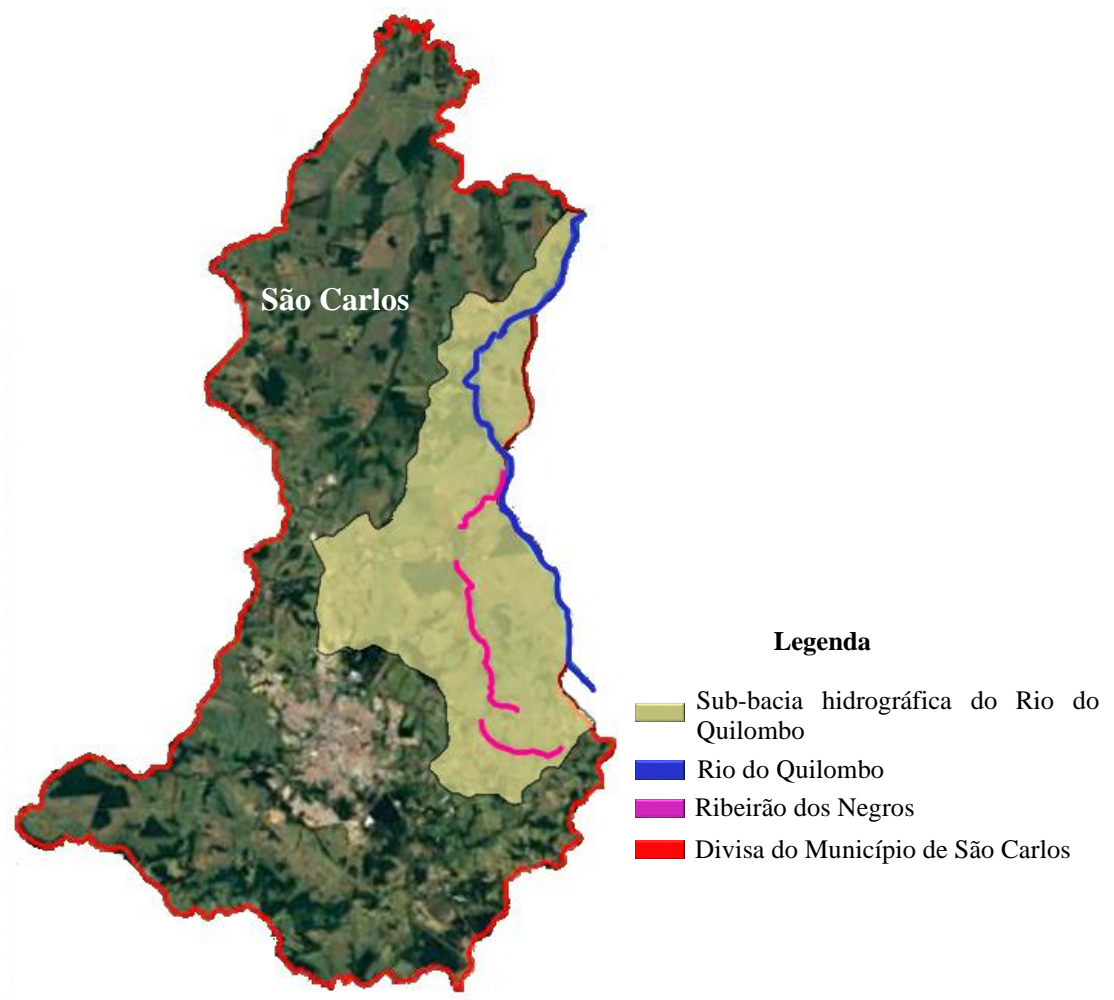
O uso do solo na região é bastante diversificado: em valores aproximados, 48% da área total da bacia é ocupada por matas e florestas plantadas; 27% é usado com pastagens, para criação de gado bovino semi-intensiva e extensiva e, 21% é ocupado pela agricultura, feita predominantemente por pequenos e médios produtores, com cultivo de café, milho, citrus e, com destaque, o cultivo de cana-de-açúcar, que vem crescendo consideravelmente ao longo dos anos.^{10; 14}

Junto com a expansão das áreas de cultivos agrícolas, visando melhorar a qualidade dos produtos e diminuir as perdas, ocorre também a elevação nas vendas e usos de pesticidas, principalmente em regiões de produção de cana-de-açúcar, já que esta é uma das quatro culturas que mais consomem estes produtos, ficando atrás apenas do plantio de soja, milho e algodão. Este fato tem motivado cada vez mais a realização de estudos com o intuito de avaliar a qualidade ambiental de locais situados próximos a áreas de cultura no que diz respeito a contaminação por pesticidas.

3.2 A SUB-BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO QUILOMBO

Com aproximadamente 418 km² de área, a Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo (SBHRQ) está localizada entre os municípios de São Carlos e Descalvado. Ocupando uma área de cerca de 304 km² na cidade de São Carlos (≅ 26% do território municipal) (Figura 3.2), esta é, juntamente com as do Ribeirão das Araras e a do Rio Monjolinho, uma das sub-bacias mais representativas dentro do município.^{15; 16}

Figura 3.2- Localização da Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo.



Fonte: FUSP, 2011¹⁷. Adaptado.

De acordo com o Plano Diretor Municipal de São Carlos, elaborado em novembro de 2005 e revisado em dezembro de 2016, a SBHRQ é considerada Zona de Interesse Turístico e de produção agrícola, além de estar apta para

instalação de estação de captação de água, para fins de abastecimento público.¹⁸

19

Em relação à ocupação do solo da SBHRQ, na região pertencente ao município de São Carlos, pode-se afirmar que esta é predominantemente agrícola, com 53,49% da área ocupada pelo cultivo de cana-de-açúcar (25,64%) e por pastagens (27,85%). A vegetação nativa é o terceiro uso mais representativo, ocupando 17,96% do território. Em relação à ocupação urbana, esta representa uma pequena parcela, 2,9% da área da SBHRQ.¹⁶

3.3 PESTICIDAS

O uso de termos como agrotóxicos, biocidas, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas e produtos fitossanitários, para se referir à substâncias químicas de origem sintética ou natural usadas com a finalidade de combater pragas e doenças das plantas tem sido uma questão bastante polêmica.^{20;21} Neste trabalho será usado o termo pesticidas para se referir à tais substâncias por ser o termo mais utilizado na literatura científica.







Pesticidas são definidos no Brasil, pelo decreto 4.074 de 4 de janeiro de 2002, como:

“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”²²

A classificação dos pesticidas pode ser feita de diferentes formas. Considerando sua estrutura química, podem ser classificados em: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas, triazinas, etc; ou, se for considerada a sua modalidade de emprego, eles podem ser divididos em: inseticidas, herbicidas,

fungicidas, acaricidas, entre outros.²³ Pode-se, ainda, classificá-los com base na sua toxicidade (Tabela 3.1), expressa em dose letal 50% (DL₅₀).²⁴

TABELA 3.1-Classificação da toxicidade dos pesticidas de acordo com efeitos causados à saúde humana.

Categoria toxicológica	Toxicidade	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹) *	Faixa colorida
1	Extremamente tóxico	≤ 5	
2	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	
3	Moderadamente Tóxico	Entre 50 e 2000	
4	Pouco tóxico	> 2000	
5	Improvável causar dano agudo	> 5000	
Não classificado	Não classificado	-	

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2019/ANVISA, 2019. * Unidade referente à quantidade de produto tóxico, em miligramas, por peso corporal, em quilogramas.

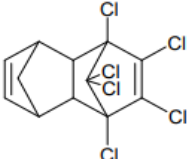
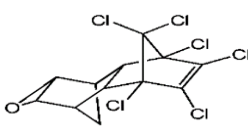
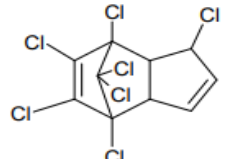
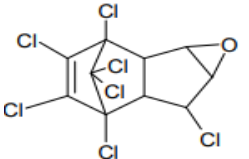
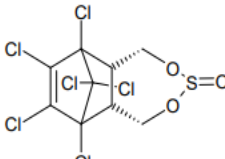
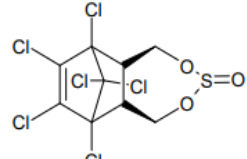
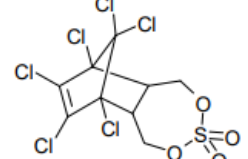
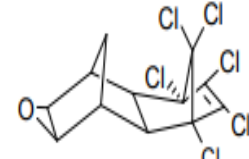
Todos os produtos, por determinação judicial, devem apresentar em seus rótulos uma faixa com a coloração indicativa de sua toxicidade,²⁵ como descrito na Tabela 3.1.

Uma vez aplicados nas lavouras, os pesticidas têm como principal destino o solo, podendo ser transportados para outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas e os sedimentos, através dos processos de lixiviação ou escoamento superficial, representando grandes problemas para o meio ambiente.²⁶

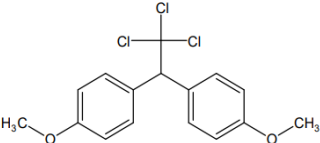
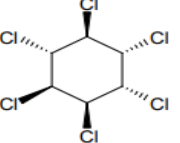
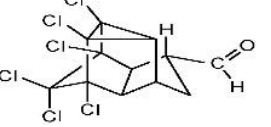
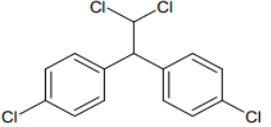
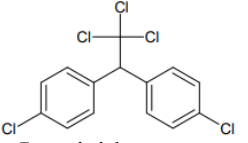
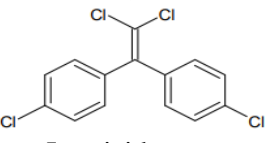
3.3.1 Características dos pesticidas estudados

Para a realização deste estudo foram selecionados 13 pesticidas pertencentes à classe dos organoclorados, além de alguns isômeros e metabólitos: Aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, endossulfan (α e β), endossulfan sulfato, 4,4'-DEE, dieldrin, endrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, endrin aldeído, metoxicloro e hexaclorociclohexano (α -BHC, β -BHC, γ -BHC e δ -BHC). Algumas características destes compostos como: tipo, solubilidade em água, fórmula estrutural, coeficiente de partição octanol-água são apresentadas na Tabela 3.2.

TABELA 3.2-Fórmulas estruturais, tipo, solubilidade em água (SA) em mg L⁻¹ a 20 °C, fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow, Coeficiente de sorção no solo (K_{oc}) em mL g⁻¹* e dose letal em mamíferos (DL₅₀) em mg kg⁻¹.

<p style="text-align: center;">Aldrin</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₂H₈Cl₆ SA: 0,027 (baixa) K_{oc}: 17500 (não móvel) P_{ow}: 6,5 (alta bioacumulação) DL₅₀: 39 (altamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">Dieldrin**</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₂H₈Cl₆O SA: 0,14 (baixa) K_{oc}: 1200 (ligeiramente móvel) P_{ow}: 3,7 (alta bioacumulação) DL₅₀:46 (altamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">Heptacloro</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₀H₅Cl₇ SA: 0,056 (baixa) K_{oc}: 24000 (não móvel) P_{ow}: 5,44 (alta bioacumulação) DL₅₀:>147 (moderadamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">Heptacloro Epóxido**</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₀H₅Cl₇O SA: 0,2 (baixa) K_{oc}: 22485 (não móvel) P_{ow}: 4,98 (alta bioacumulação) DL₅₀:15 (altamente tóxico)</p>
<p style="text-align: center;">α-endosulfan</p>  <p>Tipo: Inseticida, acaricida FM: C₉H₆Cl₆O₃S SA: 0,32 (baixa) K_{oc}: 11500 (não móvel) P_{ow}: 4,74 (alta bioacumulação) DL₅₀: 38 (altamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">β-endosulfan</p>  <p>Tipo: Inseticida, acaricida FM: C₉H₆Cl₆O₃S SA: 0,45 (baixa) K_{oc}: nm P_{ow}: 3,83 (alta bioacumulação) DL₅₀: 240 (moderadamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">Endosulfan Sulfato*</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₉H₆Cl₆O₄S SA: 0,48 (baixa) K_{oc}: 5194 (ligeiramente móvel) P_{ow}: 3,66 (alta bioacumulação) DL₅₀: 18 (altamente tóxico)</p>	<p style="text-align: center;">Endrin</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₂H₈Cl₆ SA: 0,24 (baixa) K_{oc}: 10000 (não móvel) P_{ow}: 3,2 (alta bioacumulação) DL₅₀: >7,5 (altamente tóxico)</p>

Continuação Tabela 3.2

<p>Metoxicloro</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₆H₁₅Cl₃O₂ SA: 0,1 (baixa) K_{oc}: 80000 (não móvel) P_{ow}: 5,83 (alta bioacumulação) DL₅₀: >6000 (improvável causar dano agudo)</p>	<p>BHC</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₆H₆Cl₆ SA: 2,0 (baixa) K_{oc}: 1888 (ligeiramente móvel) P_{ow}: 3,82 (alta bioacumulação) DL₅₀: 177 (moderadamente tóxico)</p>	<p>Endrin Aldeído**</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₂H₈Cl₆O SA: 0,52 (baixa) K_{oc}: 11500 (ligeiramente móvel) P_{ow}: 3,64 (alta bioacumulação) DL₅₀: não mencionado</p>	<p>4,4'-DDD</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₄H₁₀Cl₄ SA: 0,09 (baixa) K_{oc}: 131000 (não móvel) P_{ow}: 6,02 (alta bioacumulação) DL₅₀: 113 (moderadamente tóxico)</p>
<p>4,4'-DDT</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₄H₉Cl₅ SA: 0,025 (baixa) K_{oc}: 151000 (não móvel) P_{ow}: 6,91 (alta bioacumulação) DL₅₀: 113 (moderadamente tóxico)</p>	<p>4,4'-DDE**</p>  <p>Tipo: Inseticida FM: C₁₄H₈Cl₄ SA: 0,12 (baixa) K_{oc}: não mencionado P_{ow}: 6,51 (Alta bioacumulação) DL₅₀: 880 (moderadamente tóxico)</p>		

Fonte: Pesticide Properties DataBase; *K_{oc} do analito normalizado para o teor de carbono orgânico do solo. **Metabólitos.

O conhecimento das propriedades físico-químicas apresentadas na Tabela 3.2 é importante para ajudar a compreender e, até mesmo, fazer previsões em relação ao comportamento apresentado por estes pesticidas no meio ambiente.

A solubilidade em água, normalmente expressa em mg de pesticida por litro de água (mg L^{-1}), é a propriedade que indica a quantidade máxima de um composto que dissolve em água pura em uma determinada temperatura. Quanto mais polar o composto, maior será sua afinidade pela água, logo sua solubilidade será maior.²⁷

O coeficiente de partição octanol-água é uma propriedade amplamente utilizada para a avaliação do particionamento de compostos químicos no ambiente. Esta propriedade é definida como a razão entre as concentrações de equilíbrio de uma substância dissolvida em um sistema constituído de octanol-água. Este coeficiente é adimensional e geralmente é expresso em termos logarítmicos ($\text{Log } P_{ow}$).²⁸ Este parâmetro também é usado como um importante indicador do potencial de bioacumulação em organismos vivos.²⁹

Os valores do coeficiente de sorção são usados para prever a tendência de adsorção dos pesticidas pelo carbono orgânico no solo. Comumente são empregados em modelos matemáticos para avaliação da transformação e transporte dos pesticidas no ambiente.²⁷ Estes valores são obtidos pela normalização do coeficiente de partição, como mostra a seguinte equação (3.1):

$$K_{oc} = (K_d / \% \text{CO}) \times 100 \quad (3.1)$$

K_d = Coeficiente de partição;

$\% \text{CO}$ = Porcentagem de carbono orgânico no solo.

O K_d é uma medida da extensão da absorção do pesticida pelo solo. Esta normalização faz com que o valor do coeficiente de partição de um determinado

pesticida não dependa do tipo de solo.³⁰ Estes valores são expressos, geralmente, em mL de pesticidas por g de solo (mL g⁻¹).

Os parâmetros que classificam os pesticidas de acordo com as características físico-químicas descritas anteriormente estão descritos na Tabela 3.3:

TABELA 3.3 - Classificação dos pesticidas pelos parâmetros das características físico-químicas.

Características	Parâmetros	Classificação
Solubilidade em água (mg L ⁻¹ , 20 °C)	< 50	Baixa
	50 – 500	Moderada
	> 500	Alta
Coeficiente partição octanol-água (Log P _{ow})	< 2,7	Baixa bioacumulação
	2,7- 3	Moderada
	>3	Alta
Coeficiente de sorção (mL g ⁻¹)	< 15	Muito móvel
	15-75	Móvel
	75-500	Moderadamente móvel
	500- 4000	Ligeiramente móvel
	> 4000	Não móvel

Fonte: Pesticide Properties DataBase

Embora os pesticidas organoclorados tenham, no Brasil, sua comercialização, distribuição e uso, destinados a agricultura, proibidos desde 1985, pela Portaria nº 329, de 2 de setembro de 1985, do Ministério da Agricultura,⁴ a característica de persistência faz com que seja necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação destes compostos em matrizes ambientais. Somado a isso, existe o fator de que alguns países, principalmente os que se encontram em desenvolvimento, ainda utilizam compostos organoclorados, o que acaba por contribuir para o aporte dessas substâncias no meio ambiente.³¹

Além do elevado tempo de permanência dos POP'S no ambiente, a suscetibilidade destes compostos à bioacumulação e à biomagnificação ao longo da cadeia trófica fez com que fosse necessário a criação de algumas medidas a fim de preservar a saúde humana e o meio ambiente.

Assim, em 2001 foi adotado um tratado internacional conhecido como Convenção de Estocolmo, que passou a vigorar em 2004, onde os países signatários se comprometeram a eliminar e/ou reduzir a emissão dos POP'S intencionais ou não intencionais. Em 2018, a Convenção de Estocolmo contava com 183 países signatários.

3.4 FÁRMACOS

De acordo com a *U.S Food and Drug Administration* (FDA), fármacos são substâncias reconhecidas por uma farmacopeia ou formulário oficial, usados no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças, destinados a afetar a estrutura ou qualquer função do corpo.³²

Assim como os pesticidas, os fármacos também podem alcançar os corpos hídricos. Vias usuais de aporte de pesticidas nos recursos hídricos, envolvem processos de escoamento superficial, lixiviação em solos contaminados e dispersão atmosférica, principalmente nos casos em que são aplicados por aviões, onde aproximadamente 19% da quantidade pulverizada vai pelo ar para áreas circunvizinhas, chegando a atingir até 32 Km de distância das áreas de aplicação. No caso dos fármacos, uma das principais fontes de entrada destes compostos no meio aquático é o lançamento de efluentes sanitários, uma vez que as estações de tratamento de águas e esgotos não foram projetadas para a remoção destes micropoluentes.^{33; 34} Após ingeridos, mais de 70% da dosagem dos fármacos é excretada em 24 horas pelo organismo, 10% como compostos originais e 60% como metabólitos.⁵

Os fármacos presentes no ambiente aquático representam uma preocupação, com relação à possibilidade de ocasionar problemas à saúde humana e à vida aquática, não precisando, necessariamente, exibir recalcitrância, uma vez que suas elevadas taxas de transformação e/ou remoção são compensadas pela frequente introdução no meio ambiente, caracterizando a pseudo-persistência.³⁵

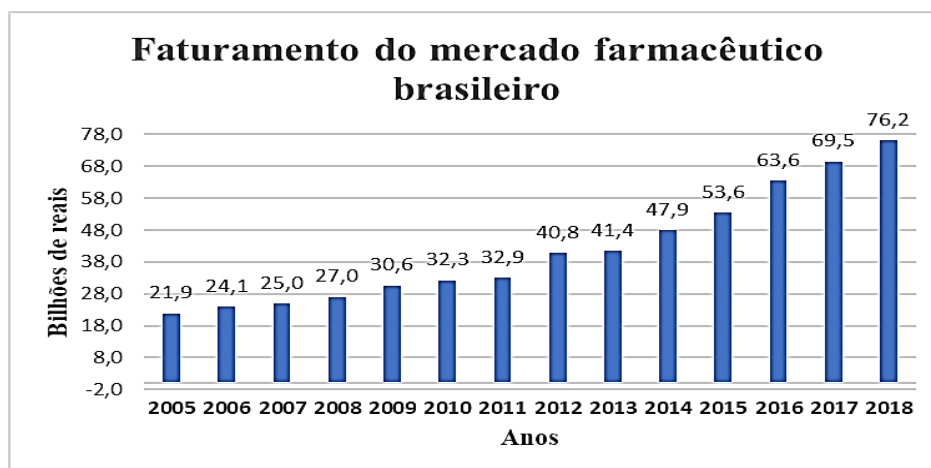
A classificação destes produtos pode ser feita de diversas maneiras, geralmente pela divisão em grupos ou classes, de acordo com sua estrutura química, uso ou mecanismo de ação.³⁶ Na Tabela 3.4, são apresentadas algumas classes terapêuticas dos fármacos e exemplos dos princípios ativos que as compõem.

TABELA 3.4 – Classes terapêuticas e princípios ativos que as compõem.

Classe Terapêutica	Exemplos de composto
Antibiótico	Amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefalexina, lincomicina, penicilina.
Analgésico	Paracetamol, dipirona, codeína.
Anti-inflamatório	Ácido acetilsalicílico (AAS), ácido mefenâmico, cetoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, nimesulida.
Drogas psiquiátricas	Alprazolam, carbamazepina, clonazepam, diazepam, duloxetina, fluoxetina, lorazepam
Betabloqueadores/ Anti-hipertensivos	Atenolol, metoprolol, propranolol; soltalol; timolol.
Contraceptivos hormonais	Etinilestradiol; desogestrel, mestranol, gestodeno, drospirenona.

De 2005 até 2018, o faturamento do mercado farmacêutico brasileiro aumentou em cerca de 348%, como observado no gráfico a seguir (Figura 3.3).

FIGURA 3.3- Gráfico da representação do faturamento do mercado farmacêutico brasileiro, em bilhões de reais, no período de 2005 até 2018.



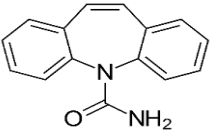
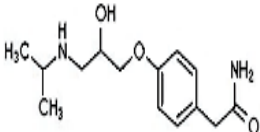
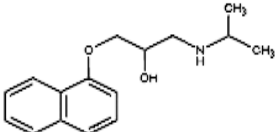
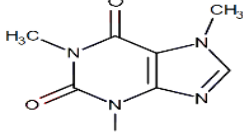
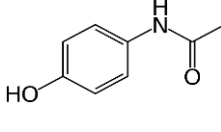
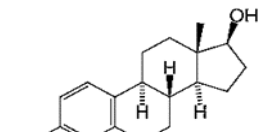
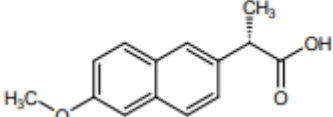
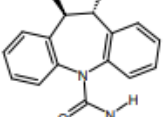
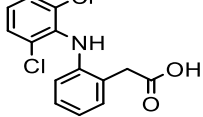
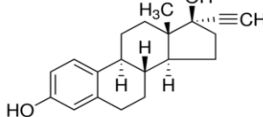
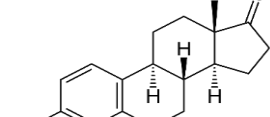
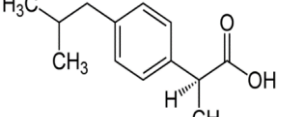
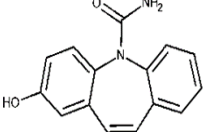
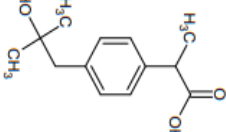
Fonte: INTERFARMA,2019 (Adaptado).

Atualmente, o Brasil ocupa 7º posição no ranking mundial de mercados farmacêuticos, ficando atrás dos Estados Unidos, China, Japão, Alemanha, França e Itália, e a projeção é de que o país alcance a 5º posição no ano de 2023, devendo movimentar neste período entre 39 e 43 bilhões de dólares.³⁷

3.4.1 Características dos fármacos estudados

Para a realização deste trabalho foram selecionados 14 fármacos (Carbamazepina, Atenolol, Propranolol, CBZ-DiOH, Cafeína, Naproxeno, Ibuprofeno, 2-Hidroxicarbamazepina, Estrona, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, Paracetamol, 2-Hydroxy ibuprofeno e Diclofenaco) para o monitoramento da existência em amostras de água superficial. Tais fármacos foram selecionados em função da sua recalcitrância em ambientes aquáticos e frequência de uso e algumas de suas características estão relacionadas na Tabela 3.5.^{38; 39}

TABELA 3.5 - Fórmulas estruturais, classe terapêutica (C.T), solubilidade em água (SA) em mg mL⁻¹, fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow.

<p>Carbamazepina</p>  <p>C.T: Anticonvulsante FM: C₁₅H₁₂N₂O S.A:0,152 Pow:2,77</p>	<p>Atenolol</p>  <p>C.T:Anti-hipertensivo FM: C₁₄H₂₂N₂O₃ S.A:0,429 Pow:0,43</p>	<p>Propranolol</p>  <p>C.T:Anti-hipertensivo FM: C₁₆H₂₁NO₂ S.A:0,0794 Pow:2,58</p>	<p>Cafeína</p>  <p>C.T: Estimulante FM:C₈H₁₀N₄O₂ S.A:11,0 Pow:-0,55</p>	<p>Paracetamol</p>  <p>C.T: Analgésico F.Q:C₈H₉NO₂ S.A:4,15 Pow:0,91</p>	<p>17-β-estradiol</p>  <p>C.T: Hormônio F.Q:C₁₈H₂₄O₂ S.A:0,0213 Pow:3,75</p>
<p>Naproxeno</p>  <p>C.T: Anti-inflamatório FM: C₁₄H₁₄O₃ S.A:0,0511 Pow:2,99</p>	<p>CBZ DiOH</p>  <p>C.T: Antiepiléptico FM: C₁₅H₁₄N₂O₃ S.A:1,8 Pow:0,81</p>	<p>Diclofenaco</p>  <p>C.T: Anti-inflamatório FM:C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ S.A:0,00447 Pow:4,26</p>	<p>17-α-etinilestradiol</p>  <p>C.T: Hormônio FM:C₂₀H₂₄O₂ S.A: 0,00677 Pow:3,67</p>	<p>Estrona</p>  <p>C.T: Hormônio F.Q: C₁₈H₂₂O₂ S.A:0,00394 Pow:4,31</p>	<p>Ibuprofeno</p>  <p>C.T: Anti-inflamatório F.Q: C₁₃H₁₈O₂ S.A:0,0684 Pow:3,84</p>
<p>2-Hidroxicarbamazepina</p>  <p>C.T: Antiepiléptico FM:C₁₅H₁₂N₂O₂ S.A:0,12 Pow:2,21</p>	<p>2-Hidroxi-ibuprofeno</p>  <p>C.T: Anti-inflamatório FM:C₁₃H₁₈O₃ S.A: 0,3 Pow:2,41</p>				

Fonte: Drugbank; ANVISA.

Embora as concentrações de fármacos encontradas em águas sejam subterapêuticas, ainda existem poucas informações sobre os efeitos que uma exposição prolongada e recorrente causaria,^{6,7} o que valida a necessidade de estudos de monitoramento destes compostos no meio ambiente.

3.5 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Uma análise química é composta por várias etapas, sendo duas delas, a amostragem e o pré-tratamento de amostras, responsáveis pela inserção da maior parte dos erros em uma análise. Na amostragem é feita a coleta do material a ser estudado, e este deve ser o mais representativo possível em relação ao todo. Para garantir uma boa amostragem deve-se levar em consideração, além da representatividade da amostra, fatores como: sua estabilidade, preservação, transporte e disponibilidade de ferramentas adequadas para amostragem, a fim de reduzir as incertezas nos resultados. O pré-tratamento consiste em submeter a amostra coletada a um tratamento adequado, cuja finalidade é prepará-la para os próximos passos da análise. Este tratamento pode envolver a transformação da espécie química de interesse para uma forma apropriada para a aplicação do método de determinação selecionado.⁴⁰ Vale ressaltar que de todas as etapas de uma análise, o pré-tratamento de amostras, além de demandar mais tempo, ser a mais crítica e a de maior custo, é também a parte do procedimento onde geralmente acontecem a maioria dos erros, cerca de 30% dos erros totais.⁴¹

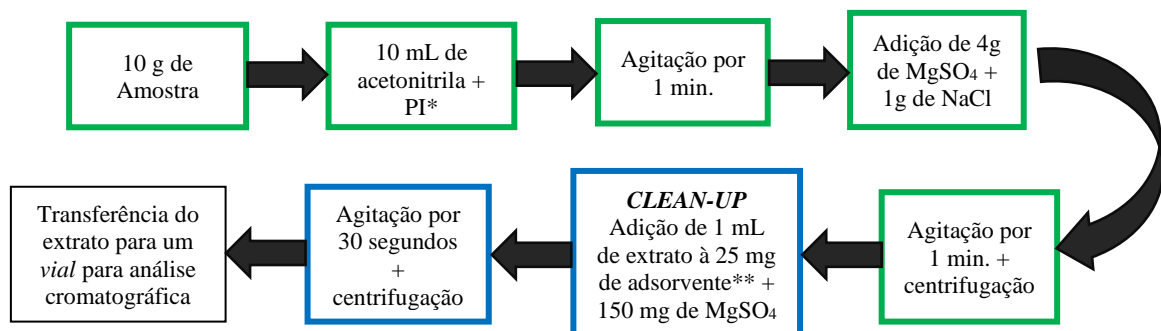
O desenvolvimento de métodos analíticos presa por aqueles que sejam constituídos de poucas etapas, que sejam de execução fácil e rápida e que apresentem bons resultados como: elevadas porcentagens de recuperação dos analitos, linearidade, baixos limites de detecção e quantificação, entre outros. Diante disso, é importante destacar os métodos *QuEChERS*, Extração Líquido-Líquido (LLE) e Extração em Fase Sólida (SPE), que apesar de serem bastante difundidos ainda possuem muitas potencialidades a serem exploradas.

3.5.1 QuEChERS

O método de preparo de amostras *QuEChERS*, um acrônimo da língua inglesa para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*, surgiu como uma alternativa para a determinação de pesticidas em frutas e vegetais. Desenvolvido por Anastassiades e colaboradores em 2003, surgiu da necessidade de um método multirresíduo que possuísse poucas etapas, necessitasse de poucos reagentes e em pequenas quantidades e fornecesse resultados de alta qualidade.⁴²

O método original era composto por 8 etapas (Figura 3.4) e objetivava, basicamente, a determinação de pesticidas organoclorados em amostras não-gordurosas utilizando acetonitrila (ACN) como solvente extrator.

FIGURA 3.4 - Representação esquemática das etapas o método *QuEChERS*



*Padrão Interno-Trifenilfosfato (TPP).; **Amina primária secundária (PSA)

Este método de preparo de amostras pode ser dividido em duas etapas: a primeira (Figura 3.4 verde) envolve uma extração baseada em uma partição promovida pelo efeito salting out, onde ocorre a formação do equilíbrio entre fase aquosa e fase orgânica, e a segunda etapa, chamada de *clean-up*, (Figura 3.4 azul) é onde ocorre uma extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), promovendo uma limpeza usando várias combinações de sorventes e sais porosos para a remoção das impurezas presentes na matriz.⁴³

Ao eleger a *QuEChERS* como o método de preparo da amostra no desenvolvimento do trabalho, é importante selecionar um solvente extrator adequado. Para isso, deve-se levar em consideração alguns fatores como:⁴⁴

- I- Habilidade de extração de uma ampla faixa de analitos que possuam diferentes polaridades;
- II- Seletividade durante a extração;
- III- Capacidade de separação da água;
- IV- Compatibilidade com as técnicas cromatográficas;
- V- Compatibilidade com as técnicas de purificação dos extratos (*clean up*);
- VI- Segurança para o analista;
- VII- Segurança para o ambiente;
- VIII- Baixo custo.

Os solventes extratores mais utilizados em métodos multirresíduo para a determinação de pesticidas em diversas matrizes, principalmente em alimentos, são a acetona, acetonitrila e o acetato de etila, e todos eles apresentam vantagens e desvantagens.

O acetato de etila possui as vantagens de ser praticamente imiscível em água, o que faz com que ele seja facilmente removido por um agente secante, e de ser capaz de extrair diferentes classes de pesticidas em diversas matrizes. Em contrapartida, o acetato de etila apresenta uma baixa porcentagem de recuperação de pesticidas com caráter básico, sendo necessário adicionar hidróxido de sódio (NaOH) para aumentar este percentual.⁴⁵

A acetonitrila se destaca pelo fato de resultar em menores quantidades de compostos lipofílicos co-extraídos da amostra, ser mais seletivo e ser mais facilmente separado da fase aquosa pelo efeito *salting out*. No entanto, possui maior toxicidade quando comparada com a acetona.⁴⁴

A acetona apresenta como desvantagem o fato de possuir elevada miscibilidade com a água, fazendo com que seja necessário o uso de solventes apolares para promover a separação entre as fases orgânica e aquosa.⁴⁴

Contrapondo este fato, a acetona possui um ponto de ebulição (56 °C) menor que dos outros dois solventes (82 °C para acetonitrila e 77,1 °C para o acetato de etila), o que colabora com a sua fácil evaporação no processo de concentração dos analitos.

Além do solvente extrator, outros parâmetros que afetam a eficiência de extração precisam ser avaliados para a otimização, como por exemplo: quantidade de amostra, quantidade de solvente extrator, pH, tipo e quantidade de sal para a promoção do efeito *salting out*, tipo e quantidade de sorvente (para a etapa *clean-up*), entre outros.⁴³

Como o próprio nome sugere, o método *QuEChERS* tem a vantagem de ser rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. Além disso, cada etapa do método original pode ser completamente alterada, a fim de adequá-lo aos analitos e aos diferentes tipos de matrizes e, devido a sua facilidade de execução, pode ser implementado em vários laboratórios de análise de rotina. Estas características do método *QuEChERS* fizeram com que se tornasse amplamente usado para análises nas mais diversas matrizes.

Na Tabela 3.6 é mostrado um breve resumo das possibilidades de uso do método *QuEChERS*, variando as matrizes, os analitos e os métodos de análise.

TABELA 3.6 - Breve apresentação das possibilidades de uso do método *QuEChERS*.

Matriz	Analitos	%Rec	Método analítico	Referência
Nozes comestíveis	Microtoxinas	75-98	nano LC MS	ALCÁNTARA-DURÁN, J. <i>et al.</i> ⁴⁶
Peixes	Pesticidas organoclorados e Piretroides	68-116	GC-Q-MS	ARISEKAR, U. <i>et al.</i> ⁴⁷
Sedimento	Pesticidas	80-112	GC-MS/MS	Mondal, R. <i>et al.</i> ⁴⁸
Sérum humano	Retardadores de chama bromados e éteres difenílicos polibromados comuns	77-129	GC/MS	GAO, L. <i>et al.</i> ⁴⁹
Mel	Pesticidas	70-120	LC MS/MS	HRYNKO, I. <i>et al.</i> ⁵⁰

3.5.2 Extração Líquido-Líquido (LLE)

A técnica de extração líquido-líquido (LLE do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) é amplamente empregada no preparo de amostras líquidas ou amostras solúveis. A LLE também é conhecida como extração por solvente orgânico ou partição, pois ocorre separação de compostos entre dois líquidos imiscíveis (orgânica e aquosa) ou fases em que o composto e matriz tenham diferentes solubilidades.^{51; 52} A eficiência deste procedimento está relacionada a diversos fatores, como por exemplo: a afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações.⁵³

Para descrever a distribuição do composto entre dois solventes imiscíveis são usados dois termos: razão de distribuição (D) e coeficiente de distribuição (K_d), sendo que este último se refere a uma constante de equilíbrio que descreve a distribuição de um composto entre os dois solventes. A proporção de distribuição do composto entre as fases imiscíveis é constante e pode ser representada pela equação (3.2) a seguir:⁵¹

$$K_d = C_{org} / C_{aq} \quad (3.2)$$

Onde:

K_d é a constante de distribuição;

C_{org} é a concentração do soluto no solvente orgânico;

C_{aq} é a concentração do soluto na água.

No entanto, é mais útil calcular a fração do composto extraído (E), e pode ser feito seguindo a fórmula apresentada na seguinte equação (3.3):

$$E = C_{org} V_{org} / C_{org} V_{org} + C_{aq} V_{aq} \quad (3.3)$$

Onde:

E é a fração do composto extraído;

V_{org} é o volume de fase orgânica;

V_{aq} é o volume de fase aquosa.

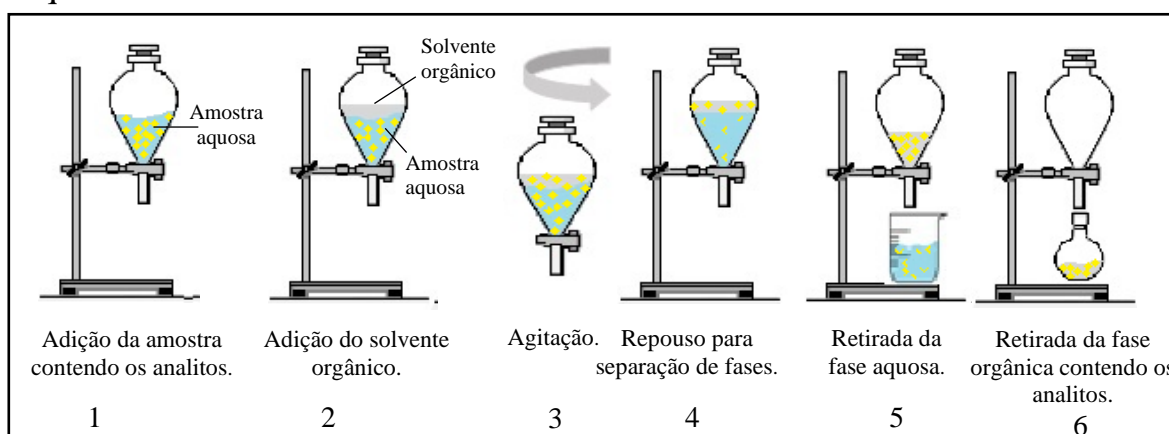
Para conseguir obter valores de recuperação superiores a 99%, geralmente se faz necessário executar a técnica com mais de uma extração, usando duas ou três extrações sucessivas. Quando se faz a LLE com uma etapa única de extração, é necessário que o K_d seja grande (>10) para se obter recuperações quantitativas ($>99\%$). Quando realizadas extrações sucessivas, a equação (3.4) é usada para determinar a quantidade de compostos extraídos ao final do procedimento:⁵⁴

$$E = 1 - [1/(1 + K_d V)]^n \quad (3.4)$$

Onde V é $V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$ e n é o número de extrações.

O método de extração líquido-líquido é composto de 6 etapas (Figura 3.5) e sua execução é considerada simples, além de utilizar apenas vidrarias comuns em laboratórios de química.

FIGURA 3.5 - Representação esquemática da extração de analitos de amostras aquosas utilizando LLE.



A figura 3.5 representa a LLE com etapa única de extração dos analitos. Para executar extrações sucessivas, a fase aquosa retirada na etapa 5 deve

ser devolvida ao funil de separação, após a retirada da fase orgânica, e então todo procedimento é reexecutado a partir da segunda etapa. Vale ressaltar que dependendo das misturas de solventes utilizadas na LLE a ordem de retirada das fases aquosa e orgânica pode ser alterada, como no caso do uso de solventes extratores mais densos do que a água.

Para garantir a eficiência e seletividade da LLE é imprescindível a escolha adequada dos dois solventes imiscíveis. Com relação ao solvente extrator, este deve possuir algumas características para que possa ser escolhido, como:⁵⁴

- Grau de pureza elevado;
- Baixa solubilidade na fase aquosa (geralmente inferior a 10%);
- Volatilidade alta para o estágio de concentração dos analitos;
- Compatibilidade com a técnica cromatográfica escolhida.

Na Tabela 3.7 estão descritos alguns exemplos de solventes extratores adequados e inadequados para utilização na LLE.

TABELA 3.7 - Exemplos de solventes adequados e inadequados para uso em LLE.

Solventes aquosos	Solventes orgânicos imiscíveis em água	Solventes Orgânicos miscíveis em água*
Água pura	Hidrocarbonetos alifáticos	Álcoois**
Solução ácida	Éter dietílico ou outros éteres	Cetonas**
Solução Básica	Cloreto de metileno	Aldeídos**
Sal elevado (efeito <i>salting-out</i>)	Clorofórmio	Ácidos carboxílicos**
Agentes complexantes	Acetato de etila e outros ésteres	Acetonitrila
	Cetonas alifáticas (C6 e acima)	Dimetilsulfóxido
	Álcoois alifáticos (C6 e acima)	Dioxano
	Tolueno, xilenos (absorvância UV!)	

Fonte: Majors, R. In: SNYDER, L. R. *et al.* (2009)⁵⁵ (Adaptado). *Inadequados para LLE; **Baixo peso molecular.

Em alguns casos podem ser feitas misturas de solventes orgânicos para que se obtenha uma solução com características ideais em relação aos solventes puros individualmente.

Além do tipo de solvente, o processo de equilíbrio entre as fases pode ser influenciado por fatores como o ajuste do pH, formação de pares iônicos com compostos ionizáveis, formação de complexos hidrofóbicos e adição de sais neutros.⁵⁴

A LLE, assim como todas as técnicas de preparo de amostras, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo: extração parcial de analitos hidrofílicos pelo solvente orgânico, exige longo tempo de análise, necessidade de solventes ultrapuros, formação de emulsões, necessidade de grandes volumes de amostra e de solvente, dificuldade de automação e a toxicidade de alguns solventes orgânicos.^{52; 53} No entanto esta técnica se destaca por ser simples e pela possibilidade de utilização de um grande número de solventes disponíveis no mercado, o que proporciona uma ampla faixa de seletividade e solubilidade.⁵⁶

Apesar das desvantagens, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de preparo de amostras e tem sido amplamente empregada em diversos tipos de análises, como, por exemplo, para determinação de: pesticidas em alimentos e em água, fármacos em matrizes biológicas humanas.^{57; 58; 59} Em 2014 Panseri et al. publicaram um estudo de determinação de 28 pesticidas em amostras de mel, usando a LLE como técnica de extração. Os resultados foram bastantes satisfatórios, uma vez que o método proposto proporcionou porcentagens de recuperação entre 75% e 102%, para faixa de trabalho de 10 e 50 ng g⁻¹ e boa linearidade, com os coeficientes de determinação superiores a 0,99 para todos os analitos selecionados.⁶⁰

Em um trabalho publicado em 2020 por Woźniak e colaboradores foi proposta a determinação de novas substâncias psicoativas em amostras de sangue utilizando extração líquido-líquido. Para os 45 estimulantes estudados (11 anfetaminas e 34 cationas sintéticas) o método proposto se mostrou linear dentro dos intervalos testados ($R > 0,9900$), com recuperações variando de 83% até 106% e limites de detecção e quantificação variando entre 0,02 e 0,72 ng mL⁻¹ e 1e 2,5 ng mL⁻¹, respectivamente.⁶¹

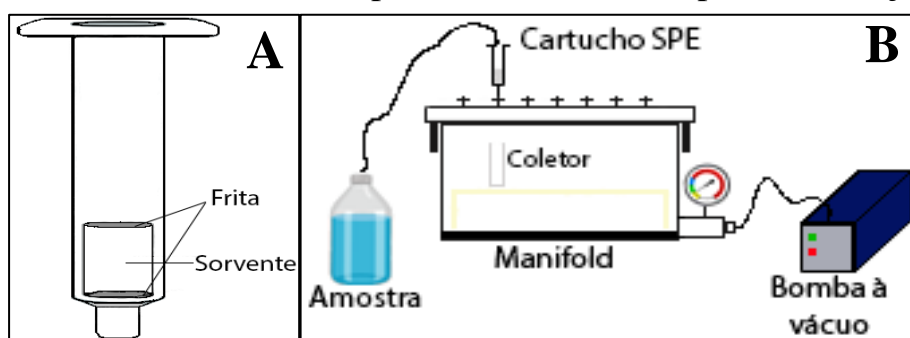
Os resultados destes e de muitos outros trabalhos comprovam o quão versátil e eficiente é o método de extração líquido-líquido, o que faz com que ele ainda seja muito usado, embora mais comumente com algumas modernizações.

3.5.3 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE do inglês *Solid-Phase Extraction*) surgiu em meados da década de 1970 como uma alternativa à técnica de extração líquido-líquido. A SPE é uma técnica de preparo de amostras baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, que concentra e purifica os analitos das soluções por sorção em fase sólida.^{62; 63} Este tipo de preparo de amostra pode ser feito utilizando diferentes tipos de dispositivos, como: discos, placa de 96 poços, ponta da pipeta, fibra revestida, barra de agitação (*SBSE*) ou cartucho, sendo este último o mais usado (Figura 3.6 A).

Ao escolher a SPE como método de preparo de amostras deve-se atender a algumas exigências da técnica, como: cartuchos perfeitamente empacotados, previamente condicionados e um aparato específico capaz de eluir o analito a vácuo (*manifold*) (Figura 3.6 B), além de profissionais capacitados, com conhecimentos teórico e prático da técnica.⁴²

FIGURA 3.6 - Cartucho (A) e aparato (B) necessário para a execução da SPE.



Os cartuchos utilizados são compostos de uma camada de material sorvente posicionada entre duas fritas (discos) de 20 μm , cujo material de

confeção pode variar entre polietileno, aço inoxidável ou teflon. Em relação ao corpo do cartucho, estes podem ser fabricados em vidro ou, mais comumente, em polipropileno, com volumes variando de 1,0 mL a 6,0 mL, com 47 mm de diâmetro.⁶⁴

Com relação a fase sorvente dos cartuchos, esta pode ser, em termos de mecanismo de separação, classificada em fase-normal, fase reversa ou em troca iônica. São usados os mais variados tipos de materiais, como: sílica, alumina, Florisil, C₁₈, ciclohexil, poliamida, amina primária-secundária, amina quaternária, entre outros. A escolha do sorvente deve ser feito levando em consideração as propriedades de afinidade dos analitos.

Além do sorvente, o solvente de eluição usado no procedimento de extração também deve ser avaliado, sempre levando em consideração as características dos analitos estudados. Na tabela a seguir (Tabela 3.8) está resumido um esquema geral da seleção destes componentes da SPE para extração de analitos com massa molar inferior a 2000 daltos.

TABELA 3.8- Esquema para seleção de sorvente e solvente de eluição para extração de analitos com massas molares inferiores a 2000 daltons.

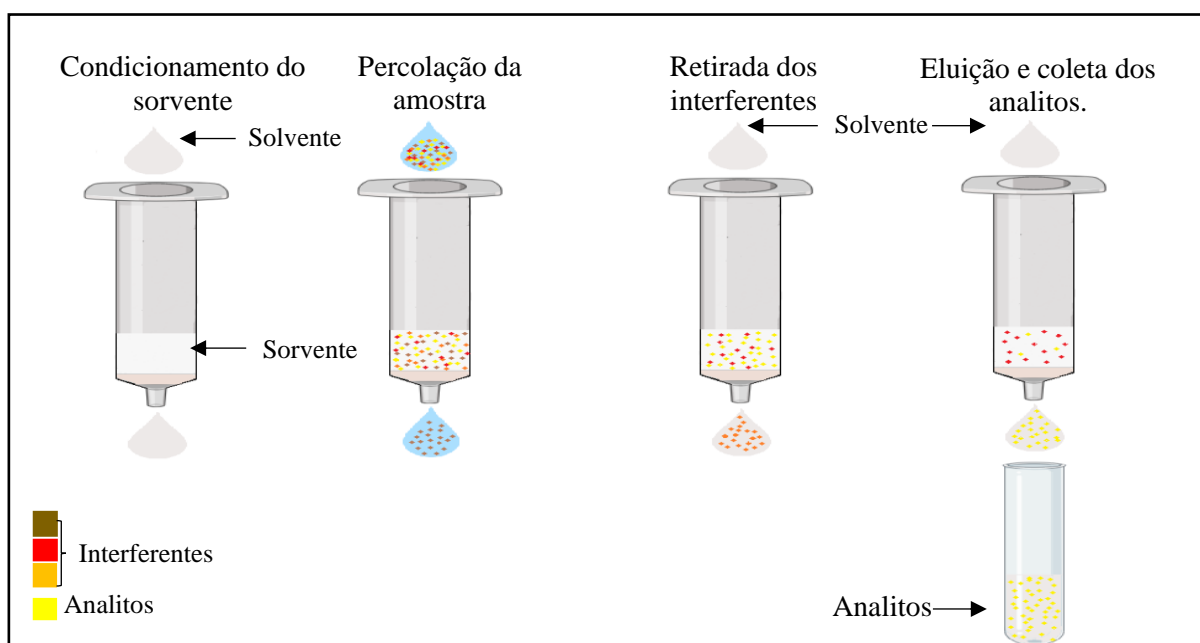
Solubilidade da amostra	Solvente	Polaridade da amostra	Fases sólidas	Solventes para eluição dos analitos
Em água	Aquoso	Apolar	Octadecil (C18), Octil, (C8), Butil (C4), Dimetil (C2), Cicloexil, Fenil, Ciano	Hexano, Diclorometano, Acetonitrila, Álcoois
		Moderadamente polar	Sílica-gel, Florisil, Alumina, Amino, Dimetilaminopropil	Clorofórmio, Diclorometano, Acetato de etila, Álcoois, Água
		Polar	Ciano, Diol, Amino Poliamida	Clorofórmio, Diclorometano, Acetato de etila, Álcoois, Água
	Iônico	Aquoso	Catiônico Ácido carboxílico, Ácido sulfônico Aniônico Amina quaternária, Amino, Dimetilaminopropil	Tampão ácido Tampão básico

Em solvente orgânico	Aquoso	Apolar	Octadecil (C18), Octil, (C8), Butil (C4), Dimetil (C2), Cicloexil, Fenil, Ciano	Hexano, Diclorometano, Acetonitrila, Álcoois
	Orgânico	Moderadamente polar	Sílica-gel, Florisil, Alumina, Amino	Clorofórmio, Diclorometano, Acetato de etila, Álcoois
	Orgânico	Polar	Ciano, Diol, Amino, Dimetilaminopropil	Clorofórmio, Diclorometano, Acetato de etila, Álcoois

Fonte: JARDIM, I. C. S. F, 2015. (Adaptado).⁶³

Em termos gerais, a SPE é um procedimento cromatográfico semelhante à HPLC e é composta de 4 etapas: i) condicionamento do sorvente com solvente adequado; ii) percolação da amostra; iii) limpeza da coluna para retirada de interferentes; iv) eluição e coleta dos analitos,⁶⁵ representadas esquematicamente na Figura 3.7.

FIGURA 3.7- Representação esquemática das etapas envolvidas na SPE.



Fonte: ANDRADE-EIROA, A. *et al.*, 2016 (Adaptado).⁶⁶

Quando comparada com técnicas como a LLE, a extração em fase sólida apresenta algumas vantagens, como: maior tempo de armazenamento dos

analitos, após adsorvidos no sorvente, sem qualquer alteração na concentração ou identidade, maior facilidade de execução, maior rapidez, extração de uma ampla gama de analitos orgânicos, alta eficiência de extração, entre outras.⁶⁶

A versatilidade da SPE faz com que esta técnica seja amplamente empregada. No procedimento de preparo de amostras ela possui 6 propósitos principais:⁵⁵

- I- remoção de interferências e "matadores de colunas";
- II- concentração de elementos traço;
- III- dessalinização;
- IV- troca de solventes;
- V- derivatização *in situ*;
- VI- armazenamento e transporte de amostras.

A aplicação da SPE é bastante diversificada, indo desde o uso para *clean-up* de extratos até para determinação de narcóticos em matrizes biológicas, de esteroides em matrizes ambientais, entre outros.^{67; 68; 69}

De Toffoli e colaboradores publicaram em 2015 um trabalho em que usaram SPE para determinação de Fipronil e três metabólitos em matrizes ambientais (água, solo e sedimento). O método proposto proporcionou elevada linearidade, com os coeficientes de correlação superiores a 0,979 para todos os analitos, além de porcentagens de recuperação variando entre 88,26% e 111,75% em todos os níveis de fortificação (40, 80 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$), com coeficientes de variação inferiores a 15%.⁷⁰

Um exemplo mais recente do uso da SPE como método para extração foi publicado por Peng e colaboradores em 2019, onde foram determinadas 20 drogas de abuso e fármacos em água potável. Os resultados relatados neste trabalho mostram que o método é bastante eficiente, pois as recuperações para a maioria dos analitos variaram de 62% até 107%, com coeficientes de variação inferiores a 15%. Os limites de detecção e de quantificação do método variaram de 0,01 até 1,09 ngL^{-1} e 0,02 até 3,64 ng L^{-1} , respectivamente.⁷¹

3.6 MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO

Calibração é definida, segundo a IUPAC, no documento *Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations 2016)*, como:

“Operação que, sob condições especificadas, em uma primeira etapa, estabelece uma relação entre os valores da quantidade com as incertezas de medição fornecidas pelos padrões de medição e as indicações correspondentes com as incertezas de medição associadas e, em uma segunda etapa, usa essas informações para estabelecer uma relação para obter um resultado de medição a partir de uma indicação.”⁷²

Este parâmetro pode ser expresso de diversas formas, como por exemplo: declaração, função, diagrama, tabela ou curva de calibração, sendo este último a expressão da relação entre a indicação e o valor da quantidade medida correspondente.^{73; 74} Em outras palavras, curva de calibração é a exibição gráfica da relação entre o sinal analítico e a concentração do analito.

Os métodos de calibração mais comumente usados são:

- I- Padronização externa;
- II- Padronização interna;
- III- Superposição de matriz;
- IV- Adição padrão.

3.6.1 Método de adição padrão

O método da adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas do analito de interesse a alíquotas de iguais volumes da amostra, para que o padrão e a amostra sejam medidos de uma única vez. Para quantificar o analito de interesse em uma amostra usando este método, deve-se, primeiro, relacionar as respostas obtidas com as concentrações de padrão adicionadas às amostras. Então, constrói-se uma curva de calibração e, pela extrapolação da reta é determinada a concentração do analito presente na amostra analisada.⁷⁵

Este método de calibração é particularmente útil na análise de amostras complexas nas quais os efeitos de matriz são significativos.⁷⁵ Também é indicada quando houver dificuldades em encontrar amostras isentas dos analitos ou dificuldade de encontrar padrões internos. Uma desvantagem significativa deste método de calibração é que ele é bastante trabalhoso, além de demandar um maior tempo para preparo e necessitar de uma maior quantidade de amostras.

3.6.2 Método da calibração por padrões externo

O método de padronização externa é utilizado para calibração de instrumentos e procedimentos quando não há interferências oriundas da matriz. Este método consiste na comparação do sinal analítico do analito a ser quantificado na amostra com sinais analíticos do mesmo analito obtido com soluções-padrão de concentrações variadas e conhecidas. Neste tipo de calibração, as soluções-padrão são preparadas em solventes e analisadas separadamente das amostras.⁷⁵

Uma série de fatores pode afetar a qualidade da calibração por padronização externa, entre eles pode-se citar: efeito matriz, devido à componentes estranhos presentes nas amostras, mas não nos padrões; diferenças nas variáveis experimentais no momento da análise dos padrões e das amostras; contaminação durante a etapa de amostragem ou de preparo de amostras; erros sistemáticos, como por exemplo preparação incorreta dos padrões, entre outros.

Por este método ser tão susceptível a erros, a calibração deve ser feita a cada análise.

3.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Após o desenvolvimento de um método analítico, uma série de verificações devem ser realizadas antes de colocá-lo em uso rotineiro. Essas

verificações são conhecidas coletivamente como validação, e tem por objetivo garantir que as características de desempenho do método sejam compreendidas e demonstrar que ele é cientificamente válido nas condições em que deve ser usado. Através de estudos laboratoriais sistemáticos, o procedimento de validação estabelece se um método é, de fato, adequado para o propósito que foi desenvolvido.⁷⁶

Os parâmetros de desempenho de método, também conhecidos por figuras de mérito, que são tipicamente avaliados no processo de validação, são: aplicabilidade, seletividade, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, faixa de operação, limite de quantificação (LQ_m), limite de detecção (LD_m), sensibilidade e robustez.⁷⁷

A validação de método é regulamentada por órgãos específicos. No Brasil existem dois que fazem este trabalho: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução RDC 166 de 24/07/2017,⁷⁸ e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) com o documento DOQ-CGCRE-008 revisão 09 de junho de 2020.⁷⁹

É fato que a validação de método é considerada de extrema importância para um laboratório analítico, uma vez que o uso de métodos validados confere credibilidade aos laboratórios. No entanto, vale ressaltar que a validação de método é apenas um dos requisitos necessários para atestar a confiabilidade dos laboratórios, sendo necessário, ainda, a acreditação destes pelos órgãos regulamentadores.

3.7.1 Tipos de validação de método

É possível encontrar relatos na literatura duas principais abordagens para validação de métodos: a abordagem de comparação interlaboratorial e a abordagem de laboratório único.

Quando está sendo desenvolvido um método e este terá um amplo uso, como um procedimento padronizado e publicado, por exemplo, um estudo colaborativo é, provavelmente, a forma preferível para realizar a validação, pois assim o método demonstrará ser robusto. Esta abordagem reduz a carga de trabalho dos laboratórios pois, se um método for validado por uma organização de aprovação de padrões, o usuário deverá apenas verificar os parâmetros de desempenho publicados, ou adequá-los ao seu uso do método.

A abordagem de laboratório único é recomendada quando um método está sendo desenvolvido para uso interno de um laboratório, por exemplo, mas não estará disponível como padrão publicado. Um outro momento em que este tipo de validação é indicado é quando existe outros laboratórios concorrentes.⁸⁰

3.7.2 Parâmetros avaliados no processo de validação

3.7.2.1 Seletividade

O estudo da seletividade de um método se refere à capacidade deste de identificar ou quantificar um determinado analito, com precisão, na presença de outros componentes, como: outros analitos, componentes da matriz, impureza, diluentes, entre outros.⁷⁸

A seletividade é um parâmetro que fornece uma ideia da confiabilidade do método analítico. O termo seletivo é usado para se referir ao método que produz resposta para vários analitos químicos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros.⁷⁹

É comum encontrar na literatura estudos que usam os termos seletividade e especificidade de forma indistinta, embora este último se refira, geralmente, a um método que produza resposta para um único analito apenas.⁸¹

Quando se trabalha com um método cromatográfico, uma forma simples de atestar sua seletividade é observando se ocorre a co-eluição de picos dos analitos com picos de interferentes. Esta averiguação é feita injetando um branco obtido a partir da amostra de estudo e observando se ocorre a sobreposição dos picos dos analitos com os picos dos interferentes.

3.7.2.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico está relacionada à capacidade, dentro de uma determinada faixa de trabalho, de obter resultados de testes que sejam diretamente proporcionais à concentração de analitos nas amostras.⁷⁷

A determinação da linearidade é determinada por uma série de injeções de padrões em diferentes concentrações. Com relação a quantidade de injeções, réplicas e o intervalo de concentração usados na determinação da linearidade, tanto o protocolo da ANVISA quanto o do INMETRO recomendam que sejam usadas, no mínimo, 5 diferentes níveis de concentração, com análises feitas em no mínimo triplicata.^{78; 79}

Para a avaliação da linearidade de um método analítico, além dos cálculos de regressão linear devem ser feitos, também, cálculos dos valores residuais, que representam as diferenças entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x. A linearidade é confirmada se os valores residuais estiverem distribuídos aleatoriamente sobre a linha de regressão, enquanto que tendências sistemáticas indicam indícios de não linearidade.^{77; 78; 79}

3.7.2.3 Efeito Matriz

De acordo com a IUPAC, o efeito matriz é definido como a combinação dos efeitos de todos os componentes da amostra, exceto o analito, na medição da quantidade.⁸²

O efeito matriz (EM) pode gerar diversas alterações em durante o procedimento de análise cromatográfica, como: i) mascaramento de pico de interesse; ii) erros de identificação dos analitos, devido a resultados falso positivos; iii) superestimação de resultados, ocasionada pela elevação no sinal do detector, além de proporcionar porcentagens de recuperação superiores a 100%.⁸³

O efeito matriz pode ser determinado relacionado a inclinação de uma curva analítica construída na matriz com a inclinação de uma construída no solvente, como mostrado na equação (3.5), mostrada a seguir:

$$EM (\%) = \left[\frac{\text{Slope na matriz}}{\text{Slope no solvente}} - 1 \right] \times 100 \quad (3.5)$$

onde o $EM (\%) < 0$ indica que há supressão de sinal, enquanto que este valor > 0 indica a ocorrência de aumento na ionização.⁸⁴

3.7.2.4 Precisão

O estudo da precisão é feito com o intuito de avaliar a concordância (grau de dispersão) entre os resultados obtidos para uma série de medidas feitas para uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa de três formas diferentes:⁷⁷

- i) Repetibilidade: também conhecida como precisão intra-ensaio, expressa a precisão sob as mesmas condições operacionais, em um curto intervalo de tempo, mantendo o mesmo analista e o mesmo equipamento;
- ii) Precisão intermediária: expressa a precisão dentro das variações do laboratório (dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc);
- iii) Reprodutibilidade: expressa a precisão entre laboratórios (estudos colaborativos).

A precisão pode ser expressa, matematicamente, em termos de coeficientes de variação (CV%), também chamado de desvio padrão relativo (DPR), conforme equação (3.6) a seguir:⁷⁹

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3.6)$$

Onde:

CV= coeficiente de variação;

S= desvio padrão;

\bar{X} = média das determinações.

Os valores aceitáveis para CV% levam em consideração a faixa de determinação dos analitos e a complexidade da matriz. É importante para os laboratórios estabelecer critérios de aceitação para os valores de CV%. Os limites aceitáveis para o coeficiente de variação estão descritos na Tabela 3.9.

TABELA 3.9- Valores de %CV aceitáveis em função da concentração dos analitos, independente da natureza do analito, da matriz e do método utilizado.

Analito %	Proporção do analito	Unidade	Horwitz* CV%	AOAC CV%
100	1,00	100%	2	1,3
10	1,00E-01	10%	3	1,9
1	1,00E-02	1%	4	2,7
0,1	1,00E-03	0,1%	6	3,7
0,01	1,00E-04	100 ppm	8	5,3
0,001	1,00E-05	10 ppm	11	7,3
0,0001	1,00E-06	1 ppm	16	11
0,00001	1,00E-07	100 ppb	22	15
0,000001	1,00E-08	10 ppb	32	21
0,0000001	1,00E-09	1 ppb	45	30

Fonte: AOAC, 2016 (Adaptado).⁸⁵ *Valores de coeficiente de variação preditos pela equação de Horwitz.

Quando a precisão for expressa como repetibilidade, deve-se adotar como critério de aceitação para o CV% os valores descritos na coluna AOAC. No entanto, se a precisão for expressa como reprodutibilidade deve-se levar em consideração os valores de CV% preditos pela equação de Horwitz.

3.7.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a proximidade de concordância entre os resultados individuais obtidos com o método em estudo e um valor de referência aceito como verdadeiro.⁷⁸ Os valores aceitos variam de acordo com a concentração de trabalho, sendo encontrada uma faixa de valores mais ampla quando se trabalha com concentrações altas e uma faixa de valores mais estreita para níveis traços.

A exatidão de um método pode ser determinada de algumas formas diferentes:^{77; 78; 85}

- i) Uso de material de referência certificado (CRM), que deve ser fornecido por instituições reconhecidas e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology), FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme);
- ii) Comparação de método. Neste caso, compara-se o resultado obtido com o método em desenvolvimento com o obtido com um método reconhecido por ser exato.
- iii) Adição padrão;
- iv) Ensaio de recuperação.

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionada a amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica.⁷⁸

Os intervalos de valores de recuperação aceitos para atestar a exatidão de um método também variam de acordo com a faixa de concentração de trabalho e estão relacionados na Tabela 3.10.

TABELA 3.10- Valores das porcentagens de recuperação aceitáveis em função da concentração dos analitos, independente da natureza do analito, da matriz e do método utilizado.

Analito %	Proporção do analito	Unidade	Média de Recuperação (%)
100	1,00	100%	98-102
10	1,00E-01	10%	98-102
1	1,00E-02	1%	97-103
0,1	1,00E-03	0,1%	95-105
0,01	1,00E-04	100 ppm	90-107
0,001	1,00E-05	10 ppm	80-110
0,0001	1,00E-06	1 ppm	80-110
0,00001	1,00E-07	100 ppb	80-110
0,000001	1,00E-08	10 ppb	60-115
0,0000001	1,00E-09	1 ppb	40-120

Fonte: AOAC, 2016.⁸⁵

3.7.2.6 Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD do inglês *Limit of detection*) é definido como o menor valor da concentração de um analito na amostra em que se pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições estabelecidas para o ensaio.⁸⁶

O limite de detecção pode ser determinado de diferentes maneiras, como: método visual, relação sinal-ruído e pelo método baseados nos parâmetros da curva de calibração. Quando utilizada a segunda forma de determinação, a relação sinal-ruído deve ser de 3:1 ou 2:1.^{78; 79}

Outra maneira de determinar o LOD do método através do limite de detecção instrumental, utilizando a equação (3.7), como descrito por Vieno et al.:⁸⁷

$$LOD = \frac{LDI \times 100}{\% Rec \times F} \quad (3.6)$$

Onde,

LDI= limite de detecção instrumental;

%Rec= porcentagem de recuperação absoluta;

F= fator de concentração.

O limite de quantificação (LOQ do inglês *Limit of quantification*) é, por definição, o menor valor de concentração do analito na amostra que possa ser determinado de forma quantitativa com precisão e exatidão adequadas. Este é um parâmetro de ensaios quantitativos para baixas concentrações de analitos em matrizes de amostras e é utilizado para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação.⁸⁶

Assim como o LOD, o limite de quantificação também pode ser determinado pelas mesmas maneiras. No entanto, alguns ajustes devem ser feitos, como por exemplo: ao usar o método sinal-ruído, esta relação deve passar de 3:1 ou 2:1 para 10:1. Contudo, relações sinal/ruído de 6:1 e 5:1 também podem ser adotadas, em função do método.⁷⁹

A abordagem descrita por Vieno et al. também pode ser usada, contudo, o LDI deve ser substituído pelo limite de quantificação instrumental, dando origem à seguinte equação (3.8):

$$\text{LOQ} = \frac{\text{LQI} \times 100}{\% \text{ Rec} \times F} \quad (3.7)$$

Onde,

LQI= limite de quantificação instrumental;

%Rec= porcentagem de recuperação absoluta;

F= fator de concentração.

Após a determinação do LOQ, este deve ser confirmado experimentalmente, onde será avaliado se a concentração do LOQ apresenta precisão e exatidão aceitáveis.⁷⁹

4 MATERIAL E MÉTODOS

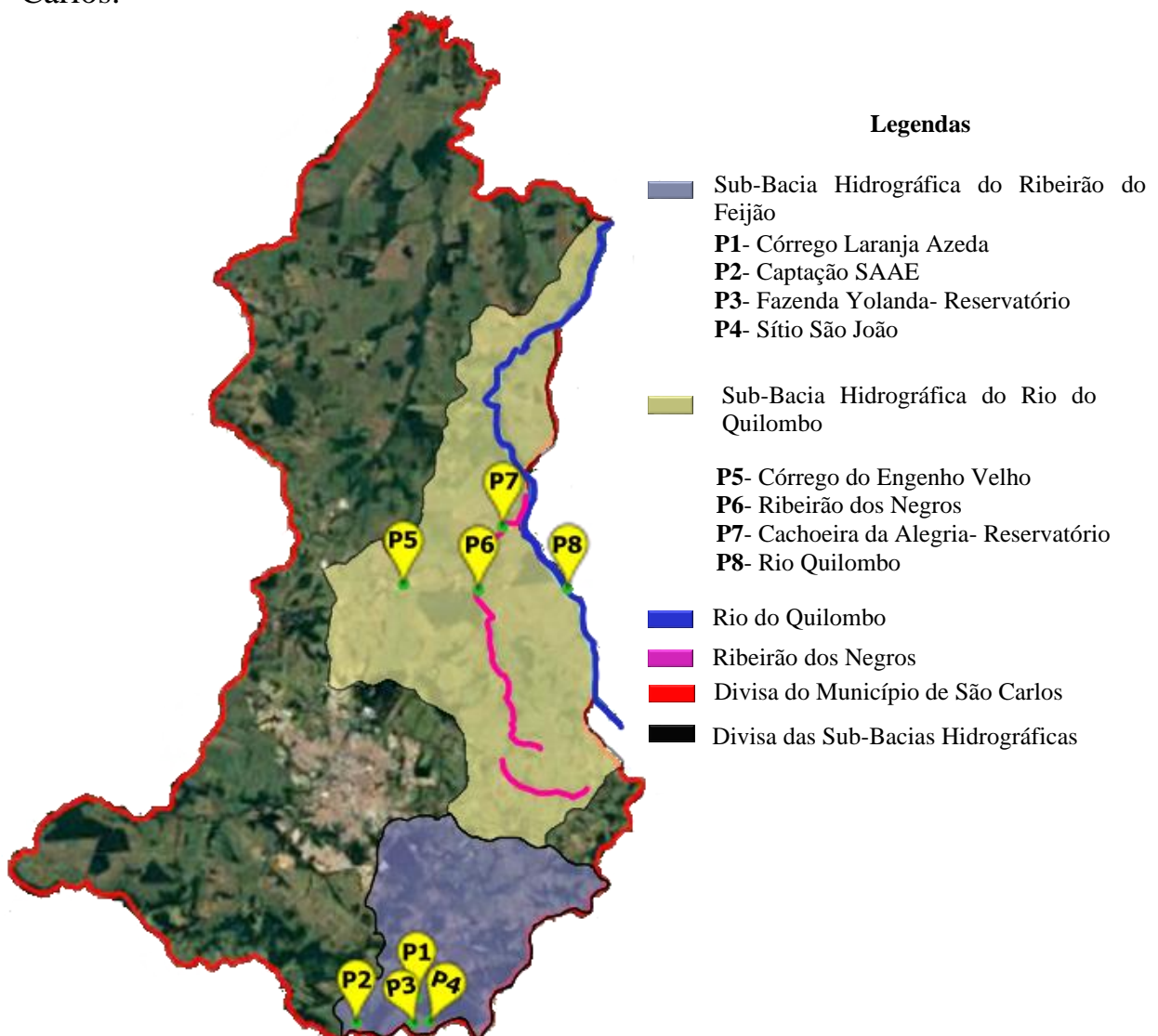
4.1 Período de amostragem

As coletas de amostras nas áreas de estudo localizadas na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão foram feitas no período em novembro de 2019, março e agosto de 2020, totalizando 3 coletas nesta região. Na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo foi feita apenas 1 coleta, em agosto de 2021.

4.2 Coleta e Condicionamento das amostras

As amostras foram coletadas em 8 pontos distintos, 4 pertencentes à SBHRF e 4 à SBHRQ, ambas no Município de São Carlos. A localização dos pontos está representada na Figura 4.1.

FIGURA 4.1-Localização dos pontos de coleta de amostra no município de São Carlos.



Fonte: FUSP,2011¹⁷. Adaptado.

As amostras sólidas foram coletadas com sondas de amostragem e armazenadas em recipientes plásticos de 250 mL de capacidade, enquanto as amostras de água foram armazenadas em garrafas de vidro com 1 L de capacidade. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas em caixas térmicas até a chegada ao laboratório.

As amostras sólidas (solo e sedimento) foram secas em estufa com circulação de ar por, aproximadamente, 48 horas a temperatura de 40 °C. Depois de secas as amostras foram trituradas com auxílio de almofariz e pistilo, seguido de peneiração em peneira granulométrica com malha de 60 *mesh*.⁴⁰

Após peneiradas, as amostras foram colocadas em sacos plásticos e armazenadas no freezer, a aproximadamente -20 °C.

As amostras líquidas foram filtradas em um sistema a vácuo (Figura 4.2) usando filtros de microfibras de vidro de três porosidades diferentes, sendo o primeiro de 1,2 µm, o segundo de 0,7 µm e por último o de 0,45 µm.

FIGURA 4.2- Representação do sistema usado para filtrar as amostras de água.



Após a filtração as amostras foram armazenadas em garrafas de vidro âmbar de 1 L de capacidade e mantidas refrigeradas a temperatura de 4 °C.

4.3 Limpeza de vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente neutro Extran MA 02 (Merck), enxaguadas em água corrente e deixadas submersas em uma solução aquosa 2% (v/v) do mesmo detergente por cerca de 12 horas. Posteriormente foram enxaguadas com água da torneira, água ultrapura e porções de acetona (P.A, Synth). Após a evaporação completa do solvente, as vidrarias, com exceção das volumétricas, foram levadas à mufla por, no mínimo, 5 horas com temperatura de 400 °C.

Os *vials* e *inserts* usados foram submetidos ao mesmo procedimento de limpeza descrito anteriormente. No entanto, antes de serem levados à mufla, foram colocados no ultrassom com três solventes diferentes: água ultrapura, acetona e etanol, por uma hora cada.

4.4 Solventes, padrões primários, sais, adsorventes usados e Membranas e cartuchos

No preparo das soluções padrão dos analitos foram usados hexano (Sigma-Aldrich), acetona (Applichem) e metanol (Merck), todos grau HPLC.

Para as extrações dos analitos foram utilizados acetona (Applichem), acetato de etila (Merck), ácido acético (Sigma-Aldrich), metanol (Merck), acetonitrila (Merck) todos grau HPLC e água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Sartorius®. No ajuste da força iônica da fase móvel do eluente para as determinações em HUPLC foi usado hidróxido de amônio (Sigma-Aldrich).

Os sais usados para execução dos procedimentos de extração foram: cloreto de sódio (99%) e acetato de sódio (98%), ambos da marca Synth, sulfato

de magnésio (98%) Vetec e amina primária secundária (PAS) adquirida da Supelco, este último usado como adsorvente na etapa de *clean-up*.

Os padrões primários utilizados foram: mix de pesticidas organoclorados CRM46960 (Supelco), PCB n° 52 (99,5% Sigma-Aldrich), 17- α -etinilestradiol (99,0% Dr. Ehrenstorfer), 17- β -estradiol (96,0% Dr. Ehrenstorfer), 1-hidroxi-ibuprofeno (99,6% Fluka Analytical), 2-hidroxicarbamazepina, 2-hidroxi-ibuprofeno (99,1% Fluka Analytical) atenolol (99,0% Dr. Ehrenstorfer), cafeína (98,5% Dr. Ehrenstorfer), carbamazepina (99,5% Dr. Ehrenstorfer), Carboxi-ibuprofeno (99,4% Fluka Analytical), diclofenaco (99,5% Dr. Ehrenstorfer), estrona (99,5% Dr. Ehrenstorfer), ibuprofeno (99,0% Dr. Ehrenstorfer), naproxeno (99,0% Dr. Ehrenstorfer), paracetamol (99,91% Dr. Ehrenstorfer), propranolol (99,5% Dr. Ehrenstorfer). Os padrões isotopicamente lábeis, usados como padrão interno (atenolol-d7, cafeína-d3, carbamazepina-d10, diclofenaco-d4, ibuprofeno-d3, naproxeno-d3, propranolol-d7) foram todos adquiridos da CND Isotopes.

Os cartuchos usados para a determinação de fármacos em água foi o Oasis HLB 6cc, adquirido da Waters.

Para a filtração das amostras foram usados filtros de microfibras de vidro (Sartorius) com três porosidades diferentes: 0,45 μm , 0,7 μm e 1,2 μm . Para filtrar os extratos foi usado filtro de seringa membrana PTFE hidrofóbico (Analítica) com 0,22 μm de porosidade.

4.5 Instrumentação

A instrumentação utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi:

- Balança analítica Shimadzu modelo ATX224, com precisão de 0,0001 g;
- Agitador tipo vortex Phoenix Lufergo modelo AP-56;
- Estufa Marconi modelo MA 035/64;
- Centrífuga Fanem Excelsa II 206 MP;

- Evaporador rotativo fisatom 802;
- Forno mufla Quimis;
- *Dry block* Solab SL 25/16;
- Micropipetas: 0-10 μL , 10-100 μL , 1000-5000 μL (Labmate), 100-1000 μL (Eppendorf);
- Peneiras granulométricas Granutest de 60 *Mesh*;
- Sistema de Purificação de água Satorius arium comfort;
- Sistema de filtração a vácuo;
- Sistema de GC-ECD- Cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC2010, com a seguinte configuração:
 - Gás de arraste: Nitrogênio 6.0 (99,9999%);
 - Injetor automático Shimadzu AOC-20i;
 - Microseringa de vidro (Hamilton);
 - Coluna capilar RTX-5 (30 m x 0,25 mm id x 0,25 μm de espessura de filme);
 - Detector de captura de elétrons
 - Sistema de aquisição de dados GCSolution.
- Sistema de UPLC- MS/MS- Cromatógrafo líquido Waters ACQUITY UPLC, com as seguintes configurações:
 - Gerenciador de solventes binário ACQUITY UPLC;
 - Gerenciador ACQUITY UPLC (EUA);
 - Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) Waters;
 - Coluna de guarda de mesmo material Waters;
 - Detector de espectrômetro de massa Waters, UK;
 - Fonte de íons de eletrospray.

4.6 Preparo das soluções padrão

Todas as soluções estoques utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram preparadas, de forma individual, a partir da pesagem de padrões sólidos, na concentração de 100 mg L^{-1} , em metanol, no caso dos fármacos, e em hexano, no caso dos pesticidas organoclorados. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar previamente lavados e aquecidos em mufla a $400 \text{ }^\circ\text{C}$, por cerca de 5 horas e mantidas refrigeradas, a aproximadamente $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

As soluções de trabalho usadas para a construção das curvas analíticas e para a fortificação das amostras, foram preparadas nas concentrações desejadas em forma de mix através da diluição das soluções estoques. Estas também foram mantidas refrigeradas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e foram renovadas a cada 3 meses.

4.7 Condições cromatográficas e avaliação dos parâmetros instrumentais

4.7.1 Condições de operação do GC-ECD

As determinações dos pesticidas organoclorados foram feitas num sistema cromatográfico a gás Shimadzu, modelo GC-2010, equipado com detector de captura de elétrons, coluna capilar a RTX-5 (30 m x 0.25 mm i.d x 0.25 μm de espessura do filme) e gás de arraste nitrogênio 6.0 (99,9999%), numa vazão de 3 mL min^{-1} . Um sistema de injeção automática Shimadzu modelo AOC-20i foi empregado no modo *splitless*. A programação usada no forno cromatográfico está descrita na Tabela 4.1:

TABELA 4.1 - Programação do forno cromatográfico usada na determinação de pesticidas organoclorados.

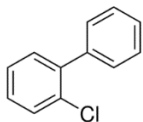
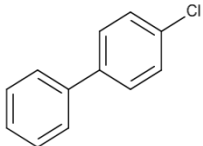
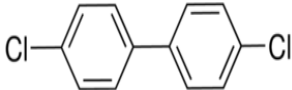
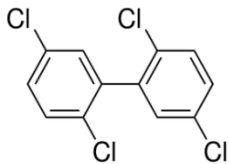
Taxa ($^\circ\text{C min}^{-1}$)	T ($^\circ\text{C}$)	Tempo (min)
-	100	1
4	200	-
2	230	-
8	280	5

As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C e 300 °C, respectivamente.

Para a averiguação dos tempos de retenção dos analitos foi injetado uma solução do padrão mix dos analitos junto com os padrões internos de 50 ppb, em hexano.

Foram testados quatro padrões internos: 2 - clorobifenil (PCB n° 1), 4 - clorobifenil (PCB n° 3), 4,4'- diclorobifenil (PCB n° 15) e 2,2',5,5' - tetraclorobifenil (PCB n° 52) para uso no estudo. Os PCB's foram selecionados para avaliação por possuírem estruturas moleculares próximas às dos analitos em estudos. Algumas de suas características estão descritas na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Fórmulas estruturais, solubilidade em água (SA) em mol L⁻¹, fórmula molecular (FM), coeficiente de partição octanol-água (Pow) em log Pow.

PCB n° 1	PCB n°3	PCB n°15	PCB n°15
			
FM=C ₁₂ H ₉ Cl S.A= 2,56 x 10 ⁻⁵ Pow: 4,53	FM=C ₁₂ H ₉ Cl S.A= 7,10 x 10 ⁻⁶ Pow: 4,61	FM=C ₁₂ H ₈ Cl ₂ S.A= 2,78 x 10 ⁻⁷ Pow: 5,23	FM=C ₁₂ H ₆ Cl ₄ S.A= 5,24 x 10 ⁻⁸ Pow: 6,09

Fonte: PubChem.

Com a finalidade de garantir a qualidade dos resultados, foi utilizado um cromatógrafo a gás com detector de espectrômetro de massas (GC-MS) Shimadzu QP2010, operado no modo *full-scan*, para determinar os tempos de retenção dos analitos. O equipamento foi operado com as mesmas condições empregadas no GC-ECD. Os tempos de retenção dos analitos obtidos pela análise com GC-MS são mostrados na Tabela 4.3;

TABELA 4.3- Tempos de retenção (Tr) obtidos para os analitos a partir da técnica de GC-MS.

Analito	Tr (min)
α-BHC	16,71
γ-BHC	18,18
β-BHC	18,34

δ -BHC	19,67
Heptacloro	21,69
PCB n° 52	22,81
Aldrin	23,28
Heptacloro epóxido	25,25
α -Endosulfan	26,88
Dieldrin	28,2
4,4'-DDE	28,38
Endrin	29,3
β -Endosulfan	29,89
4,4'-DDD	30,65
Endrin aldeído	30,99
Endosulfan Sulfato	32,55
4,4'-DDT	32,82
Metoxicloro	36,77

4.7.2 – Condições de operação do UPLC- MS/MS

As determinações dos fármacos foram feitas em um cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (TQD), usando um gerenciador de solvente binário Waters ACQUITY UPLC.

A coluna usada para as separações foi a ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m) Waters, precedida de uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A coluna foi mantida em 40 °C. As injeções foram realizadas por meio do injetor automático, empregando um volume de 10 μ L, e mantidas refrigeradas em 10 °C até o momento da injeção.

A fase móvel empregada na separação cromatográfica foi água ($2,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NH₄OH) (A) e metanol (B), operando no modo gradiente conforme descrito na tabela 4.4, com fluxo de 0,45 mL min⁻¹.

TABELA 4.4- Gradiente utilizado para a eluição dos compostos.

	Tempo (min)	%A	%B
	-	80,0	20,0
	1,20	80,0	20,0
Gradiente	5,80	5,0	95,0
	6,70	5,0	95,0
	6,80	80,0	20,0
	8,60	80,0	20,0

Em relação ao detector, foi usado um espectrômetro de massa (Waters, UK) equipado com uma fonte de ionização de eletrospray (ESI) e as

análises foram realizadas tanto no modo de ionização positiva quanto negativa, sendo o primeiro modo aplicado à cafeína, atenolol, carbamazepina, propranolol, 2-hidroxi-carbamazepina e CBZ-DiOH, e o segundo modo aplicado aos demais fármacos.

As configurações usadas no detector foram as seguintes: temperatura de solvatação ajustada para 500 °C; tensão capilar de 3 kV e 2,5 kV para os modos de ionização positiva e negativa, respectivamente; fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio) de 750 L h⁻¹ e fluxo do gás de colisão (argônio) de 3 x10⁻³ mbar.

As determinações e quantificações foram feitas no modo de monitoramento de reações selecionadas, onde cada uma das moléculas de fármacos foi monitorada pela transição de maior abundância entre um íon principal e suas fragmentações, mostrados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5- Voltagem do cone, energia de colisão e transições monitoradas na determinação dos analitos usando o espectrômetro de massas.

Analitos	SRM1	Voltagem do cone (eV)	Energia de Colisão (V)	SRM2	Energia de colisão (V)
Modo de ionização: positiva					
2-hidroxi-carbamazepina	253,2>208>2	30	20	235,1>210,0	20
Atenolol	267,0>145,0	32	30	267,0>190,0	20
Atenolol-d ₇	274,0>145,0	32	28		
Cafeína	195,0>42,0	35	30	195,0>138,0	20
Cafeína-d ₃	198,0>138,0	35	22		
Carbamazepina	237,1>192,0	33	20	237,1>194,0	20
Carbamazepina-d ₁₀	247,0>204,0	33	25		
CBZ-DiOH	271,0>236,0	15	9	271,0>253,0	9
Propranolol	260,1>72	34	24	260,1>116,0	22
Propranolol-d ₇	267,2>72,0	34	35		
Modo de ionização: negativa					
17- α -etinilestradiol	295,2>145,0	55	40	295,2>159,0	34
17- α -etinilestradiol-d ₄	299,2>147,0	55	49		
17- β -estradiol	271,2>145,1	53	35	271,2>283,1	40
17- β -estradiol-d ₅	276,2>147,0	53	40		
1-hidroxi-ibuprofeno	221,3>159,3	14	10	231,3>177,30	8
2-hidroxi-ibuprofeno	221,3>177,3	15	8		
Diclofenaco	294,0>250,1	20	12	296,0>252,0	12
Diclofenaco-d ₄	298,0>254,0	20	12		
Estrona	269,1>143,0	53	40	269,1>145,0	38
Estrona-d ₄	273,2>147,0	53	35		

Ibuprofeno	205,1>161,1	15	8		
Ibuprofeno-d ₃	208,0>164,0	15	8		
Naproxeno	299,0>170,1	15	15	229,0>185,1	8
Naproxeno-d ₃	232,0>188,0	12	8		
Paracetamol	150,0>107,1	34	18		
Paracetamol-d ₃	153,0>107,0	32	18		

4.8 Procedimento de preparo das amostras sólidas para determinação de pesticidas

A etapa *QuEChERS* do procedimento de preparo de amostras sem a etapa *clean-up*, consistiu em:

- Pesagem de 2,0 g de amostras de solo em um tubo de polipropileno do tipo falcon com capacidade de 15,0 mL;
- Adição de 5,0 mL de solvente extrator;
- Agitação em vortex por 1 min, seguida da adição de 1,0 g de MgSO₄ + 0,2 g de NaCl + 0,2 g de NaAc;
- Agitação em vortex por 30 s seguido de centrifugação por 5 min a 3500 rpm.

4.8.1 etapa *clean-up* do método *QuEChERS*

Com o intuito de obter extratos com menor número de interferentes e, conseqüentemente, melhorar a qualidade da análise cromatográfica foi feita a etapa de *clean-up*, onde todo o sobrenadante obtido após a última centrifugação na etapa *QuEChERS* foi transferido para outro tubo *falcon* contendo 0,150 g do adsorvente amina primária-secundária (*Primary Secondary Amine- PSA*) + 0,150 g de MgSO₄. O tubo foi agitado em vortex por 30 s e depois centrifugado por 5 min a 3500 rpm.

4.8.2- Concentração dos extratos

Com objetivo de melhorar o sinal cromatográfico dos analitos foi feita a etapa de concentração dos extratos. Para isso, todo sobrenadante obtido após a *clean-up* foi transferido para um tubo de ensaio de vidro e levado ao *dry block* com fluxo de nitrogênio (bloco aquecido a 50 °C) para evaporação parcial do solvente, até cerca de 200 µL.

O extrato foi transferido para um *vial* e o tubo foi lavado com 3 porções (400 µL cada) de acetona HPLC, que também foram juntados ao extrato. Os *vials* foram mantidos sob fluxo de nitrogênio até a completa evaporação do solvente. Então, 1000 µL de hexano HPLC foram adicionados ao *vial* e agitados em vortex. Este extrato foi filtrado em filtro de seringa membrana PTFE 0,22 µm de porosidade, seguido da adição de padrão interno e de análise cromatográfica.

4.9 Procedimento de preparo das amostras de água para determinação de pesticidas

As determinações dos pesticidas em água foram feitas com o método LLE. Para isso, a amostra, em temperatura ambiente, foi colocada em um funil de separação e em seguida adicionado 5,0 g de NaCl. O funil foi agitado vigorosamente, até a completa dissolução do sal.

Em seguida, foi adicionado 1/3 do volume total de solvente extrator (acetato de etila acidificado com 1% (v/v) de ácido acético) e o funil foi agitado vigorosamente, com constante alívio de pressão, por aproximadamente 1 min. O funil foi deixado em repouso até a completa separação das fases.

Então, a fase orgânica foi recolhida para um balão de fundo redondo e a amostra foi devolvida para o funil. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Ao final, o balão contendo o extrato foi levado ao evaporador rotativo, com a temperatura do banho a 60 °C, para a evaporação parcial do solvente, até aproximadamente 300 µL. O extrato foi transferido para um *vial* e o

balão foi lavado com 3 porções (400 μL cada) de hexano HPLC, que também foram juntados ao extrato.

Os *vials* foram levados ao *dry block* com fluxo de nitrogênio até a completa evaporação do solvente. Após totalmente secos, 1000 μL de hexano HPLC foram adicionados ao *vial* e agitado em vortex, seguido de adição de padrão interno e de análise cromatográfica.

4.10 Procedimento de preparo de amostras para determinação de fármacos

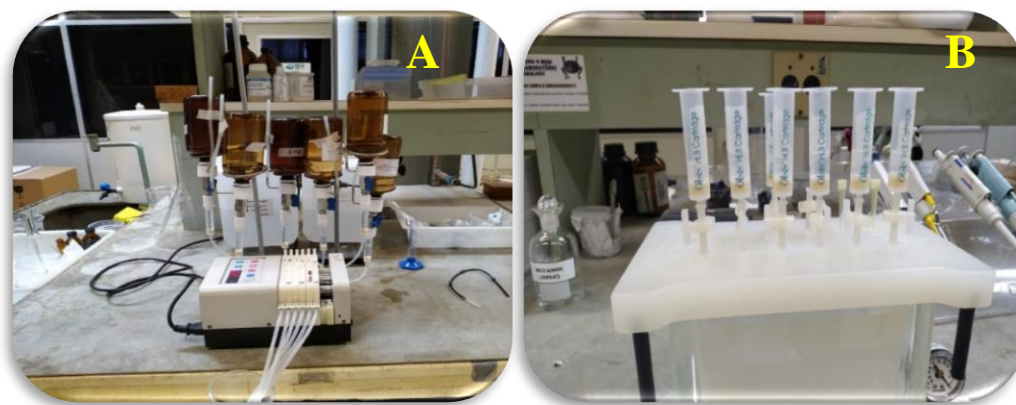
As determinações de fármacos foram feitas com o método de SPE. Assim, o primeiro procedimento foi o condicionamento dos cartuchos.

Os cartuchos Oasis HLB 6cc foram condicionados pela passagem de 2 alíquotas de 5 mL de metano HPLC, seguida de mais 2 alíquotas, de mesmo volume, de água ultrapura. Este procedimento foi feito sem o uso de vácuo, apenas pela gravidade.

Para extração dos analitos, 500 mL de água, em temperatura ambiente, já com a solução padrão dos analitos deuterados adicionada, foram percolados pelos cartuchos com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 6 mL min^{-1} (Figura 4.3-A).

Após o término da passagem da amostra, os cartuchos foram colocados no *manifold* (Figura 4.3-B) e, sob vácuo, foram passados 10 mL de água ultrapura. Em seguida, ainda sob vácuo, os cartuchos foram secos por 45 min.

Figura 4.3- Representação do processo de percolação das amostras de água pelos cartuchos (A) e da etapa de secagem dos cartuchos usando o manifold (B).



Após este período, sem o uso de vácuo, foram passados pelo cartucho 2 alíquotas de 3 mL de metanol HPLC e 1 alíquota, de mesmo volume, de metanol:acetona (1:1). Os solventes foram recolhidos em tubos de ensaio de vidro e levados *dry block* com fluxo de nitrogênio (bloco aquecido a 45° C) para evaporação parcial, até cerca de 200 μ L. O extrato foi transferido para um *vial*, onde foi completamente seco.

Os analitos foram ressuspensos em 1 mL de metanol:água (20:80) e levados para análise cromatográfica.

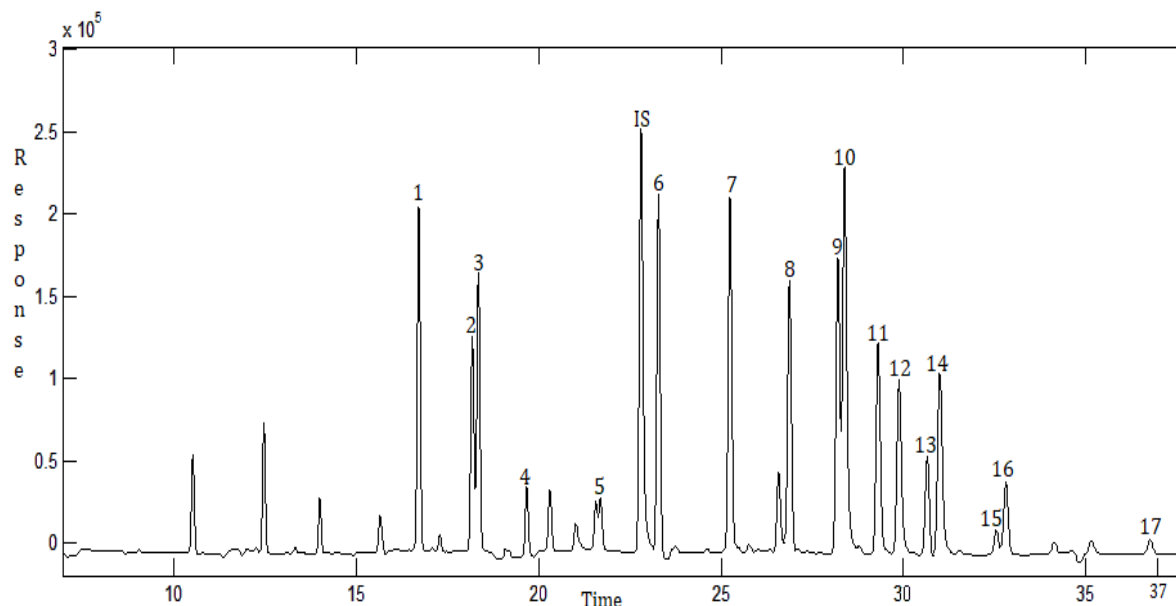
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições cromatográficas e parâmetros instrumentais

5.1.1 Condições operacionais do GC-ECD

Operando o equipamento com as condições cromatográficas apresentadas anteriormente (Item 4.5.1) todos os analitos foram separados em, aproximadamente, 37 min., com resolução superior a 1,26, com exceção do par Dieldrin/4,4-DDE, que apresentou resolução de 0,72, como mostrado na imagem a seguir (Figura 5.1):

Figura 5.1-Cromatograma obtido com a injeção de uma solução mix de analitos ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) e uma solução de padrão interno (IS - $25 \mu\text{g L}^{-1}$), ambas preparadas em hexano.



1- α -BHC; 2- γ -BHC; 3- β -BHC; 4- δ -BHC; 5- Heptacloro; 6- Aldrin; 7- Heptacloro epóxido; 8- α -Endosulfan; 9- Dieldrin; 10- 4,4'-DDE; 11- Endrin; 12- β -Endosulfan; 13- 4,4'-DDD; 14- Endrin aldeído; 15- Endosulfan Sulfato; 16- 4,4'-DDT; 17- Metoxicloro. IS- PCB n°52.

Embora a resolução para o par Dieldrin/4,4-DDE não seja superior a 1, a detecção e quantificação destes analitos não foram prejudicadas.

Com relação ao tempo total da corrida cromatográfica, este foi de 52 min. No entanto, a partir dos 37 min., após a eluição do último analito, a corrida prosseguiu apenas para garantir a limpeza da coluna, medida que se fez necessária devido às concentrações de trabalho serem bastantes baixas.

Em relação ao padrão interno, o escolhido para o desenvolvimento deste trabalho foi o PCB n° 52, pois, além de não co-eluir com nenhum dos analitos estudados, possui um tempo de retenção mais próximos a maioria dos analitos e apresenta um sinal cromatográfico de maior intensidade, quando comparados com os outros PCB avaliados.

5.2 Ajustes nas etapas dos métodos de extração

5.2.1 O método *QuEChERS*

Durante o desenvolvimento da etapa *QuEChERS* foram testados, inicialmente, dois tipos de solventes extratores: acetonitrila e acetona acidificada com 1% (v/v) de ácido acético. Foi feito apenas um teste usando acetonitrila, mas logo foi observado que o tempo de evaporação do solvente era muito elevado. Assim, foi escolhido, como solvente extrator, a acetona acidificada com ácido acético.

Em relação a massa de MgSO_4 , foi observado que o uso de 1,0 g deste sal ocasionava um aumento na temperatura, o que poderia contribuir para a extração de interferentes presentes na matriz. Esta questão foi contornada diminuindo a massa de MgSO_4 para 0,4 g, que foi o suficiente para a eliminação de água dos extratos.

A etapa de *clean-up* dos extratos não precisou ser modificada, tendo sido aplicada como descrito no item 4.8.1 deste trabalho.

5.2.2 O método LLE

No desenvolvimento desta etapa foram testados dois volumes de amostras para a extração dos analitos. Inicialmente, foram feitos testes de recuperação dos analitos, em três níveis de concentração (10 ng L^{-1} , 50 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1}) utilizando 0,3 L de amostra e 0,1 L de solvente extrator (acetato de etila acidificado com 1% (v/v) ácido acético). Nestes testes foi observado que os valores dos %CV, no primeiro nível de fortificação, e as %Rec, nos dois primeiros níveis, estavam acima do recomendado pelos protocolos de validação para a maioria dos analitos. Estes valores são mostrados na Tabela 5.1.

TABELA 5.1- Valores dos coeficientes de variação (%CV) e porcentagens de recuperação (%Rec) dos analitos, em três níveis de fortificação, com 0,3 L de amostra.

Analitos	10 ng L ⁻¹		50 ng L ⁻¹		100 ng L ⁻¹	
	% CV	Rec (%)	% CV	Rec (%)	% CV	Rec (%)
4,4'-DDD	22	166	1	130	8	104
4,4'-DDE	22	146	9	141	8	87
4,4'-DDT	23	197	4	135	7	101
α-BHC	39	84	10	60	16	58
β-BHC	29	93	4	80	6	66
γ-BHC	19	151	9	128	6	95
δ-BHC	21	152	5	118	5	104
Aldrin	16	148	3	84	2	70
Dieldrin	22	147	8	126	7	90
α -Endosulfan	22	148	3	122	4	95
β -Endosulfan	22	161	8	134	5	104
Endosulfan Sulfato	25	181	12	120	4	119
Endrin	24	164	5	126	4	101
Endrin aldeído	23	163	9	132	4	96
Heptacloro	20	136	8	76	6	71
Heptacloro epóxido	22	142	5	114	6	87
Metoxicloro	27	191	2	126	3	115

A medida tomada para contornar este problema foi o aumento do volume de amostras usado, passando para 1 L, pois, dessa forma, também foi elevada a quantidade, em massa, dos analitos, fazendo com que as variações observadas durante as extrações diminuíssem. Estes resultados serão apresentados mais adiante.

Com o aumento no volume de amostras foi necessário readequar o volume de solvente extrator, passando a ser utilizado 0,3 L.

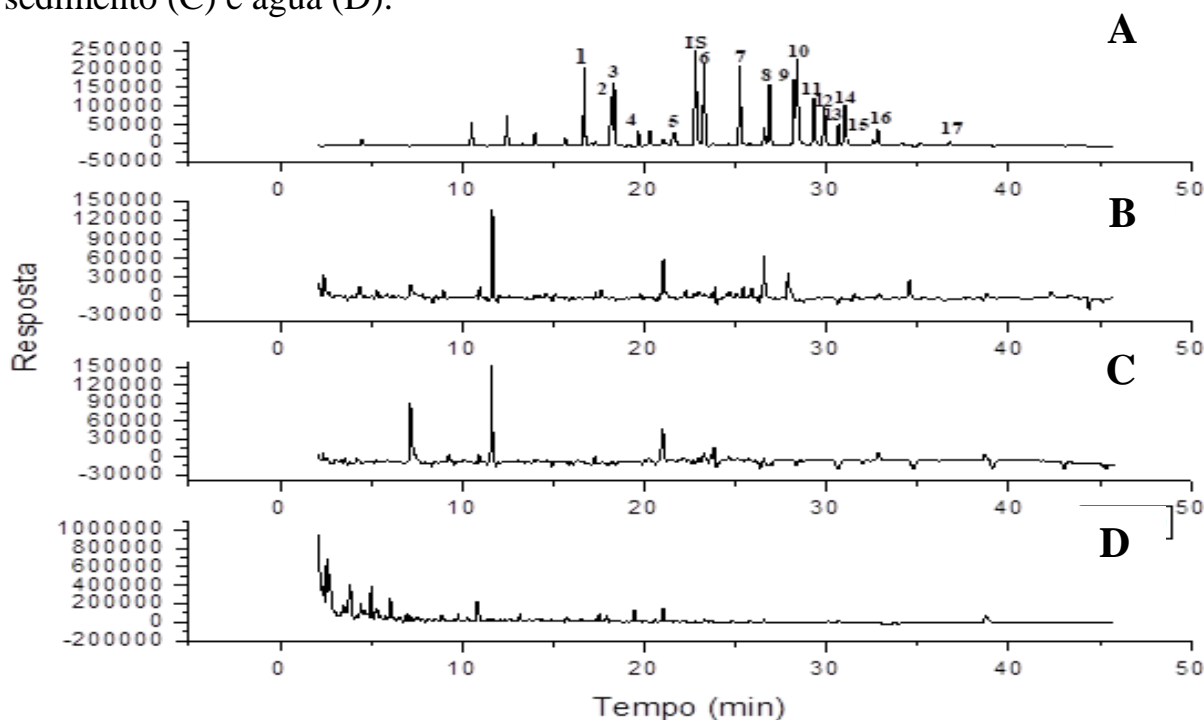
5.2 Validação de método

5.2.1 Validação dos métodos para determinação de pesticidas organoclorados

A comparação de um cromatograma proveniente da injeção de uma solução de um padrão mix dos pesticidas organoclorados com os cromatogramas dos brancos analíticos (Figura 5.2), evidencia que os métodos propostos são

seletivos, uma vez que não houve co-eluição dos analitos com nenhum componente presente nas amostras.

FIGURA 5.2- Comparação entre os cromatogramas obtidos com o padrão mix de pesticidas $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) e os brancos analíticos das amostras de solo (B), sedimento (C) e água (D).



1- α -BHC; 2- γ -BHC; 3- β -BHC; 4- δ -BHC; 5- Heptacloro; 6- Aldrin; 7- Heptacloro epóxido; 8- α -Endosulfan; 9- Dieldrin; 10- 4,4'-DDE; 11- Endrin; 12- β -Endosulfan; 13- 4,4'-DDD; 14- Endrin aldeído; 15- Endosulfan Sulfato; 16- 4,4'-DDT; 17- Metoxicloro. IS- PCB n°52.

Para as amostras sólidas, a porcentagem de recuperação dos pesticidas organoclorados, avaliadas em 4 diferentes níveis de fortificação ($1,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$, $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$), no entanto, apenas os dois últimos níveis atendem aos LQs dos analitos. Assim, a %Rec ficou entre 50% e 117% para o endrin aldeído e o 4,4'-DDT, respectivamente. Estes valores mostram que o método proposto é exato para 15 dos 17 analitos estudados, sendo estes mesmos analitos as exceções, uma vez que as %Rec não atendem aos valor estabelecido pelos protocolos de validação (Tabela 3.10).

Todos os analitos apresentaram valores de coeficiente de variação, inferiores a 19% nos níveis de fortificação avaliados. Em relação aos valores de coeficiente de correlação linear, R^2 , estes foram superiores a 0,98 para todos os

analitos. Os valores de todos os parâmetros obtidos nos testes de adição e recuperação nos dois últimos níveis de fortificação são apresentados na Tabela 5.2.

TABELA 5.2- Parâmetros da curva analítica pelo método de adição padrão, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os pesticidas estudados em amostras sólidas, fortificadas em dois níveis.

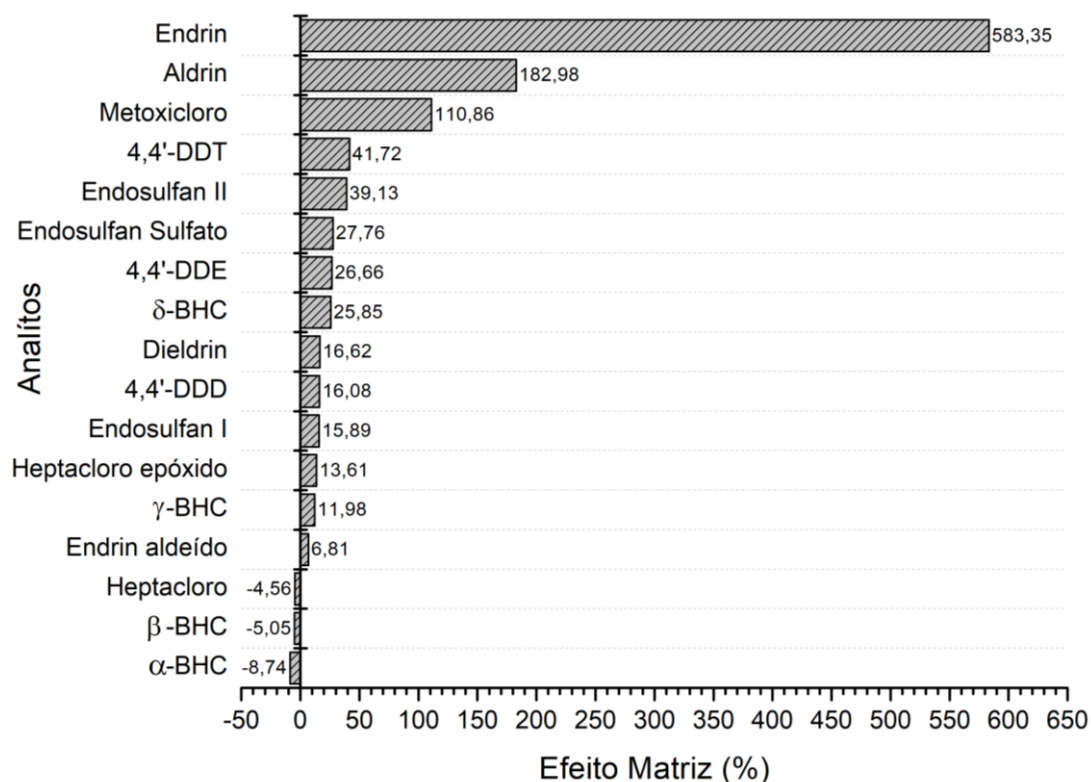
Analitos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R ²	Concentração de fortificação ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)			
				5,0		10,0	
				% CV	%Rec	% CV	%Rec
4,4'-DDD	5-25	$y = 0,0247x + 0,0474$	0,995	9	107	9	91
4,4'-DDE	5-25	$y = 0,0367x + 0,0541$	0,994	8	101	11	90
4,4'-DDT	5-25	$y = 0,0252x + 0,0652$	0,999	16	117	8	87
α -BHC	5-25	$y = 0,0313x + 0,0515$	0,989	8	98	13	61
β -BHC	5-20	$y = 0,0308x - 0,0214$	0,995	8	94	9	71
γ -BHC	5-25	$y = 0,0357x + 0,0709$	0,993	6	98	4	91
δ -BHC	5-25	$y = 0,0357x + 0,0709$	0,996	9	96	8	87
Aldrin	10-25	$y = 0,031x + 0,0357$	0,988	4	102	6	76
Dieldrin	5-25	$y = 0,0244x + 0,1395$	0,995	9	93	8	84
α -Endosulfan	5-25	$y = 0,0317x + 0,0725$	0,993	8	92	8	82
β -Endosulfan	5-25	$y = 0,0336x + 0,0809$	0,998	9	110	8	91
Endosulfan Sulfato	5-25	$y = 0,027x + 0,0871$	0,998	6	107	6	96
Endrin	10-25	$y = 0,0282x + 0,1067$	0,996	8	102	9	85
Endrin aldeído	5-25	$y = 0,0266x + 0,0745$	0,998	19	72	10	50
Heptacloro	5-20	$y = 0,024x + 0,0685$	0,995	8	103	9	71
Heptacloro epóxido	5-20	$y = 0,033x + 0,0458$	0,999	9	106	8	83
Metoxicloro	10-25	$y = 0,0182x + 0,0319$	0,992	14	111	6	91

Os valores de R^2 evidenciam a elevada linearidade do método proposto. Em relação ao %CV, o valor máximo desejado para que se possa atestar a precisão de um método varia de acordo com a faixa de concentração escolhida para o desenvolvimento do trabalho. ⁸⁸

Dessa forma, considerando a faixa de concentração de trabalho utilizada, pode-se concluir, a partir dos resultados anteriormente apresentados, que o método proposto para a determinação de pesticidas organoclorados em amostras de solo e sedimento é preciso para todos os analitos estudados.

Para a quantificação dos analitos, a curva analítica foi construída utilizando o método de adição padrão. Este método foi selecionado após a avaliação do efeito matriz (EM) nas amostras de solo, onde foram obtidos efeitos bastantes significativos, variando de -8,73% até 585,35% para o α -BHC e para o endrin, respectivamente. Na Figura 5.3 é apresentado o valor do efeito matriz calculado para cada um dos analitos.

FIGURA 5.3- Efeito de matriz, em porcentagem, calculado para todos os analitos em amostras sólidas.



Embora seja mais trabalhoso, o método de adição padrão foi usado devido à necessidade de compensação dos resultados, evidenciada pelos valores de EM calculados.

Com relação aos valores dos limites de detecção e de quantificação do método, para as amostras de solo o LD_m ficou entre 0,7586 µg Kg⁻¹, para o 4,4'-DDD, e 2,1441 µg Kg⁻¹ para o endosulfan sulfato, enquanto o LQ_m ficou entre 2,528 µg Kg⁻¹ e 7,147 µg Kg⁻¹ para os mesmos analitos. Os valores de LD_m e LQ_m para todos os analitos nas amostras sólidas estão descritos na Tabela 5.3.

TABELA 5.3- Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em µg Kg⁻¹, para o método de extração aplicado às amostras sólidas.

Analitos	LD_m	LQ_m
4,4'-DDD	0,7586	2,528
4,4'-DDE	0,8469	2,823
4,4'-DDT	0,7621	2,540
α-BHC	1,257	4,193
β-BHC	1,2879	4,293
γ-BHC	0,8820	2,9402
δ-BHC	1,1586	3,862
Aldrin	0,7805	2,601
Dieldrin	0,9159	3,053
α -Endosulfan	0,8826	2,942
β -Endosulfan	0,90363	3,012
Endosulfan Sulfato	2,1441	7,147
Endrin	0,9873	3,291
Endrin aldeído	2,0469	6,823
Heptacloro	0,98654	3,2884
Heptacloro epóxido	0,86345	2,87819
Metoxicloro	1,10594	3,68649

Com relação as amostras líquidas, após o ajuste no volume usado no procedimento para determinação dos pesticidas em água, os ensaios de recuperação, feitos em 3 níveis de concentração (10 ng L⁻¹, 50 ng L⁻¹, 100 ng L⁻¹), forneceram, no geral, resultados bastantes satisfatórios. Os valores das %Rec para os analitos variaram de 40%, para o α-BHC até 144%, para 4,4'-DDE. Na tabela a seguir, Tabela 5.4, estão descritos, além de outros parâmetros, as %Rec obtidas para os analitos em cada um dos três níveis de fortificação.

TABELA 5.4-Parâmetros da curva analítica pelo método de adição padrão, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os pesticidas estudados em amostras de água, fortificadas em três níveis diferentes.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	Concentrações de fortificação					
				10 ng L ⁻¹		50 ng L ⁻¹		100 ng L ⁻¹	
				% CV	% Rec	% CV	% Rec	% CV	% Rec
4,4-DDD	1-25	$y=0,0047x-0,0462$	0,99	12	104	12	100	7	103
4,4-DDE	1-25	$y=0,005x-0,0009$	0,99	15	144	8	98	6	97
4,4-DDT	5-25	$y=0,0045x+0,0006$	0,99	12	131	10	102	12	85
α -BHC	1-25	$y=0,0087x-0,0008$	0,99	37	67	34	60	38	40
β -BHC	1-25	$y=0,0077x+0,0051$	0,99	16	93	18	74	24	57
γ -BHC	1-25	$y=0,0044x+0,0099$	0,99	10	127	4	94	7	91
δ -BHC	1-25	$y=0,0072x+0,0074$	0,99	10	101	7	115	20	76
Aldrin	1-25	$y=0,0429x+0,022$	0,99	9	102	12	76	13	65
Dieldrin	1-25	$y=0,0051x-0,0018$	0,99	13	135	6	97	9	95
α -Endosulfan	1-25	$y=0,0066x+0,0009$	0,99	10	128	1	96	7	92
β -Endosulfan	1-25	$y=0,0059x-0,0011$	0,99	13	137	7	106	7	100
Endosulfan Sulfato	5-25	$y=0,0045x-0,0012$	0,99	n.q		11	124	12	83
Endrin	5-25	$y=0,0058x-0,0073$	0,99	11	129	5	103	7	94
Endrin aldeído	1-25	$y=0,0345x-0,0212$	0,99	15	128	13	97	7	100
Heptacoloro	1-25	$y=0,0054x+0,0065$	0,99	19	78	17	79	20	57
Heptacoloro epóxido	1-25	$y=0,0066x+0,0005$	0,99	8	120	1	93	8	85
Metoxicloro	5-25	$y=0,0025x-0,0063$	0,99	13	130	5	110	9	95

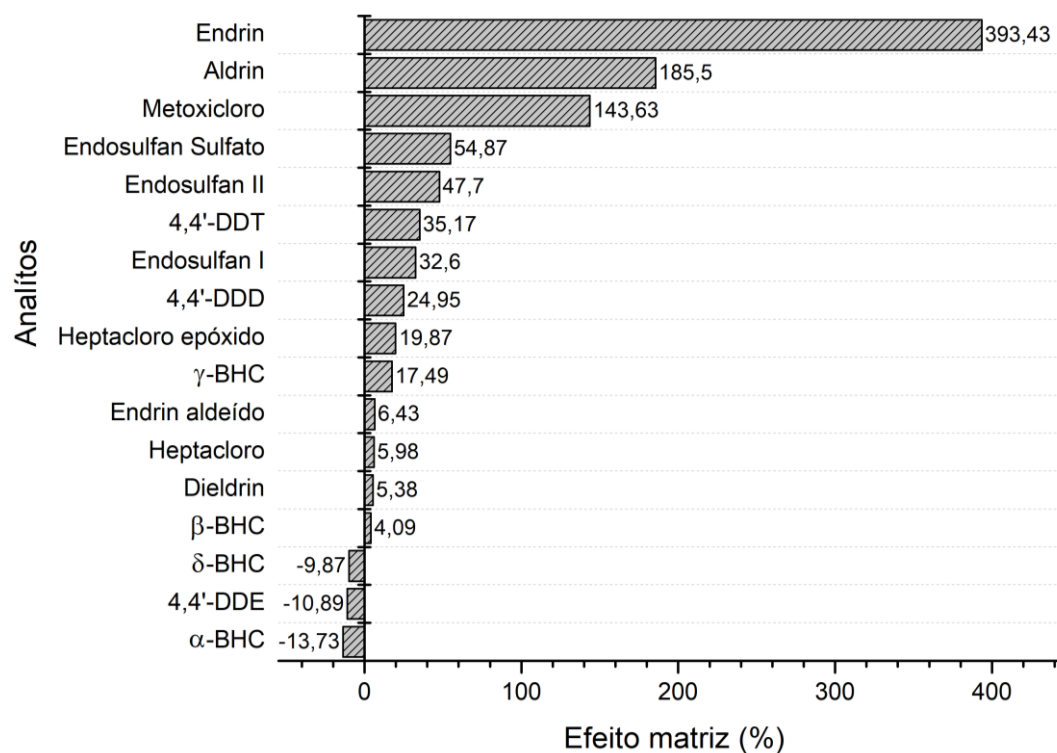
n.q- valores não quantificados devido a concentração de fortificação ser inferior ao LQ_m do analito.

Com relação aos valores dos coeficientes de variação, estes foram inferiores a 24, em todos os níveis de fortificação, para 16 dos 17 analitos estudados. A exceção foi o α -BHC, cujas %CV foram de 37, 34 e 38, para as fortificações feitas com 10 ng L^{-1} , 50 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1} , respectivamente. Estes valores permitem inferir que o método proposto é preciso para a maioria dos analitos estudados, uma vez que atende os critérios dos protocolos de validação.⁷⁹

Em relação a linearidade do método proposto para a determinação de pesticidas em água, esta é evidenciada pelos elevados valores de coeficiente de correlação linear obtidos, todos superiores a 0,992.

Assim como para as amostras sólidas, a quantificação dos pesticidas organoclorados em amostras de água também foi feita usando curva analítica construída com o método de adição padrão, uma vez que, na avaliação do EM, também foram observados efeitos significativos, que variam de -13,73% para o α -BHC até 393,43% para o endrin. O EM calculado para cada um dos analitos está representado na Figura 5.4.

FIGURA 5.4- Efeito de matriz, em porcentagem, calculado para todos os analitos em amostras de água.



Sobre os valores de LD_m e LQ_m para os analitos nas amostras de água, o primeiro variou de 1,641 ng L⁻¹ para o α -BHC até 4,433 ng L⁻¹ para o endosulfan sulfato, enquanto o segundo parâmetro variou entre 5,473 ng L⁻¹ e 14,779 ng L⁻¹ para os mesmos analitos. A relação completa dos valores destes parâmetros está apresentada na Tabela 5.5.

TABELA 5.5-Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em ng L⁻¹, para o método de extração de pesticidas organoclorados aplicado às amostras de água.

Analitos	LD_m	LQ_m
4,4'-DDD	1,707	5,692
4,4'-DDE	2,027	6,757
4,4'-DDT	1,885	6,284
α -BHC	1,641	5,473
β -BHC	1,778	5,926
γ -BHC	2,0098	6,699
δ -BHC	2,380	7,935
Aldrin	1,787	5,956
Dieldrin	2,174	7,248
α -Endosulfan	1,797	5,991
β -Endosulfan	2,174	7,248
Endosulfan Sulfato*	4,433	14,779
Endrin	2,527	8,425
Endrin aldeído	2,476	8,254
Heptacloro	1,7886	5,962
Heptacloro epóxido	1,8864	6,288
Metoxicloro	2,6975	8,99

5.2.2 Validação dos métodos para determinação de fármacos em amostras de água

O método SPE utilizado neste trabalho para a determinação de fármacos em água foi o mesmo usado no preparo de amostras por de Sousa et al., 2014,³⁸ apenas com algumas alterações. Como o método em questão já havia sido validado, foram feitos somente alguns testes para confirmar sua eficácia, assegurando, assim, a qualidade dos resultados obtidos.

Os testes de adição e recuperação apresentaram resultados bastante satisfatórios, pois as %Rec ficaram entre 71%, para o 2-Hidroxi ibuprofeno, e 120% para o ibuprofeno. Em relação aos valores de %CV, estes foram inferiores

a 10 para 13 dos 14 analitos estudados, sendo a única exceção o ibuprofeno, com %CV de 38. Os valores destes parâmetros para os demais analitos estão listados na Tabela 5.6.

TABELA 5.6- Parâmetros da curva analítica pelo método padronização externa, faixa linear, porcentagens de recuperação (%Rec) e os coeficientes de variação (%CV) obtidos para os fármacos estudados em amostras de água, fortificadas em $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Analito	Faixa linear ppb	Equação da reta	R ²	%CV	%Rec
Cafeína	1-75	$y=0,0095x-0,0022$	0,99	5	107
Atenolol	1-50	$y=0,0098x-0,0029$	0,99	7	100
Carbamazepina	1-100	$y=0,0336x-0,0456$	0,99	3	100
Propranolol	1-75	$y=0,0273x-0,0182$	0,99	2	99
2-Hidroxicarbamazepina	1-75	$y=0,0134x-0,0152$	0,99	6	98
CBZ-DiOH	1-75	$y=0,0024x-0,0009$	0,99	8	102
Naproxeno	1-75	$y=0,0212x-0,0188$	0,99	4	98
Ibuprofeno	1-75	$y=0,0185x-0,0055$	0,98	38	120
Diclofenaco	1-75	$y=0,0157x-0,0006$	0,99	6	95
Estrona	1-75	$y=0,0202x-0,0221$	0,99	5	100
17- β -estradiol	1-75	$y=0,0215x-0,0072$	0,99	5	101
17- α -etinilestradiol	1-75	$y=0,0319x-0,0172$	0,99	7	93
Paracetamol	1-75	$y=0,0119x-0,0111$	0,99	9	100
2-Hidroxi ibuprofeno	1-75	$y=0,0116x-0,0025$	0,99	5	71

Relacionado aos valores do coeficiente de correlação linear, estes foram superiores a 0,98 para todos os analitos.

Os resultados obtidos nos testes de adição e recuperação, apresentados na Tabela 5.6 permitem inferir que o método de preparo de amostras proposto é preciso, exato e linear, para a maioria dos analitos.

Sobre os valores dos LD_m e LQ_m, o primeiro variou de 2,885 ng L⁻¹, para o ibuprofeno até 5,292 ng L⁻¹ para o 17- β -estradiol, enquanto o segundo variou entre 9,618 ng L⁻¹ e 17,642 ng L⁻¹, para os mesmos analitos. Os valores dos limites de detecção e de quantificação do método para os demais analitos encontram-se na Tabela 5.7.

TABELA 5.7-Valores dos limites de detecção (LD_m) e de quantificação (LQ_m) de método para os analitos, em $ng L^{-1}$, para o método de extração de fármacos aplicado às amostras de água.

Analito	LD_m	LQ_m
Cafeína	3,304	11,012
Atenolol	3,827	12,758
Carbamazepina	4,475	14,917
Propranolol	3,873	12,908
2-Hidroxicarbamazepina	3,916	13,052
CBZ-DiOH	3,756	12,520
Naproxeno	4,244	14,147
Ibuprofeno	2,885	9,618
Diclofenaco	3,156	10,518
Estrona	4,425	14,748
17- β -estradiol	5,293	17,642
17- α -etinilestradiol	3,650	13,633
Paracetamol	4,563	15,210
2-Hidroxi ibuprofeno	5,140	17,152

Os resultados obtidos nos testes de validação dos métodos, tanto para a determinação de pesticidas organoclorados quanto para a determinação de fármacos, possibilitam a confirmação de que os métodos propostos são bastantes confiáveis para a determinação dos analitos selecionados para estudos em amostras ambientais (solo, sedimento e água). Dessa forma, após a finalização da etapa de validação, os métodos foram aplicados em amostras ambientais coletadas na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão e na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo e os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO

5.3.1 Pontos de coleta de amostras

Para a aplicação dos métodos desenvolvido foram realizadas coletas de amostras em duas sub-bacias hidrográficas diferentes: 4 pontos situados na Sub-Bacia do Ribeirão Feijão e 4 situados na Sub-Bacia do Rio Quilombo (Figura 5.5), ambas localizadas no município de São Carlos.

Figura 5.5- Localização dos pontos de coleta das amostras nas Sub-Bacias Hidrográficas do Ribeirão Feijão (P1-P4) e do Rio Quilombo (P5-P8).



P1- Córrego Laranja Azeda
 Lat: 22° 8'26.00"S Long: 47°51'13.75"O



P2- Captação SAAE
 Lat: 22° 9'8.10"S Long: 47°53'9.69"O



P3- Fazenda Yolanda – Reservatório
 Lat: 22°9'13.99"S Long: 47°51'18.26"O



P4- Sítio São João
 Lat: 22° 9'16.49"S Long: 47°50'44.72"O



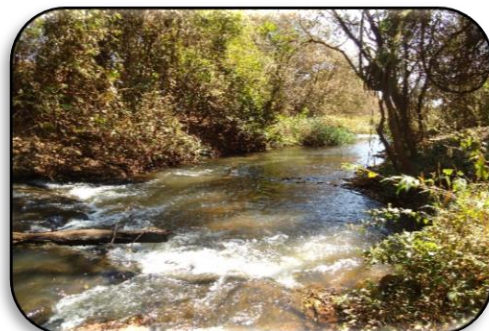
P5- Córrego Engenho Velho
 Lat: 21°54'31.19"S Long: 47°51'37.82"O



P6- Ribeirão dos Negros
 Lat: 21°54'47.07"S Long: 47°48'49.71"O



P7- Cachoeira da Alegria- Reservatório
 Lat: 21°52'45.53"S Long: 47°48'04.38"O



P8- Rio Quilombo
 Lat: 21°54'45.27"S Long: 47°45'47.23"O

5.3.2 Caracterização das áreas de estudo

Com as amostras líquidas coletadas foram avaliados parâmetros como: pH, carbono orgânico total (COT), carbono inorgânico (CI), carbono total (CT), temperatura, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e potencial redox (E_H), para a caracterização físico-química das águas. Os valores obtidos para todos estes parâmetros estão descritos na Tabela 5.8.

TABELA 5.8- Valores obtidos na avaliação dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletas em diferentes períodos na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão e na Sub-Bacia do Rio Quilombo.

Coletas	Pontos	pH	Turb (NTU)	OD (mg/L)	Temp (°C)	E_H (mV)	COT* (mg/L)	CI* (mg/L)	CT* (mg/L)
**NOV/19	P1	7,86	13,9	6,3	33	269	1,98	2,16	4,14
	P2	7,44	9,79	7,8	29	276	2,08	1,59	3,67
	P3	7,05	16,9	5,3	35,8	256	2,53	1,53	4,06
	P4	5,10	6,82	8,2	24,8	270	1,86	1,55	1,86
**MAR/20	P1	7,54	18,9	7,6	18	222	4,12	3,12	7,24
	P2	7,29	13,2	6,9	19,5	244	4,39	2,27	6,66
	P3	6,58	25,7	7,6	-	186	3,30	4,53	7,84
	P4	6,83	12,5	7,0	18	260	4,96	2,32	7,28
**AGO/20	P1	7,45	5,13	9,1	13	-	1,32	1,71	3,03
	P2	7,67	11,8	9,0	14,5	-	1,83	1,65	2,71
	P3	7,32	14,0	8,9	18,8	-	2,34	0,94	3,20
	P4	7,40	3,8	8,4	13	-	1,31	1,30	2,62
***AGO/21	P5	7,86	3,45	8,7	12,9	328	2,966	1,946	4,912
	P6	7,76	10,6	8,5	13,0	306	1,290	4,116	5,421
	P7	7,96	3,34	9,3	15,9	292	1,401	2,905	4,306
	P8	7,85	4,81	10,1	15,0	307	1,738	2,009	3,747

*Valores médios (n=3).**Amostras coletadas na SBHRF.***Amostras coletadas na SBHRQ.

Os 5 primeiros parâmetros apresentados na tabela anterior foram medidos ainda em campo, enquanto os três últimos foram determinados no laboratório utilizando um analisador de carbono orgânico total Shimadzu TOC-L, em alíquotas preservadas pela adição de ácido fosfórico concentrado.

Avaliando a os valores de pH, OD e turbidez obtidos, é possível perceber que as águas analisadas, com relação aos parâmetros citados, apresentam características de águas pertencentes à Classe 1, de acordo com a Resolução CONAMA nº 375 de 2005. As águas pertencentes a esta classe podem ser destinadas à diversas finalidades, como: abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado, proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário e irrigação, por exemplo.

Com relação ao COT, este parâmetro pode ser usado para a quantificação do carbono orgânico presente na água, uma vez que não mede outros elementos ligados à cadeia e não depende do estado de oxidação da matéria orgânica, sendo um forte indicador do grau de poluição dos corpos hídricos.⁸⁹ No Brasil, atualmente, tanto a portaria que legisla sobre a potabilidade da água quanto a resolução de classificação das águas não estabelecem um valor máximo permitido de COT em águas doces.

Com relação à presença de algumas substâncias no meio ambiente, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) prevê, tanto para água quanto para solo e sedimento, valores máximos permitidos (VMP) de diversas substâncias, entre elas, alguns pesticidas organoclorados selecionados para este estudo.

Os VMP das substâncias variam, para água superficial, de acordo com sua classe, uso e tipo (doce, salina e salobra). Nas tabelas 5.9 e 5.10 estão listados os VMP para os pesticidas organoclorados contemplados pelas resoluções para água doce, solo e sedimento. Para as águas doces pertencentes à Classe 2 aplicam-se os mesmos MVP estabelecidos para as águas de Classe 1, por este motivo não foi descrito na tabela a seguir.

TABELA 5.9 - Valores Máximos Permitidos (MVP) para pesticidas organoclorados em água doce, de acordo com as classes.

Analitos	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Classe 1	Classe 3
Aldrin+ Dieldrin	0,005	0,03
DDT (4,4'-DDT +4,4'- DDE+4,4'-DDD)	0,002	1,0
Endosulfan ($\alpha+\beta$ +sulfato)	0,056	0,22
Endrin	0,004	0,2
Heptacloro + Heptacloro epóxido	0,01 0,000039*	0,03
γ -BHC	0,02	2,0
Metoxicloro	0,03	20,0

Fonte: CONAMA 357/05. * Água doce de Classe 1 onde há pesca ou cultivo de organismo para fins de consumo intensivo.

TABELA 5.10 -Valores Máximos Permitidos (MVP) para pesticidas organoclorados em solo e sedimento.

Analitos	VMP	
	Solo* (mg kg^{-1})	Sedimento ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aldrin	0,015	-
Dieldrin	0,043	2,85
DDT	0,010	1,19
DDD	0,013	3,54
DDE	0,021	1,42
Endrin	0,001	2,67
γ -BHC	0,001	0,94
β -BHC	0,011	-

Fonte: CONAMA 420/09; CONAMA 454/12.*

Como pode ser observado, a tolerância com a presença de pesticidas organoclorados tanto em água quanto em solo e sedimento é bastante baixa. Isso pode estar atribuído ao fato de que a exposição recorrente a estes compostos pode causar problemas graves de saúde, como: distúrbios hormonais, obesidade, doenças neurológicas e câncer,³¹ uma vez que eles apresentam, entre outras, a característica de bioacumulação, favorecendo o acúmulo em tecidos de animais e humano. Além disso, alguns destes compostos são chamados de biomagnificados, por aumentarem sua concentração ao longo da cadeia alimentar, como no caso do DDT.

Nas análises feitas visando a determinação dos organoclorados, os resultados obtidos ficaram, para todos os analitos, abaixo dos limites de detecção.

Isso ocorreu em todas as amostras das três diferentes matrizes estudadas, tanto na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão quanto na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo, o que corrobora a hipótese de que não há presença de pesticidas organoclorados nas áreas selecionadas para estudo em nenhuma das duas sub-bacias hidrográficas em concentração detectável e conseqüentemente, não são violados os padrões apresentados nas Tabelas 5.9 e 5.10.

Estes resultados são importantes pois vão de encontro ao que era esperado, uma vez que SBHRF está situada em uma Área de Proteção Ambiental, cuja lei regulamentadora proíbe atividades potencialmente poluidoras, capazes de afetar mananciais de água, o solo e o ar. Adicionalmente, é gerado aqui um importante cenário de referência para a proteção destes mananciais, em planos de gestão que poderão ser empregados para as próximas décadas.

Com relação aos fármacos, nas análises feitas objetivando a determinação destes compostos em águas superficiais foi possível concluir a ocorrência de 8 analitos em pelo menos uma das amostras, como mostrado na Tabela 5.11.

TABELA 5.11- Valores das concentrações de fármacos determinadas nas amostras de água coletadas nas Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão e na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo.

Analito	Concentração (ng L ⁻¹)			
	NOV/2019	MAR/2020	AGO/2020	AGO/2021*
Cafeína	105,2	54,9	52,3	184,4
Atenolol	<LQ	52,8	28,3	17,2
Carbamazepina	n.d	22,8	17,6	36,2
Propranolol	n.d	28,5	63,9	78,4
2-Hidroxicarbamazepina	n.d	<LQ	n.d	n.d
CBZ-DiOH	<LQ	<LQ	<LQ	n.d
Naproxeno	n.d	n.d	n.d	n.d
Ibuprofeno	<LQ	53,9	10,9	<LQ
Diclofenaco	n.d	13,4	42,7	22,0
Estrona	<LQ	n.d	<LQ	n.d
17-β-estradiol	n.d	n.d	n.d	n.d
17-α-etinilestradiol	n.d	n.d	n.d	n.d
Paracetamol	n.d	<LQ	n.d	n.d
2-Hidroxi ibuprofeno	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d= não detectado. *Amostras coletadas na SBHRQ.

Dos 14 analitos selecionados para o estudo, apenas a cafeína foi detectada e quantificada em todas as amostras analisadas, tanto na SBHRH quanto na SBHRQ, apresentando concentrações que variaram de 52,3 ng L⁻¹ em AGO/2020, até 184,4 ng L⁻¹ em AGO/2021.

As concentrações mais elevadas de cafeína, quando comparada com outros analitos, encontradas nas amostras pode estar relacionada ao fato de que este composto não está presente apenas em medicamentos, uma vez que também faz parte da formulação de bebidas e de alimentos (café, refrigerantes, chás, bebidas energéticas, chocolate etc.) muito presentes no cotidiano da população. Como o consumo de cafeína é predominantemente feito por humanos, este composto pode ser usado como um indicador da poluição de origem antrópica.⁹⁰

O ibuprofeno foi detectado e quantificado apenas nas coletas de MAR/2020, AGO/2020. A carbamazepina, o propranolol e o diclofenaco foram detectados e quantificados nas coletas de MAR/2020, AGO/2020 e AGO/2021.

A 2-hidroxicarbamazepina, a CBZ-DiOH, a estrona e o paracetamol foram detectados em amostras de pelo menos uma das coletas realizadas, no entanto, os as concentrações obtidas para estes analitos ficaram abaixo do LQ_m, não sendo possível quantificá-los.

Em relação aos demais analitos (naproxeno, 17- β-estradiol, 17-α-etinilestradiol e 2-Hidroxi ibuprofeno), nenhum deles foi detectado em nenhuma das amostras coletadas.

Atualmente, a legislação brasileira não prevê VMP para nenhum dos fármacos aqui estudados em águas superficiais. Embora a não regulamentação da potabilidade da água em relação à contaminação por fármacos seja uma realidade em muitos países ao redor do mundo, pesquisadores têm alertado sobre a importância do monitoramento destas substâncias no meio ambiente. Assim, em 2018, foi publicado no Diário Oficial da União Europeia o documento : “Decisão De Execução (UE) 2018/840 Da Comissão de 5 de junho de 2018” que estabelece

uma lista de 15 substâncias farmacológicas a serem monitoradas na União Europeia, incluindo o 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol e Estrona.⁹¹

Embora não haja uma regulamentação vigente em relação à contaminação ambiental por fármacos, muitos estudos sobre este tema têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Veras e colaboradores publicaram um estudo em 2018 sobre o monitoramento dos fármacos diclofenaco e paracetamol, no período de julho a dezembro de 2016, em dois pontos do Rio Beberibe, PE - Brasil. As concentrações relatadas variaram de 0,019 mg L⁻¹ até 0,193 mg L⁻¹ para o diclofenaco e de 0,003 mg L⁻¹ até 0,042 mg L⁻¹ para o paracetamol, sendo que este último analito não foi determinado em um dos pontos estudados, localizado em uma área de preservação.⁹²

Em um trabalho publicado em 2020 Pivetta et al. relataram o monitoramento no rio Atibaia de dez psicotrópicos, dos quais seis foram detectados, destacando-se a carbamazepina, pois foi o analito com a maior concentração média (3530 ng L⁻¹) e maior frequência de determinação, estando presente em 57% das amostras analisadas.⁹³

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que os métodos *QuEChERS* e LLE, propostos para análise de pesticidas organoclorados em matrizes ambientais sólidas (solo e sedimento) e em água, respectivamente, são seletivos, lineares, precisos e exatos, para a maioria dos analitos estudados. Além disso, os estes métodos apresentaram limites de detecção e de quantificação capazes de atender à legislação vigente.

Tanto para as amostras sólidas quanto para as amostras de água, foram encontrados valores de efeito matriz significativos, solucionados pelo uso do método de adição padrão para a construção da curva analítica.

O método aplicado para a determinação de fármacos em água, SPE, também se mostrou bastante adequado, uma vez que apresenta baixos valores de limite de detecção, de limite de quantificação e de coeficiente de variação, com linearidade adequada e valores de recuperação superiores à 71%.

Em relação à ocorrência dos analitos nas áreas estudadas, não foram encontrados indícios da presença de pesticidas organoclorados nem nas amostras coletadas na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão nem nas coletadas na Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Quilombo. No entanto, em ambas as áreas foram detectadas a presença alguns dos fármacos estudados, ainda que em concentrações relativamente baixas para a maioria dos analitos.

A cafeína esteve presente em todas as amostras analisadas, com concentrações variando de 52,3 ng L⁻¹ até 184,4 ng L⁻¹. Os analitos atenolol, carbamazepina, propranolol, diclofenaco e ibuprofeno foram quantificadas em, pelo menos, duas das amostras analisadas, com concentrações variando de 10,9 ng L⁻¹ até 78,4 ng L⁻¹, enquanto a CBZ-DiOH, a estrona, a 2-Hidroxicarbamazepina e o paracetamol foram detectados em pelo menos uma das amostras, mas com concentrações abaixo dos valores de LQ_m. Em relação aos demais fármacos estudados, estes não foram detectados em nenhuma das amostras.

Comparando dados apresentados neste trabalho com os obtidos em estudos de outros corpos hídricos da região como, por exemplo, os Rios Monjolinho³⁹ e Jundiaí³⁸, o Ribeirão Feijão e o Córrego Engenho Velho estão preservados. No entanto, frente à grande capacidade de detecção de espécies químicas propiciadas pela técnica de UPLC-MS/MS empregada, foi possível quantificar valores de concentrações de fármacos, indicando a presença de moléculas sintéticas nos pontos estudados. Tais valores podem ser considerados como concentrações sentinelas para os trabalhos de monitoramento destas áreas, com o objetivo de prevenir degradações ambientais destes corpos hídricos,

assegurando, assim, a continuidade da disponibilidade de água de boa qualidade na região, bem como a preservação da vida aquática.

7 REFERÊNCIAS

- ¹ MISHRA, V. K.; SINGH, G.; SHUKLA, R. Impact of xenobiotics under a changing climate scenario. In: (Ed.). **Climate Change and Agricultural Ecosystems**: Elsevier, 2019. cap. 6, p.133-151.
- ² VAFEIADI, M. et al. Persistent organic pollutants in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. **Environment international**, v. 98, p. 89-95, 2017. ISSN 0160-4120.
- ³ ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. Annablume, 2002.
- ⁴ BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Sect. 1, 329 Sep 3, 1985. Proíbe, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária dentre outros. 1985. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mapa_gm/1985/prt0329_02_09_1985.html
>.

- 5 GILLARD, N. et al. Detection of pharmaceutical products in untreated hospital wastewater. **Quality Assurance Safety of Crops Foods**, v. 6, n. 4, p. 459-468, 2014. ISSN 1757-837X.
- 6 PETERSEN, K.; HEIAAS, H. H.; TOLLEFSEN, K. E. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. **Aquatic toxicology**, v. 150, p. 45-54, 2014. ISSN 0166-445X.
- 7 DEBLONDE, T.; HARTEMANN, P. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals. **Public health**, v. 127, n. 4, p. 312-317, 2013. ISSN 0033-3506.
- 8 COSTA, C. W.; DUPAS, F. A.; PONS, N. A. D. Regulamentos de uso do solo e impactos ambientais: avaliação crítica do plano diretor participativo do município de São Carlos, SP. **Geociências**, v. 31, n. 2, p. 143-157, 2012.
- 9 MACHADO, F. H.; DUPAS, F. A. Valoração de recursos hídricos como subsídio na gestão do manancial urbano do Ribeirão do Feijão, São Carlos-SP. **GEOUSP: Espaço e Tempo**, n. 33, p. 111-126, 2013. ISSN 2179-0892.
- 10 CERMINARO, A.; OLIVEIRA, D. D. Relações Solo-Relevo Através da Compartimentação Geomorfológica da Bacia Hidrográfica do Ribeirão Feijão, nos Municípios de São Carlos, Analândia e Itirapina no Estado de São Paulo-BR: Ordenações de Unidades para Uso e Ocupação Adequados. **Rev. Bras. de Geog. Física**, v. 8, n. 2, p. 352-364, 2015.
- 11 COSTA, C. W. **Mapeamentos geoambientais, em escala 1: 50.000, aplicados em análises de planejamento territorial de manancial periurbano: bacia do Ribeirão do Feijão, São Carlos, SP**. 2017. 182. Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal de São Carlos.
- 12 OLIVEIRA, J. A. **Análise da perda de solo na Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Feijão, São Carlos (SP)**. 2011. Dissertação de Mestrado em Engenharia da Energia. Núcleo de Estudos Ambientais, Planejamento Territorial e Geomática -NEPA, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá-MG.
- 13 COSTA, C. W. et al. Monitoramento da expansão urbana, cenários futuros de crescimento populacional e o consumo de recursos hídricos no município de São Carlos, SP. **Geosciences= Geociências**, v. 32, n. 1, p. 63-80, 2013. ISSN 1980-900X.
- 14 SCARPINELLA, G. D. A. **Erosão em carregadores da cultura da cana-de-açúcar: estudo de caso na bacia do Ribeirão do Feijão (SP)**. 2012. 209 p. Tese (doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos., Universidade de São Paulo. 209
- 15 FREITAS, D.; SANTOS, S. A. M. D. **Atlas Histórico e Socioambiental das Regiões Hidrográficas de São Carlos-SP** São Carlos-SP: Diagrama Editorial, 2020.
- 16 ASCIUTTI, G. A. M. **Mapeamento da fragilidade ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio do Quilombo-São Carlos/SP**. 2019. 104 Dissertação, Universidade Federal de São Carlos São Carlos-SP.

- 17 SÃO CARLOS/FUSP. **Revisão do Plano Diretor do Município de São Carlos. Produto 4. Propostas para a revisão do Plano Diretor do Município de São Carlos. Contrato nº40/11.** São Carlos 2011.
- 18 SÃO CARLOS. **Lei Municipal nº13.691, de 25 de novembro de 2005. Plano Diretor do Município de São Carlos.** São Carlos, SP: 73 p. 2005.
- 19 _____. **Lei Municipal nº18.053, de 19 de dezembro de 2016. Plano Diretor do Município de São Carlos.** São Carlos, SP: Diário Oficial do Município de São Carlos: 32 p. 2016.
- 20 BARONAS, R. L. Agrotóxico versus pesticida: notas de leitura sobre polêmica e amemória discursiva. **Bakhtiniana: Revista de Estudos do Discurso**, v. 14, n. 2, p. 62-87, 2019. ISSN 2176-4573.
- 21 MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS.** 2010. Dissertação de Mestrado Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria
- 22 BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989., 2002. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm >.
- 23 YADAV, I. C.; DEVI, N. L. Pesticides classification and its impact on human and environment. **Environmental science engineering**, v. 6, p. 140-158, 2017.
- 24 WHO. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019.** World Health Organization, 2019. ISBN 9240005668.
- 25 BRASIL. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos.** ANVISA 2019.
- 26 VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. **Current Opinion in Environmental Science Health**, v. 4, p. 5-9, 2018. ISSN 2468-5844.
- 27 DE OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: (Ed.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninha.** Curitiba: Omnixpax 2011. cap. 11, p.263-304.
- 28 ECETOC. **Environmental Exposure Assessment of Ionizable Organic Compounds:** European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals Brussels, Belgium 2013.
- 29 BAIRD, C.; CANN, M. Pesticidas. In: (Ed.). **Química ambiental.** 4ªed: Bookman, 2011. cap. 10,

- 30 WAGENET, R.; RAO, P. Modeling pesticide fate in soils. In: (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts modeling**. Madison, Wisconsin, USA v.2, 1990. cap. 10, p.351-399.
- 31 ALHARBI, O. M.; KHATTAB, R. A.; ALI, I. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, p. 442-453, 2018. ISSN 0167-7322.
- 32 US FOOD DRUG ADMINISTRATION. Drugs@ FDA glossary of terms. 2017. Disponível em: < <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-glossary-terms#D> >.
- 33 LI, Y. et al. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 908-932, 2014. ISSN 0048-9697.
- 34 KNOPP, G. et al. Elimination of micropollutants and transformation products from a wastewater treatment plant effluent through pilot scale ozonation followed by various activated carbon and biological filters. **Water research**, v. 100, p. 580-592, 2016. ISSN 0043-1354.
- 35 BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **TrAC. Trends in analytical chemistry**, v. 22, n. 10, 2003. ISSN 0165-9936.
- 36 RANG, H. P.; STRINGER, J. L. Drugs. **Encyclopedia Britannica**, 2019. Disponível em: < <https://www.britannica.com/science/drug-chemical-agent> >.
- 37 INTERFARMA. **Guia 2019: Dados do setor**. 2019. Disponível em: < <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/guia-interfarma-2019-interfarma2.pdf> >.
- 38 DE SOUSA, D. N. R. et al. Electrical conductivity and emerging contaminant as markers of surface freshwater contamination by wastewater. **Journal Science of the total environment**, v. 484, p. 19-26, 2014. ISSN 0048-9697.
- 39 CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science**, v. 22, n. 10, p. 7936-7947, 2015. ISSN 0944-1344.
- 40 JÚNIOR, D. S. et al. Tratamentos preliminares. In: KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2º ed. São Paulo: EditSBQ 2019. cap. 4, p.89-122.
- 41 EDITORS, L. Overview of sample preparation **LC GC North America**, v. 33, n. 11, p. 46-51, 2015. Disponível em: < <http://www.chromatographyonline.com/print/304554?page=full%20%3E> >.
- 42 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 international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

- 43 PERESTRELO, R. et al. QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica chimica acta**, 2019. ISSN 0003-2670.
- 44 MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004. ISSN 0021-9673.
- 45 PIHLSTRÖM, T. et al. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Analytical bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1773-1789, 2007. ISSN 1618-2642.
- 46 ALCÁNTARA-DURÁN, J. et al. Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 279, p. 144-149, 2019. ISSN 0308-8146.
- 47 ARISEKAR, U. et al. Accumulation of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in fish, water, and sediments in the Thamirabarani river system of southern peninsular India. **Environmental Nanotechnology, Monitoring Management**, v. 11, p. 100194, 2019. ISSN 2215-1532.
- 48 MONDAL, R. et al. GC-MS/MS determination and ecological risk assessment of pesticides in aquatic system: A case study in Hooghly River basin in West Bengal, India. **Chemosphere**, v. 206, p. 217-230, 2018. ISSN 0045-6535.
- 49 GAO, L. et al. Determination of novel brominated flame retardants and polybrominated diphenyl ethers in serum using gas chromatography–mass spectrometry with two simplified sample preparation procedures. **Analytical bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7835-7844, 2016. ISSN 1618-2642.
- 50 HRYNKO, I.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Liquid chromatographic MS/MS analysis of a large group of insecticides in honey by modified QuEChERS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 2307-2319, 2018. ISSN 1936-976X.
- 51 BARTH, T. et al. Técnicas Clássicas ou Convencionais. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. D., et al (Ed.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. Rio de Janeiro: LTC, v.1, 2015. cap. 5, p.29-39. ISBN 9788521626947.
- 52 NARENDERAN, S.; MEYYANATHAN, S.; BABU, B. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. **Food Research International**, v. 133, p. 109141, 2020. ISSN 0963-9969.
- 53 JIN, B. et al. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. **Food research international**, v. 46, n. 1, p. 399-409, 2012. ISSN 0963-9969.
- 54 DEAN, J. R. Classical Approaches for Aqueous Extraction. In: (Ed.). **Analytical Techniques in the Sciences**: West Sussex: John Wiley & Sons, 2009. cap. 2, p.39-47.

- 55 MAJORS, R. Sample Preparation. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J., *et al* (Ed.). **Introduction to modern liquid chromatography**: John Wiley & Sons, 2009. cap. 16, p.757-808. ISBN 1118210395.
- 56 QUEIROZ, S. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001. ISSN 0100-4042.
- 57 DE PINHO, G. P. et al. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food control**, v. 21, n. 10, p. 1307-1311, 2010. ISSN 0956-7135.
- 58 SILVÉRIO, F. O. et al. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012. ISSN 0100-4042.
- 59 BORGES, K. B. et al. LC–MS–MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 2, p. 915-925, 2011. ISSN 1618-2642.
- 60 PANSERI, S. et al. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. **Food Control**, v. 38, p. 150-156, 2014. ISSN 0956-7135.
- 61 WOŹNIAK, M. K. et al. Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. **Forensic Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 42-58, 2020. ISSN 1860-8973.
- 62 MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Solid-Phase Extraction. In: (Ed.). **Modern sample preparation for chromatography**: Amsterdam: Elsevier, 2015. cap. 7,
- 63 JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. D., *et al* (Ed.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, v.1, 2015. cap. 8, p.62-79. ISBN 9788521626947.
- 64 BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, present, and future of solid phase extraction: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198-213, 2012. ISSN 1040-8347.
- 65 MAVUMENGWANA-KHANYILE, B. et al. Recent advances in sorbents applications and techniques used for solid-phase extraction of atrazine and its metabolites deisopropylatrazine and deethylatrazine: a review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 11, p. 1017-1068, 2019. ISSN 0306-7319.

- 66 ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641-654, 2016. ISSN 0165-9936.
- 67 LY, T.-K. et al. Determination of 400 pesticide residues in green tea leaves by UPLC-MS/MS and GC-MS/MS combined with QuEChERS extraction and mixed-mode SPE clean-up method. **Food chemistry**, v. 326, p. 126928, 2020. ISSN 0308-8146.
- 68 WINBORN, J.; KERRIGAN, S. Quantitative analysis of desomorphine in blood and urine using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1106, p. 43-49, 2019. ISSN 1570-0232.
- 69 GOLOVKO, O. et al. Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 1066-1073, 2017. ISSN 0048-9697.
- 70 DE TOFFOLI, A. L. et al. Development, validation, and application of a method for the GC-MS analysis of fipronil and three of its degradation products in samples of water, soil, and sediment. **Journal of Environmental Science Health, Part B**, v. 50, n. 11, p. 753-759, 2015. ISSN 0360-1234.
- 71 PENG, Y.; GAUTAM, L.; HALL, S. W. The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 223, p. 438-447, 2019. ISSN 0045-6535.
- 72 HIBBERT, D. B. Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations 2016). **Pure Applied Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 407-443, 2016. ISSN 0033-4545.
- 73 BIPM et al. **The international vocabulary of metrology—basic and general concepts and associated terms (VIM)**. 3°. Sèvres: JCGM, 2012.
- 74 HIBBERT, D. B.; KORTE, E.-H.; ÖRNEMARK, U. Metrological and Quality Concepts in Analytical Chemistry (IUPAC Provisional Recommendations 2020). **Pure and Applied Chemistry**, 2020. Disponível em: < https://iupac.org/wp-content/uploads/2020/08/PAC-REC-2019-0819.R2_PR20200807.pdf >.
- 75 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Cengage learning, 2017. ISBN 1337468037.
- 76 BARWICK, V. Eurachem/CITAC Guide: Guide to quality in analytical chemistry: An aid to accreditation. **Retrieved Feb**, v. 19, p. 2018, 2016. ISSN 0948926325.
- 77 BORMAN, P.; ELDER, D. Q2 (R1) validation of analytical procedures. **ICH Quality guidelines**, p. 127-166, 2017.
- 78 BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA -RDC Nº 166, DE 24 DE JULHODE 2017**. ANVISA 2017.

- 79 _____ **DOQ-CGCRE-008 -Revisão 09. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.** INMETRO. Rio de Janeiro 2020.
- 80 MAGNUSSON, B. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics (2014):** Eurachem 2014.
- 81 NATA. General Accreditation Guidance-Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. 2018.
- 82 IUPAC. Compendium of chemical terminology- Gold Book. **International Union of Pure Applied Chemistry**, v. 528, 2014.
- 83 PINHO, G. P. et al. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009. ISSN 0100-4042.
- 84 WU, X. et al. Residue analysis and persistence evaluation of fipronil and its metabolites in cotton using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173690, 2017.
- 85 AOAC, O. M. O. A. **Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements** 2016.
- 86 USP. <1225> Validation in compendial procedures. USP 39., p. 1640-1645, 2016.
- 87 VIENO, N. M.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 101-111, 2006.
- 88 TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 480-490, 2004.
- 89 CETESB. **Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo| Apêndice E- Significado Ambiental e Sanitário das Variáveis de Qualidade.** São Paulo 2019.
- 90 EBRAHIMZADEH, G. et al. Monitoring of caffeine concentration in infused tea, human urine, domestic wastewater and different water resources in southeast of Iran-caffeine an alternative indicator for contamination of human origin. **Journal of Environmental Management**, v. 283, p. 111971, 2021. ISSN 0301-4797.
- 91 COMISSÃO EUROPEIA. Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão, de 5 de junho de 2018, que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, e que revoga a Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão [notificada com o número C (2018) 3362]. **Jornal Oficial da União Europeia L**, v. 141, p. 9-12, 2018.
- 92 VERAS, T. B. et al. Analysis of the presence of anti-inflammatory drugs in surface water: A case study in Beberibe river-PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, p. 961-969, 2019. ISSN 0045-6535.

- ⁹³ PIVETTA, R. C. et al. Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 727, p. 138661, 2020. ISSN 0048-9697.