

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE QUÍMICA

André Bortolucci Saggioro

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
TEBUTIURÔM, DIURÔM E SEUS PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO EM ÁGUA SUPERFICIAL.**

**Araraquara
2012**

André Bortolucci Saggioro

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE
TEBUTIUROM, DIUROM E SEUS PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO EM ÁGUA SUPERFICIAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara

2012

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, irmãos, tios e amigos, que com amor e carinho não mediram esforços para que eu completasse essa etapa de minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, que me amou por primeiro e com muita paciência me conduziu no bom caminho;

Aos meus avós, Osvaldo e Neuza pela sabedoria e apoio, mas especialmente aos meus queridos Zequinha e Pina (*IN MEMORIAM*), que me ensinaram o que é saudades;

Aos meus queridos pais, Benê e Sueli, que me inspiraram e foram o meu porto seguro em todos os momentos de minha vida;

Aos meus irmãos, Lucas e Ana Clara, que sempre estiveram do meu lado;

Aos meus tios, tias, primos e primas, que me acompanharam nessa caminhada, mas especialmente minha tia Angela que, como minha segunda mãe, esteve presente nos momentos mais importantes de minha vida;

Aos meus amigos de colégio e da São Judas, que me acompanharam nesses anos todos e que hoje posso chamar de irmãos: Matheus Flores, Denis Lazarim, Mateus Borgo, Emerson, os demais acólitos, Renan Quevedo, Fernanda, Amália, Larissa, Bianca, Farah, Luiz, Carlos;

À minha orientadora, Mary Rosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional;

Ao GRESCO e demais colegas de laboratório, especialmente à Stephane, pela ajuda e esclarecimentos nos trabalhos;

Ao PIBIC e FACTER, pelo apoio financeiro;

À todos os meus amigos de Araraquara, especialmente ao Ovídio, Tatu, Carla♂, Hiro, Curió, Natielly, Marcela e Carol, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos de vida com os quais me tornei mais confiante, vão deixar saudades;

Aos meus professores e colegas do IQ e da Fundação, pelo conhecimento que me passaram;

À todos que de uma forma ou outra fizeram parte de minha vida e, muito sinceramente, me desculpo por não ter mencionado.

Resumo

Em 2001, estimava-se que o uso de pesticida em todo mundo ultrapassava os 2,27 bilhões de quilogramas, dos quais mais de 35% eram herbicidas. O Brasil é considerado um dos líderes na produção da cana-de-açúcar e principalmente do etanol como combustível. A monocultura da cana-de-açúcar exige o uso de uma série de pesticidas, dentre estes, os herbicidas diurom e tebutiurum. Os produtos de degradação mais estudados (DCA e DCPU) são os provenientes do diurom, principalmente pelas características toxicológicas deste herbicida que é apontado como carcinogênico e suspeito de atuar como alterador endócrino em mamíferos. Após a otimização da separação cromatográfica utilizando HPLC-UV, construiu-se a curva analítica em solvente e posteriormente na matriz (água superficial). O método de extração incluiu o uso de SPE (extração em fase sólida) (Strata-X, 200mg / 6 mL), aplicação de 1 L de amostra e eluição com 5 mL de acetonitrila/metanol (50:50, v/v). A análise por HPLC/UV foi efetuada em modo gradiente, acetonitrila/água (70/30-74/26 até 1 min, 74/26 - 78/22 até 3,2 min, voltando a condição inicial e nesta permanecendo até 10 min), coluna C18 (Phenomenex, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de 5µm) e detecção a 254 nm. Realizou-se os testes F e t para verificar a presença de efeito matriz. Houve efeito matriz para todos os analitos, variando entre -33% (DCA) e 38% (tebutiurum). Desta maneira o método foi otimizado e validado para análise de diurom, tebutiurum, DCA e DCPU em água superficial, utilizando HPLC/UV. Os dados obtidos indicam que para garantir a confiabilidade analítica desejada há necessidade de utilizar a curva analítica construída na matriz para a quantificação destes analitos em água.

Palavras-chave: Tebutiurum. Diurom. Metabólitos. HPLC/UV. SPE.

Abstract

In 2001, it was estimated that pesticide used worldwide exceeded 2.27 billion kilograms, over 35%, of which, were herbicides. Brazil is considered one of the leaders in the production of sugarcane and mainly ethanol as fuel. The monoculture of sugarcane requires the usage of a range of pesticides, among these, the herbicides diuron and tebuthiuron. The degradation products most studied (DCA and DCPU) are diuron's, especially for toxicological characteristics of this herbicide that is identified as carcinogen and suspected to be endocrine disruptor in mammals. After optimization of the chromatographic separation using HPLC-UV, the analytical curve was constructed in solvent and subsequently in the matrix (surface water). The extraction method contains the usage of SPE (solid phase extraction) (Strata-X, 200 mg/6 mL), applying 1L of sample and elution with 5 mL of acetonitrile / methanol (50:50, v/v). Analysis by HPLC/UV was performed in gradient mode, acetonitrile/water (70/30-74/26 by 1 min, 74/26 - 78/22 till 3.2 min, returning to initial conditions and remaining this way until 10 min), C18 column (Phenomenex, 4.6 mm diameter, 250 mm long and 5 μ m particle size) and detection at 254 nm. Tests F and t were performed to verify the presence of the matrix effect. There was matrix effect to all analytes, ranging from -33% (DCA) and 38% (tebuthiuron). Thereby the method was optimized and validated for analysis of diuron, tebuthiuron, and DCPU DCA in surface water using HPLC/UV. The data obtained show that in order to assure the analytical reliability desired the use of the analytical curves in the matrix for the quantification of these analytes in water is required.

Keywords: Tebuthiuron. Diuron. Metabolites. HPLC/UV. SPE.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	História dos pesticidas	7
1.2	Propriedades e efeitos do tebutiuram, diuram e seus produtos de degradação	9
1.3	Alguns métodos analíticos dos pesticidas de interesse e seus produtos de degradação	12
1.4	Validação Analítica	13
2	OBJETIVO	19
3	MATERIAIS E REAGENTES	20
4	PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1	Otimização da separação e resposta do sistema HPLC-UV	21
4.2	Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV	21
4.3	Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico	22
4.4	Estudo da recuperação em cartuchos SPE	22
4.5	Construção das curvas de linearidade e analíticas em amostra de água de rio. Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico.	23
4.6	Aplicação do método em amostras de água superficial enriquecida com os analitos - Validação.	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV	25
5.2	Otimização da separação e resposta do sistema HPLC-UV	26
5.3	Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico	30
5.4	Estudo da recuperação em cartuchos SPE	34
5.5	Construção das curvas de linearidade e analíticas em amostra de água de rio. Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico.	38
5.6	Aplicação do método em amostras de água superficial enriquecida com os analitos - Validação.	43
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 História dos pesticidas

O meio mais adotado para controle de pragas no mundo é o uso de pesticidas e, no Brasil, um dos maiores produtores de alimentos do mundo, 90% dos agricultores dependem do uso dos pesticidas, com mais de 673 milhões de toneladas de pesticidas aplicados em 2008 (JARDIM; CALDAS, 2012). O uso de pesticidas na agricultura é de suma importância para o aumento da qualidade e quantidade dos produtos. De fato, é utilizado desde os primórdios da agricultura. Já os gregos, chineses e romanos, a três mil anos atrás, conheciam as propriedades do pó de enxofre no combate à insetos e da capacidade do sal em matar ervas daninhas. Há ainda registros do uso de água com sabão, extratos de pimenta, cal entre outros, com resultados questionáveis. A descoberta do “Verde de Paris” (acetoarsenito de cobre) para combater o escaravelho da batata no século XIX é o primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos (SANTOS, 2008; BAIRD, 2002).

Ainda no início da Segunda Guerra Mundial, a seleção de inseticidas limitava-se diversos compostos com arsênico e produtos de origem natural. Foi, na verdade, o esforço da guerra que introduziu o conceito de controle químico das pestes, com o reconhecimento das propriedades inseticidas dos hidrocarbonetos clorados, dos quais o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) é o mais conhecido. O DDT foi sintetizado em 1874 pelo químico alemão Zeidler onde permaneceu em um frasco por 65 anos. Somente em 1939 suas propriedades inseticidas foram descobertas, por Paul Müller, devido o DDT possuir alta estabilidade, as suas propriedades ainda estavam ativas (BORGES, 2011; BAIRD, 2002).

Hoje banido devido à seus devastadores efeitos ambientais, o DDT salvou milhões de italianos da febre tifóide, também sendo o responsável pela erradicação da malária na Europa e América do Norte. Tal fato rendeu ao químico suíço Paul Herman Müller o Prêmio Nobel de Medicina em 1948 (BORGES, 2011; BAIRD, 2002).

As descobertas das propriedades inseticidas do DDT influenciaram novas pesquisas, realizadas a partir de 1940. Depois disso, surgiram novos pesticidas clorados, tais como metoxiclor, HCH (hexaclociclohexanos) e ciclodienos clorados.

Já ao final de década de 1940 os organoclorados já se apresentavam obsoletos, pois já existiam insetos resistentes a eles (FRANCO, 2009).

Com o intuito de produzir armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial, foram descobertas duas grandes classes de inseticidas: os carbamatos e os organofosfatos. Os organofosfatos ou “gás dos nervos” apresentaram efeitos devastadores nas tropas e foi uma das mais poderosas armas químicas da época. Foi a introdução maciça desses organofosfatos e carbamatos no mercado que levaram aos primeiros sinais de preocupação com relação à toxicidade desses pesticidas (SANTOS, 2008).

Foi na década de 1960 que começaram a ocorrer movimentos ambientalistas, os quais denunciaram os problemas relativos às resistências adquiridas por algumas espécies de insetos e os efeitos da bioacumulação dos pesticidas. Mesmo assim, na mesma década, o setor industrial ampliou e consolidou o número de inovações no segmento dos fungicidas, os quais também apresentaram problemas de resistência nos organismos. Lançaram os inseticidas “piretróides” sintéticos, menos tóxicos e mais eficientes. Os herbicidas intensificaram-se em termos de inovação com o lançamento dos herbicidas pós-emergentes, que interferem na ação fotossintética das ervas daninhas (FRANCO, 2009; PIMENTEL et al., 2006)

Foi, de fato, no final do século XX que se concentraram esforços para o desenvolvimento de novos pesticidas, menos agressivos para o homem e o meio ambiente. Novas áreas são exploradas intensamente para atingir esta meta, entre elas o controle biológico, a genética e a própria produção de plantas (SANTOS, 2008).

Alguns desses pesticidas podem ser aplicados diretamente na água doce para controlar organismos indesejáveis, no entanto a maioria acaba entrando em contato com águas superficiais indiretamente através de deslizamentos de terra, pulverizações, lixiviações, etc (VERCRAENE-EAIRMAL et al., 2010).

Segundo o levantamento efetuado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 no Brasil está estimada em 8.527,8 mil hectares, o que representa um aumento de 2,1% ou 171,7 mil hectares em relação a safra passada. (COMPANHIA..., 2012).

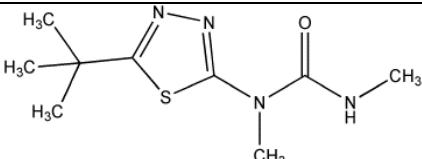
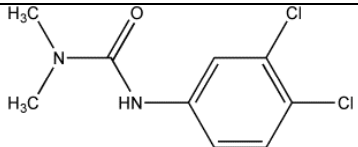
1.2 Propriedades e efeitos do tebutiurum, diurom e seus produtos de degradação

O diurom (N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetiluréia) é um herbicida utilizado no controle de ervas daninhas e musgos, sendo relativamente persistente no solo, água e água subterrânea (FERNANDES et al., 2012). O tebutiurum (N-[5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-tiadiazol-2-yl]-N,N-dimetilurea) e o diurom são alguns dos pesticidas mais utilizados na monocultura da cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2008).

Ambos atuam inibindo a fotossíntese, interrompendo o transporte de elétrons e, conseqüentemente, impedindo a fixação do gás carbônico, limitando a produção de adenosina trifosfato (ATP) (BACIGALUPO; MERONI; MERONI, 2007; VAN DAM et al., 2004).

A tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas do diurom e tebutiurum.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do diurom e tebutiurum

Nome	Estrutura	Propriedades
Tebutiurum	 CAS 34014-181	$\frac{1}{2}$ vida no solo = 360 dias Log Koc = 1,90 Kd = 0,2-10 Solubilidade* = 2.500 mg/mL
Diurom	 CAS 330-54-1	$\frac{1}{2}$ vida no solo = 1 a 12 meses Log Koc = 2,77 Kd = não definido Solubilidade* = 42 mg/mL

*água, 25 °C

Fonte: Adaptado de (EXTENTION..., 2011).

Considerando as informações dispostas na tabela 1, ambos os pesticidas têm alto potencial de lixiviação, além do que o tebutiurum também pode ser considerado persistente. Os produtos de degradação ambiental do diurom e do tebutiurum são igualmente polares e, portanto solúveis em água.

O intervalo de degradação de meia-vida do tebutiurum foi reportado como de 1 a 7 anos (VAN DAM et al., 2004). Para o diurom, existem evidências de que este

possua relativa persistência em solo (BACIGALUPO; MERONI; MERONI, 2007; FERNANDES et al., 2012) água e água subterrânea (FERNANDES et al., 2012).

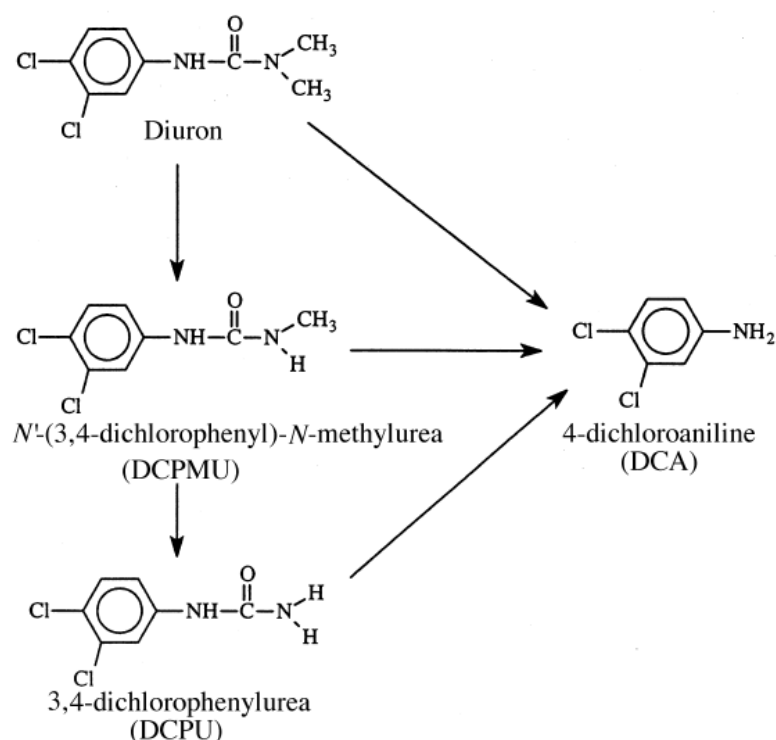
A fotólise é uma forma de degradação do tebutiurum (VAN DAM et al., 2004) e também do diurum, sendo que este último se degrada também por hidrólise quando em água (BACIGALUPO; MERONI, 2007). Na água, estudos mostram que o tebutiurum degradou-se após 15 dias de contínua exposição à luz de uma lâmpada ultravioleta. Os metabólitos da degradação do tebutiurum, aparentemente, possuem uma fraca atividade herbicida, ou ainda não apresentam tal atividade. (VAN DAM et al., 2004).

Os valores de Koc médio do tebutiurum estão entre 39 e 22 L/kg (DORNELAS DE SOUZA et al., 2001), o que indica que este herbicida possui um alto potencial de lixiviação, devido ao seu baixo Koc (CERDEIRA et al., 2007), o que ocorre também com o diurum, que é altamente propenso à lixiviação, já que a literatura apresenta trabalhos da presença desse herbicida em águas subterrâneas (RIBEIRO et al., 2007).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) identificou oficialmente o diurum como causa de toxicidade no desenvolvimento e/ou reprodução (FERNANDES et al., 2012), sendo classificado como o terceiro mais perigoso pesticida para fontes de águas subterrâneas, com um limite em água potável de 10 µg/L (FIELD et al., 1997).

A figura 1 apresenta os principais produtos de degradação do diurum, sendo a DCA (3,4-dichloroaniline) considerada o metabólito mais presente e de mais alta toxicidade (FERNANDES et al., 2012).

Figura 1 - Processo de degradação do diurom



Fonte: (SCRIBNER; THURMAN; ZIMMERMAN, 2000, p. 165).

Embora as propriedades de alteração endócrina desses compostos sejam ambíguas, o diurom encontra-se na lista dos principais alteradores endócrinos da União Européia (MARAGOU; THOMAIDIS; KOUPPARIS, 2011). Além disso, estudos da atividade androgênica e anti-androgênica de vários herbicidas da classe das fenilureias mostram que o diurom, a DCA e o DCPU são capazes de interagir com o receptor andrógeno (MARAGOU; THOMAIDIS; KOUPPARIS, 2011; FERNANDES et al., 2012).

Alguns dados informam que o tebutiurrom tem, geralmente, baixa toxicidade em peixes, anfíbios e invertebrados de climas temperados, com toxicidade aguda no intervalo de 112 - 300 mg/L e toxicidade crônica com intervalo de níveis NOEL (*no observed effects levels*) de, aproximadamente, 10 e 30mg/L (VAN DAM et al., 2004).

Outros estudos da toxicidade do tebutiurrom na água indicam que 7 dias de exposição de culturas de microalgas com aproximadamente 6 mg/L de tebutiurrom resultaram na inibição de mais de 50% na absorção de ¹⁴C em 9 das 10 espécies avaliadas, ou seja, essas espécies tiveram sua fotossíntese inibida em mais de 50% (VAN DAM et al., 2004).

1.3 Alguns métodos analíticos dos pesticidas de interesse e seus produtos de degradação

Os vários métodos de análises desses pesticidas têm como foco o diurom e seus metabólitos devido a sua capacidade de alteração endócrina. Como o diurom não é volátil, a análise por cromatografia gasosa requer que este seja derivado por acilação, metilação, hidrólise à sua correspondente anilina ou por pirólise. Já a análise por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), devidos as condições de baixa temperatura, minimiza a decomposição térmica do diurom e seus metabólitos e, portanto, preserva a forma como o diurom se encontra em amostras ambientais (FIELD et al., 1997).

A tabela 2 apresenta alguns dos métodos de análise para esses pesticidas:

Tabela 2 - Métodos de análise de pesticidas em algumas matrizes

Referência	Analito	Amostra	Método analítico
FIELD et al., 1997	Diurom, DCA, DCPMU e DCPU	Água do lençol freático e água superficial	SPE-HPLC-UV
KOLPIN; BARBASH; GILLIOM, 1998	Tebutiurum e outros 45 pesticidas	água do lençol freático	SPE-GC-MS
GATIDOU et al., 2005	Diurom e seus metabólitos	Água do mar	SPE-HPLC-DAD
LANDRY; DOUSSET; ANDREUX, 2006	oryzalin, diurom, DCPMU, DCPU e DCA	Lixiviado de solo agrícola	SPE e HPLC-UV/DAD
LOURENCETTI; MARCHI; RIBEIRO, 2008	Diurom, Hexazonona e tebutiurum	Solo/solo tratado com vinhaça de cana-de-açúcar	SPE e HPLC-UV
MOU; CHEN; ZHI, 2008	Diurom, Tebutiurum e outros 13 herbicidas	Grãos de arroz e milho	SPE e HPLC-fluorescência e UV
TOFOLI et al., 2009	Tebutiurum	Palha da Cana-de-açúcar	HPLC-UV/vis, coluna C18
ZAPPAROLI et al., 2010	Tebutiurum	Solo	HPLC
SACK et al., 2011	Diurom, tebutiurum e outros 171 pesticidas	Laranja, cenoura e espinafre	QuEChERS e LC-MS/MS
ZHANG et al., 2011	209 pesticidas, dentre eles o diurom	24 commodities agrícolas	QuEChERS e LC-MS/MS
WANG; XIAO; CHENG, 2011	isoproturon, linuron e diurom	vegetais verdes e arroz	MSPD-CE-ECL
LISSALDE et al., 2011	Diurom, DCPU, DCPMU e outras 30 moléculas	Água natural	SPE e POCIS, LC-ESI-MS/MS
MARAGOU; THOMADIS; KOUPPARIS, 2011	Irgarol 1051, Diurom e seus produtos de degradação	Água marinha, de torneira, sedimento marinho e mexilhões	LC-ESI-MS/MS e LC-APCI-MS/MS
JARDIM; CALDAS, 2012	Tebutiurum, diurom e outros pesticidas	22 frutas, vegetais, arroz e feijão	GC-FPD, GC-ECD, CG-NPD, GC-MS/MS ou LC-MS/MS

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se notar que existe uma grande quantidade de trabalhos envolvendo o diurom e seus metabólitos, principalmente pelos indícios de atividades de alteração endócrina apresentadas por eles. No entanto, os trabalhos com tebutiurom são mais escassos e antigos do que os trabalhos envolvendo diurom. A maioria dos trabalhos envolve análise por LC-UV, e LC-MS/MS.

1.4 Validação Analítica

A validação busca garantir, por meio de estudos experimentais, que o método analítico atenda as exigências de aplicação e apresente resultados confiáveis (RIBANI et al., 2004; BERNARDES; SOUZA, 2011), de modo que a qualidade dos resultados obtidos está diretamente ligado ao processo de validação (RIBANI et al., 2004).

Procedimentos de validação inadequados podem gerar avaliações equivocadas sobre o uso de um método, com impacto negativo na confiabilidade dos resultados, que podem levar a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI et al., 2004; BERNARDES; SOUZA, 2011),

A validação deve ser, antes de tudo, representativa, ou seja, deve estabelecer um quadro realista, de modo que a faixa de concentração e os tipos de amostra sejam adequados (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos (ou figuras de mérito) devem basear-se na intenção do uso do método, de modo que os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. Por exemplo, um método para um composto majoritário requer critérios e abordagens de avaliação diferentes de um método para análise de traços (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros avaliados com mais frequência em processos de validação analítica incluem os limites de detecção e quantificação, a seletividade, a linearidade ou faixa de trabalho, a precisão e a exatidão (BERNARDES; SOUZA, 2011; VIEIRA; LICHTIG, 2004; CASSIANO et al., 2009).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de componentes (por exemplo impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz) que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004;

BERNARDES; SOUZA, 2011). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009)

A seletividade pode ser avaliada comparando-se a matriz isenta da substância de interesse (amostras brancas) e a matriz adicionada com esta substância (padrão), de modo nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI et al., 2004; BERNARDES; SOUZA, 2011).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI et al., 2004; BERNARDES; SOUZA, 2011). A linearidade geralmente se associa à curva analítica e a variação de sua inclinação (RIBANI et al., 2004; VIEIRA; LICHTIG, 2004).

Para construir as curvas de linearidade (curva analítica) utiliza-se o procedimento chamado Teste de Huber, como descrito por Valente, Riedo e Augusto (2003), no qual se descarta dados anômalos. Para isso, é necessário estabelecer um valor central e, acima e abaixo deste, intervalos de confiança, que definem quais os dados aceitáveis, ou seja, que pertencem ao intervalo de confiança linear (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003).

É necessário um critério para estabelecer o valor central de forma que ele não dependa dos dados anômalos, isto é feito obtendo-se a mediana (md) dos dados, já que os dados anômalos descaracterizam o significado da média por serem muito discrepantes. Para obter a mediana, ordenam-se os dados (área/concentração) (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003).

A seguir é necessário estabelecer o intervalo de confiança. Para isso obtêm-se o chamado desvio absoluto da mediana (mad), ou seja, a mediana da diferença absoluta entre cada valor de A/C e mediana. Os limites superiores e inferiores são calculados pela fórmula $IC_{s,i} = md \pm k \cdot mad$, onde k é um fator que pode variar de 2 a 8, IC_s é o valor do limite superior e IC_i é o valor do limite inferior. Os pontos que estiverem fora do intervalo compreendido pelos limites superiores e inferiores são descartados na construção da curva analítica (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003).

Para a construção da curva analítica, utiliza-se soluções padrões de concentrações conhecidas. Embora apenas dois pontos sejam necessários para determinar uma reta, utilizam-se geralmente cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido a erros associados (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

Matematicamente, pode-se determinar os coeficientes de uma curva analítica (a e b) a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão, também é possível calcular o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação próximo de 1,0 indicam uma regressão linear adequada. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al., 2004; BERNARDES; SOUZA, 2011).

A precisão expressa o grau de repetibilidade, ou seja, a dispersão entre ensaios independentes, entre os resultados de análises individuais, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em idênticas condições de análise (VIEIRA; LICHTIG, 2004; RIBANI et al., 2004). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. Essa variabilidade pode ser devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária pode ser expressada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD ou CV) (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

O desvio padrão absoluto (s) se expressa por: (CASSIANO et al., 2009)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$\bar{x}$ = média das determinações

x_i = valor individual de uma medição

n = número de medições

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV): (CASSIANO et al., 2009)

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI et al., 2004).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção (LD) representa a mais baixa concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental (CASSIANO et al., 2009; BERNARDES; SOUZA, 2011).

O LD pode ser determinado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O método visual é utilizado empregando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

O método da relação sinal-ruído pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que apresentem o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

O método que se baseia em parâmetros da curva analítica pode ser expresso como: (RIBANI et al., 2004)

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

s = desvio padrão

S = coeficiente angular da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas por um determinado procedimento experimental (BERNARDES; SOUZA, 2011).

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. A determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre os coeficientes da equação da reta da curva analítica a partir da equação: (RIBANI et al., 2004)

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

s = desvio padrão

S = coeficiente angular da curva analítica

De acordo com Paschoal et al. (2008) e Cassiano et al. (2009), o LQ pode ser determinado como sendo o primeiro valor dentro do intervalo da curva de linearidade, ou seja, o menor nível de concentração da curva analítica.

Para Thier e Zeumer (1987) o LQ deve ser maior ou igual ao LD, ter porcentagem de recuperação maior ou igual a 70% e possuir um CV igual ou menor que 20%.

O "efeito do resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz" ou "efeito matriz" ocorre quando substâncias inerentes à matriz coeluem com os compostos de interesse (CASSIANO et al., 2009) e pode causar um aumento ou

diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008).

Para avaliar esse efeito, compara-se os coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente e na matriz isenta do analito e baseia-se nos testes estatísticos F e t. Se o valor de F calculado for menor que o valor de F tabelado, pode se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas são iguais. Neste caso, a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada. O teste t será aplicado após o cálculo do desvio padrão agrupado. Se valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado então a matriz não afeta a análise (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008).

Entretanto, se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado, as variâncias não serão consideradas iguais demonstrando que a matriz tem efeito sobre a precisão do método, e uma abordagem diferente deve ser considerada. O valor de t calculado utiliza, nesse caso, os valores das estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares. Se o valor de t calculado for maior que o valor de t tabelado, então a diferença entre os coeficientes é significativa, demonstrando que o efeito matriz afeta a análise (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008).

2. OBJETIVO

Considerando-se que os pesticidas diurom e tebutiurum são de uso intenso nas lavouras de cana-de-açúcar, que ocupam mais de 70% do solo agricultável do estado de São Paulo e que estes dois pesticidas degradam-se naturalmente a compostos com maior impacto ambiental, como a dicloroanilina (DCA), além de outros metabolitos (DCPU e DCPMU) de menor impacto ambiental. Este trabalho teve como objetivo a otimização e validação de um método para análise de diurom, tebutiurum e DCA em água superficial.

3. MATERIAIS E REAGENTES

Foram utilizados os seguinte reagentes e equipamentos:

- Diurom, pureza $\geq 97,0\%$ – Sigma Aldrich
- 3,4-dicloroanilina (DCA) , pureza 99,5% - ChemService
- 3,4-diclorofenil-uréia (DCPU), pureza 99,0% - ChemService
- 3,4- diclorofenil-metil uréia (DCPMU), pureza 99% - ChemService
- Tebutiurom, pureza 99,0% - Sigma Aldrich
- Coluna para HPLC Phenomenex Gemini C18 (250mm x 4,6 mm x 5 μ m);
- Cromatógrafo líquido Varian 920, com detector UV e fluorescência
- Espectrofotômetro Hewlett Packard - 8453
- Micropipeta de 10-100 μ L (volume ajustável)
- Balança analítica marca Mettler Toledo, modelo AG245, precisão 0,01 mg
- Balões volumétricos
- Pipetas volumétricas
- Solventes: água deionizada (obtida de sistema Milli-Q, Millipore), acetonitrila, metanol e acetona, com grau de pureza HPLC da marca J.T.Baker.
- Cartuchos para SPE: Phenomenex, Strata-X (200mg / 6 mL)
- Manifold –SPE- 20 pontos - Waters

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Otimização da separação e resposta do sistema HPLC-UV

Preparou-se a solução estoque de cada analito separados em acetonitrila grau HPLC da marca J. T. Barker, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dessas soluções, preparou-se uma mistura dos cinco analitos, todos com concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, também em acetonitrila. A partir dessa solução de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, foi realizada a otimização das condições cromatográficas.

A otimização cromatográfica se baseou inicialmente no método descrito por Franco (2009), que analisou diurom, DCA, DCPU e DCPMU em urina de ratos, apresentado na tabela 3:

Tabela 3 - Condições cromatográficas otimizadas para análise do diurom e seus produtos de degradação em urina de rato.

Equipamento	Cromatógrafo líquido Varian Pro Star, com detector de arranjo de diodos
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de $5\mu\text{m}$)
Fase Móvel	Acetonitrila/ Água (76:24 %) modo isocrático, vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de injeção	$20\mu\text{L}$ (injeção automática)
Deteção	250 nm

Fonte: (FRANCO, 2009, p. 45)

A partir do espectro de absorção no UV dos analitos, foi selecionada a detecção em 254nm. Através de variações na composição e na vazão da fase móvel e da temperatura da coluna, buscou-se otimizar a separação cromatográfica, agora com o tebutiurom incluído nas soluções a serem analisadas. As demais condições (equipamento, coluna e volume de injeção) foram mantidas as mesmas daquelas descritas na tabela 3, e o comprimento de onda do detector foi mantido constante a 254 nm.

4.2 Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV

Devido à má resolução entre o DCPMU e tebutiurom, optou-se verificar quais os máximos de absorção das substâncias para que fosse possível a separação monitorando dois canais de UV através do software.

Utilizando as soluções estoques cada analito separados com concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparado duas soluções de DCPMU e tebutiuram, separados, ambos com concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em acetonitrila. Utilizando essas soluções de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi obtido o espectro de absorção no UV para esses dois analitos, no Espectrofotômetro Hewlett Packard - 8453 utilizando varredura de 190 a 1100 nm, em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

4.3 Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico.

Utilizando a solução estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito, foram preparadas misturas dos analitos em diversas concentrações, em acetonitrila.

As concentrações utilizadas (0,06; 0,08; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10; 14; 16; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram analisadas em triplicada, sendo utilizada a área média das triplicatas dos picos de cada analito para o teste de Huber e construção da curva analítica, como descrito por Valente, Riedo e Augusto (2003).

4.4 Estudo da recuperação em cartuchos SPE

Baseando-se inicialmente no método de extração desenvolvido por Franco (2009) (tabela 4), no qual foi analisado diurom, DCA, DCPU e DCPMU em urina de rato, realizou-se testes de recuperação dos analitos em cartuchos de SPE com fase polimérica Strata-X (200 mg/6mL, Phenomenex).

Tabela 4 - Condições de condicionamento e extração para diurom, DCPU, DCPMU e DCA em urina de rato.

	Strata-X
Condicionamento	3 mL de MeOH
Equilíbrio	3 mL de H ₂ O Milli-Q
Aplicação da amostra	1 mL
Limpeza	3 mL de MeOH/H ₂ O (10:90) (v/v)
Vácuo	2 min
Eluição	5 mL ACN/MeOH (50:50) (v/v)

Fonte: adaptado de Franco (2009)

Tendo em vista que a matriz de interesse é água de rio e que, portanto, a concentração dos analitos devem ser baixas, utilizou-se 1L de amostra no lugar de 1

mL. Para o estudo da recuperação, utilizou-se inicialmente 1L de água Milli-Q medido em proveta, fortificada com $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito em 1L de água Milli-Q. Dessa forma, após a extração, haveria uma pré-concentração de 200 vezes, obtendo 5 mL de um extrato final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após a fortificação, a amostra permanecia em temperatura ambiente por uma noite sendo a seguir extraída.

Para cada teste de recuperação, variou-se apenas a composição do solvente de eluição, mas não seu volume, buscando obter as melhores condições de recuperação para os analitos (diurom, tebutiurom, DCA e DCPU). Os testes foram realizados em triplicada da fortificação e triplicata de injeção, utilizando o método otimizado.

4.5 Construção das curvas de linearidade e analíticas em amostra de água de rio. Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico.

Utilizando o método de extração em SPE e o método cromatográfico otimizado (tabelas 10 e 6, respectivamente) construiu-se a curva analítica na matriz.

Nesta fase do estudo utilizou-se água de rio coletada Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP). Este ponto de amostragem está localizado antes do lançamento do efluente da ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) da cidade. Com isso, infere-se que este ponto esteja livre de qualquer contaminação por efluentes. Próximo a este ponto também não há nenhum tipo de cultivo agrícola que poderia ser fonte de contaminação. As amostras de água de rio foram recolhidas em frascos âmbar de 4 L. O transporte até o laboratório foi efetuado em caixa isotérmica.

Imediatamente após chegar ao laboratório as amostras de água foram filtradas em filtros de fibra de vidro com $1,2 \mu\text{m}$ de diâmetro de poros, para a retirada do material particulado, e submetidas à extração em SPE como descrito na tabela 10.

Para a construção da curva analítica na matriz, adicionou-se o volume adequado da solução padrão dos analitos, completando-se o volume com o extrato obtido das amostras de água, de modo a obter 5 mL de solução final nas concentrações de 16, 10, 6, 2 e $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito.

4.6 Aplicação do método em amostras de água superficial enriquecida com os analitos - Validação.

Coletou-se água do rio Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP) no ponto de amostragem considerado livre de interferentes em frascos âmbar de 4L e, após chegar ao laboratório, as amostras de água foram filtradas em filtros de fibra de vidro com 1,2 μm de diâmetro de poros, para a retirada do material particulado.

Utilizou-se 1L deste filtrado medido em proveta, o qual foi fortificado em três níveis (0,01; 0,04 e 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com o padrão de cada analito. Dessa forma, após a extração, haveria uma pré-concentração de 200 vezes, obtendo 5 mL de um extrato final de 2, 8 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após a fortificação, a amostra permanecia em temperatura ambiente por uma noite sendo a seguir extraída.

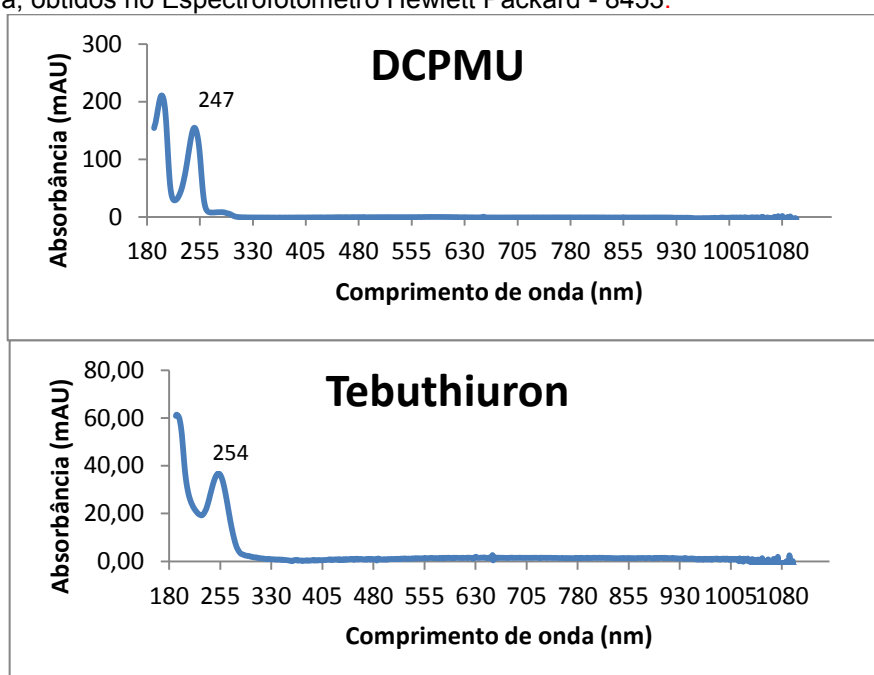
As recuperações foram calculadas através do ponto na matriz com o volume adequado da solução padrão de cada analito, completando-se com o extrato obtido das amostras testemunha (amostra não fortificada), de modo a obter 5 mL de solução final nas concentrações de 2, 8 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC/UV

Devido à má resolução entre o DCPMU e tebutiurum, optou-se verificar quais os máximos de absorção das substâncias para que fosse possível a separação monitorando dois canais de UV através do software. A figura 2 apresenta os espectros obtidos para o DCPMU e tebutiurum.

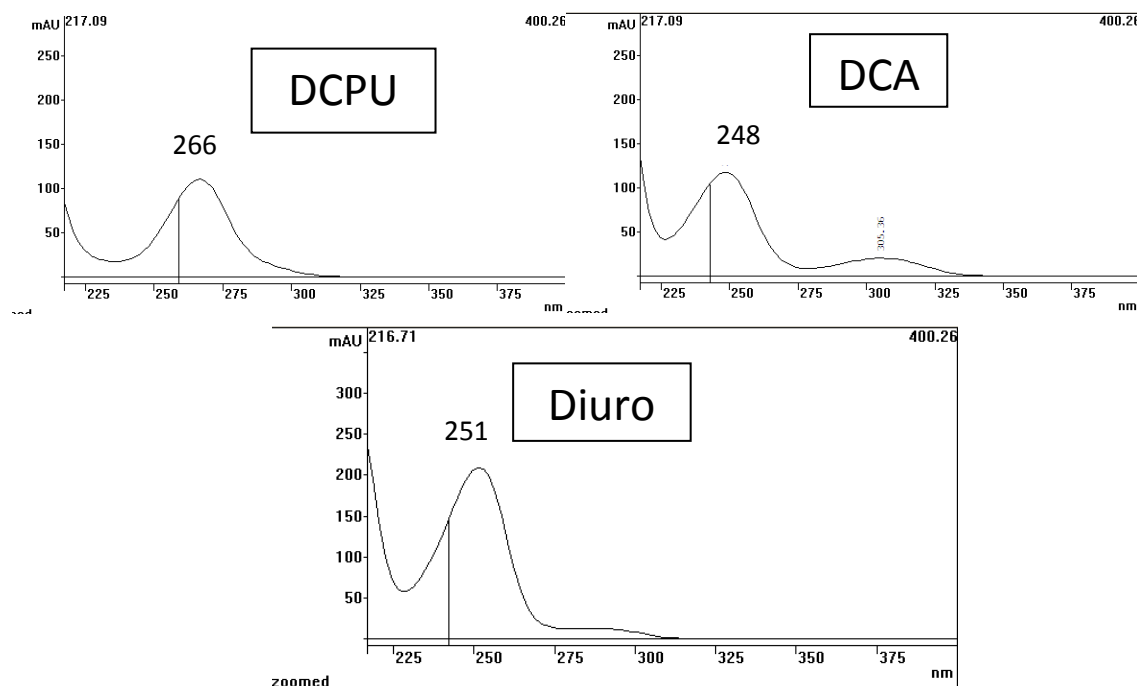
Figura 2 - Espectros de absorção no UV do DCPMU e tebutiurum, a partir de soluções $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila, obtidos no Espectrofotômetro Hewlett Packard - 8453.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 3 apresenta o espectro de absorção no UV do diurom, DCPU e DCA obtidos por Franco (2009) com solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos separados em acetonitrila, no Cromatógrafo Varian Pro Star, com detector de arranjo de diodos, utilizando varredura de 200 a 400 nm.

Figura 3 - Espectros UV, obtidos no sistema HPLC/DAD Varian ProStar, utilizando soluções 10 µg mL⁻¹ de cada substância em acetonitrila



Fonte: adaptado de Franco (2009).

A partir dos espectros de absorção no UV dos analitos apresentados nas figuras 2 e 3, pode-se notar que os analitos apresentam sua máxima absorção entre 247 e 266 nm. Utilizou-se o comprimento de onda de 254 nm, por ser um valor próximo da média da faixa onde os analitos encontram seu máximo de absorção. Além disso, a baixa absorção do tebutiurum frente aos demais analitos, mesmo em seu máximo de absorção, contribuiu para a escolha desse comprimento de onda, o que permite uma maior detectabilidade do tebutiurum, sem interferir na detectabilidade do diurom e DCA. Com isso não foi possível utilizar a ferramenta do software para o monitoramento de dois canais de UV, pois os máximos de absorção do DCPMU e tebutiurum são muito próximos.

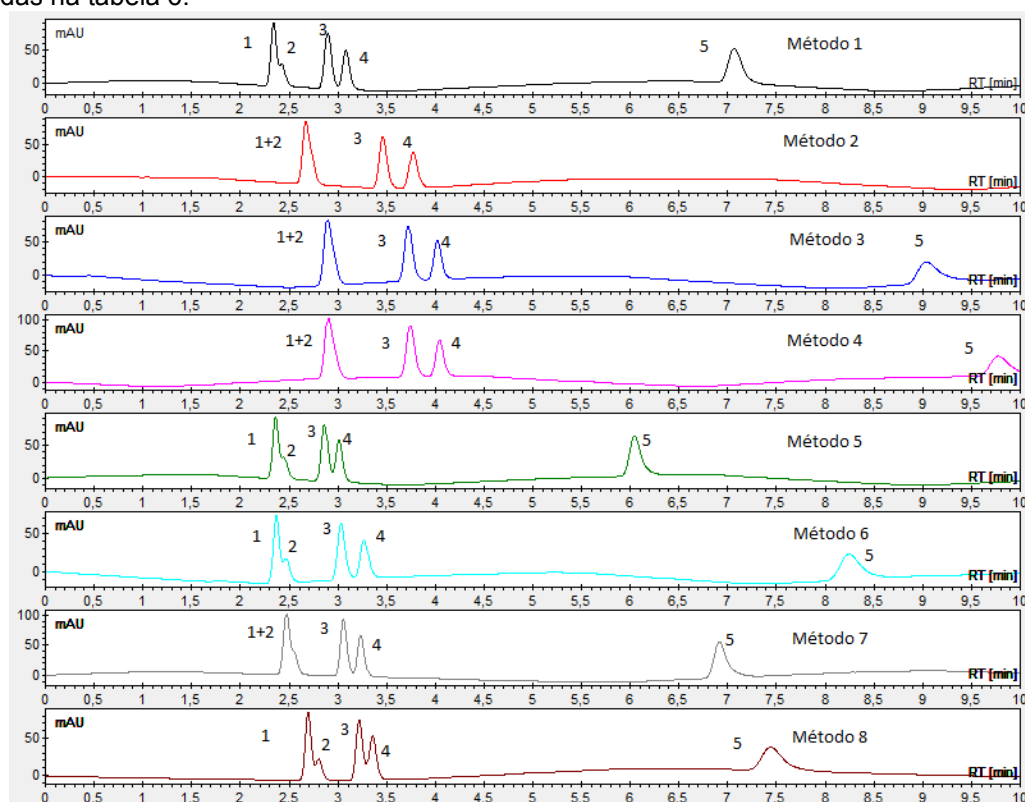
5.2 Otimização da separação e resposta do sistema HPLC-UV

Na tabela 5 são apresentadas as condições de alguns dos vários testes realizados para a otimização da separação dos analitos. Na Figura 4 são apresentados os respectivos cromatogramas das condições testadas.

Tabela 5 - Condições testadas para otimização cromatográfica.

Método	Composição da Fase Móvel ACN/H ₂ O (v/v)	Vazão da Fase Móvel (mL min ⁻¹)	Temperatura do Forno(°C)
1	76/24 - isocrático	1,4	30
2	70/30 - isocrático	1,3	30
3	70/30 - 80/20 até 3 min	1,2	30
	80/20 - 70/30 até 5 min	1,2	
	70/30 - isocrático até 10 min	1,4	
4	70/30 - 74/26 até 1 min	1,2	30
	74/26 - 78/22 até 3,2 min	1,2	
	78/22 - 70/30 até 3,5 min	1,2	
	70/30 (isocrático)	1,4	
5	80/20 - isocrático	1,4	30
6	70/30 - 74/26 até 1 min	1,4	30
	74/26 - 78/22 até 3,2 min		
	78/22 - 70/30 até 3,5 min		
	70/30 (isocrático)		
7	76/24 - isocrático	1,4	40
8	80/20 - 70/30 até 3,2 min	1,2	30
	70/30 - isocrático até 3,5 min	1,2	
	70/30 - isocrático	1,4	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 - Cromatogramas HPLC/UV, obtidos a 254 nm, para as condições cromatográficas detalhadas na tabela 6.

Legenda: (1) DCPMU; (2) tebutiurom; (3) diurom; (4) DCA; (5) DCPU (ELABORADO PELO AUTOR)

Tabela 6 - Condições cromatográficas otimizadas.

Equipamento	Cromatógrafo Líquido Varian Pro Star, com detector fluorescência e UV
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de 5µm)
Composição da Fase Móvel	Acetonitrila/Água 70/30 - 74/26 até 1 min 74/26 - 78/22 até 3,2 min 78/22 - 70/30 até 3,5 min 70/30 (isocrático) até 10 min
Vazão da Fase Móvel	1,4 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	20 µL
Deteção	254 nm
Temperatura do Forno	30°C

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se notar pela figura 4 que não foi possível a separação do DCPMU e do tebutiurum, que co-eluíram totalmente nos cromatogramas apresentados pelos métodos 2, 3, 4 e 7. Nos demais métodos é possível a identificação visual dos picos do tebutiurum e DCPMU, mas não sua quantificação. Ao mesmo tempo, buscou-se o método cuja separação entre os picos do diurom e DCA fosse a melhor possível. Dessa forma o cromatograma que apresenta a melhor separação entre o diurom e a DCA e ao mesmo tempo permite a melhor identificação visual entre DCPMU e tebutiurum é o apresentado pelo método 6.

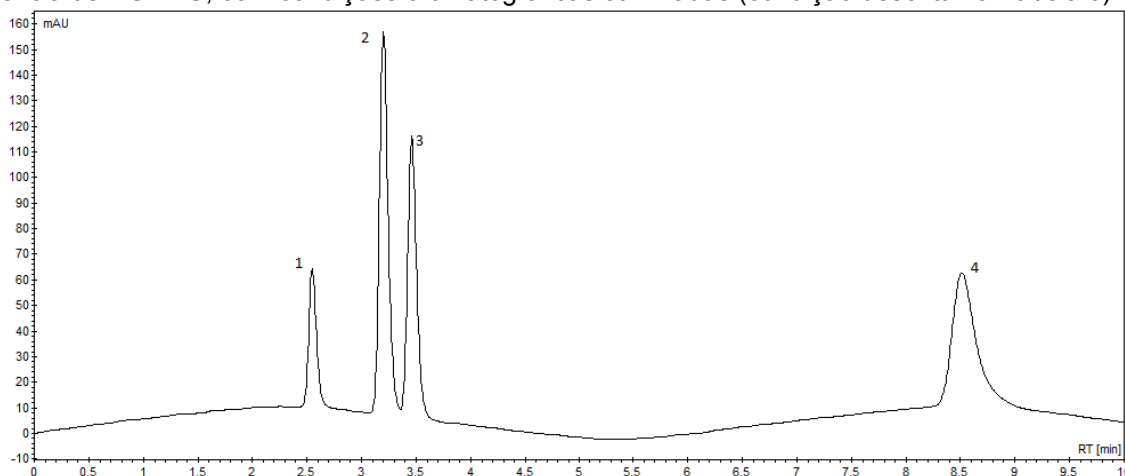
A partir desse método 6 é possível identificar visualmente o tebutiurum e DCPMU, e ao mesmo tempo quantificar diurom, DCA e DCPU.

Tendo em vista que o diurom e tebutiurum são os herbicidas aplicados (SOUZA, 2008) e sabendo-se que o DCPMU é encontrado em baixas concentrações em águas superficiais e subterrâneas (THOMAS; McHUGH; WALDOCK, 2002; FIELD et al., 1997), optou-se por não incluir o DCPMU nas curvas analíticas, de modo que fosse possível quantificar o tebutiurum. O produto final de degradação do diurom é DCA, que, assim como o diurom, possui ação endócrina (BOTI; SAKKAS; ALBANIS, 2007; MARAGOU; THOMAIDIS; KOUPPARIS, 2011; FERNANDES et al., 2012). Já para DCPMU, que é intermediário da degradação do diurom, não existe dados experimentais válidos de que possua capacidade de alteração endócrina (BOTI; SAKKAS; ALBANIS, 2007).

Dessa forma, o método otimizado, detalhado na tabela 6, permite a identificação do DCPMU e do tebutiurum, e permite quantificar o tebutiurum na ausência de DCPMU, além de permitir a quantificação do diurom, DCA e DCPU.

A partir das estruturas das substâncias (Tabela 1 e Figura 1), pode-se inferir os mecanismos que determinam a ordem de eluição. O primeiro mecanismo é o de partição, no qual moléculas mais polares eluem primeiro que moléculas mais apolares. É o caso do DCPMU e tebutiurum em relação ao diurom. No segundo mecanismo há a influência dos pares de elétrons dos grupos amina, que interagem com os silanóis residuais da coluna cromatográfica por ligações de hidrogênio. O tebutiurum elui pouco depois do DCPMU por possuir quatro grupos amínicos em sua cadeia, sendo que o DCPMU possui apenas dois, dessa forma, ambos acabam tendo tempos de retenção muito próximos, o que dificulta sua separação. O fato do DCPU ter o maior tempo de retenção ocorre devido aos seus dois grupos carbamínicos possuírem menor impedimento estérico do que os demais analitos. A melhor resolução obtida pode ser visualizada na figura 5.

Figura 5 - Cromatograma dos padrões dos analitos em estudo com concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, na ausência de DCPMU, com condições cromatográficas otimizadas (condição descrita na Tabela 6).



Legenda: (1) tebutiurum; (2) diurom; (3) DCA; (4) DCPU (ELABORADO PELO AUTOR)

5.3 Construção das curvas de linearidade e analíticas. Determinação dos limites de detecção e quantificação do sistema analítico.

As figuras 6, 7, 8 e 9 representam o teste de Huber para o tebutiurum, diurom, DCA e DCPU, respectivamente, enquanto as figuras 10, 11, 12 e 13 apresentam as curvas analíticas dos mesmos, construídas de acordo com Valente, Riedo e Augusto (2003).

Para todas as curvas:

$A_{\text{média}}$: área média das replicatas os picos de cada analito

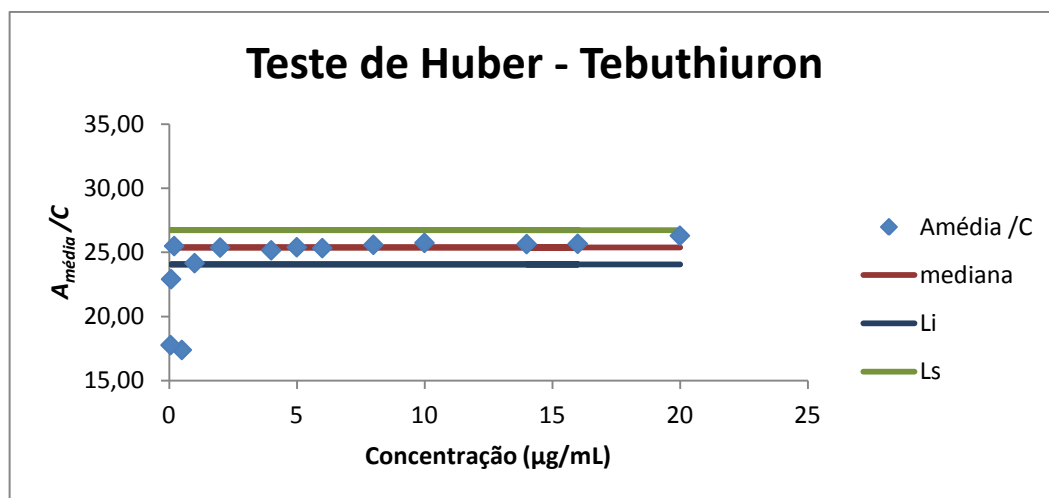
$A_{\text{média}}/C$: área média das replicatas sobre a concentração

mediana: mediana dos valores obtidos de $A_{\text{média}}/C$, para cada valor de concentração

Li: Limite inferior do intervalo de confiança.

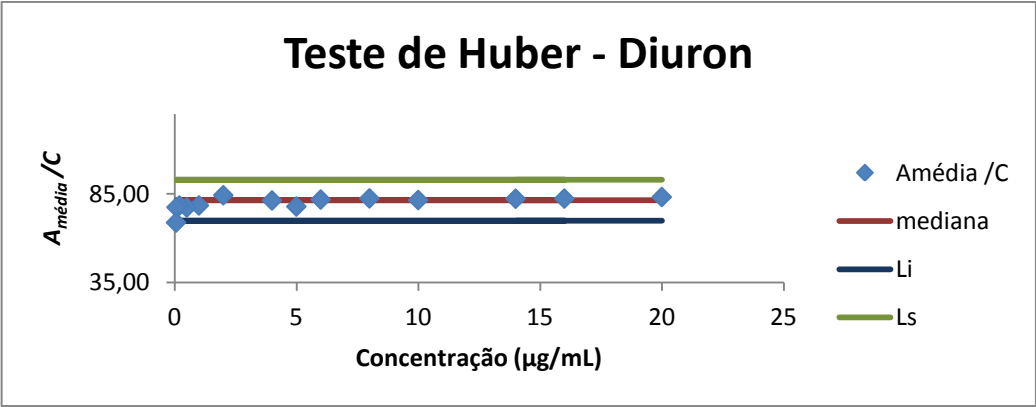
Ls: Limite superior do intervalo de confiança

Figura 6 - Teste de Huber do tebutiurum.



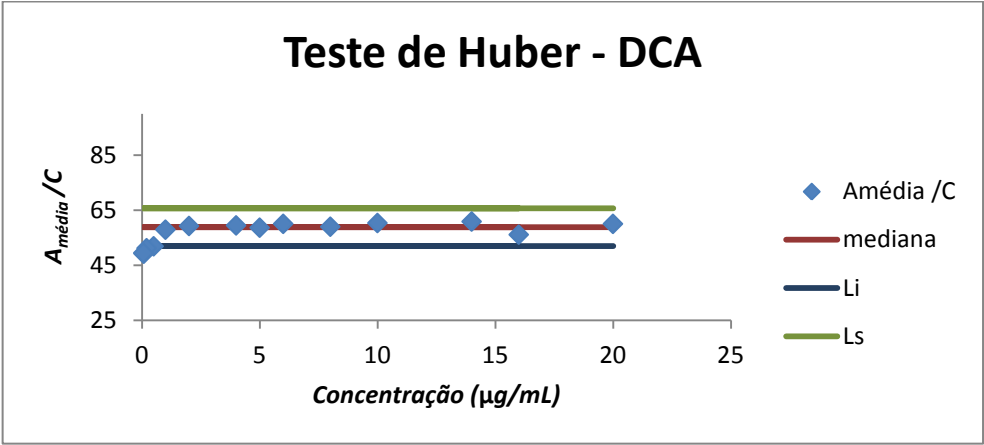
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Teste de Huber do diuron.



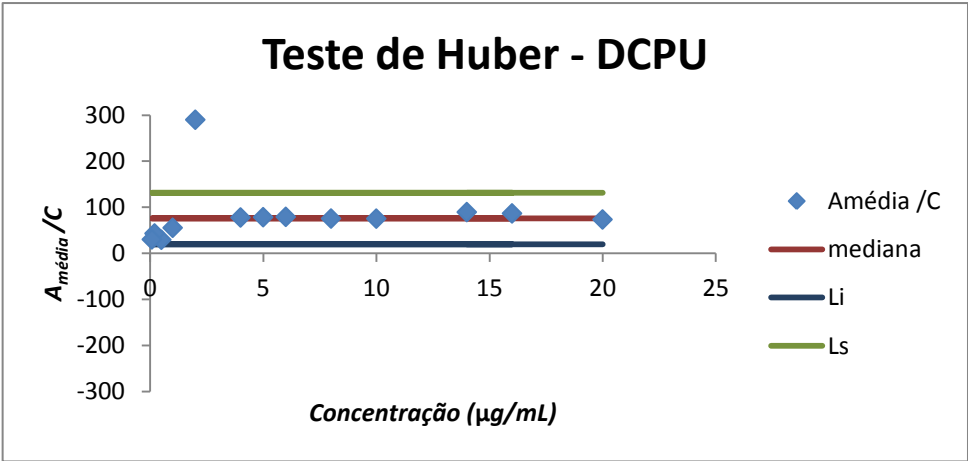
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Teste de Huber da DCA.



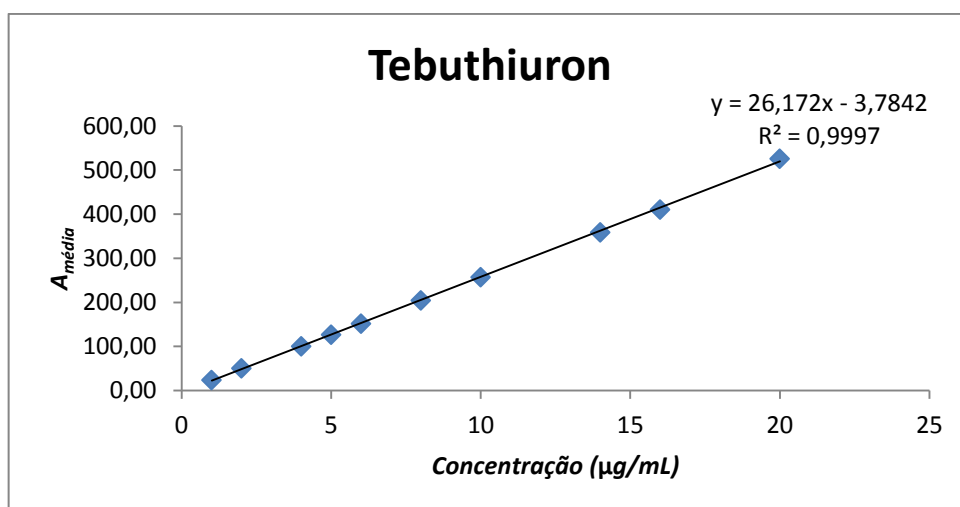
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 - Teste de Huber do DCPU



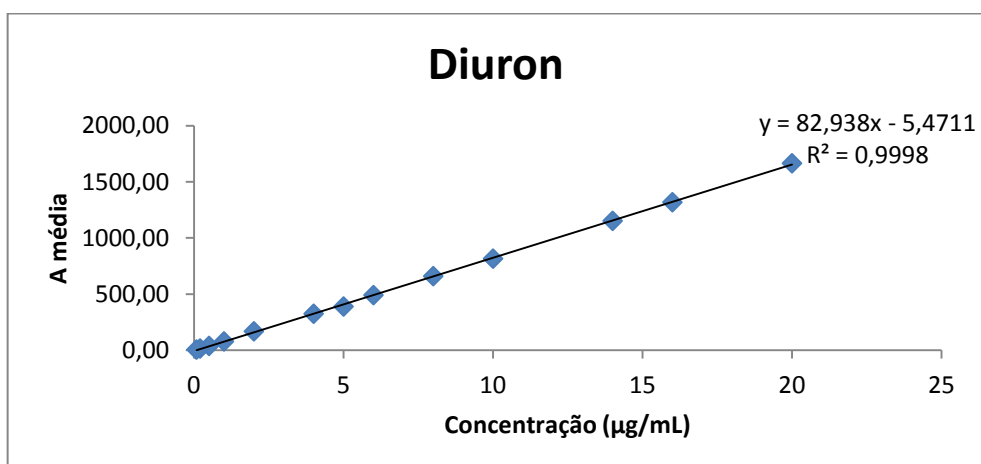
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - Curva analítica do tebutiuron.



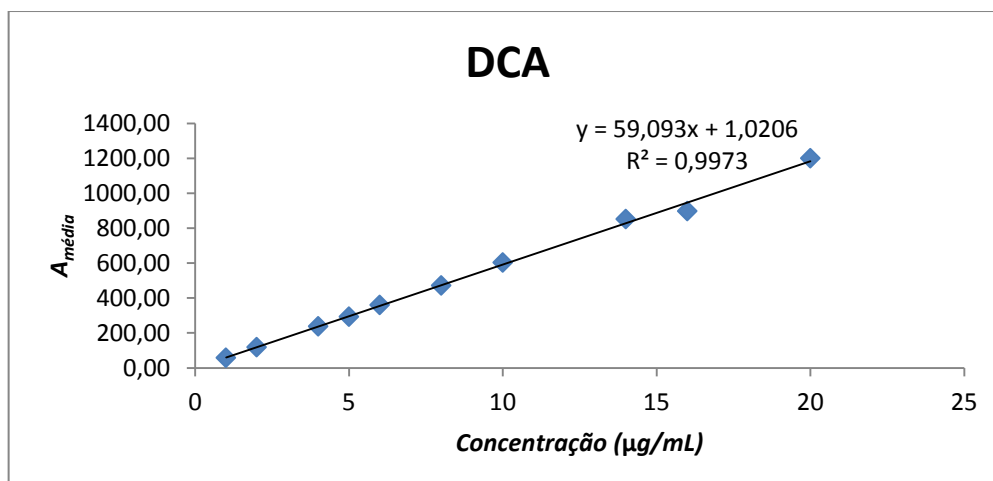
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 - Curva analítica do diuron.

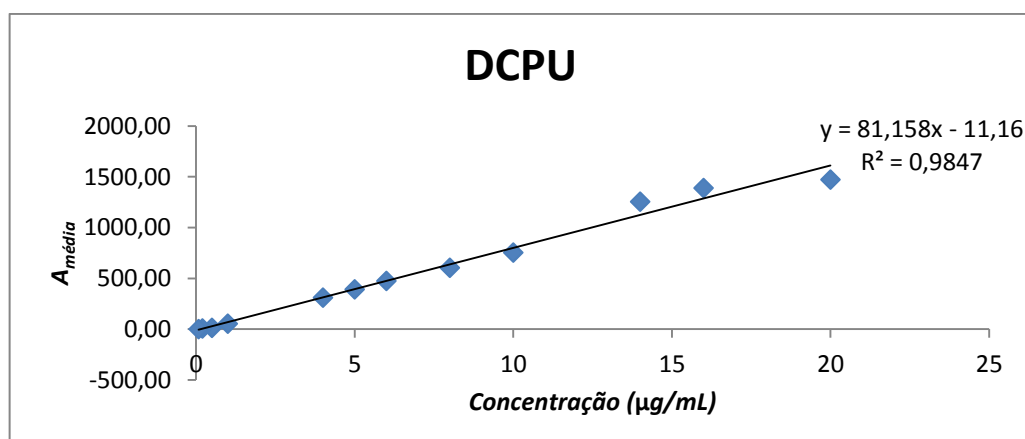


Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Curva analítica da DCA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Curva analítica do DCPU.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O limite instrumental de detecção (LD) foi obtido de maneira visual (RIBANI et al., 2004) e o limite instrumental de quantificação (LQ) como sendo o primeiro valor dentro do intervalo da curva de linearidade, ou seja, o menor nível de concentração da curva analítica (PASCHOAL et al., 2008; CASSIANO et al., 2009). A tabela 7 apresenta o LD e LQ para cada substância.

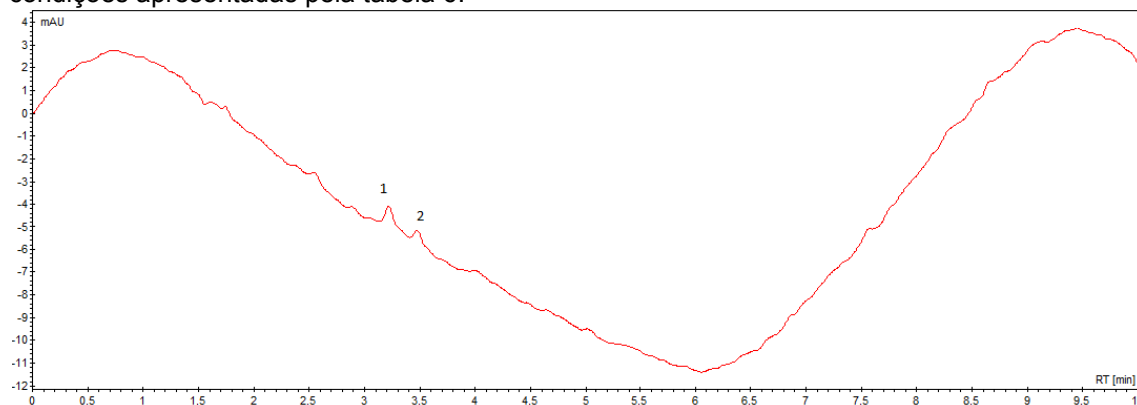
Tabela 7 - Limites instrumentais de detecção e quantificação para os analitos, de acordo com o método cromatográfico descrito na tabela 6.

Substância	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Tebutiurum	0,2	1,0
Diurum	0,06	0,08
DCA	0,06	1,0
DCPU	0,2	0,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

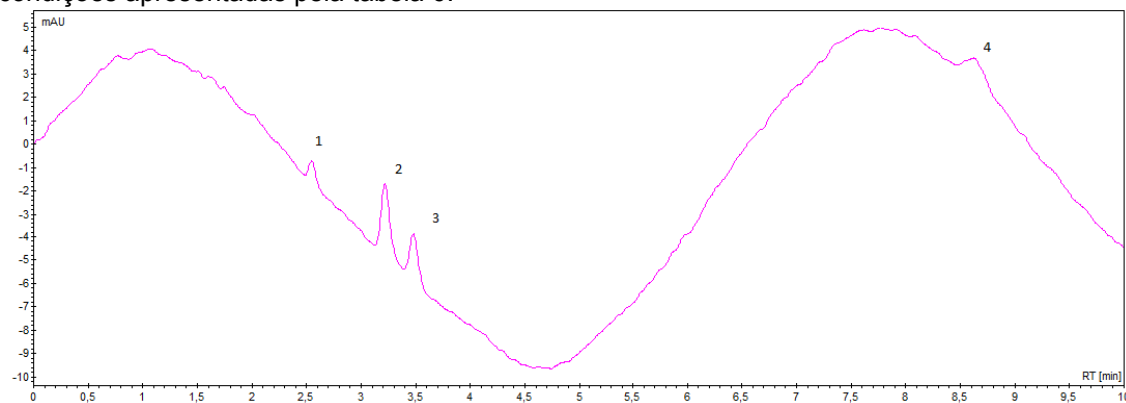
Pode-se notar que o diurum e DCA possuem o menor LD, e o tebutiurum e DCPU possuem o mesmo LD. Ao mesmo tempo, o diurum possui o menor LQ. Nas figuras 14 e 15 são apresentados os cromatogramas obtidos com concentração 0,06 e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Figura 14 - Cromatograma da solução padrão dos analitos ($0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila, nas condições apresentadas pela tabela 6.



Legenda: (1) diurom; (2) DCA. Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Cromatograma da solução padrão dos analitos ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila, nas condições apresentadas pela tabela 6.



Legenda: (1) tebutiurom; (2) diurom; (3) DCA; (4) DCPU. Elaborado pelo autor

A oscilação da linha de base pode ser explicada pela escala ampliada do eixo “y”.

5.4 Estudo da recuperação em cartuchos SPE

A tabela 8 mostra o solvente de eluição utilizados nos testes de recuperação dos analitos.

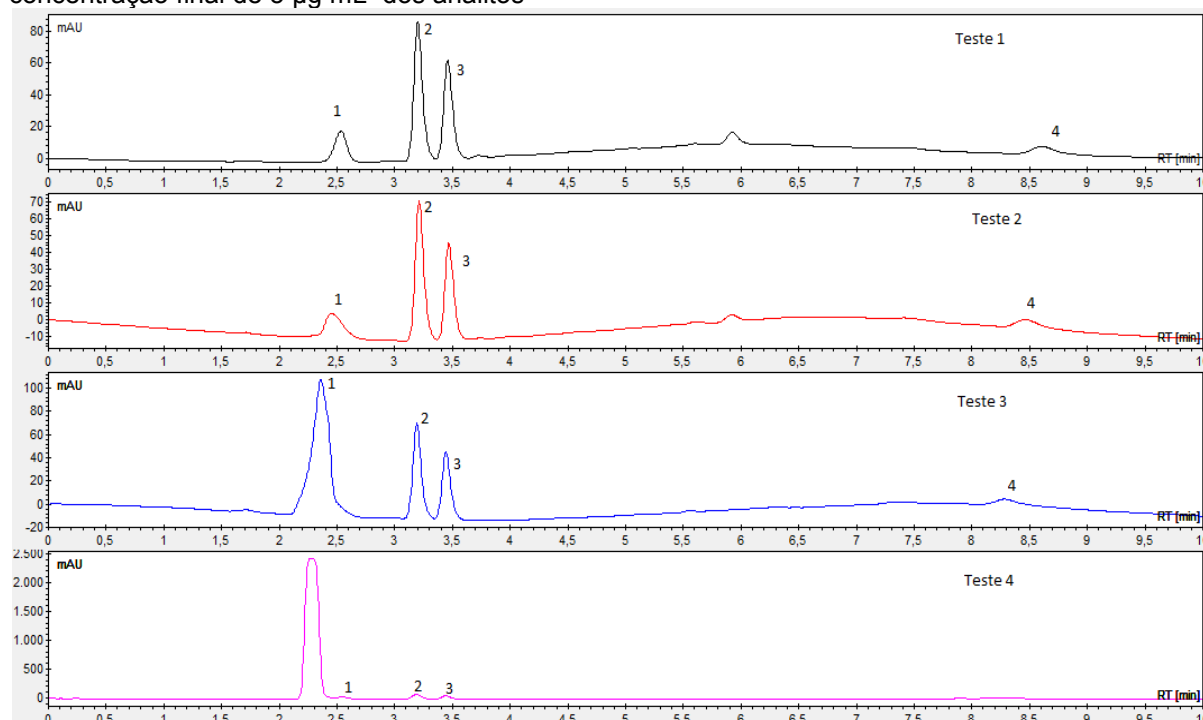
Tabela 8 - Testes de recuperação realizados em água Milli-Q fortificada, de modo que o extrato final contivesse $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito.

Teste	Solvente de Eluição (5 mL)
1	ACN/MeOH (50:50) (v/v)
2	ACN/MeOH (30:70) (v/v)
3	ACN/MeOH (20:80) (v/v)
4	ACN/acetona (50:50) (v/v)

Fonte: Elaborada pelo autor

A figura 16 apresenta os cromatogramas obtidos no extrato em cada teste, utilizando o método cromatográfico otimizado (descrito na tabela 6).

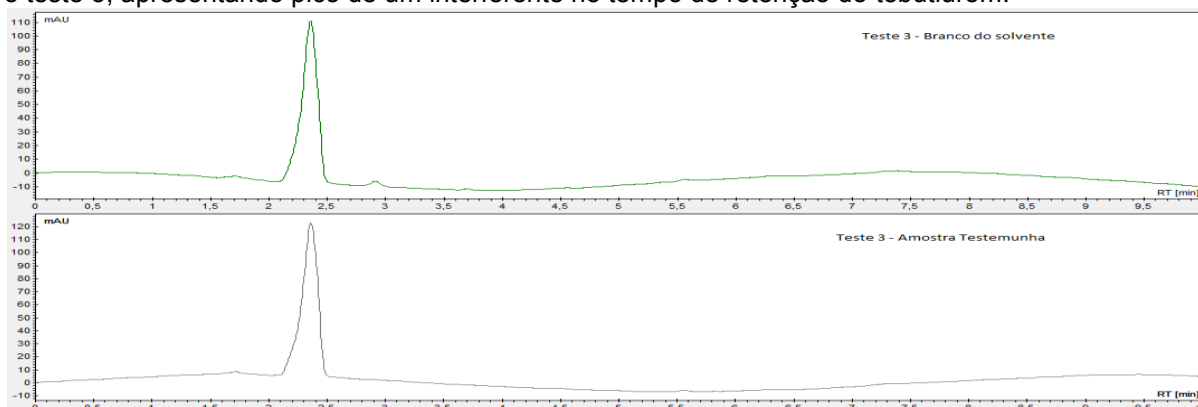
Figura 16 - Cromatogramas dos testes de recuperação em água Milli-Q com extrato com concentração final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos



Legenda: (1) Tebutiuron, (2) Diuron, (3) DCA, (4) DCPU. Elaborado pelo autor

O teste 3 apresentou um pico no mesmo tempo de retenção do tebutiuron. No entanto, utilizando a amostra testemunha sem fortificação, pôde-se subtrair a área deste pico, permitindo a o cálculo da recuperação do tebutiuron. A figura 17 apresenta o cromatograma da amostra testemunha e do branco do solvente obtido no teste 3.

Figura 17 - Cromatogramas da amostra testemunha (água Milli-Q) e branco do solvente obtidos com o teste 3, apresentando pico de um interferente no tempo de retenção do tebutiurum.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para o teste 4, que utiliza ACN/acetona como solvente de eluição, obteve-se um pico antes do tebutiurum (como se observa na figura 16), provavelmente proveniente do solvente usado.

Utilizando as curvas analíticas obtidas na primeira parte deste trabalho (figuras 10, 11, 12, 13), calculou-se a recuperação para cada teste, conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9 - Valores de recuperação para água Milli-Q fortificada com os analitos, com um extrato final de concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

	Tebutiurum		Diurum		DCA		DCPU	
	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)
Teste 1	101	2	105	2	102	3	16	5
Teste 2	110	6	105	1	101	2	25	47
Teste 3	105	8	99	1	97	1	14	5
Teste 4	68	7	101	6	102	1	5	9

Fonte: Elaborado pelo autor.

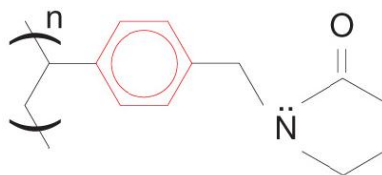
A partir dos dados da tabela 9, pode-se notar que em nenhum teste foi obtido uma boa recuperação para o DCPU, cuja melhor recuperação foi de aproximadamente 25% no teste 2. No entanto, o CV de aproximadamente 47% indica um dado não dentro do esperado para este tipo de amostra. O teste 1 foi selecionado como o melhor teste de recuperação já que os CVs são os menores e a recuperação está mais próxima de 100%. A tabela 10 apresenta as condições de extração com melhores resultados:

Tabela 10 - Condições de condicionamento e extração com melhores resultados.

	Strata-X (200 mg/6mL, Phenomenex)
Condicionamento	3 mL de MeOH
Equilíbrio	3 mL de H ₂ O Milli-Q
Aplicação da amostra	1 L
Limpeza	3 mL de MeOH/H ₂ O (10:90) (v/v)
Vácuo	2 min
Eluição	5 mL ACN/MeOH (50:50) (v/v)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo de retenção do Strata-X consiste em interações π - π e ligação de hidrogênio que resulta num sorvente com alta seletividade para compostos aromáticos e polares e permite a lavagem com solvente orgânico sem perda dos analitos, o que torna a eliminação de contaminantes que podem interferir na análise altamente eficiente.

Figura 18 - Estrutura química do sorvente Strata-X.

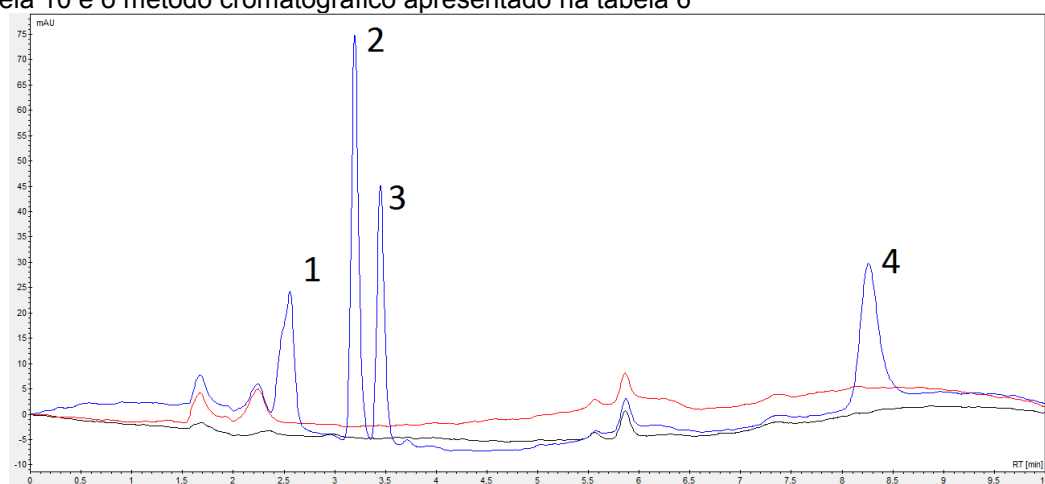
Fonte: (PHENOMENEX, 2012)

Segundo Franco (2009), a DCA é altamente volátil, o que faz com que este composto tenha alto potencial de perda por evaporação devido à alta pressão de vapor ($6,30 \cdot 10^{-3}$ torr à 25°C), e estudos indicam como uma possível fonte de perda a secagem com nitrogênio durante a etapa de extração em fase sólida (SPE) (FRANCO, 2009). Dessa forma, optou-se por não realizar a secagem com N₂.

5.5 Construção das curvas de linearidade e analíticas em amostra de água de rio. Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico. Avaliação do efeito matriz.

A figura 19 apresenta um cromatograma da solução de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ na matriz, obtido pelo método cromatográfico otimizado (tabela 6) sobreposto aos cromatogramas do branco do solvente e da amostra testemunha de água natural.

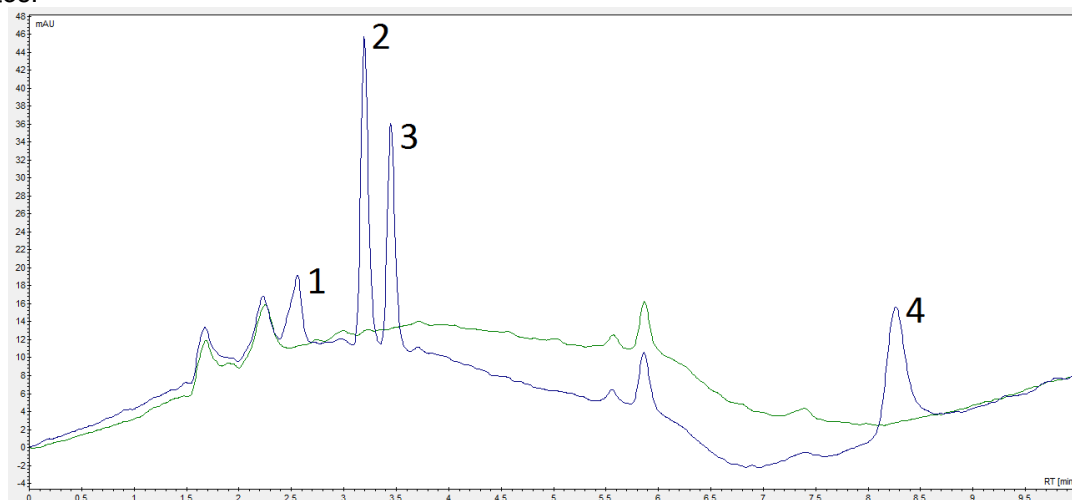
Figura 19 - Cromatograma dos padrões dos analitos com concentração $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, em extrato da amostra de água natural sobreposto ao cromatograma da amostra testemunha de água de rio sem os analitos e do cromatograma do branco do solvente, obtidos com o método de extração apresentado na tabela 10 e o método cromatográfico apresentado na tabela 6



Legenda: Cromatograma dos padrões dos analitos (em azul), cromatograma da amostra testemunha de água de rio sem os analitos (em vermelho) do branco do solvente (em preto), (1) tebutiurum; (2) diurum; (3) DCA; (4) DCPU. Elaborado pelo autor.

Através dos cromatogramas apresentados na figura 19, pode-se notar que não há interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados, o que permite detectar e quantificar todas as substâncias de interesse na matriz. A figura 20 apresenta o cromatograma da amostra testemunha de água de rio, sem analitos, sobreposto ao cromatograma dos padrões dos analitos com concentração $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, em extrato da amostra de água de rio, o que permite confirmar a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 20 - Cromatograma dos padrões dos analitos com concentração $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, em extrato da amostra de água natural sobreposto ao cromatograma da amostra testemunha de água de rio sem os analitos.

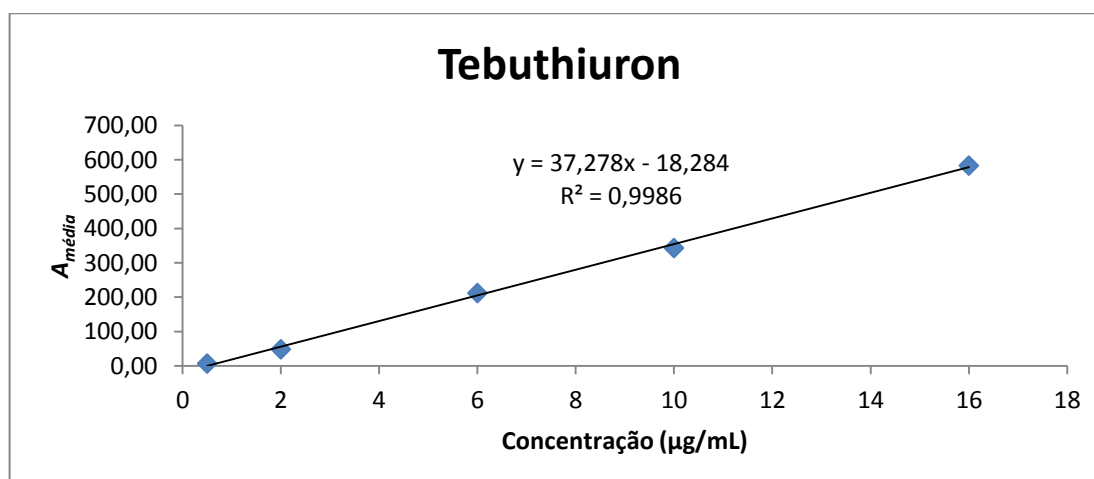


Legenda: Cromatograma dos padrões dos analitos (em azul); cromatograma da amostra testemunha de água de rio sem os analitos (em verde) (1) tebutiurum; (2) diurom; (3) DCA; (4) DCPU. Elaborado pelo autor.

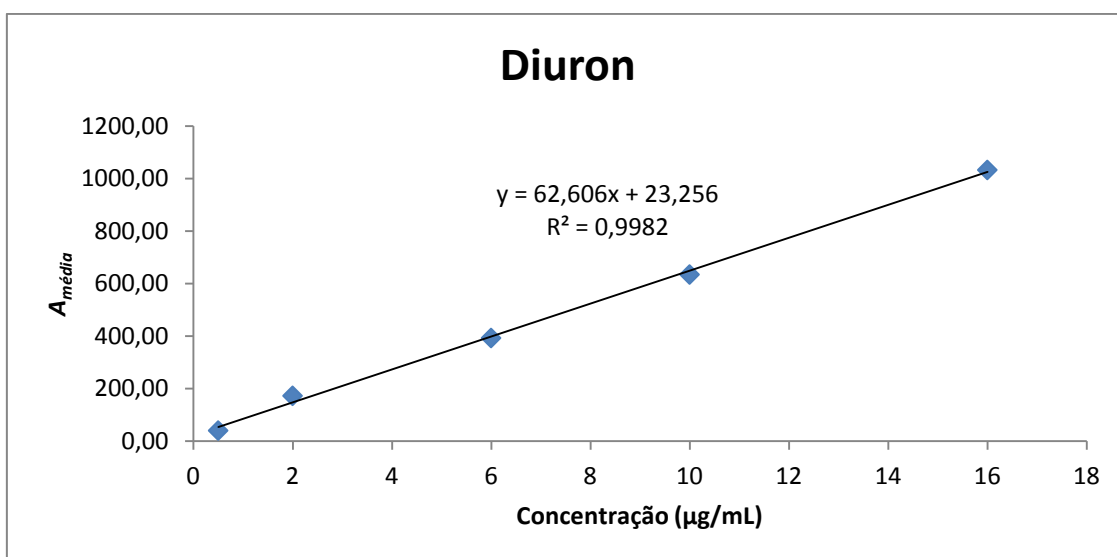
Cada concentração ($16; 10; 6; 2$ e $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida em duplicata e cada uma destas replicatas foi analisada em triplicata pelo método cromatográfico otimizado (tabela 6). Após obter a área média das triplicatas dos picos de cada analito, foi calculada a média entre as médias das duplicatas. Com essa média final, realizou-se o teste de Huber e construção da curva analítica na matriz, como descrito por Valente, Riedo e Augusto (2003).

As figuras 21, 22, 23 e 24 apresentam as curvas analíticas para o tebutiurum, diurom, DCA e DCPU em amostra de água de rio, respectivamente. Para todas as curvas, $A_{\text{média}}$ corresponde a área média das replicatas os picos de cada analito.

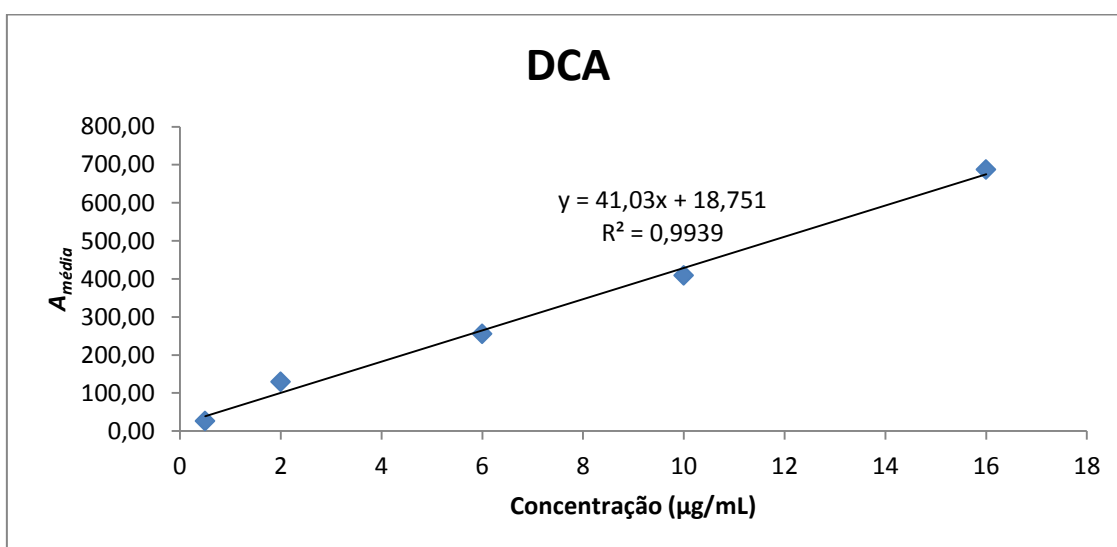
Figura 21 - Curva analítica do tebutiurum na matriz.



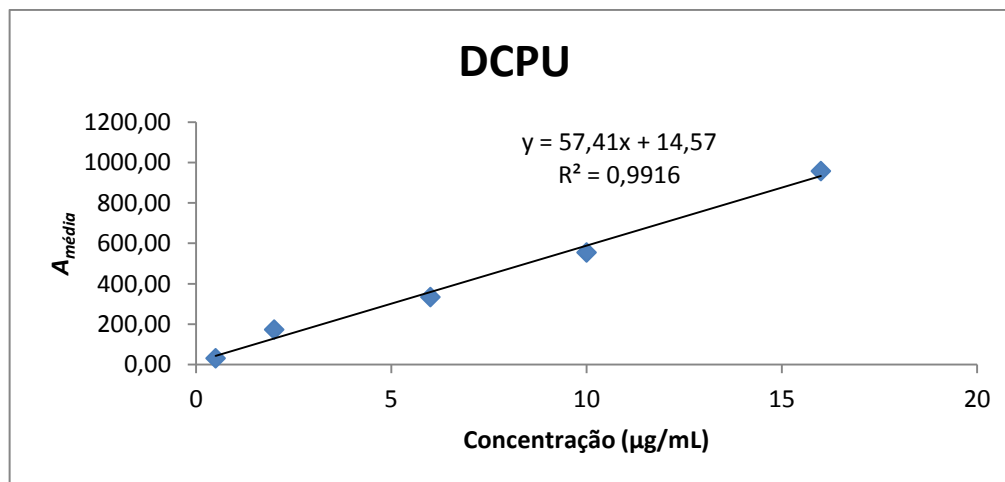
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 - Curva analítica do diurom na matriz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 - Curva analítica da DCA na matriz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Curva analítica do DCPU na matriz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O limite de detecção do método (LD) foi obtido de maneira visual e o limite de quantificação do método (LQ) como sendo o primeiro valor dentro do intervalo da curva de linearidade na matriz, ou seja, o menor nível de concentração da curva analítica em água natural (PASCHOAL et al., 2008). Para todas as substâncias, o LD e o LQ do método foi de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Utilizando as curvas analíticas dos padrões em solvente e na matriz, avaliou-se o efeito matriz comparando-se os coeficientes angular das curvas. Os testes estatísticos F e T, realizados utilizando o programa Microsoft Excel 2007, apresentaram valores calculados menores que o tabelado para o teste F e maiores que o tabelado para o teste T, ou seja, para todos os analitos há efeito matriz (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008). A tabela 11 apresenta a relação dos coeficientes angulares das curvas analíticas em solvente e em matriz, em porcentagem, para cada analito.

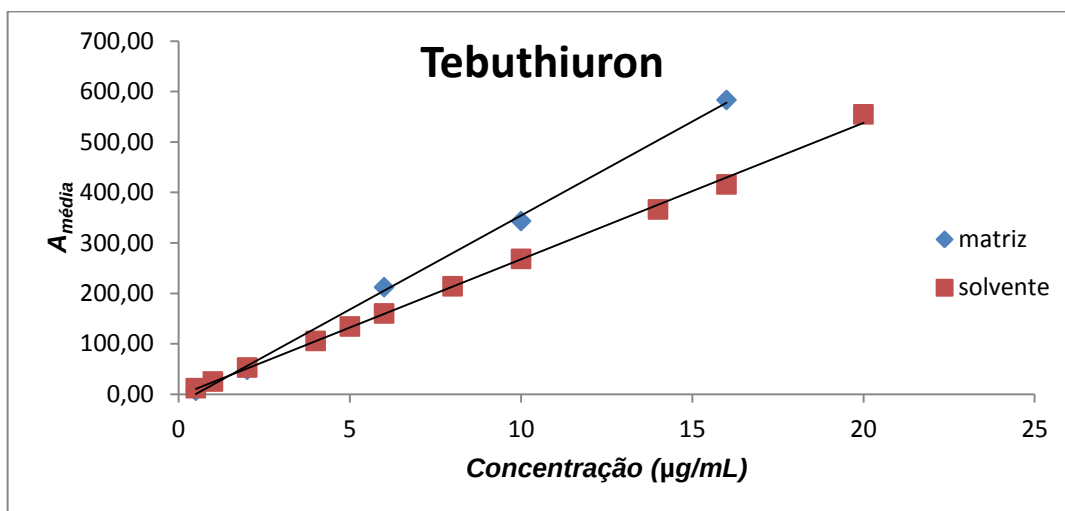
Tabela 11 - Relação dos coeficientes angulares das curvas analíticas da matriz e do solvente, em porcentagem, para cada analito.

Substância	Relação dos Coeficientes Angulares (%)
Tebutiurum	38
Diurom	-27
DCA	-33
DCPU	-31

Fonte: Elaborado pelo autor.

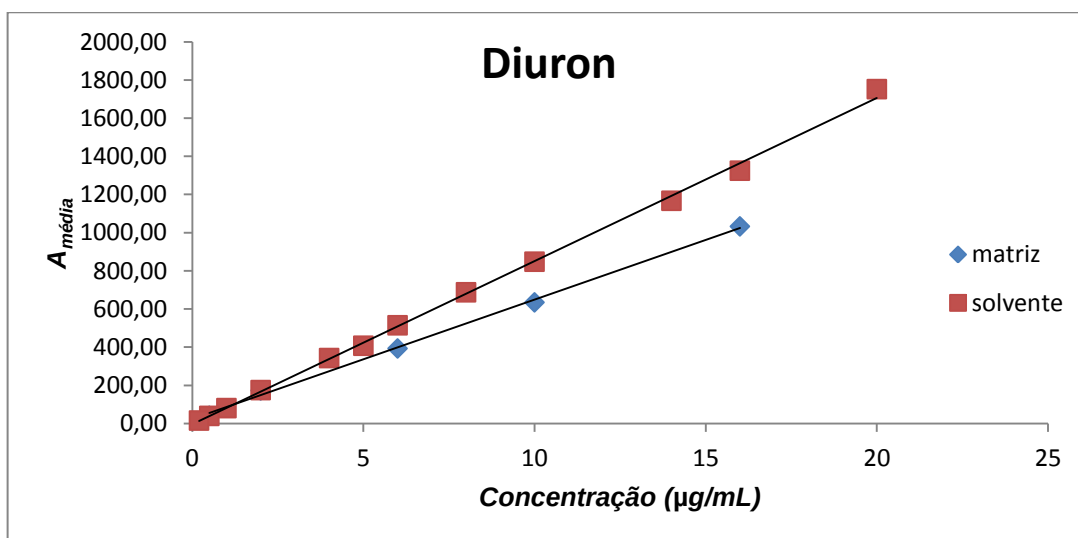
A partir da tabela 11, percebe-se que o coeficiente angular da curva analítica na matriz possui desvio de mais de 20% do coeficiente angular da curva em solvente, o que confirma a presença do efeito matriz para todos os analitos (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008). As figuras 25, 26, 27 e 28 apresentam as curvas analíticas no solvente sobrepostas à curva na matriz para o tebutiurum, diurom, DCA e DCPU, respectivamente.

Figura 25 - Curvas analíticas do tebutiurum na matriz e no solvente.



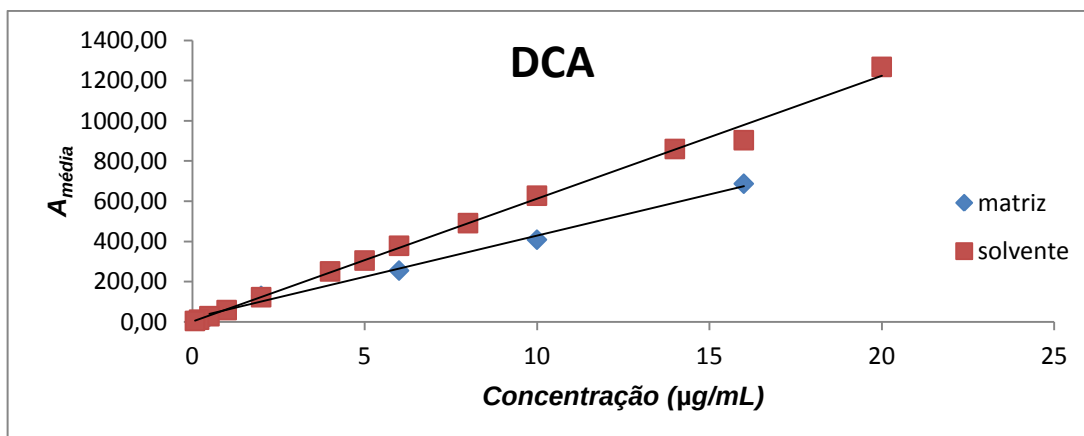
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Curvas analíticas do diurom na matriz e no solvente.



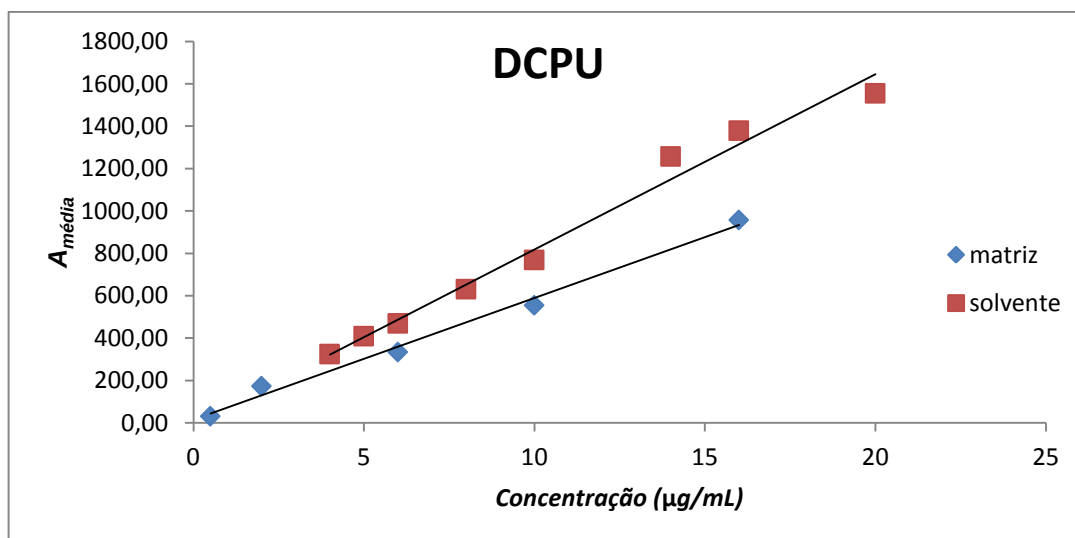
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Curvas analíticas da DCA na matriz e no solvente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 - Curvas analíticas do DCPU na matriz e no solvente.

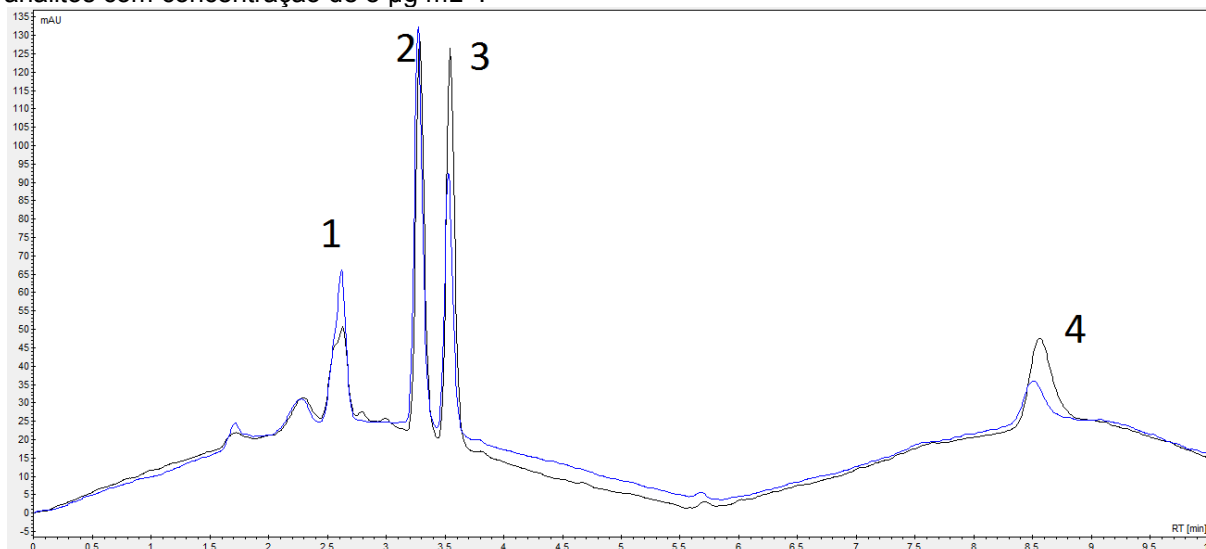


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Aplicação do método em amostras de água superficial enriquecida com os analitos - Validação.

A figura 29 apresenta o cromatograma da amostra enriquecida com os analitos sobreposto ao cromatograma dos extratos enriquecidos com os analitos, obtidos pelo método cromatográfico otimizado.

Figura 29 - Cromatograma dos padrões dos analitos com concentração $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, em amostra de água natural sobreposto ao cromatograma do extrato de amostra de água enriquecida com os analitos com concentração de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Legenda: Cromatograma dos padrões dos analitos em amostra de água natural (em preto); cromatograma dos analitos em extrato de amostra de água natural (em azul) (1) tebutiurum; (2) diurum; (3) DCA; (4) DCPU. Elaborado pelo autor.

Comparando-se os resultados obtidos pelos extratos e pela amostra enriquecida, calculou-se a recuperação do método, conforme apresentado na tabela 12.

Tabela 12 - Testes de recuperação realizados em água superficial fortificada.

Analito	$2 \mu\text{g mL}^{-1}$		$8 \mu\text{g mL}^{-1}$		$12 \mu\text{g mL}^{-1}$	
	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)
Tebutiurum	79	12	77	8	98	5
Diurum	80	7	99	3	100	4
DCA	144	3	155	1	99	2
DCPU	326	6	188	23	35	4

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos dados da tabela 12, pode-se inferir que o método possui uma boa recuperação para o diurum e tebutiurum (recuperação entre 70% e 120%) (RIBANI et al., 2004), enquanto que para o DCA a recuperação só foi adequada para o maior nível de fortificação ($12 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para o DCPU não houve nenhum nível de fortificação com boa recuperação.

Pode-se inferir que em baixa concentração o diurum se degrada a DCA e DCPU, fazendo com que haja altas recuperações dos mesmos. A hipótese de degradação do diurum quando em água se sustenta ainda pelo alargamento do pico do tebutiurum, o que indicaria a presença de outro metabólito do diurum, o DCPMU.

Dessa forma, a baixa concentração seria um fator que favorece a hidrólise do diurom, que é uma das formas de degradação deste pesticida em água (BACIGALUPO; MERONI, 2007).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se obter as curvas analíticas dos analitos no solvente e em água de rio. Da mesma forma, foi possível o estudo dos mecanismos da ordem de eluição das substâncias, e a otimização da separação cromatográfica, e também do método de extração por SPE que não foi eficaz apenas para uma substância, o DCPU, mas que foi muito eficaz para as substâncias de maior interesse (tebutiurum, diurom e DCA). Pôde-se também avaliar que há efeito matriz para todos os analitos. O método foi validado e considerado eficiente para o diurom e tebutiurum, e para a DCA quando em concentração maiores de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. O estudo também indica que a degradação do diurom por hidrólise em água é favorecida a baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- BACIGALUPO; MERONI, M. M. A.; MERONI, G. Quantitative determination of diurom in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diurom, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, n. 55, p. 3823-3828, 2007.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BERNARDES, A. C. M.; SOUZA, S. V. C. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos proposto pela ANVISA (Renº 899 de 2003) com o documento orientativo do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC INTERNACIONAL, ISO E IUPAC. **Analytica**, n. 51, p. 66-77, 2011.
- BORGES, E. N. **Dicloro Difenil Tricloetano (DDT) - vindas e idas de sua história para contextualizar o ensino de Química**. 2011. 23 f. Monografia (Licenciatura em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- BOTI; SAKKAS; ALBANIS, V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples part I: ultrasonic extration from diverse sediment matrices. **Journal of Chromatography A**, n. 1146, p. 139-147, Feb. 2007.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatografica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. **Analytica**, n. 34, p. 48-55, abr./maio 2008.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- CERDEIRA, A. L. et al. Leaching and half-life of the herbicide tebutiurrom on a recharge area of Guarany aquifer in sugarcane fields in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, n. 42, p. 635-639, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-açúcar safra 2012/2013 segundo levantamento agosto de 2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_08_10_14_57_19_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2012.
- DORNELAS DE SOUZA, M. et al. Adsorção e lixiviação de tebutiurrom em três tipos de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 25, p. 1053-1061, 2001.
- EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide information profile. tebuthiron**. Disponível em: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/tebutiurrom-ext.html>>. Acesso em: 15 abr. 2011.
- EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide information profile. diurom**. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/diurom.htm>> . Acesso em: 15 abr. 2011.
- FERNANDES, G. S. A. et al. Effects of diurom on male rat reproductive organs: a developmental and postnatal study. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, n. 75, p. 1059–1069, 2012.
- FIELD, J. A. et al. Diurom and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3897-3902, 1997.

FRANCO, S. **Otimização, validação e aplicação de método para análise de diurom e seus metabólitos em urina de ratos utilizando SPE e HPLC-DAD**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

GATIDOU, G. G. et al Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diurom and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, n. 528, p. 89-99, Nov. 2005.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. **Food Control**, n. 25, p. 607-616, 2012.

KOLPIN, D. W.; BARBASH, J. E.; GILLIOM, R. J. Occurrence of pesticides in Shallow Groundwater of the United States: initial results from the national water-quality assessment program. **Environmental Science & Technology**, v.32, n.5, p. 558-566, 1998.

LANDRY, D. ; DOUSSET, S.; ANDREUX, F. Leaching of oryzalin and diurom through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. **Chemosphere**, n. 62, p. 1735-1747, 2006.

LISSALDE, S. et al. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, p. 1492–1502, 2011.

LOURENCETTI, C.; MARCHI, M. R. R.; RIBEIRO, M. L. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. **Talanta**, n.77, p.701-709, 2008.

MARAGOU, N. C.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS M. A. Optimization and comparison of ESI and APCI LC-MS/MS methods: a case study of irgarol 1051, diurom, and their degradation products in environmental samples, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, n. 22, p. 1826-1838, 2011.

MOU, R-X.; CHEN, M-X.; ZHI, J-L. Simultaneous determination of 15 phenylurea herbicides in rice and corn using HPLC with fluorescence detection combined with UV decomposition and post-column derivatization. **Journal of Chromatography B**, n. 875, p. 437-443, 2008.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1190-1198, 2008.

PHENOMENEX. **SPE brand**: Strata-X with phase: X, polymeric reversed phase. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>>. Acesso em: 22 nov. 2012

PIMENTEL, L. C. F. et al. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1138-1149, 2006.

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

RIBEIRO, M. L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

SACK, C. et al. Collaborative validation of the QuEChERS procedure for the determination of pesticides in food by LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, n. 59, p. 6383-6411, 2011.

SANTOS, S. P. **A química dos inseticidas**: parte I. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_085_043_09.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2011.

SCRIBNER, E. A.; THURMAN, E. M.; ZIMMERMAN, L. R. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. **The Science of the Total Environment**, n. 248, p.157-167, 2000.

SOUZA, E.L.C. et al. Comportamento do tebutiurum em solo de cultivo de cana-de-açúcar utilizando lisímetro de drenagem modificado. **Planta Daninha**, v. 26, n.1, p. 157-163, 2008.

THEIR, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Chemie, 1987.

THOMAS, K. V.; McHUGH, M.; WALDOCK, M. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, n. 293, p.117-127, 2002.

TOFOLI, G. R. et al. Dinâmica do tebutiurum em palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 27, n.4, p. 815-821, 2009.

VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F.; AUGUSTO, F. **Análise quantitativa por cromatografia**. 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>>. Acesso em : 05 mar. 2012.

VAN DAM, R. A. et al. Ecological risk assessment of tebutiurum following application on Tropical Australian Wetlands. **Human and Ecological Risk Assessment**, n.10, p.1069-1097, 2004.

VERCRAENE-EAIRMAL, M. et al. Diurom biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. **Chemosphere**, n. 81, p. 837–843. 2010.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p.1-749, 2004.

WANG, Y.; XIAO, L.; CHENG, M. Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, p. 9115-9119, 2011.

ZAPPAROLI, R. A. et al. Quantificação do herbicida tebutiurum em solo sob diferentes sistemas de cultivo de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Resumos...** Londrina: SBCPD, 2010.

ZHANG, K. et al. Multiresidue pesticide analysis of agricultural commodities using acetonitrile salt-out extraction, dispersive solid-phase sample clean-up, and high-performance liquid chromatography_tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, n. 59, p.7636-7646, 2011.