

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL — PPGQTA LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E METAIS- LACOM

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO QUECHERS MODIFICADO, LC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maicon Renato Ferreira Sampaio

Rio Grande - RS, Brasil 2011

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO QUECHERS MODIFICADO, LC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

por

Maicon Renato Ferreira Sampaio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, RS, Brasil 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL - PPGQTA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO QUECHERS MODIFICADO, LC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

elaborada por **Maicon Renato Ferreira Sampaio**

como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Comissão Examinadora	
Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (Orientador - Presidente)	
Prof ^a . Dr ^a . Martha Bohrer Adaime (UFSM	
Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (FURG)	

Rio Grande, 28 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela orientação, pelo apoio, incentivo e amizade. Por acreditar na minha capacidade, por todas as sugestões durante o trabalho e pelo aprendizado que vou levar para minha vida profissional. Muito obrigado!

À **Prof** ^a. **Dr** ^a. **Martha Bohrer Adaime**, pela disponibilidade em participar na defesa da dissertação e agradeço por contribuir com suas sugestões para o trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte** pela participação e sugestões no exame de qualificação, na defesa da dissertação e pelos ensinamentos nos seminários e nas discussões no laboratório.

Ao **Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves** pela co-orientação, pelas contribuições no exame de qualificação e pelo aprendizado enquanto professor.

À minha mãe **Teresinha** e minha avó **Dina**, pelo amor, pelo apoio, pela educação. Vocês sempre me apoiaram nos estudos e nunca me deixaram faltar nada. Obrigado por tudo. Amo vocês com todo o meu coração!

Ao meu amigo, **Leandro**, que sempre esteve me apoiando na vida e ajudando durante toda minha vida acadêmica. Obrigado por tudo!

Às minhas amigas e colegas **Débora e Liziane**, onde juntos éramos os "sombras", com vocês aprendi muito, obrigado pela amizade, pelas contribuições no trabalho, tanto na parte experimental como na parte teórica. Vou sentir saudade de vocês. Obrigado por tudo!

À minha amiga **Sergi**, pela receptividade, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência e, pela disposição em me ajudar em todos os momentos. Obrigado por tudo!

Aos colegas do LACOM com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas, tenho um carinho muito grande por todos: **Jaqueline**, **Sherol**, **Vivi**, **Márcia**, **Fabi**, **Liziara**, **Adriana**, **Bruno Meira**, **Bruno Guimarães**, **Maria**, **Augusto**, **Natiele**, **Guilherme**, **Ana Luíza**, **Laura**, **Adriele**, **Marcelo**, **Pérsia**,

Juliana, Luis, Sergi, Maristela, Cátia, Ednei, Ana Laura, Fábio, Renata, Liziane e Débora.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, pelos momentos vividos durante o decorrer desses dois anos. Em especial, agradeço à Eliete e a Ana Paula pela amizade no decorrer das disciplinas e nas discussões sobre nossos trabalhos, obrigado, vocês são muito especiais para mim.

À **FURG** pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica, proporcionando-me esta realização e formação com qualidade.

Agradeço aos funcionários da EQA, em especial ao Diego e à Suelem da Secretaria da PPGQTA por prestarem ajuda de diversas formas.

Agradeço a **Deus** pela minha vida, proteção e por mais uma vitória.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQTA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO QUECHERS
MODIFICADO, LC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: MAICON RENATO FERREIRA SAMPAIO ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL Rio Grande, 28 de fevereiro de 2011

A cana-de-acúcar (Saccharum officinarum L) tem grande importância social e econômica. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-acúcar. A grande produção deve-se à sua múltipla utilização, principalmente na produção de álcool e açúcar. Produtos como melado e caldo de cana são alimentos obtidos da cana-deaçúcar e importante fonte de renda para pequenos produtores. No entanto, a cana-deaçúcar pode ser atacada por pragas, principalmente por ser uma cultura típica de clima tropical e por ser rica em nutrientes. Sendo assim, na cultura são usados agrotóxicos e esta representa o terceiro lugar no consumo de agrotóxicos no Brasil. O uso muitas vezes, indiscriminado destes, bem como o descumprimento das boas práticas agrícolas podem afetar a segurança alimentar. Neste caso, pode ser observada a ocorrência de resíduos de agrotóxicos nos derivados alimentícios da cana-de-acúcar. Neste trabalho, a determinação dos agrotóxicos 2,4-D, diurom e fipronil utilizando LC-DAD e determinação dos agrotóxicos atrazina, simazina, fipronil, carbofurano, clomazona, tiametoxam, imidacloprido, imazapique, diurom e 2,4-D em melado e caldo de cana por LC-ESI-MS/MS empregaram QuEChERS modificado como preparo de amostra. Para o método empregando QuEChERS modificado foram utilizados 10,0 g de amostra (melado) ou 10 mL (caldo de cana), 4,0 g de MgSO₄ anidro e 5.0 mL de acetonitrila. Todas as curvas analíticas utilizando ambos detectores apresentaram valores de r maiores que 0,99. Os LOQs para o método, usando LC-DAD variaram entre 0,05 - 0,3125 mg kg⁻¹ para o melado e 0,025 - 0,1 mg L⁻¹ para o caldo de cana. As recuperações foram entre 63,3 – 120,0% e RSD menor que 15,1%. Para o sistema LC-ESI-MS/MS, LOQs para o método variaram entre 0,0005 - 0,05 mg kg⁻¹ para o melado e 0,0005 - 0,05 mg L⁻¹ para o caldo de cana. As recuperações foram entre 60,0 e 120,0% para a repetitividade e entre 65,7 e 104,8% para a precisão intermediária, com RSD menor que 20,4% para todas as substâncias. Com relação ao efeito de matriz (EM) avaliado para todos os analitos, observou-se EM, principalmente usando LC-ESI-MS/MS. Entretanto, os EM para ambos os métodos foram compensados com calibração por superposição na matriz. Os métodos apresentaram vantagens em relação aos métodos tradicionais de preparo de amostra como pouca exposição do analista à solventes, rapidez na execução e utilização de pouco volume de solvente orgânico. Os limites de quantificação dos métodos, principalmente no LC-ESI-MS/MS ficaram abaixo dos limites máximos de resíduos permitidos pela legislação brasileira para agrotóxicos em cana-de-acúcar, sendo que não há limites máximos de resíduos estabelecidos para alimentos derivados da cana-de-açúcar. O método empregando QuEChERS foi aplicado para determinação de resíduos destes agrotóxicos em amostras de melado e caldo provenientes de Santo Antônio da Patrulha, RS. Resíduos de agrotóxicos não foram detectados nas amostras analisadas.

Palavras-chave: agrotóxicos; melado, caldo de cana-de-açúcar; QuEChERS; LC-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQTA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHODS USING MODIFIED,
QuECHERS, LC-DAD AND LC-ESI-MS/MS FOR THE DETERMINATION OF
PESTICIDE IN SUGARCANE DERIVATIVES
AUTHOR: MAICON RENATO FERREIRA SAMPAIO
ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.
February 28th, 2011, Rio Grande, RS, Brazil

The sugarcane (Saccharum officinarum L) has great social and economic importance. Brazil is the world's largest producer of sugarcane. Large production due to its multiple use, particularly in the production of ethanol and sugar. Products such as honey and juice are foods derived from sugarcane and important source of income for small producers. However, the sugarcane may be attacked by pests, mainly because it is a typical culture of tropical country and it is rich in nutrients. So pesticides are used in culture and this is the third in the consumption of pesticides in Brazil. Use often indiscriminate these as well as a breach of good agricultural practices can affect food safety. In this case, can be observed the occurrence of pesticide residues in food derived from sugarcane. In this study, the determination of the pesticides 2,4-D, diuron and fipronil in using LC-DAD and determination the pestides atrazine, simazine, fipronil, carbofuran, clomazone, thiamethoxam, imidaclopride, imazapic, diuron e 2,4-D in honey and juice sugarcane by LC-ESI-MS/MS using modified QuEChERS as sample preparation. For the method employing modified QuEChERS were used 10.0 g of sample (honey) or 10 mL (sugarcane juice), 4.0 g MgSO₄ and 5.0 mL of acetonitrile were used. All calibration curves for the both detectors showed r values higher than 0.99. The LOQs of the method using LC-DAD ranged from 0.05 to 0.3125 mg kg⁻¹ for the honey from 0.025 to 0.1 mg L⁻¹ for the juice. The recoveries were between 63.3 to 120.0% and RSD less than 15.1%. For LC-ESI-MS/MS system, LOQs for the method ranged from 0.0005 to 0.05 mg kg⁻¹ for honey and from 0.0005 to 0.05mg L⁻¹ for sugarcane juice. The recoveries were between 60.0 to 120.0% for repeatability and between 65.7 and 104.8% for intermediate precision, with RSD less than 20.4% for all substances. Regarding to the Matrix Effect (ME) which was evaluated for all analytes, was observed ME, principally using LC-ESI-MS/MS, the ME for both methods was compensated with matrix-matched calibration. The methods showed advantages over traditional methods of sample preparation such little exposure for the solvents of the analyst, speed of execution and use of a low volume of organic solvent. The limits of quantification of methods, particularly in the LC-ESI-MS/MS were below the maximum residue limits allowed by Brazilian legislation for pesticides in sugarcane, and there are not maximum residue limits established for foods derived from sugarcane. The method employing QuEChERS was applied for determination of pesticide residues in samples of honey and juice from Santo Antonio da Patrulha, RS. Pesticide residues were not detected in the samples.

Keywords: pesticides; honey, juice sugarcane; QuEChERS; LC-ESI-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas do ataque de broca na cultura de cana-de-açúcar. Fonte (EMBRAPA, 2010)	16
Figura 2. Vendas de agrotóxicos (principais culturas) no ano de 2009, Valor - US\$ 1.000 (SINDAG, 2010).	18
Figura 3. Fluxograma representativo do método QuEChERS original (Adaptado de ANASTASIADES <i>et al.</i> , 2003).	27
Figura 4. Diagrama de um detector de arranjo de diodos (Adaptado de SCOTT, 2003 b).	33
Figura 5. Componentes básicos de um espectrômetro de massas hifenizado com sistema LC (Adaptado de HARRIS, 2008)	38
Figura 6. Sistema de espectrometria de massas em tandem (Adaptado de SKOOG, et al., 2009).	39
Figura 7. Diferentes respostas para o agrotóxico acetamiprido em solvente e em diferentes extratos de alimentos (Adaptado de FERNANDEZ-ALBA, 2005)	41
Figura 8. Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LD e LQ (Adaptado de KURZ, 2007)	56
Figura 9. Composições de fase móvel e vazões testadas no LC-DAD (a) MeOH:água pH 3,0 (50:50 v/v), (b) MeOH:água pH 3,0 (60:40 v/v), (c) MeOH:água pH 3,0 (65:35 v/v); coluna analítica C18 15 cm, eluição no modo isocrático, vazão 1 mL min ⁻¹	59
Figura 10. Composições de fase móvel e vazões na otimização da separação dos agrotóxicos por LC-DAD: (a) MeOH:água pH 3,0 (68:32 v/v), (b) MeOH:água pH 3,0 (65:35 v/v); coluna analítica C18 25 cm, eluição no modo isocrático, vazão 1 mL min ⁻¹	60
Figura 11. (a) Espectro de absorção característico para cada analito no LC-DAD. (b) Cromatograma de uma solução contendo 5 mg L ⁻¹ da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD	61
Figura 12. Cromatogramas de uma solução analítica da mistura dos agrotóxicos na concentração 10 mg L ⁻¹ em MeOH, usando como fase móvel metanol:água ultrapura pH 3,0 (a) e metanol:água ultrapura em modo de eluição por gradiente (b)	63
Figura 13. Espectros de absorção característicos obtidos por LC-DAD de uma solução analítica contendo 10 mg L ⁻¹ de cada agrotóxico: (a) 2,4-D , (b) diurom e (c) fipronil	64
Figura 14. Cromatogramas no modo MRM contendo a fragmentação monitorada para quantificação	68
Figura 15. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando diferentes massas de amostra; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg ⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%	69

Figura 16. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando diferentes solventes de extração; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg ⁻¹); 5,0 mL de solvente. As barras de erro indicam valores de RSD%	71
Figura 17. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando QuEChERS com e sem NaCl; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg ⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%	72
Figura 18. Método QuEChERS modificado, no nível de 5,0 mg kg ⁻¹ , com e sem emprego da etapa de <i>clean-up</i> para a matriz de melado. (nível de 5,0 mg kg ⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%	73
Figura 19. (a) Cromatogramas do extrato branco da matriz caldo de cana extraído por QuEChERS; (b) Cromatogramas obtidos para a mistura dos analitos no nível 2,5 mg L ⁻¹ após QuEChERS sem <i>clean-up</i> ; (c) Procedimento QuEChERS com <i>clean-up</i> ;	74
Figura 20. Comparação entre o método QuEChERS modificado, no nível de 5,0 mg kg⁻¹, com a amostra aquecida a 105℃, resfriada a temperatura ambiente e extraída e a amostra extraída sem aquecimento anterior. As barras de erro indicam valores de RSD%	76
Figura 21. Percentual de efeito matriz (%EM) para o método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/ MS para determinação de agrotóxicos em melado e em caldo de cana, concentração esperada 1 mg L ⁻¹	77
Figura 22. Comparação do percentual de efeito matriz (EM%) na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ , utilizando QuEChERS modificado e determinação por LC-DAD em melado e caldo de cana.	77
Figura 23. Cromatograma do íon total (TIC) para a mistura dos 10 agrotóxicos na concentração de 1 mg L ⁻¹ (a) modo de ionização positiva (ESI +) (b) modo de ionização negativa (ESI -)	78
Figura 24. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS modificado	79
Figura 25. Comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas no extrato branco da matriz de melado e no solvente (a) 2,4-D (b) fipronil (c) diurom	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes da cana-de-açúcar	5
Tabela 2. Dados da produção nacional de cana-de-açúcar, em toneladas, por estados brasileiros na safra 2008/2009	6
Tabela 3. Vendas de defensivos agrícolas, por classes, no ano de 2009	.14
Tabela 4. Classificação dos agrotóxicos em relação a sua toxicidade	.15
Tabela 5. Condições cromatográficas otimizadas para as determinações por LC-DAD	.65
Tabela 6. Condições de fragmentação para determinação dos agrotóxicos no espectrômetro de massas	.67
Tabela 7. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-DAD para ambas matrizes	.80
Tabela 8. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-ESI-MS/MS para ambas matrizes	.81
Tabela 9. Limites de detecção e quantificação instrumental (mg L ⁻¹) e dos métodos (mg kg ⁻¹ melado e mg L ⁻¹ caldo)	.83
Tabela 10. Limites de detecção e quantificação do método (mg kg ⁻¹) melado, mg L ⁻¹ (caldo) e limites máximos de resíduos (mg kg ⁻¹) para os agrotóxicos em cana-de-açúcar, de acordo com a ANVISA	.84
Tabela 11. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) do método empregando QuEChERS e LC-DAD para os agrotóxicos (2,4-D, diurom e fipronil) em amostras de melado e caldo de cana fortificadas em diferentes níveis	.86
Tabela 12. Recuperação R(%), precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-DAD para os agrotóxicos (2,4-D, diurom e fipronil) em amostras de melado e caldo de cana	.86
Tabela 13. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de melado fortificadas em diferentes níveis	.87
Tabela 14. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de caldo de cana fortificadas em diferentes níveis	.88
Tabela 15. Classe, grupo químico, LMR e intervalo de segurança para os agrotóxicos selecionados para estudo.	102
Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4,5-T - ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

C18 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C18

C8 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C8

CAS - Chemical Abstracts Service

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CODEX - Codex Alimentarius

CCPR - Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues

d.i. - diâmetro interno

DAD - Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês Diode Array Detection

DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

DL - dose letal

DLLME - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive* Liquid-Liquid Extraction

DLLME-IL - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva com líquidos iônicos

DSPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês Electron-Capture Detection

EM – Efeito de Matriz, do inglês *matrix effect*

EMATER- Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI - Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

FAO - Food Agriculture Organization

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

HCB- hexaclorobenzeno

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

LC-DAD - Cromatografia Líquida acoplada a Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Liquid Chromatography Diode Array Detection*

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês Liquid-Liquid Extraction

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification

m/z - razão massa-por-carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MASE- Extração com membrana assistida por solvente, do inglês *membrane* assisted solvent extraction

MCPA - ácido 4-cloro-2-metil fenoxiacético

MRM - Monitoramento de Múltiplas Reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*

NCI – ionização química negativa

OCLLE - Extração líquido-líquido em coluna, do inglês *On-column liquid-liquid extraction*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PDA – Detector por arranjo de fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*

PSA - Amina primária secundária, do inglês Primary Secondary Amine

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Eficiênte, Robusto e Seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

r - Coeficiente de correlação linear

R - Recuperação

rpm - rotação por minuto

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation

SBSE- extração sortiva em barra de agitação, do inglês stir bar sorptive extraction

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPME- Microextração em fase sólida dispersiva, do inglês solid-phase microextraction

t_R - tempo de retenção

US-EPA- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States – Environmental Protection Agency.*

UV - ultravioleta

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 CANA-DE-AÇÚCAR	4
3.1.1 Aspectos gerais e composição química	4
3.1.2 Produção e importância sócio-econômica	5
3.1.3 Produtos derivados da cana-de-açúcar	6
3.1.3.1 Melado ou mel de engenho	7
3.1.3.2 Caldo de cana-de-açúcar ou garapa	8
3.1.4 Contaminação da cana-de-açúcar e problemas de saúde pública	8
3.2 AGROTÓXICOS	10
3.2.1 Classificação	11
3.2.2 Histórico e consumo	12
3.2.3 Toxicidade	14
3.2.4 Uso de agrotóxicos na cultura da cana-de-açúcar	16
3.2.5 Agrotóxicos selecionados para o estudo	18
3.2.5.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	18
3.2.5.2 Simazina	19
3.2.5.3 Atrazina	20
3.2.5.4 Diurom	21
3.2.5.5 Fipronil	21
3.2.5.6 Imidacloprido	22
3.2.5.7 Tiametoxam	22
3.2.5.8 Carbofurano	23
3.2.5.9 Clomazona	24
3.2.5.10 Imazapique	25
3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM	
ALIMENTOS	25
3.3.1 Método QuEChERS	27
3.3.1.1 Solvente de extração	28
3.3.1.2 Adição de sais	29
3.3.1.3 Padrão interno	29

3.3.1.4 <i>Clean-up</i>	30
3.3.1.5 Aspectos gerais do método QuEChERS	30
3.3.1.6 Aplicações do método QuEChERS para matrizes de alimentos	31
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE	
DIODOS	32
3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE	
MASSAS	36
3.5.1 Fontes de ionização	38
3.5.2 Monitoramento de Reações Múltiplas	
3.5.3 Detector	40
3.6 EFEITO DE MATRIZ EM LC-DAD E LC-ESI-MS/MS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	42
4.2 REAGENTES, SOLVENTES, ADSORVENTES E MATERIAIS	43
4.3 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS PARA ESTUDO	44
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	45
4.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DOS	
ANALITOS	46
4.5.1 Preparo e escolha da fase móvel	47
4.5.2 Vazão da fase móvel	48
4.5.3 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção	48
4.6 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-ESI-MS/MS	48
4.6.1 Preparo e escolha da fase móvel	48
4.6.2 Acidificação da fase móvel	49
4.6.3 Condições do sistema de detecção	49
4.7. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO QUECHERS MODIFICADO	50
4.7.1 Amostras de melado	50
4.7.2 Amostras de caldo de cana	50
4.7.3 Acidificação da amostra	51
4.7.4 Massa de amostra	52
4.7.5 Seleção do solvente de extração	
4.7.6 Influência da adição de NaCl	
4.7.7 Avaliação da etapa de <i>clean-up</i>	53
4.7.8 Influência da temperatura	54

4.8 EFEITO DE MATRIZ EMPREGANDO QUECHERS MODIFICADO	54
4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	54
4.9.1 Curva analítica e linearidade	55
4.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação	55
4.9.3 Exatidão	56
4.9.4 Precisão	57
4.9.5 Robustez	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A	
DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS POR LC-DAD	58
5.1.1 Composição da fase móvel	58
5.1.2 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção	63
5.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-ESI-MS/MS PARA	
DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS	65
5.2.1 Acidificação da fase móvel	65
5.2.2 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no	
espectrômetro de massas	66
5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA	68
5.3.1 Massa de amostra	68
5.3.2 Seleção do solvente de extração	
5.3.3 Influência da adição NaCl na recuperação dos analitos	71
5.3.4 Avaliação da influência da etapa de <i>clean-up</i> na exatidão do método	72
5.3.5 Influência da temperatura	74
5.3.6 Efeito de matriz empregando QuEChERS modificado	76
5.3.7 Procedimento QuEChERS otimizado	78
5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS	79
5.4.1 Curva analítica e linearidade	79
5.4.2 Limites de detecção e limites de quantificação	82
5.4.3 Exatidão	84
5.4.4 Precisão	85
5.4.5 Robustez	89
5.5 APLICABILIDADE	89
6. CONCLUSÕES	89
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91

8. TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS	91
9. REFERÊNCIAS	91
10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO	101
ANEXO 1	102

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L*) é uma cultura bastante difundida no Brasil, sendo industrialmente utilizada para produção de açúcar e álcool. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, onde cerca de 55% da cana brasileira transforma-se em álcool e 45% em açúcar (UNICA, 2010).

Além disso, derivados artesanais são produzidos a partir da cana-de-açúcar como cachaça, rapadura, melado, açúcar mascavo e caldo da cana. Estes produtos são uma importante fonte de renda para pequenos produtores. No entanto, a cana-de-açúcar é atacada por várias pragas, tanto no caule quanto, nas folhas e nas raízes, prejudicando a produtividade agrícola (EMBRAPA, 2010). Para contornar este problema são usados agrotóxicos e o uso, muitas vezes, indiscriminado destes, bem como o descumprimento das boas práticas agrícolas podem afetar a segurança alimentar. Neste caso, pode ser observada a ocorrência de resíduos de agrotóxicos nos derivados alimentícios da cana-de-açúcar como melado, caldo de cana, rapadura, entre outros. Uma vez que algumas substâncias usadas como agrotóxicos são sistêmicas e podem penetrar na seiva da planta, não ficando apenas na superfície.

O Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos. A cultura da cana-de-açúcar representa o terceiro lugar no consumo de agrotóxicos no Brasil (SINDAG, 2010). Além disso, a ANVISA estabelece limites máximos de resíduos de agrotóxicos na cana-de-açúcar, porém não há uma legislação específica para alimentos derivados da cana-de-açúcar.

Por isso, a determinação de resíduos de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar é importante e esta prática é dependente de métodos eficientes de extração e análise que atendam às exigências das legislações da área. Na maioria dos casos, as análises qualitativas e quantitativas incluem uma etapa preliminar de preparo da amostra, a qual é fundamental para garantir a eficiência do processo analítico. A etapa de preparo de amostra em um método analítico é dependente das características da matriz, das propriedades do analito e do nível de concentração da substância a ser determinada. Alguns produtos como melado e caldo de cana apresentam uma

matriz complexa, rica em açúcares, além de conter sais, minerais, pigmentos que podem ocasionar problemas durante o preparo de amostra bem como na determinação. Em geral, as etapas típicas incluídas no preparo da amostra são: amostragem, homogeneização, extração, clean-up e pré-concentração, seguido pela determinação do analito. Nos últimos anos o método QuEChERS vem sendo amplamente utilizado para a extração de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos. Este método combina processos de extração, partição, tamponamento e clean-up, empregando pouco volume de solventes orgânicos e não expõe o analista diretamente aos solventes.

Para determinação de agrotóxicos podem ser empregadas técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa. Essas técnicas podem ser acopladas a diferentes detectores, como ultravioleta, fluorescência, sendo que maiores seletividade e sensibilidade são alcançadas pelo acoplamento com a espectrometria de massas.

O desenvolvimento de métodos para análise de agrotóxicos em alimentos que apresentem maior sensibilidade e seletividade, que utilizem pequeno volume de solventes orgânicos, que sejam rápidos e simples na execução, exemplifica o papel fundamental da Química Analítica na questão da segurança alimentar.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar métodos para determinar resíduos de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar empregando o método QuEChERS modificado e cromatografia líquida acoplada ao detector por arranjo de diodos e cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massas, tandem, espectrometria de massas.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar os principais agrotóxicos empregados na cultura de cana-deaçúcar;
- Testar diferentes composições de fase móvel e colunas analíticas de diferentes dimensões a fim de obter a melhor separação dos analitos no LC-DAD:
- Adaptar os parâmetros instrumentais do LC-ESI-MS/MS como, por exemplo, fase móvel, pH, vazão, energia do cone, energia de colisão, temperatura da fonte e fluxo do gás de dessolvatação;
 - Propor modificações no método QuEChERS;
- Validar os métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação dos agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar, avaliando a influência do efeito de matriz (EM) na exatidão dos métodos:
- Demonstrar a aplicabilidade do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS na determinação de resíduos de agrotóxicos em melado e caldo de cana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

3.1.1 Aspectos gerais e composição química

Originária do sudeste da Ásia, a cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil, inicialmente, na região Nordeste através da criação de engenhos de açúcar e atingiu o estado de São Paulo após o ano de 1615, sendo este estado o principal produtor da cultura no país. Nos últimos anos, com o uso do etanol, essa cultura disseminou-se por quase todos os estados brasileiros, estabelecendo-se nos mais diferentes tipos de solos (AGROBYTE, 2010).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea, botanicamente, classificada na classe *Monocotiledonea* e gênero *Saccharum*, sendo que dentre as 30 espécies conhecidas, a espécie *Saccharum officinarum* é a mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais e mais explorada economicamente em função de suas características como altos teores de sacarose, porte elevado, colmos grossos e pouco teor de fibra (EMBRAPA, 2010; SANTOS *et al.*, 2006).

A cultura compõe-se, essencialmente, de duas partes: uma subterrânea, formada pelos rizomas e pelas raízes e outra aérea constituída pelo colmo, folhas e flores. O colmo é constituído de nós e entrenós e é um sistema de duas fases: sólida e líquida. A fase sólida é um complexo composto de celulose, lignina e pentosanas, conhecida geralmente como fibra. Na fase líquida, o caldo contém uma grande variedade de substâncias orgânicas, entre as quais, aproximadamente 90% são sacarose (SANTOS *et al.*, 2006). Os principais constituintes sólidos solúveis da cana-de-açúcar são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais constituintes da cana-de-açúcar

Constituintes	Sólidos solúveis (%)
Açúcares totais	75 a 93
Sacarose	70 a 91
Glicose	2 a 4
Frutose	2 a 4
Sais totais	3 a 5
Sais de ácidos inorgânicos	1,5 a 4,5
Sais de ácidos orgânicos	1,0 a 3,0
Proteínas	0,5 a 0,6
Amido	0,001 a 0,05
Gomas	0,3 a 0,6
Ceras e graxas	0,05 a 0,15
Corantes	3 a 5

Fonte: (SANTOS et al., 2006).

3.1.2 Produção e importância sócio-econômica

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China, segundo dados oficiais da Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação (*Food and Agriculture Organization-* FAO) (FAO, 2010).

Os últimos dados sobre a produção nacional apontam 569.062.629 toneladas na safra 2008/2009, com mais de sete milhões de hectares plantados. A Tabela 2 apresenta dados estatísticos da produção na safra 2008/2009 por estado. São Paulo é o maior produtor, com uma área de 4,45 milhões de hectares disponíveis para colheita. O Rio Grande do Sul foi o estado que apresentou a menor produção na mesma safra (UNICA, 2010). No Rio Grande do Sul cidades como Santo Antônio da Patrulha, Viamão, Gravataí tem na produção de cana-de-açúcar uma importante fonte de renda para economia local (IBGE, 2008).

Tabela 2. Dados da produção nacional de cana-de-açúcar, em toneladas, por estados brasileiros na safra 2008/2009

Estado	Produção em toneladas
São Paulo	346.292.969
Paraná	44.829.652
Minas Gerais	42.480.968
Goiás	29.486.508
Mato Grosso	15.283.134
Mato Grosso do Sul	18.090.388
Rio Grande do Sul	107.184

Fonte: (UNICA, 2010)

A grande produtividade brasileira da cana-de-açúcar está ligada a importância desta cultura com relação a sua múltipla utilização. Além de matéria-prima para a produção de álcool e açúcar, os subprodutos e resíduos da cana-de-açúcar são utilizados para geração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras, bem como, matéria prima para a fabricação de produtos artesanais como garapa ou caldo de cana, açúcar mascavo, rapadura, melado, aguardente, entre outros (AGROBYTE, 2010). Além disso, podem ser produzidos plásticos a partir do etanol de cana-deaçúcar, que podem ser reutilizados após um processo de reciclagem. Adicionalmente, biodegradáveis polímeros produzidos por alimentadas por sacarose e outras substâncias estão na linha de frente de pesquisas e investimentos anunciados por grandes empresas do ramo petroquímico (ERENO, 2007).

3.1.3 Produtos derivados da cana-de-açúcar

Produtos como o caldo de cana in natura, melado, rapadura, cachaça, entre outros, produzidos a partir do caldo de cana, são tradicionalmente consumidos pelas populações em países tropicais como o Brasil e países da América Central (GARBELLINI, 2005). A cachaça, por exemplo, é a bebida destilada mais consumida no Brasil, segundo dados do IBRAC (IBRAC, 2010).

Os derivados artesanais como melado e rapadura são importante fonte de renda para produtores de cana-de-açúcar (GARBELLINI, 2005).

Para a produção de derivados artesanais, a cana deve ter um maior teor de açúcar. O teor e a pureza do açúcar (sacarose) na cana dependem e variam de acordo com as condições do clima, fertilidade do solo, qualidade do solo e propriedade da adubação, variedade da cana, idade do canavial, etc. (CARVALHO, 2007).

3.1.3.1 Melado ou mel de engenho

A Resolução 12/35 de 1978 da comissão nacional de normas e padrões para alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde define melado, também chamado de mel de engenho, como um líquido xaroposo obtido da evaporação do caldo de cana-de-açúcar, até atingir um teor de sólidos (°Brix) entre 65 e 75%. Também pode ser obtido a partir da rapadura através de processos tecnológicos adequados. A temperatura necessária para atingir o teor de sólidos é entre 105 e 110 °C (CNNPA, 2010). O melado de cana-de-acúcar apresenta uma matriz complexa rica em carboidratos, além de conter proteínas, minerais como cálcio e ferro, vitaminas, além de antioxidantes naturais como os flavonóides. A quantidade de melado obtida depende da riqueza em sacarose da cana e do peso de caldo extraído por tonelada de cana. O valor esperado de produção está compreendido na faixa entre 126 e 203 kg ton-1 de cana. Na produção de melado, cujo açúcar não cristalize e para conservação utiliza-se ácido cítrico (grau alimentar) na proporção de 75 g para 100 L de caldo. O uso do ácido cítrico, além de ser um alvejante, permite que ocorra a reação de inversão de parte da sacarose em açúcares redutores, com isto o melado produzido desse modo terá um teor de açúcares redutores de cerca de 20% e pH em torno de 4,0, o que é desejável na produção de melado (CARVALHO, 2007; SILVA et al., 2003).

3.1.3.2 Caldo de cana-de-açúcar ou garapa

O caldo de cana-de-açúcar é uma bebida energética, e seu conteúdo energético está diretamente ligado ao elevado teor de açúcar (TFOUNI *et al.*, 2009). O caldo é a matéria-prima utilizada na fabricação de açúcar mascavo e melado, constituído em média por 80% de água e 20% de sólidos solúveis (CARVALHO, 2007). O caldo conserva todos os nutrientes da cana-de-açúcar, entre ele minerais (de 3 a 5%) como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio e cloro, além de vitaminas do complexo B e C. A planta contém ainda glicose (de 2% a 4%), frutose (de 2% a 4%), proteínas (0,5% a 0,6%), amido (0,001% a 0,05%) ceras e graxas (0,05% a 0,015%) e corantes (clorofila, sacaretina e antocianinas, entre 3% a 5%). O caldo tem a sua composição dependente da cana que lhe deu origem (FAVA, 2004).

A bebida conhecida no Brasil como garapa é extraída de colmos limpos, maduros e sadios, que não sofreram o processo de queima. Para melhorar o aspecto da bebida, sua casca pode ser raspada e o caldo coado para eliminar impurezas que podem causar turbidez. Alguns comerciantes adicionam suco de limão para adquirir o sabor cítrico, que também atua como estabilizante e alvejante. A presença de ferro pode escurecer o caldo, sendo então recomendado moenda de aço-inox. A garapa é comercializada por vendedores ambulantes, não devendo ser estocada, pois, após a sua extração adquire coloração bastante escura devido à oxidação de seus componentes (especialmente, clorofila e polifenóis). Tal fato pode influenciar negativamente o consumidor na aquisição desta bebida (PRATI et al., 2005).

3.1.4 Contaminação da cana-de-açúcar e problemas de saúde pública

A colheita da cana-de-açúcar pode ser manual ou mecanizada. Para facilitar a colheita manual, eliminando a palha e a ponteira da cana, os canaviais são queimados e a queima além da geração de gás carbônico, monóxido de carbono, particulados, gera substâncias químicas nocivas, dentre estas os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (TFOUNI *et al.*, 2009).

TFOUNI e colaboradores (2007) analisaram amostras de caldo de canade-açúcar colhidas verde e cana colhida após a queima, e também produtos intermediários e finais do processo de obtenção do açúcar de cana quanto à presença de 5 HPAs, considerados carcinogênicos. Para a determinação destes analitos foi utilizada a técnica de LC com detector de fluorescência. Os resultados evidenciaram a presença de HPAs em níveis relativamente superiores nos caldos obtidos da cana queimada, confirmando que a queima dos canaviais pode ser fonte de emissão de HPAs que podem ser transferidos para a cana-de-açúcar e derivados.

Além dos HPAs, na cultura da cana-de-açúcar são usados agrotóxicos, e o uso indiscriminado destes, assim como o desrespeito às boas práticas agrícolas podem contribuir para que agrotóxicos permitidos ou não permitidos para esta cultura estejam presentes tanto na cana-de-açúcar como nos seus derivados.

Zuin e colaboradores (2006) compararam duas técnicas de preparo de amostra: a SBSE e a MASE. Neste estudo, foi feita a determinação de 18 contaminantes orgânicos, incluindo herbicidas triazínicos como atrazina, simazina e ametrina, dimetoato e hexaclorobenzeno (HCB) em amostras de caldo de cana-de-açúcar. E nas amostras reais de caldo de cana obtidas de São Carlos (São Paulo), dentre os agrotóxicos estudados, resíduos de HCB e triazinas foram encontrados nas amostras por ambos métodos, contudo em níveis menores que os LMR estabelecidos pela ANVISA para a cana-de-açúcar. (ZUIN *et al.*, 2006). Pesquisadores do Instituto de Tecnologia dos Alimentos, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, analisaram 80 amostras de garapa coletadas em Campinas e Ribeirão Preto, a fim de verificar a contaminação por agrotóxicos.

Neste estudo foram estudados 7 ingredientes ativos, dos 64 cuja utilização é permitida para a cana-de-açúcar. A escolha considerou o fato de os agrotóxicos selecionados serem sistêmicos, ou seja, penetram na seiva da cana, e não ficam apenas na superfície. As amostras foram preparadas pelo método QuEChERS e a determinação feita por GC-ECD. Neste estudo, nenhum agrotóxico foi detectado (>LOD) nas 80 amostras analisadas (FURLANI *et al.*, 2010).

Deve-se destacar que além da presença de contaminantes químicos nos produtos derivados da cana-de-açúcar, aqueles que são obtidos diretamente da cana, como o caldo, estão suscetíveis à contaminação bacteriológica, principalmente em função do armazenamento inadequado da cana. Como o caldo é obtido diretamente da moagem da cana, é de suma importância a higienização da cana e dos equipamentos para processamento da cana, assim como os locais de estocagem da cana. Para que não ocorram problemas de saúde pública como, por exemplo, a contaminação ocorrida no Brasil, no estado de Santa Catarina, pelo transmissor da doença de chagas, em função do incorreto armazenamento da cana-de-açúcar. Neste incidente, a bebida pode ter sido contaminada com as fezes do inseto ou alguns insetos podem ter sido moídos com a cana. (FOLHA DE SÃO PAULO, 2005).

3.2 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos, defensivos químicos, pesticidas, praguicidas, remédios de planta, venenos, biocidas são algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas naturais ou sintéticas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas. (RIBAS & MATSUMURA, 2009). O termo agroquímico, aplicado em sentido mais amplo, refere-se a substâncias que são empregadas para aumentar a produção agrícola. Neste último, estão incluídos os hormônios ou reguladores de crescimento de plantas e os fertilizantes (BARBOSA, 2004).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, um corpo subsidiário da FAO, pesticida é definido como sendo "toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição /e processamento do alimento ou ração animal" (FAO, 2005). Ainda conforme BAIRD (2002), os pesticidas eliminam ou controlam o organismo alvo de alguma maneira (por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo). Todos os pesticidas químicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos.

De acordo com a legislação brasileira, através do Decreto n° 4.074, que regulamenta a lei 7802/1989, os agrotóxicos são definidos 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". (BRASIL, 2002).

Neste estudo, agrotóxico foi o termo adotado conforme BRASIL (2002) e é o termo usado em publicações e reuniões nacionais sobre o tema, como o VI Workshop de Analistas de Resíduos de Agrotóxicos do Estado do Rio Grande do Sul, realizado em Bento Gonçalves, no ano de 2009.

3.2.1 Classificação

Quanto à classificação, os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas com diferentes modos de ação e toxicidade, podendo ser classificados de acordo com o emprego, modo de ação, persistência e estrutura química. Dois grandes principais distinguem-se, os agrotóxicos de contato e sistêmicos. Os agrotóxicos de caráter sistêmico penetram na planta e movimentam-se pelo sistema vascular, um exemplo destes são os herbicidas ácidos, como o agrotóxico 2,4-D (SILVA & FAY, 2004).

Quanto ao emprego, os agrotóxicos são classificados de acordo com o organismo alvo em que agem, como inseticidas, fungicidas, herbicidas (controle de ervas daninhas), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), rodenticidas ou raticidas (controle de roedores/ratos), nematicidas (controle de nematóides), acaricidas (controle de ácaros), entre outros. (RIBAS & MATSUMURA, 2009). Quanto ao modo de ação nas pragas alvo, podem ser classificados por ingestão, contato e fumigante, sendo possível o enquadramento em mais de uma classe. Quanto à

persistência, são classificados segundo o tempo de meia vida, que é o tempo necessário, depois de aplicado, para que tenha sua eficácia reduzida à metade. Consideram-se persistências: Curta: até 90 dias; Média: de 91 a 180 dias; Longa: maior que 180 dias.

Quanto à natureza química são classificados em inorgânicos (tais como arsênio e enxofre), hoje não totalizam 10% dos produtos em uso. Os de natureza orgânica constituem o grupo de maior importância, sendo divididos em sintéticos e naturais. Os orgânicos sintéticos são, atualmente, os mais estudados devido a sua maior utilização. Podem ser classificados conforme sua estrutura química em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros. Dentre os naturais, pode-se destacar os piretros obtidos a partir de macerado de flores de *Chrysantemum* (SILVA & FAY, 2004).

Alguns cientistas têm enfatizado recentemente que as próprias plantas produzem inseticidas, com o objetivo de combater pragas que as consomem e, consequentemente, estamos expostos à concentrações muito maiores desses agrotóxicos "naturais" que os sintéticos em nossa dieta alimentar (BAIRD, 2002).

3.2.2 Histórico e consumo

O uso mais antigo de agrotóxicos de que se tem registro é a queima do enxofre para fumigar os lares gregos por volta do ano 1000 a.C. O uso do arsênio e seus compostos como inseticidas data da época dos romanos. Infelizmente, os pesticidas inorgânicos e organometálicos são geralmente bastante tóxicos para os seres humanos, especialmente nos níveis de dosagem requeridos para torná-los efetivos. Durante e após a segunda guerra mundial foram desenvolvidos muitos inseticidas orgânicos, dos quais são requeridas menores quantidades para que os produtos sejam efetivos contra as pragas (BAIRD, 2002). Dentre os agrotóxicos orgânicos sintéticos, vários deles já serviram de arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o Agente Laranja (mistura de 2,4-D e 2,4,5 T), desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a introdução de agrotóxicos orgânico sintéticos teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO et al., 2004). O DDT é um inseticida organoclorado que possui grande persistência no solo e elevada toxicidade para vários artrópodes. São substâncias insolúveis em água, de baixa volatilidade e apresentam a tendência a bioacumulação em tecidos vivos, facilitando o transporte ao longo da cadeia alimentar. Para substituição dos inseticidas organoclorados surgiram os organofosforados, que são substâncias químicas instáveis derivadas do ácido fosfórico. São substâncias menos persistentes em comparação com os organoclorados. No entanto, muitos deles têm elevada toxicidade aos mamíferos e outros animais, como pássaros. Cabe salientar, que novos inseticidas orgânicos como os piretróides apresentam menor toxicidade aos mamíferos e baixa persistência no ambiente. Já os inseticidas e fungicidas da classe química dos carbamatos são mais persistentes que os organoclorados no solo e diferem consideravelmente quanto à toxicidade aos mamíferos. (SILVA & FAY, 2004).

No Brasil, no período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78% enquanto que o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700%, no mesmo período (SPADOTTO *et al.*, 2004). Em 2008, o Brasil assumiu a liderança mundial no consumo de agrotóxicos, posição antes ocupada pelos Estados Unidos. Só o mercado de agrotóxicos movimentou mais de US\$ 7 bilhões. Os principais consumidores são estados de São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (SINDAG, 2009). O mercado brasileiro de agrotóxicos é o maior do mundo, e representa 16% do mercado mundial. Só em 2009, foram vendidas mais de 780 mil toneladas de produtos em nosso país. A Tabela 3 apresenta as vendas anuais de agrotóxicos por categoria de produto no ano de 2009.

Tabela 3. Vendas de defensivos agrícolas, por classes, no ano de 2009

Classes	Produto comercial (Toneladas)	Ingrediente ativo (Toneladas)	Valor US\$ 1.000
Total	725.577	335.816	6.625.610
Herbicidas	429.693	202.554	2.505.414
Fungicidas	89.889	37.934	1.791.477
Inseticidas	137.908	53.286	1.987.800
Acaricidas	12.281	7.968	88.195
Outros	55.806	34.074	252.724

Fonte: SINDAG, 2010

3.2.3 Toxicidade

Os agrotóxicos podem ter efeitos (toxicologia aguda ou crônica) sobre os organismos vivos, incluindo o homem. O efeito agudo se observa após o contato com uma única dose do agrotóxico, e é dependente da toxicidade da substância, da dose, do tipo de contato e do organismo em particular. O efeito crônico ocorre quando o organismo é exposto a pequenas doses de uma substância potencialmente perigosa por um longo período de tempo. A ingestão de alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos é um exemplo de exposição que pode ocasionar efeitos crônicos sobre o sistema nervoso central ou, mesmo, câncer, dependendo do tipo de substância e da quantidade ingerida (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a toxicidade aguda dos agrotóxicos é expressa em termos de valor da dose letal 50% (*Lethal Dose* 50% ou LD₅₀), que é a dose de uma substância química que provoca a morte de, pelo menos, 50% das espécies estudadas (geralmente, ratos ou camundongos), quando administrada pela mesma via, por exemplo, oral. A LD₅₀ é representada pela relação mássica, ou seja, miligramas do produto tóxico por quilograma de massa viva (m.v.). Assim, para fins de prescrição das medidas de segurança contra os riscos à saúde humana, os produtos comerciais devem ser enquadrados em função da LD₅₀, inerente a cada substância. Nesse contexto, o Ministério da Saúde divide os agrotóxicos em quatro classes toxicológicas: Classe I (extremamente tóxicos, LD₅₀ \leq 5 mg kg $^{-1}$ de m.v.), Classe II (altamente tóxicos, 5 < LD₅₀ \leq 50 mg kg $^{-1}$

de m.v.), Classe III (medianamente tóxicos, $50 < LD_{50} \le 500$ mg kg⁻¹ de m.v.) e Classe IV (pouco ou muito pouco tóxicos, $LD_{50} > 5000$ mg kg⁻¹ de m.v.).

A legislação brasileira obriga às formulações de agrotóxicos a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade, para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002). De acordo com a Tabela 4, a identificação dos rótulos desses produtos é feita por meio de faixas coloridas.

Tabela 4. Classificação dos agrotóxicos em relação a sua toxicidade.

Classe	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
1	Extremamente tóxico	Vermelho vivo
П	Altamente tóxico	Amarelo intenso
III	Mediamente tóxico	Azul intenso
IV	Pouco tóxico	Verde intenso

Fonte: ANVISA, 2005.

No que tange à legislação ambiental brasileira, a CETESB, em conjunto com o Ministério da Saúde, definiu os limites máximos permitidos para alguns agrotóxicos presentes em compartimentos ambientais, como solos e águas subterrâneas. Por outro lado, a ANVISA dispõe sobre o uso de agrotóxicos (durante o pré-plantio, o manejo e o pós-plantio) em diversos cultivares e estabelece os limites máximos de resíduos destas substâncias em alimentos. Para cada produto registrado existe um LMR permitido por lei. Esses LMR são obtidos com base em estudos realizados seguindo-se as boas práticas agrícolas. A legislação brasileira sobre resíduos de agrotóxicos tem sido aperfeiçoada nos últimos anos com base em informações fornecidas pela FAO/OMS e pelo *Codex Alimentarius* (BARBOSA, 2004).

O Codex Alimentarius define LMR como sendo a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg⁻¹), recomendado pelo comitê do Codex Alimentarius (CCPR) sobre resíduos de agrotóxicos como sendo legalmente permitido dentro do alimento ou da ração animal (PRESTES et al., 2009). As doses de agrotóxicos usadas atualmente na agricultura convencional foram elaboradas a partir da ingestão diária aceitável. Segundo esse

paradigma, o organismo humano pode ingerir, inalar ou absorver certa quantidade diária, sem que isso tenha consequência para a sua saúde. Em síntese, a IDA deriva de um outro conceito relevante, a toxicidade aguda.

3.2.4 Uso de agrotóxicos na cultura da cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar está sujeita ao ataque de mais de 80 espécies de pragas, sendo que algumas delas, como alguns besouros e cupins, muitas vezes são observadas nas lavouras somente após terem causado danos, uma vez que são pragas de solo e, por isso, de difícil observação. Há também pragas que atacam as raízes, o caule e as folhas (EMBRAPA, 2010).

A broca da cana-de-açúcar, *Diatrea sacchralis*, é a principal praga da cana-de-açúcar. A lagarta jovem alimenta-se, inicialmente, das folhas para depois penetrar pelas partes mais moles do colmo (bainha). Ela abre galerias de baixo para cima, que podem ser longitudinais - maioria das vezes - ou transversais (Figura 1).



Figura 1. Sintomas do ataque de broca na cultura de cana-de-açúcar. Fonte (EMBRAPA, 2010)

Dentre as demais doenças que afetam a cultura da cana-de-açúcar, causando prejuízos econômicos, pode ser citada a podridão vermelha do colmo causada pelos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliformetripes*. Já as raízes, podem ser afetadas pela Cigarrinha-da-raiz (*Mahanarva fimbriolata*). As folhas podem ser atacadas pela Cigarrinha-da-folha (*Mahanarva posticata*) e pulgões (*Rhopalosiphum maidis e Melanaphis sacchari*) (EMBRAPA, 2010).

As plantas daninhas habitam espontaneamente áreas de cultivo agrícola. A sua interferência se dá na concorrência por recursos naturais (água, luz e nutrientes do solo), prejudicando a produtividade agrícola das lavouras. O controle químico é realizado com o uso de herbicidas que, aplicados em doses corretas, matam ou retardam o crescimento das plantas daninhas. As vantagens do controle químico são a economia de mão-de-obra e a rapidez da aplicação dos herbicidas (EMBRAPA, 2010).

Os agrotóxicos têm fornecido muitos benefícios à agricultura, uma vez que as pestes e doenças danificam até um terço das colheitas, o que consolidou no uso frequente destas substâncias. Segundo o SINDAG, um grupo de apenas quatro produtos domina esse consumo, respondendo por cerca de 75% desses insumos no Brasil, onde podem ser citados: soja, milho, cana-de-açúcar e algodão, conforme ilustra a Figura 2. No entanto, se Boas Práticas Agrícolas não forem efetuadas a campo, pode haver exposição humana a agrotóxicos (KOLBERG, 2008).

As Boas Práticas Agrícolas são um conjunto de medidas adotadas pelo agricultor com o objetivo de produzir economicamente fibras e alimentos saudáveis, com qualidade e de forma a preservar a saúde das pessoas e o meio ambiente. A boa prática agrícola é considerada um dos alicerces da agricultura sustentável, pois somente por meio dela os agricultores poderão preservar os recursos naturais para as gerações futuras (ANDEF, 2010).

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), iniciado em 2001 pela ANVISA, avalia continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor (PARA, 2009).

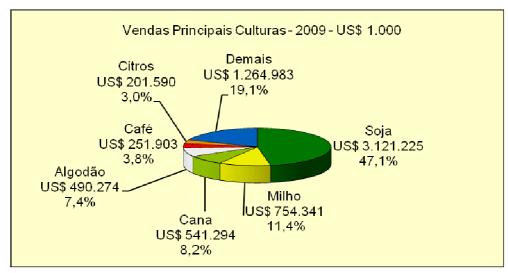


Figura 2. Vendas de agrotóxicos (principais culturas) no ano de 2009, Valor - US\$ 1.000 (SINDAG, 2010).

3.2.5 Agrotóxicos selecionados para o estudo

As características das substâncias apresentadas no anexo 1 e algumas características listadas abaixo foram obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003) e na ANVISA (SIA, 2007).

3.2.5.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

- ✓ Grupo químico: ácido fenoxiacético
- ✓ Nome químico (IUPAC): ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ✓ Classe: herbicida
- ✓ Fórmula molecular: C₈H₆Cl₂O₃
- ✓ Número no CAS: 94-75-7
- ✓ Massa molar: 221,04 g mol⁻¹
- ✓ Classe toxicológica: I, extremamente tóxico
- ✓ Nome comerciais: Aminol[®], DMA 806 BR[®], 2,4-D Isamina[®], Esteron 400 BR[®]

No Brasil, o 2,4-D é indicado para as culturas de café, cana-de-açúcar, soja, milho, trigo, sorgo, arroz, aveia, centeio, cevada e pastagens (SIA, 2007).

O 2,4-D é um herbicida altamente seletivo, ou seja, ao ser utilizado para matar ervas daninhas não prejudica o cultivo. Este herbicida pertencente ao grupo químico dos clorofenóxiacéticos, sendo sistêmico e pós-emergente (SILVA & FAY, 2004; SANCHES et al., 2003). Herbicidas aplicados em préemergência como o próprio nome indica, controlam as plantas daninhas no estágio mais inicial, após a sua germinação. Esse processo é feito, normalmente, poucos dias após a semeadura da cultura. E em pós-emergência é mais comum para o controle de gramíneas invasoras (SILVA & FAY, 2004).

O agente laranja (mistura de 2,4-D, 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e pentaclorofenol) ficou conhecido, no passado, e usado nas guerras da Coréia e do Vietnã, sendo um agente desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas, sendo razoavelmente solúveis em água, alcançando de forma relativamente fácil, os lençóis subterrâneos (SILVA & FAY, 2004). FARHADI et al., (2009) têm desenvolvido métodos para determinar resíduos de herbicidas clorofenoxiacéticos, incluindo 2,4-D e MCPA em amostras de água. Os autores relatam que estas substâncias e seus metabólitos são tóxicos a humanos por serem carcinogênicos e tóxicos a organismos aquáticos. Na região sul do Brasil o 2,4-D é amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e boa seletividade (FONSECA et al., 2007).

3.2.5.2 Simazina

✓ Grupo químico: Triazina

✓ Nome químico (IUPAC): 6-cloro-N², N⁴-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

✓ Classe: herbicida

√ Fórmula molecular: C₇H₁₂ClN₅

✓ Número no CAS: 122-34-9

✓ Massa molar: 201,7 g mol⁻¹

✓ Classe toxicológica: III, mediamente tóxico

Nome comerciais: Herbazin 500 BR, Extrazin SC (Atrazina e simazina)

3.2.5.3 Atrazina

✓ Grupo químico: Triazina

✓ Nome químico (IUPAC): 6-cloro-N²-etil,N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

✓ Classe: herbicida

✓ Fórmula molecular: C₈H₁₄ClN₅
 ✓ Número no CAS: 1912-24-9
 ✓ Massa molar: 215,7 g mol⁻¹

✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico

✓ Nome comerciais: Atrazina Nortox 500 SC, Genius WG

Atrazina e simazina são herbicidas pertencentes ao grupo químico das triazinas. As triazinas são grupos de substâncias derivados de anéis aromáticos tri-substituídos por átomos de nitrogênio. As mais usadas (atrazina, simazina) apresentam anéis simétricos (1,3,5-triazinas), conforme pode-se observar nas respectivas estruturas químicas no anexo 1. A simazina é um herbicida pré e pós-emergente utilizado no controle de ervas-daninhas nas culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo, pinus, etc. Semelhantemente, a atrazina é indicada como herbicida em aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo (CAPPELINI, 2008; SIA, 2007).

RADISIC *et al.*, (2009) investigaram agrotóxicos, incluindo simazina e atrazina, em amostras de sucos de maçã, pêssego, laranja e framboesa. Neste estudo não foram identificados resíduos de herbicidas triazínicos nos limites estabelecidos pelo método. No entanto, foram detectados agrotóxicos como carbendazim e dimetoato, porém em níveis de concentração menores que os LMR´s.

TSENG *et al.*, (2004) desenvolveram um método empregando determinação por LC-UV e MSPD como técnica de preparo de amostra para analisar simazina em cana-de-açúcar. O método permitiu a detecção de simazina em nível de 0,02 mg kg⁻¹, sendo que o estabelecido pelo departamento de saúde de Taiwan é 0,2 mg kg⁻¹. Além disso, os autores destacam que a simazina é suspeita de ser disruptor endócrino. Disruptores

endócrinos são agentes e substâncias químicas que promovem alterações no sistema endócrino humano e nos hormônios (WAISSMANN, 2002).

3.2.5.4 Diurom

✓ Grupo químico: uréia

✓ Nome químico (IUPAC): 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia

✓ Classe: herbicida

✓ Fórmula molecular: C₉H₁₀Cl₂N₂O

✓ Número no CAS: 330-54-1
 ✓ Massa molar: 233,1 g mol⁻¹

✓ Classe toxicológica: III, mediamente tóxico

✓ Nome comerciais: Diurex Agricur 500SC[®], Diuron Nortox[®], Diuromex[®]

Os derivados da uréia pela substituição de átomos de hidrogênio são usados como herbicidas. O subgrupo mais conhecido é o das feniluréias. Dentre eles, o diurom é amplamente utilizado e indicado para aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, seringueira e uva. É empregado em pós-emergência para plantas infestantes nas culturas de milho, soja e trigo (CAPPELINI, 2008). PROCÓPIO et al., (2003) relatam que o herbicida diurom causa poucos danos à cultura da cana-de-açúcar e apresenta um tempo de vida residual de 40 a 70 dias.

3.2.5.5 Fipronil

✓ Grupo químico: Pirazol

✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- α , α , α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazol-3-carbonitrila

✓ Classe: Formicida e cupinicida

√ Fórmula molecular: C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS

✓ Número no CAS: 120068-37-3

✓ Massa molar: 437,2 g mol⁻¹

- ✓ Classe toxicológica: classe II, altamente tóxico
- ✓ Nome comerciais: Fipronil Técnico Milenia[®]; Violin TS[®], Amulet[®]

O fipronil é um inseticida de contato aplicado no solo nas culturas de batata, cana-de-açúcar e milho e aplicado nas folhas nas culturas do algodão, arroz, cana-de-açúcar, eucalipto, milho e soja. Esta substância apresenta um tempo de meia-vida variando de 116 a 130 dias (RAYTON *et al.*, 2006).

Resíduos de fipronil têm sido investigados em amostras de alimentos como mel, (JIMENEZ *et al.*, 2007) e soja (PIZZUTI *et al.*, 2007). Nestes estudos, resíduos de fipronil não foram encontrados nas amostras analisadas.

3.2.5.6 Imidacloprido

- ✓ Grupo químico: Neonicotinóide
- ✓ Nome químico (IUPAC): 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidina-2-ilideneamina
- ✓ Classe: inseticida
- ✓ Fórmula molecular: C₉H₁₀ClN₅O₂
- ✓ Número no CAS: 138261-41-3
- ✓ Massa molar: 255,7 g mol⁻¹
- ✓ Classe toxicológica: Classe III, mediamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Imidacloprid 700 W®; Imidacloprid Técnico BCS®

3.2.5.7 Tiametoxam

- ✓ Grupo químico: Neonicotinóide
- ✓ Nome químico (IUPAC): 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)amina
- ✓ Classe: inseticida
- √ Fórmula molecular: C₈H₁₀ClN₅O₃S
- ✓ Número no CAS: 153719-23-4
- ✓ Massa molar: 291,7 g mol⁻¹
- ✓ Classe toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

✓ Nomes comerciais: Actara 750 SG®: Thiamethoxam Actara® 250 WG

Como representantes do grupo químico neonicotinóides tem-se os inseticidas imidacloprido e tiametoxam. O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide nitro-substituído que atua nos insetos, imitando o mensageiro químico acetilcolina e se liga ao sítio receptor. Este sítio de ligação é mais abundante em insetos do que em animais. O bloqueio do sítio leva ao acúmulo de acetilcolina, paralisando o inseto. As abelhas melíferas são alvo de pesquisa da ocorrência de contaminação por inseticidas, como no método desenvolvido por RANCAN et al., (2006), onde resíduos de tiametoxam foram investigados. Os limites de detecção do método foram de 0,002 mg kg⁻¹. Tiametoxam é indicado no combate a pragas nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva, com aplicação no solo. Já o imidacloprido é usado nas culturas de cana-de-açúcar, café, eucalipto, fumo e pinus, também com aplicação no solo. Tiametoxam, imidacloprido, acetamiprido e tiacloprido foram investigados em leite bovino por SECCIA et al., (2008). Neste estudo os limites de detecção do método foram entre 0,003 e 0,02 mg kg⁻¹.

3.2.5.8 Carbofurano

- ✓ Grupo químico: Metilcarbamato de benzofuranila
- ✓ Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-metilcarbamato
- ✓ Classe: Inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida
- ✓ Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO₃
- ✓ Número no CAS: 1563-66-2
- ✓ Massa molar: 221,3 g mol⁻¹
- ✓ Classe toxicológica: classe I, extremamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Carboran[®], Fersol[®], Diafuran[®], Furacarb[®], Ralzer[®], Furadan[®]

O agrotóxico carbofurano está incluído no grupo dos derivados dos carbamatos. Os agrotóxicos derivados dos carbamatos são, principalmente,

24

utilizados na agricultura, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, acaricidas, sendo utilizados também como biocidas industriais e, entre outras aplicações, como para uso doméstico. Atualmente, são uma das maiores classes de agrotóxicos orgânicos sintéticos e utilizados mundialmente em larga escala (GOU *et al.*, 2000; SILVA & FAY, 2004; CALDAS, 2009). Alguns estudos têm demonstrado que os carbamatos e seus produtos de degradação são contaminantes de recursos ambientais e alimentos. Além disso, eles estão na lista de substâncias prioritárias do US-EPA (GOU *et al.*, 2000).

O agrotóxico carbofurano é usado na cultura do arroz irrigado para controle da praga bicheira-da-raiz, mas também é utilizado em culturas como algodão, amendoim, banana, café, cana-de-açúcar, cenoura, fumo, repolho, tomate e trigo (CALDAS, 2009).

3.2.5.9 Clomazona

✓ Grupo químico: Isoxazolidinona

✓ Nome químico (IUPAC): 2-(2-clorobenzil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona

✓ Classe: herbicida

✓ Fórmula molecular: C₁₂H₁₄ClNO₂

✓ Número no CAS: 81777-89-1

✓ Massa molar: 239,7 g mol⁻¹

✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico

✓ Nomes comerciais: Gamit[®], Commence[®]

O herbicida clomazona, da família das isoxazolidinonas, é um herbicida bastante utilizado no Rio Grande do Sul, principalmente na cultura do arroz irrigado (GONÇALVES, 2007). Clomazona é geralmente utilizado em culturas de soja, algodão, cana-de-açúcar, milho, fumo, e uma variedade de outros grãos.

3.2.5.10 Imazapique

√ Grupo químico: imidazolinona

✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-5-metil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1H-imidazol-2-il)-ácido nicotínico

✓ Classe: herbicida

✓ Fórmula molecular: C₁₄H₁₇N₃O₃
 ✓ Número no CAS: 81334-60-3

✓ Massa molar: 275,3 g mol⁻¹

✓ Classe toxicológica: classe III, mediamente tóxico

✓ Nomes comerciais: Plateau[®], Only[®]

O herbicida imazapique é seletivo para controle em pré e pósemergência de algumas plantas daninhas. Este herbicida age inibindo a produção de aminoácidos de cadeia ramificada que são responsáveis pela síntese de proteínas e o crescimento da célula. Apresenta relativamente baixa toxicidade para mamíferos, pássaros e anfíbios, tendo tempo de meia-vida no solo de até 120 dias. Cabe salientar que esta substância é rapidamente degradada pela luz solar em solução aquosa. Não é registrado para uso em sistemas aquáticos, quando aplicado individualmente. É mais indicado para o uso em culturas de cana-de-açúcar e algodão (GONÇALVES, 2007).

3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

O preparo de amostras antes da análise instrumental é um requisito essencial para o estabelecimento de um método com elevada sensibilidade e seletividade destinado à análise de contaminantes traço em matrizes complexas. Os métodos de preparo de amostra têm evoluído para atender as demandas analíticas e acompanhar o aumento da eficiência cromatográfica resultante das novas instrumentações e fases estacionárias. Com isso, procura-se aumentar a produção de resultados analíticos em laboratórios de pesquisa e, simultaneamente, diminuir a geração de resíduos (DIONÍSIO *et al.*, 2010). A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, devido à baixa concentração dos analitos, apresentarem propriedades químicas distintas, bem como a complexidade das matrizes, faz com que ocorra a

necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra. Devido ao fato de que as medições são normalmente efetuadas em baixas concentrações, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, promover a extração dos analitos da matriz e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. As perdas de analito nesta etapa podem ser consideráveis e comprometer o resultado das análises (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Os passos típicos da etapa de preparo de amostra incluem amostragem, armazenamento e conservação das amostras (quando necessário), homogeneização, extração, *clean-up* e concentração antes da determinação. A etapa de amostragem deve ser representativa, ou seja, qualquer parcela ou alíquota amostrada para a determinação deve representar a amostra original (RIDGWAY *et al.*, 2007).

A otimização das etapas envolvidas no preparo da amostra é essencial para reduzir o tempo e as possíveis fontes de erro relacionadas com o procedimento. Os limites permitidos pelas legislações da área estão sob constante avaliação, exigindo o desenvolvimento e validação de métodos que atinjam as exigências dos órgãos competentes e que apresentem maior sensibilidade e confiabilidade (RODRIGUES, 2010).

As maiores limitações dos procedimentos analíticos tradicionais são que, além de exigirem muito trabalho e tempo de operação, requerem quantidades excessivas de solventes tóxicos (PRESTES, 2007). Dentre as técnicas mais utilizadas para extração de agrotóxicos em alimentos, podem ser citadas extração líquido-líquido (LLE) (PIRARD *et al.*, 2007), dispersão na matriz em fase sólida (MSPD) (RODRIGUES *et al.*, 2010) e microextração em fase sólida (SPME) (VÁSQUEZ *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, novos procedimentos de preparo de amostra, baseados na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração de analitos em matrizes complexas vêm sendo amplamente empregados (ANASTASIADES, *et al.*, 2003).

3.3.1 Método QuEChERS

Em 2003, ANASTASSIADES e colaboradores introduziram um novo método de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos, buscando superar limitações práticas dos métodos multirresíduos de extração disponíveis na época. O método foi denominado QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)* por possuir características de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Este método baseia-se na extração dos analitos da matriz com um solvente orgânico (comumente acetonitrila) e partição líquido-líquido simultânea (adição de MgSO₄ e NaCl), seguido da etapa de *clean-up* com extração em fase sólida dispersiva (JARDIM *et al.*, 2009; WIKOWSKA & BIZIUK, 2011). Na Figura 3, é apresentado um fluxograma representativo do método QuEChERS original.

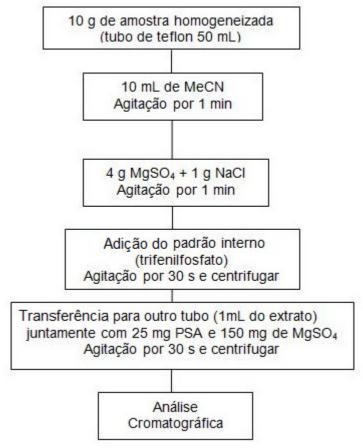


Figura 3. Fluxograma representativo do método QuEChERS original (Adaptado de ANASTASIADES *et al.*, 2003).

Nos próximos itens são detalhadas as etapas típicas do método QuEChERS.

3.3.1.1 Solvente de extração

A escolha do solvente de extração é um passo crucial no desenvolvimento do método. Muitos aspectos devem ser considerados, incluindo: *i*) habilidade para extrair uma ampla faixa de agrotóxicos orgânicos de diferentes polaridades; *ii*) apresentar seletividade, que pode ser adquirida durante a extração, partição e *clean-up*; *iii*) separação da fase aquosa; *iv*) compatibilidade com as técnicas de separação; *v*) custo, segurança e aspectos ambientais (PRESTES *et al.*, 2009).

Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de agrotóxicos são acetato de etila (EtAc), acetona e acetonitrila (MeCN), sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens. A acetonitrila quando comparada aos demais solventes de extração citados, proporciona uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos (ceras, graxas e pigmentos lipofílicos) provenientes da amostra. Além disso, apresenta a vantagem de extrair uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades. Acetonitrila quando acidificada, permite recuperações satisfatórias para agrotóxicos que, geralmente, apresentam problemas de estabilidade (PRESTES *et al.*, 2009; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada que acetona e acetato de etila quando é empregada a técnica de LC-MS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). No método QuEChERS original a acetonitrila foi escolhida como solvente de extração empregando-se 10 mL do solvente para 10 g de amostra, resultando uma relação 1 g de amostra por 1 mL de solvente, sem envolver etapa de evaporação. Este valor é considerado baixo se comparado a outros métodos de extração que normalmente apresentam uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g por 1 mL no extrato final. Porém, com a instrumentação analítica disponível atualmente, esta relação é considerada adequada uma vez que valores de LD entre 10 e 100 μg kg ⁻¹, conforme ANASTASSIADES e colaboradores (2003) utilizando GC-MS e LC-MS.

A acetonitrila apresenta uma baixa volatilidade, o que pode dificultar a evaporação do solvente e reconstituição do extrato em outro solvente. Contudo, é vantajoso o seu uso, com relação à menor exposição do analista a

solventes. Acetato de etila comparado a acetonitrila não é um bom solvente para agrotóxicos mais polares, além de extrair maior quantidade de interferentes, comparado à acetonitrila (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

3.3.1.2 Adição de sais

A adição de sais na etapa de partição promove o efeito "salting out" propiciando melhores percentuais de recuperação para analitos polares. Isto ocorre pelo fato da adição de sais diminuir a solubilidade destas substâncias na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. O uso de MgSO₄ como secante apresenta grande capacidade de remover água quando comparado a outros sais e, por isso foi escolhido durante o desenvolvimento do método QuEChERS original. Além disso, a hidratação do MgSO₄ é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra a temperaturas entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos analitos apolares (PRESTES *et al.*, 2009). No desenvolvimento do método QuEChERS original foi empregada uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄) (KOLBERG, 2008).

3.3.1.3 Padrão interno

A propagação dos erros nas etapas do método QuEChERS original foi monitorada através da utilização do padrão interno trifenilfostato, que apresenta vantagens como fornecer elevados percentuais de recuperação (>98%) na fase orgânica e não interagir com o sorvente amina primária-secundária (PSA) utilizado na etapa de *clean-up* (ANASTASIADES, *et al.*, 2003).

3.3.1.4 Clean-up

A etapa de *clean-up* é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. Um novo método de *clean-up* denominado extração em fase sólida dispersiva (DSPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS, onde 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária e 150 mg de MgSO₄. A etapa de *clean-up* ocorre simultaneamente com a remoção de água residual na DSPE. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares. O sorvente retém as interferências da matriz sendo que, após agitação manual e centrifugação, o extrato está apto para ser injetado no sistema cromatográfico. PSA é um adsorvente de troca iônica fraco com habilidade de remover ácidos graxos, açúcares e outros co-extrativos da matriz que formam ligações de hidrogênio (KOLBERG, 2008), (SHIMELIS, *et al.*, 2007).

3.3.1.5 Aspectos gerais do método QuEChERS

Ensaios de proficiência empregando o método QuEChERS mostram que este método é robusto, sendo executado com sucesso entre os laboratórios participantes (LEHOTAY, 2007). Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007, como método oficial da AOAC para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC International, 2007). O método QuEChERS também é considerado um método oficial pelo *Codex Alimentarius* (2007). Além disso, durante a 39ª Sessão do Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os Estados Unidos apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão do *Codex Alimentarius* (*European Union*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

3.3.1.6 Aplicações do método QuEChERS para matrizes de alimentos

Desde seu desenvolvimento, o método QuEChERS tem sido modificado para ser empregado na determinação de diferentes analitos em diferentes matrizes. Ao efetuar uma revisão bibliográfica no sistema de busca de periódicos *Science direct*, em novembro de 2010 com as palavras chaves: QuEChERS and pesticides e limitação para o ano de 2010, foram encontrados 58 resultados. A seguir, serão apresentadas algumas publicações que utilizaram o método QuEChERS para análise de agrotóxicos em matrizes de alimentos.

CIESLIK *et al.*, (2010) desenvolveram um método empregando QuEChERS para determinação de agrotóxicos organoclorados em frutas, como diferentes tipos de pêras e damasco. Foram utilizados 10,0 g de amostra, 10,0 mL de acetonitrila, 1,0 g de citrato de sódio dihidratado, 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado, 1,0 g de NaCl e 4 g MgSO₄. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada. Em 6 mL do sobrenadante foram adicionados 0,15 g de PSA e 0,9 g MgSO₄, na etapa de *clean-up*. Em 4 mL do extrato pós-*clean-up* foram adicionados 40 μL de ácido fórmico 5%. Os extratos foram evaporados com nitrogênio até volume final de 1 mL e analisados por GC/MS. Os valores dos limites de detecção (LOQ) foram de 0,001 a 0,013 mg kg⁻¹ e os valores de recuperação variaram entre 70 e 120%, com desvio padrão relativo inferior a 17%.

KOLBERG *et al.*, (2010) desenvolveram um método para a determinação de 15 agrotóxicos em pão utilizando GC-MS, operando no modo de ionização química negativa (NCI). No preparo de amostra utilizou-se acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, na presença de acetato de sódio, citrato de sódio e sulfato de magnésio. As recuperações foram satisfatórias apresentando valores entre 70 e 117%, com RSD inferior a 18% para quase todos os analitos. O LOQ do método variou de 10 a 20 μg kg⁻¹.

RODRIGUES (2010) otimizou e validou o método QuEChERS juntamente com a técnica de LC-ESI-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em cebola. No método QuEChERS modificado foram utilizados 10,0 g de amostra, 4,0 g de MgSO₄ anidro e 10,0 mL de acetonitrila. Os LOQs

para o método, variaram entre 0,0005 e 0,0500 mg kg⁻¹. As recuperações foram entre 65 e 121%, com RSD < 20% para todos os analitos.

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS

Os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em alimentos estabelecidos pelas agências reguladoras vêm diminuindo, o que demanda a necessidade de métodos de maior sensibilidade e confiabilidade de determinação, devido a uma maior avaliação do risco e maior necessidade de segurança alimentar para o consumidor (RIDWAY *et al.*, 2007). Diversos detectores acoplados à cromatografia líquida vêm sendo utilizados para a determinação de contaminantes traço em alimentos, tais como ultravioleta, fluorescência e espectrometria de massas (CHEN *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010).

O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico. Ele mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente, direta e proporcionalmente à concentração do componente da amostra. Esse sinal é gerado assim que o eluente chega ao detector (COLLINS *et al.*, 2006).

Detectores por absorvância na região do ultravioleta e visível baseiamse na absorção da luz por parte dos componentes da amostra. A detecção na região do UV é ressaltada na literatura como sendo a melhor região para a determinação de agrotóxicos por LC (FARIA, 2004).

A maioria das aplicações da espectrometria de absorção para compostos orgânicos baseiam-se em transições eletrônicas de um estado de menor energia para um estado mais energético e tais transições exigem a presença de grupos funcionais que são capazes de absorver radiação ultravioleta-visível e são chamados cromóforos (SKOOG, *et al.*, 2009).

Os compostos que absorvem luz na região do UV incluem todas as substâncias que têm elétrons π e elétrons desemparelhados, uma dupla ligação adjacente a um átomo contendo elétrons não ligantes (>C=C-X), todas olefinas, todos aromáticos, grupos carbonila (>C=O), grupos nitro (-NO₂), íons

inorgânicos (Br $^-$, I $^-$, NO $_3$ $^-$, NO $_2$ $^-$) e compostos com duas duplas conjugadas (>C=C-C=C<) (COLLINS *et al.*, 2006).

Dentre os detectores por absorvância, ou espectrofotométricos, destacase o DAD. Tal detector permite a coleta de dados de um espectro completo, na região do ultravioleta e do visível (de 90 a 800 nm), em aproximadamente 1 segundo. Assim, dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que são eluídos (SKOOG *et al.*, 2009).

Um detector por arranjo de diodos utiliza uma lâmpada de deutério ou xenônio, e a radiação emitida por esta lâmpada é colimada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A radiação total que passa através da célula contendo a amostra incide sobre uma grade de difração. Esta grade irá difratar a radiação, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, transforma a radiação em corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão. Através de um circuito adequadamente calibrado, esta corrente será transformada em unidades de absorbância para os diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção do analito (SCOTT, 2003a, SCOTT, 2003b, CALDAS, 2009). Um diagrama de funcionamento do DAD é mostrado na Figura 4.

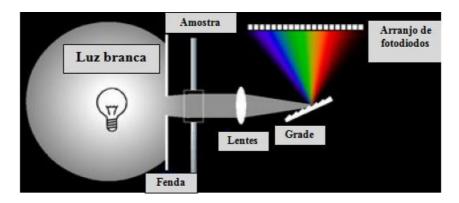


Figura 4. Diagrama de um detector de arranjo de diodos (Adaptado de SCOTT, 2003 b).

O detector por arranjo de diodos apresenta inúmeras vantagens tais como:

- Obtenção de espectros tridimensionais, apresentando absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção (CALDAS, 2009);

- Permite selecionar o comprimento de onda de máxima absorvância de cada substância presente na amostra, aumentando a detectabilidade e eliminando picos interferentes (CALDAS, 2009);
- Com o uso de detectores como o DAD, acoplados à LC, o espectro de absorvância de cada substância pode ser obtido, propiciando um caminho adicional para confirmar a identidade do pico, pois juntamente com o tempo de retenção permite análises qualitativas nas quais a identificação pode ser feita através da comparação com um padrão ou uma biblioteca *on line* (LANÇAS, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).
- A qualidade da análise é aumentada, permitindo checar a identidade do analito e a pureza do pico. A pureza do pico é examinada comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como por exemplo, no início, no ápice e no fim. Se os espectros se sobrepõem, o pico é puro. Isto fornece um dado extra para o analista, diferenciando interferentes e analitos que tenham o mesmo tempo de retenção (CALDAS, 2009; COLLINS *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos têm sido publicados utilizando o detector DAD em conjunto com a LC para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A aplicação dessa técnica é descrita em alguns artigos nos próximos parágrafos.

WANG *et al.*, (2009) desenvolveram um método para análise simultânea de resíduos de inseticidas carbamatos e organofosforados e drogas veterinárias (fluoroquinolonas) em tecido suíno utilizando o método de MSPD e a técnica de LC-DAD. As recuperações ficaram entre 60,1 e 107,8%, com RSD menor que 8,1% satisfatórios. Os limites de detecção do método foram entre 9 e 22 μg kg⁻¹. Os analitos foram separados utilizando coluna Kromasil C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) mantida a 25°C, utilizando eluição por gradiente, variando a proporção da fase móvel entre ácido fosfórico 0,003 mol L⁻¹ e acetonitrila. Para detecção no LC-DAD, foram selecionados os comprimentos de onda de 220 e 280 nm. O tempo de análise foi de 200 min. Para a MSPD foram utilizados 0,5 g de amostra, 2,0 g de C18 e 0,5 g de sulfato de magnésio anidro, e a mistura resultante foi lavada com 6 mL n-hexano, seguido de eluição com 8 mL de acetonitrila em vazão controlada de 0,5 mL min⁻¹. O

eluato foi evaporado com N_2 e o resíduo dissolvido em 1 mL de metanol. O redissolvido foi filtrado em filtros de 0,45 μ m e injetado no LC.

TSAI *et al.*, (2009) utilizaram a técnica de microextração em fase sólida dispersiva para a determinação de tetraciclinas em amostras de água e leite por LC-DAD. Diferentes sorventes foram avaliados quanto à capacidade de pré-concentrar as tetraciclinas. Neste estudo, os sorventes baseados em sílicamodificada com grupos amina ou carbonila apresentaram maior capacidade que sorventes poliméricos. A extração foi realizada com acetonitrila e a partição foi promovida por sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A separação cromatográfica foi executada usando coluna Intersil ODS-2 C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm), operando a 40 °C. O modo de eluição foi por gradiente variando-se a composição da fase móvel entre ácido oxálico 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila. A vazão foi de 1 mL min⁻¹. O detector por arranjo de diodos foi ajustado a 360 nm. Recuperações médias de 97,1 a 104,1% e precisão de 2,0 a 5,6%. Limites de detecção de 0,7 a 3,5 ng mL⁻¹ e 7,9 a 35,3 ng g⁻¹ para amostras de água de superfície e leite, respectivamente.

TOPUZ *et al.*, (2005) desenvolveram um método para determinação simultânea de fungicidas e herbicidas em sucos de maçã, cereja e pêssego. O método envolveu a pré-concentração de 25 g de amostra de suco de frutas através de cartuchos C18 de extração em fase sólida. Os analitos foram separados e quantificados por LC-DAD em 220 e 260 nm. A separação analítica foi executada com eluição por gradiente variando-se a composição de acetonitrila e água com vazão de 1 mL min⁻¹ e coluna analítica Phenomenex C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), e pré-coluna de mesmo material (4 mm × 3 mm, 5 μm). As recuperações variaram de 94% a 100%, com RSD inferior a 3,4%. Os limites de detecção foram na faixa de 0,5 a 1 μg kg⁻¹.

RAVELO-PÉREZ *et al.* (2009) otimizaram e validaram um método empregando como preparo de amostra por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) utilizando líquidos iônicos à temperatura ambiente. As amostras de frutas foram homogeneizadas e extraídas (1 g) com acetonitrila e, em seguida, o extrato foi evaporado e reconstituído em 10 mL de água. Após, procedeu-se a DLLME-IL, utilizando 1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato ([C₆MIM][PF₆]) como solvente de extração. O trabalho é pioneiro, pois utiliza

líquidos iônicos como solventes de extração na DLLME para matrizes de alimentos. A propriedade dos líquidos iônicos de apresentar baixa pressão de vapor é destacado no trabalho como substitutos de solventes voláteis, muitas vezes tóxicos, reduzindo, assim, a exposição do analista. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18 (150 mm × 3.9 mm, 4 μm) e pré-coluna C18 (4 μm), ambas da Waters. A eluição foi no modo gradiente e isocrático variando-se a composição de água e acetonitrila, com vazão 1,0 mL min⁻¹. Os comprimentos de onda selecionados foram 205, 215 e 220 nm. As recuperações foram de 69 a 97% (exceto para os agrotóxicos tiofanato-metílico e carbofurano, os quais foram de 53 a 63%), com RSD inferior a 8,7%. Os limites de detecção foram de 0,32 a 4,66 μg kg⁻¹, que estão abaixo dos limites máximos de resíduos estabelecidos pela União Européia.

WANG *et al.* (2010) também otimizaram e validaram a método DLLME-IL para extração e determinação por LC-DAD de triazinas em mel. ([C₆MIM][PF₆]) foi usado como extrator e 10% Triton X 114 foi usado como dispersante. A separação cromatográfica foi obtida usando coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm × 5 μm). A fase móvel consistia de eluição por gradiente variando-se a proporção entre acetonitrila e água, com vazão de 1,0 mL min⁻¹.Os limites de detecção do método foram 5,3-8,6 μg kg⁻¹. As recuperações ficaram na faixa 60,1-133,0% com RSD ≤16,5%.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma das técnicas mais poderosas para a determinação de resíduos de agrotóxicos polares iônicos, de baixa volatilidade ou instabilidade térmica. A LC é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto a espectrometria de massas permite a identificação e/ou confirmação em nível de traços. Instrumentos modernos de LC-MS, empregando ionização à pressão atmosférica, provêm excelente seletividade e detectabilidade, que habilitam determinação de analitos em níveis de traço (JARDIM *et al.*, 2009).

Um problema fundamental no acoplamento de cromatografia líquida com a espectrometria de massas foi o grande descompasso entre os volumes relativamente grandes de solvente da primeira e os requisitos de vácuo da

segunda, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (10⁻⁵ a 10⁻⁸ torr) (SKOOG *et al.*, 2009). Após a superação parcial das deficiências com as interfaces, a técnica de LC-MS vem sendo cada vez mais utilizada (HARRIS, 2001; FERNADEZ-ALBA, 2005).

O acoplamento entre as duas técnicas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al.*, 2008). O espectrômetro de massas é um equipamento que identifica moléculas em fase gasosa, ionizando-as no vácuo e separando-as ao passar por um campo eletrostático e um campo eletromagnético. A separação de cada íon ocorre porque a trajetória no campo eletromagnético varia de acordo com a massa de cada íon (ZARZUELA & ARAGÃO, 1999).

Recentemente, o acoplamento LC em série com o espectrômetro de massas (LC-MS/MS) está se tornando importante para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras. O monitoramento dos produtos da fragmentação secundária (MS/MS) permite uma discriminação muito maior dos interferentes da matriz que o uso dos produtos de fragmentação primária (MS). De fato, esta técnica permite a determinação de agrotóxicos na concentração da ordem de ng kg⁻¹ ou inferior, mesmo na presença de interferentes. A fragmentação controlada da espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para a identificação confiável do analito com maior seletividade e especificidade. Além disso, essa fragmentação gera sinais mais limpos, melhorando a razão sinal/ruído e diminuindo, portanto, os limites de detecção e quantificação (JARDIM *et al.*, 2009).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado constituído basicamente de três partes: a fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, o analisador de massas e o detector de íons com aquisição /processamento de dados. Os componentes básicos de um espectrômetro de massas são mostrados na Figura 5.

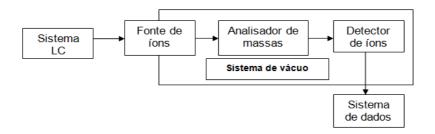


Figura 5. Componentes básicos de um espectrômetro de massas hifenizado com sistema LC (Adaptado de HARRIS, 2008).

3.5.1 Fontes de ionização

Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são as que operam com ionização em pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*). Estas fontes são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) (COLLINS *et al.*, 2006).

Na técnica de ionização por eletronebulização a fase líquida proveniente da coluna cromatográfica entra em um nebulizador capilar de aço juntamente com um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio), visando a remoção do solvente. A diferença de potencial entre a ponta do tubo de metal e o cone de amostragem cria um aerossol fino formado por gotículas da fase móvel contedo o analito, e o gás nebulizador. Na ESI, O solvente é evaporado, fazendo com que a gotícula diminua sucessivamente de tamanho, até que os íons do analito evaporem e sejam direcionados para o cone de amostragem indo, então, para o analisador de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008; HARRIS, 2008; ARDREY, 2003).

A ESI possibilita a ionização de substâncias sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (DEMOLINER, 2008; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Para algumas misturas complexas, a combinação da LC com a espectrometria de massas não fornece uma resolução suficiente. Nos anos mais recentes, tornou-se factível o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em uma técnica conhecida como espectrometria de massas

tandem. Quando se combina a técnica de LC com a espectrometria de massas tandem, conforme mostrado na Figura 6, o instrumento recebe o nome de LC-MS-MS. Os íons produzidos na fonte são filtrados no primeiro quadrupolo de forma que somente o íon selecionado passe para a célula de colisão. Um gás de colisão (normalmente argônio) promove a fragmentação do íon selecionado. Os fragmentos são selecionados pelo quadrupolo (analisador de massas) e detectados. Na maioria dos casos, a célula de colisão também é um quadrupolo operado de forma que os fragmentos de íons sejam dirigidos para o analisador de massas (SKOOG et al., 2009).

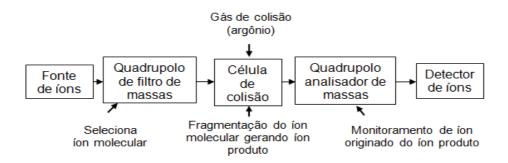


Figura 6. Sistema de espectrometria de massas em tandem (Adaptado de SKOOG, *et al.*, 2009).

3.5.2 Monitoramento de Reações Múltiplas

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados (modo SIM) e fragmentados novamente (MS/MS). O modo MRM é extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). Através do modo MRM é possível determinar multianalitos dentro de uma mesma análise, já que permite a identificação e separação de cada transição monitorada, apresentando como principal vantagem, a seletividade (DEMOLINER, 2008). Cabe salientar, que a seletividade e a razão sinal/ruído podem ser expressivamente melhoradas pelo monitoramento seletivo de reações, com um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (HARRIS, 2003; CALDAS, 2009).

3.5.3 Detector

O espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão massa/carga (*m/z*) (RODRIGUES, 2008). A detecção do íon é feita por meio do tubo multiplicador de elétrons, que determina a intensidade do feixe de elétrons. Uma grande quantidade de dados é gerada pelo espectrômetro de massa, de modo que programas computacionais altamente avançados são necessários para a aquisição e processamento dos dados (COLLINS *et al.*, 2006).

3.6 EFEITO DE MATRIZ EM LC-DAD E LC-ESI-MS/MS

LC-ESI-MS/MS é um método altamente seletivo, principalmente no modo MRM, no qual somente o sinal de interesse é registrado. No entanto, outras substâncias que co-eluem com o analito podem interferir nos resultados (KRUVE *et al.*, 2008).

A mudança na eficiência da ionização na presença de outras substâncias é chamado de Efeito de matriz. Esta mudança pode acarretar supressão ou enriquecimento na ionização, fornecendo resultados falsos de recuperação. O exato mecanismo de supressão é desconhecido. Tem sido discutido que o efeito matriz pode ser causado por material não volátil ou substâncias com alta atividade superficial. Alguns autores relatam que componentes da matriz podem interferir na ionização dos analitos quando estiverem presentes na amostra em concentração superior a 10⁻⁵ mol L⁻¹ (KEBARLE & TANG, 1993 apud FERNANDEZ-ALBA, 2005).

O LC-MS é muito superior a outros métodos de detecção, como o LC-UV. No caso de detectores UV, como o DAD, as interferências da matriz que co-eluem com o analito de interesse são mais visíveis nos cromatogramas gerados (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Na Figura 7 é possível avaliar que o efeito matriz em LC-MS pode alterar os dados quantitativos gerados, a variação na resposta para um analito em diferentes extratos comparada com a resposta para o analito no solvente pode ser diferente e esta variação na resposta além de causar modificações na área

e formato do pico, pode causar variação no tempo de retenção (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

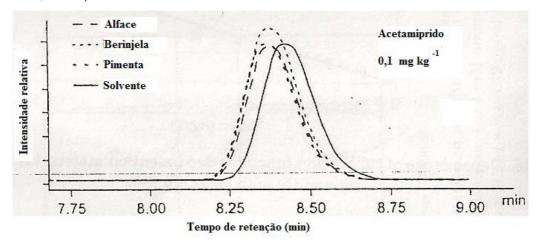


Figura 7. Diferentes respostas para o agrotóxico acetamiprido em solvente e em diferentes extratos de alimentos (Adaptado de FERNANDEZ-ALBA, 2005)

É recomendado por SANCO, documento Nº 10684/2009 usar curvas de calibração preparadas no extrato branco da matriz ou por superposição na matriz (*matrix-matched calibration standards*) que podem compensar o efeito matriz (SANCO, 2009). A resposta do analito adicionado ao extrato branco da matriz (fortificação após a extração) e a resposta do padrão preparado em um determinado solvente ou na fase móvel são avaliadas. Esta forma de avaliar a intensidade do efeito matriz é amplamente empregada quando se trabalha com a determinação de substâncias em baixas concentrações em matrizes complexas. Entretanto, a o método de fortificação no extrato branco da matriz não elimina a causa do efeito de matriz, pois a intensidade do efeito varia de acordo com a matriz (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

Para minimizar ou eliminar o efeito matriz algumas alternativas têm sido descritas tais como: mudanças nas condições cromatográficas (o que depende do consumo de tempo) e modificações na técnica de preparo de amostra (GÓMEZ *et al.*, 2006; KRUVE *et al.*, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental do trabalho consistiu na validação de métodos para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de melado e caldo de cana. As amostras foram preparadas pelo método QuEChERS modificado, o qual foi otimizado para ambas matrizes para alcançar maior eficiência no processo de extração. Também, foram otimizados os parâmetros cromatográficos do equipamento LC-DAD para determinação simultânea dos analitos 2,4-D, diurom e fipronil, assim como parâmetros do LC-MS para determinação de atrazina, simazina, carbofurano, clomazona, imazapique, imidacloprido, tiametoxam, 2,4-D, diurom e fipronil. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (São Paulo, Brasil)
- Bomba de vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 1000 μL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- pHmetro Hanna pH20 pH21 eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex (San Francisco, CA, USA);
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3[®] Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Ultrassom (banho) Quimis® modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- Vortex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Bioteck Internacional, Alemmar Comercial e Industrial S.A.);
- Estufa (temperatura 50 a 250 °C) marca DeLeo (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Cromatógrafo a Líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição por gradiente, Detector por Arranjo de Diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower

- PDA e coluna marca Thermo Hyperclone BDS C18 5 μ m, 130 Å (250 x 4,6 mm de d.i.) (Thermo, Torrance, CA, USA);
- Coluna analítica Waters Spherisorb $^{\! B}$ ODS2 C18 5 μm 130 Å (150 x 4,6 mm d.i.).
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, separador de massas, Micromass[®] Quatro Micro[™] API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray,* sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra[®] MS C18 3,5 μm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments, Escócia).

4.2 REAGENTES, SOLVENTES, ADSORVENTES E MATERIAIS

- Ácido fórmico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- Ácido fosfórico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- Água destilada;
- Água Ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade de 18,2 M Ω cm);
- Metanol e acetonitrila grau HPLC (Phillisburg, NJ, USA),
- Sorvente PSA (primary secondary amine), IUPAC nomenclature etilenodiamina-N-propil silano, 40 µm bondesil by Varian (Palo Alto, CA, USA);
- Sulfato de magnésio anidro (99,8%) J. T. Baker (Tokyo, Japan);
- Cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Germany);
- Detergente Extran® neutro (Merck,RJ, Brasil);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Membrana filtrante de nylon 0,45 μm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- Padrões analíticos: 2,4-D 99,6%, carbofurano 99,5%, clomazona 97,4%, simazina 99,9%, atrazina 97,4%, diurom 99,5%, tiametoxam 99,7% e imidacloprido 99,9%, Imazapique 99,0% e fipronil 97,6% (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);

4.3 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS PARA ESTUDO

A etapa inicial do trabalho foi conhecer o município de Santo Antônio da Patrulha, seus aspectos sociais e econômicos. Santo Antônio da Patrulha, município da microrregião litoral norte do Rio Grande do Sul, com população estimada 39.302 habitantes, tem no cultivo da cana-de-açúcar, na produção e comercialização de derivados artesanais da cana-de-açúcar como a cachaça, a rapadura, o melado, o açúcar mascavo e o caldo da cana uma importante fonte de renda para economia local. Dessa forma, e levando-se em conta que no município, para a produção desta cultura são usados agrotóxicos, foi apresentada uma proposta de trabalho para autoridades locais e representantes dos agricultores. A proposta de trabalho era o desenvolvimento de um método analítico para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar.

Deve-se destacar também que a orizicultura é cultivada em escala extensiva e com alta tecnologia no município. Na região serrana, distribuída em minifúndios, desenvolvem-se, além da cana-de-açúcar, culturas como feijão, milho, fumo e mandioca. A contaminação da cana-de-açúcar por agrotóxicos pode ocorrer por deriva, porque parte do produto aplicado em uma cultura se perde para o ambiente, o que, além do prejuízo resultante da perda de agrotóxico, causa danos em culturas adjacentes (GIL & SINFORT, 2005).

A etapa posterior a definição da proposta de trabalho foi a seleção dos agrotóxicos a serem estudados, o que baseou-se nas informações fornecidas pelo engenheiro agrônomo Paulo Renato Rojahn (EMATER, Santo Antônio da Patrulha- regional de Porto Alegre), o qual informou o nome comercial dos inseticidas: Decis (princípio ativo- deltametrina) e Orthene (acefato) e herbicidas Roundup (glifosato), Diurom, Sencor (metribuzim) e DMA (2,4-D) efetivamente usados na cultura de cana-de-açúcar no município. O inseticida fipronil não foi listado, mas foi comentado na reunião, o seu uso em outras culturas da região.

A partir dos dados obtidos, foi realizada uma pesquisa nas páginas eletrônicas da ANVISA e do MAPA, para identificar quais das substâncias mais empregadas em Santo Antônio da Patrulha são agrotóxicos permitidos para a cultura de cana-de-açúcar e quais destes poderiam ser determinados no

Laboratório de Análise de Compostos orgânicos e Metais (LACOM) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), conforme a disponibilidade de padrões analíticos no laboratório e de acordo com a instrumentação disponível. Foram considerados para seleção dos agrotóxicos as características químicas, as propriedades físico-químicas e a classificação toxicológica.

Os agrotóxicos escolhidos para o desenvolvimento do método foram Diurom, Fipronil e 2,4-D. Foi utilizada como método para determinação dessas substâncias a técnica de LC-DAD.

Conforme o andamento do trabalho experimental e a chegada de novos padrões analíticos, bem como o desenvolvimento do método de preparo de amostra, 7 agrotóxicos foram inclusos, os quais são indicados para a cultura da cana-de-açúcar conforme a ANVISA e o MAPA. No entanto a quantificação dessas substâncias foi efetuada com a técnica de LC-MS. Os agrotóxicos inclusos no trabalho foram atrazina, simazina, imazapique, carbofurano, clomazona, imidacloprido e tiametoxam. Os agrotóxicos selecionados são moléculas pertencentes a diferentes classes químicas tais como: herbicidas triazínicos (simazina e atrazina), inseticidas neonicotinóides (imidacloprido e tiametoxam), inseticidas carbamatos (carbofurano), herbicidas derivados da uréia (diurom), inseticidas do grupo pirazóis (fipronil), herbicidas das classes ácidos fenoxiacéticos (2,4-D), isoxazolidinona (clomazona) e imidazolinona (imazapique), conforme podem ser visualizadas as respectivas estruturas químicas destas substâncias no anexo 1, bem como a Tabela 15 (anexo 1) que apresenta informações sobre classe e grupo químico, limite máximo de resíduos de acordo com a ANVISA e o Codex Alimentarius e o intervalo de segurança (em dias) para os analitos estudados e a Tabela 16 (anexo 1) que apresenta as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo.

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico (2,4-D, diurom, fipronil, imazapique, imidacloprido, carbofurano, clomazona, tiametoxam, simazina e atrazina) foram preparadas pela dissolução

do padrão sólido em metanol, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 °C.

A partir das soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas soluções estoque de concentrações de 100 mg L⁻¹ de cada substância em metanol. A solução trabalho contendo a mistura de 3 agrotóxicos (2,4-D, diurom e fipronil) foi preparada na concentração de 10 mg L⁻¹, a partir das soluções estoque de concentrações de 100 mg L⁻¹, diluições foram realizadas para a otimização da separação cromatográfica por LC-DAD, bem como para o preparo das curvas analíticas e fortificação das amostras. A solução trabalho foi preparada mensalmente e as diluições utilizadas foram preparadas diariamente. Para o sistema LC-ESI-MS/MS uma mistura dos 10 agrotóxicos foi preparada na concentração de 10 mg L⁻¹ a partir da diluição das respectivas soluções estoques de cada substância na concentração de 1000 mg L⁻¹. A solução trabalho contendo a mistura dos analitos foi preparada na concentração de 1 mg L⁻¹ a partir da mistura de 10 mg L⁻¹.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

Após a definição dos analitos a serem estudados (2,4-D, diurom e fipronil), procedeu-se à otimização do sistema cromatográfico, levando-se em consideração que os analitos apresentam polaridade intermediária, foi utilizado o método cromatográfico de fase reversa, onde a fase estacionária é apolar. As fases estacionárias clássicas (C8 e C18), que são as fases estacionárias mais difundidas e empregadas nas separações rotineiras por método cromatográfico de fase reversa, consistem de uma camada orgânica apolar ligada quimicamente, imobilizada ou apenas sorvida a um suporte cromatográfico e a fase móvel é mais polar (MeOH, água, MeCN, ou misturas destes) (MALDANER *et al.*, 2010; COLLINS *et al.*, 2006). Por isso, na otimização, foram utilizadas como fase estacionária (FE) colunas contendo C18 e como fase móvel (FM), diferentes proporções de solventes polares: metanol e água ultrapura.

Para a otimização das condições cromatográficas, primeiramente foram injetadas, individualmente, as soluções analíticas na concentração de 10 mg L⁻¹ dos agrotóxicos selecionados para este estudo, observando o tempo de

retenção e o espectro de absorção molecular de cada substância, obtido pelo DAD. Durante as outras etapas do estudo, a ordem de eluição dos analitos foi feita comparando os tempos de retenção (t_R) e o espectro dos picos na mistura com o t_R e o espectro dos picos dos padrões, injetados individualmente.

4.5.1 Preparo e escolha da fase móvel

Os solventes utilizados foram preparados individualmente. A água ultrapura foi acidificada com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v). Os solventes foram filtrados à vácuo através de membranas de nylon 0,45 μ m e degaseificados em banho de ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes, rotulados com informações a respeito da sua composição e pH. As soluções foram degaseificadas diariamente e a água ultrapura preparada diariamente.

Para a definição da composição da fase móvel para a separação cromatográfica foram testadas misturas contendo diferentes proporções de diferentes solventes, utilizando metanol e água ultrapura pH 3,0.

Em LC de fase reversa, quanto mais hidrofóbico for o analito, mais ele é retido. Quando o analito se ioniza, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui (KURZ, 2007). A fase móvel foi acidificada com ácido fosfórico, pois este composto apresenta uma baixa absorção na região do UV, principalmente em comprimentos de onda próximos a 220 nm (CALDAS, 2009). A presença de ácido fosfórico na fase móvel dificulta a ionização dos grupamentos ácidos, permitindo que susbtâncias ácidas fiquem na forma molecular (SONAGLIO *et al,* 1986). Devido às características dos agrotóxicos em estudo, foi avaliada a necessidade de acidificação da fase móvel e da amostra, a fim de garantir uma maior interação dos agrotóxicos com a fase estacionária, sem comprometer a separação.

4.5.2 Vazão da fase móvel

A função da bomba é enviar um fluxo constante e reprodutível de FM para a coluna, produzindo uma vazão que permita que as análises sejam realizadas em um tempo curto e a uma vazão constante para não interferir no sistema de detecção (COLLINS *et al.*, 2006). A vazão da fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções de referência, sendo inicialmente a vazão de 1,0 mL min⁻¹.

4.5.3 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada agrotóxico, foi injetada no equipamento LC-DAD a solução de referência individual 10 mg L⁻¹ de cada analito. A partir do espectro de absorção molecular, monitorado entre 190 e 400 nm, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção dos agrotóxicos. O espectro do padrão foi utilizado para confirmar a identidade dos picos nas amostras.

Com o detector e software utilizados também é possível verificar a pureza dos picos. Para isto, foram comparados os espectros de absorção obtidos em três diferentes pontos do pico cromatográfico, no início, no ápice e no fim. Se o espectro desses três pontos coincidirem o pico é considerado puro. Isso foi realizado durante todo o procedimento analítico.

4.6 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-ESI-MS/MS

4.6.1 Preparo e escolha da fase móvel

O procedimento de preparo da fase móvel foi o mesmo realizado para o LC-DAD, como descrito no item 4.5.1. Foram testadas algumas composições de fase móvel, com os mesmos solventes utilizados no LC-DAD (MeOH e água ultrapura acidificada).

A vazão da fase móvel foi 0,2 mL min⁻¹. E foi mantida, sendo que outros parâmetros foram variados, como a composição e acidificação da fase móvel.

4.6.2 Acidificação da fase móvel

Para o equipamento LC-ESI-MS/MS a fase móvel foi acidificada com 0,1% (*v/v*) de ácido fórmico utilizando diferentes proporções de MeOH e água. Após a definição da melhor proporção de MeOH e água, um outro teste foi realizado, sendo a fase móvel, neste teste acidificada com 0,1% (*v/v*) de ácido acético. Em sistemas de cromatografia líquida acoplada com detectores de massas é indicado o uso de ácidos orgânicos mais voláteis para evitar que estes cristalizem na interface. A acidificação também influencia na eficiência de ionização dos analitos a serem determinados (KUSTER *et al.*, 2006).

4.6.3 Condições do sistema de detecção

As condições do sistema de detecção foram baseadas no trabalho de DEMOLINER *et al.*, (2010). Sendo assim, foram definidos modo de ionização da fonte (*electrospray* positivo ou *electrospray* negativo), voltagem do cone e energia de colisão, temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente, voltagem do capilar e do cone extrator.

Após a definição destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e identificação. Algumas condições e íons monitorados para outros agrotóxicos como o tiametoxam e imidacloprido foram baseados em outros trabalhos (PIZZUTTI *et al.*, 2007).

4.7. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO QUECHERS MODIFICADO

4.7.1 Amostras de melado

Para os procedimentos de otimização e validação de métodos foram utilizadas amostras comerciais de melado de supermercados de Pelotas, marca DACOLÔNIA, oriunda de Costa da Miraguaia, 2° distrito de Santo Antônio da Patrulha, cujo rótulo apresentava algumas informações, descritas a seguir:

-Ingredientes: caldo de cana;

Informação nutricional (porção de 20 g)

-Valor energético: 63 kJ;

-Carboidratos: 16 g;

-Cálcio: 20 mg;

-Ferro: 0,7 mg;

-Fósforo: 15 mg;

-Potássio: 79 mg

4.7.2 Amostras de caldo de cana

As amostras de caldo de cana, utilizadas nos procedimentos de otimização e validação, foram obtidas através de contato com um produtor de cana-de-açúcar, residente próximo ao Parque de Eventos Morada do Sol, em Pelotas. O caldo de cana foi obtido através da moagem da cana-de-açúcar em moedor manual e, segundo o produtor, não eram usados agrotóxicos.

Todas as amostras (caldo e melado) foram analisadas sem a adição dos agrotóxicos (branco do procedimento), para verificar possíveis interferentes e/ ou a presença de agrotóxicos.

O método de extração otimizado no presente trabalho baseou-se no método estabelecido por BARAKAT e colaboradores (2007), com relação às condições de extração e partição, e no método QuEChERS original (condições testadas na etapa de *clean-up*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Neste trabalho foram realizadas modificações em ambos métodos e para isto, foram

realizados testes de otimização, os quais foram realizados no nível de fortificação de 5 mg kg⁻¹, para os analitos determinados no LC-DAD (2,4-D, diurom e fipronil) e para o melado. Posteriormente, as condições otimizadas foram utilizadas para a validação no LC-DAD e LC-ESI-MS/MS.

A otimização do procedimento de extração incluiu a seleção da massa de amostra (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 g), seleção do solvente de extração (acetato de etila, acetonitrila, acetona e metanol), influência da adição de NaCl e avaliação da etapa de *clean-up* na eficiência da extração. Para o melado foi realizado, também, um teste para avaliar a influência da temperatura na concentração dos agrotóxicos. Este último teste não foi um procedimento de otimização, foi apenas um experimento de avaliação da temperatura na concentração dos agrotóxicos, uma vez que o melado é um produto processado e que passa por aquecimento.

Para o caldo de cana foram realizados alguns testes de otimização, tais como: influência da adição de NaCl na etapa de partição e avaliação da etapa de *clean-up*, sendo as demais condições semelhantes as já estabelecidas para o melado. Como o caldo de cana-de-açúcar é uma matriz líquida, foram utilizados 10 mL de amostra para o procedimento de validação. O volume foi baseado também nos volumes estabelecidos em artigos para determinação de contaminantes em sucos de frutas (RADIŠIC *et al.*,2009).

4.7.3 Acidificação da amostra

Durante todo o procedimento de otimização e validação do método, as amostras de melado e caldo de cana foram acidificadas a pH 2,0 com ácido fosfórico 1:1 v/v. A acidificação foi feita, baseando-se no trabalho de CALDAS (2010), porque agrotóxicos como o 2,4-D, que são substâncias com caráter ácido, são normalmente determinados em pH entre 2,0 e 3,0 (ZANELLA *et al.*, 2003).

Experimentalmente, na etapa de fortificação, um volume conhecido da mistura dos agrotóxicos foi adicionado à amostra e após 1 h, 10 mL de água ultrapura foram adicionados ao melado, a amostra foi acidificada, o procedimento foi realizado nesta sequência, com objetivo de refletir a situação

real, uma vez que o pH do melado é na faixa 5,4-5,5, semelhante ao caldo que tem pH na faixa 5,3-5,4.

4.7.4 Massa de amostra

No desenvolvimento do método QuEChERS original, a massa de amostra utilizada foi de 10 g, sendo esta considerada ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo (PRESTES *et al.*, 2009; ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Diferentes massas de amostra de melado foram avaliadas: (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 g). Para isso, cada massa de amostra pesada foi fortificada com a mistura dos agrotóxicos, resultando no nível de fortificação de 5 mg kg⁻¹ da mistura dos analitos. Foram usados 5 mL de acetonitrila como solvente de extração e 4,0 g de sulfato de magnésio anidro. Para separação de fases foram usadas as condições 5000 rpm e 2 min, conforme BARAKAT *et al.*, (2007).

4.7.5 Seleção do solvente de extração

A escolha do solvente de extração é uma decisão crucial no desenvolvimento do método de preparo de amostra. O principal aspecto a ser considerado é a habilidade deste para extração simultânea de uma ampla faixa de substâncias com características químicas e propriedades distintas (LEHOTAY *et al.*, 2005). Os solventes testados foram: metanol, acetato de etila, acetona e acetonitrila. Para isto os experimentos foram executados com as condições: 10 g de massa de amostra, 5 mL do solvente de extração e 4,0 g de sulfato de magnésio anidro. Para separação de fases foram usadas as condições 5000 rpm e 2 min.

4.7.6 Influência da adição de NaCl

Os métodos empregados por ANASTASSIADES *et al.*, (2003) e, por BARAKAT e colaboradores (2007) utilizam sais como sulfato de magnésio e cloreto de sódio e sulfato de magnésio e acetato de sódio, respectivamente.

A adição de sais promove o efeito "salting out" em vários métodos multirresíduos, o que promove um aumento nas recuperações para analitos mais polares, pois a adição de sais diminui a solubilidade destas substâncias na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES et.al., 2009).

Para realização dos testes foram pesados 10,0 g de amostra (melado) ou 10 mL de caldo de cana em tubos de polipropileno (capacidade 50 mL); as amostras foram fortificadas no nível de 5,0 mg kg⁻¹ (amostras de melado) e 2,5 mg L⁻¹ (amostras de caldo) e foram adicionados 5 mL de acetonitrila em cada tubo; em três amostras foram adicionados 4,0 g de MgSO₄ e 1,0 g de NaCl e, nas três amostras restantes foram adicionados apenas 4,0 g MgSO₄, sem emprego de etapa de *clean-up*. Para separação de fases foram usadas as condições 5000 rpm e 2 min.

4.7.7 Avaliação da etapa de *clean-up*

A etapa de *clean-up* foi avaliada conforme o método QuEChERS original estabelecido por ANASTASSIADES *et al.*, (2003). Para isto os experimentos foram executados com as condições: 10 g de massa de amostra (melado) e 10 mL (caldo de cana), 5 mL de solvente e 4,0 g de sulfato de magnésio anidro. Para separação de fases foram usadas as condições 5000 rpm e 2 min. Para a etapa de *clean-up*, 1,0 mL do sobrenadante foi adicionado a um tubo de polipropileno contendo 0,025 g de amina primária secundária (PSA) e 0,15 g de sulfato de magnésio anidro, centrifugação a 3000 rpm durante 2 min. Uma alíquota do extrato foi retirada e 20 μL injetados no sistema cromatográfico.

4.7.8 Influência da temperatura

Para avaliar a influência da temperatura na concentração dos agrotóxicos na amostra, um teste de aquecimento foi realizado. A amostra aquosa (10,0 g de amostra e 10 mL de água ultrapura) de melado fortificada com mistura dos agrotóxicos no nível de 5 mg kg⁻¹, foi aquecida em estufa durante 1h a 105 °C, e após foi resfriada a temperatura ambiente e submetida ao processo de extração. Para isto os experimentos foram executados com as condições: 10 g de amostra, 5 mL de solvente e 4,0 g de sulfato de magnésio anidro. Para separação de fases foram usadas as condições 5000 rpm e 2 min. Os resultados obtidos da amostra aquecida e resfriada, foram comparados com aqueles obtidos para a amostra fortificada a 20 °C e não aquecida.

Para alguns resultados da otimização do preparo de amostra aplicou-se um teste estatístico utilizando o programa *GraphPad InStat (GraphPad InStat Software Inc, Version 3.00, 1997)*, com o nível de confiança de 95%.

4.8 EFEITO DE MATRIZ EMPREGANDO QUECHERS MODIFICADO

Para avaliar o efeito de matriz sobre os agrotóxicos estudados foi injetada no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos diluídos com o extrato branco da matriz extraído por QuEChERS e a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos diluída com metanol.

O cálculo do efeito de matriz (%EM) foi realizado segundo KRUVE *et al.*, (2008) aplicando a Equação 1.

$$\%EM = \frac{\text{área padrão matriz}}{\text{área padrão metanol}} x 100 \tag{1}$$

4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após a otimização do preparo de amostra e das condições de separação e determinação dos analitos, foi realizada a validação do método. Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a validação dos métodos analíticos foram: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão

(recuperação), precisão (repetitibidade e precisão intermediária) e robustez (SANCO, 2009).

4.9.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do instrumento e do método foram avaliadas pela construção de curvas analíticas através de calibração externa no solvente e por superposição da matriz com soluções analíticas nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ no LC-DAD e 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05, 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ no LC-ESI-MS/MS .

Para calibração externa por superposição da matriz foram preparadas soluções analíticas através de diluições da solução de referência com o extrato branco da matriz, extraído pelo método QuEChERS modificado. Os procedimentos foram realizados com a matriz sem a adição dos agrotóxicos, branco do procedimento, cuja procedência já foi mencionada nos itens 4.7.1 e 4.7.2. A calibração externa no solvente foi realizada por diluições da solução de referência em metanol.

Cada solução foi injetada três vezes nos dois equipamentos, e o gráfico da área do pico *versus* a concentração foi obtido com auxilio dos *softwares* dos equipamentos. A partir das curvas analíticas foi avaliada a linearidade do equipamento e método, avaliando o coeficiente de correlação linear (r).

4.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do instrumento (LDi) e o limite de quantificação do instrumento (LQi) para cada substância foi estimado a partir da relação sinal/ruído, considerando, respectivamente no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), conforme Figura 8.

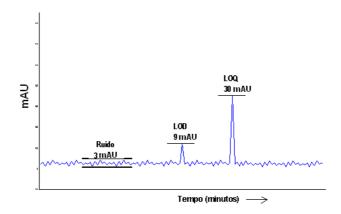


Figura 8. Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LD e LQ (Adaptado de KURZ, 2007)

Os limites instrumentais foram obtidos através de calibração externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em metanol. Os limites de detecção (LD_m) e quantificação (LQ_m) do método empregando QuEChERS modificado foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas através de diluições da solução de referência com o extrato branco da matriz, extraído por QuEChERS modificado.

Para o método empregando QuEChERS modificado o LD_m e o LQ_m , em $mg\ kg^{-1}$ para o melado e em $mg\ L^{-1}$ para o caldo de cana-de-açúcar, foi obtido multiplicando o valor estimado de LD_m e LQ_m , em $mg\ L^{-1}$, pelo fator de conversão obtido (fator = 0,5). O fator foi calculado pela razão entre o nível de fortificação da amostra e a concentração esperada para os analitos após a extração por QuEChERS, uma vez que, proporção é 1,0 g de amostra (melado) ou 1 mL (caldo) para 0,5 mL de extrato.

4.9.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação, em três níveis de fortificação, próximo aos valores de LQ_m para os analitos. No método QuEChERS modificado, utilizando LC-DAD, as amostras de melado foram fortificadas nos níveis de 0,25; 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹ e as amostras de caldo nos níveis de 0,05; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹. No LC-ESI-MS/MS as amostras de melado,

foram fortificadas nos níveis de 0,0025; 0,005 e 0,05 mg kg⁻¹ e as amostras de caldo nos níveis 0,0025; 0,005 e 0,05 mg L⁻¹ a partir da adição de um volume conhecido de solução de referência com a mistura dos agrotóxicos a 10,0 g de melado ou 10 mL de caldo de cana. Após, foram adicionados 5,0 mL de acetonitrila, 4,0 g de MgSO₄, realizada etapa de agitação, centrifugação e 1,0 mL do extrato final foi retirado para injeção de uma alíquota no sistema cromatográfico. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e injetado em triplicata no sistema cromatográfico.

Para a quantificação dos analitos foi utilizada a concentração do padrão diluído com o extrato branco da matriz. Os cálculos foram feitos de acordo com a equação 2, onde é expressa em porcentagem de recuperação.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$
 (2)

Onde:

C₁ = concentração determinada na amostra fortificada

C₂ = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C₃ = concentração esperada para o nível de fortificação

4.9.4 Precisão

A precisão dos métodos foi avaliada em função da repetibilidade (RSD_r), e da precisão intermediária (RSD_{pi}). Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração por QuEChERS em diferentes níveis de fortificação, em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes. A partir das nove determinações foi calculado o RSD%. A precisão intermediária foi avaliada com três determinações, e em diferentes dias no LC-DAD e em 6 determinações no LC-MS. O valor numérico para avaliar a precisão, RSD%, foi calculado através da equação 3.

$$RSD(\%) = \frac{s}{Xm} \times 100 \tag{3}$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.9.5 Robustez

Um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2003). Alguns exemplos de variações incluem: tempo de extração, estabilidade das soluções analíticas, variação do pH da fase móvel e composição da fase móvel em LC (ANVISA, 2003).

A robustez do método também pode ser avaliada através da variação da matriz. PIRARD *et al.* (2007) desenvolveram um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em mel por extração líquido-líquido em coluna (OCLLE) e determinação por LC-MS/MS. O método foi robusto, uma vez que, foi aplicado a diferentes tipos de méis, e aplicado a outras matrizes como abelhas e ceras.

A robustez do método QuEChERS modificado foi avaliada pela variação da matriz, uma vez que o mesmo método foi aplicado para matrizes semelhantes (melado e caldo de cana) em termos de constituição química, mas com diferentes teores destes constituintes e, consequentemente, com diferença na complexidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS POR LC-DAD

5.1.1 Composição da fase móvel

Na Figura 9 podem ser visualizados as diferentes proporções de fase móvel (MeOH e água ultrapura pH 3,0 com H₃PO₄ 1:1 v/v) e a influência no

tempo de retenção dos analitos. Nos cromatogramas das Figuras 9a e 9b, respectivamente nas proporções percentuais de MeOH:água pH 3,0 (50:50 v/v e 60:40 v/v) o fipronil não eluiu até 22 min. Aumentando-se a força de eluição , sendo utilizado a proporção metanol:água pH 3,0 (65:35 v/v), conforme Figura 9c o fipronil não eluiu até 20 min. No entanto observou-se uma maior separação entre os picos dos analitos 2,4-D e diurom. Todas as análises descritas foram feitas no modo de eluição isocrático utilizando como fase estacionária uma coluna analítica C18 5 μm (150 x 4,6 mm d.i.).

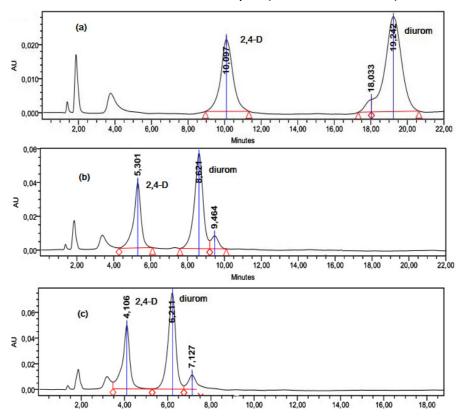


Figura 9. Composições de fase móvel e vazões testadas no LC-DAD (a) MeOH:água pH 3,0 (50:50 v/v), (b) MeOH:água pH 3,0 (60:40 v/v), (c) MeOH:água pH 3,0 (65:35 v/v); coluna analítica C18 15 cm, eluição no modo isocrático, vazão 1 mL min⁻¹

Como os resultados anteriores foram insatisfatórios, testou-se uma nova coluna analítica C18 5 µm (250 x 4,6 mm d.i.). A proporção MeOH:água pH 3,0 (68:32 v/v) não foi satisfatória, uma vez que os analitos 2,4-D e diurom coeluem conforme Figura 10a. A coluna analítica de 25 cm foi melhor comparando-se com a coluna analítica de 15 cm, uma vez que houve maior separação para os analitos mais polares (2,4-D e diurom) e picos estreitos e finos foram

observados, mas o fipronil eluiu em 18,8 min, conforme Figura 10b na proporção MeOH:água pH 3,0 (65:35 v/v).

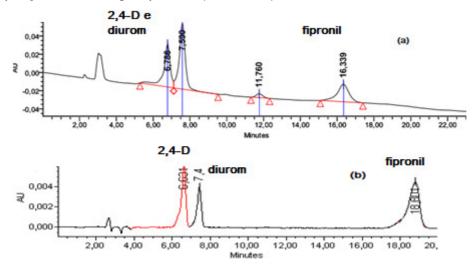


Figura 10. Composições de fase móvel e vazões na otimização da separação dos agrotóxicos por LC-DAD: (a) MeOH:água pH 3,0 (68:32 v/v), (b) MeOH:água pH 3,0 (65:35 v/v); coluna analítica C18 25 cm, eluição no modo isocrático, vazão 1 mL min⁻¹

Como a eluição por modo isocrático não foi suficiente, testou-se a eluição por modo gradiente, sendo que a efetiva separação dos picos nos cromatogramas foi adquirida com composição inicial de fase móvel metanol:água pH 3,0 acidificada com H_3PO_4 1:1 (v/v) na proporção (65:35, v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹ e aumentando para metanol:água pH 3,0 (80:20, v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹ (0-8 min), mantendo estas condições por 4 min, voltando a composição inicial em 1 min e permanecendo nestas condições até 20 min, durante 13 min. As condições ótimas de separação foram obtidas com a coluna C18 5 μ m (250 × 4.6 mm d.i.), uma vez que picos bem resolvidos e com tempo de retenção aceitável foram obtidos, conforme cromatograma de separação dos analitos no solvente mostrado na Figura 11b, e na Figura 11a é apresentado o espectro de absorção característico para cada analito.

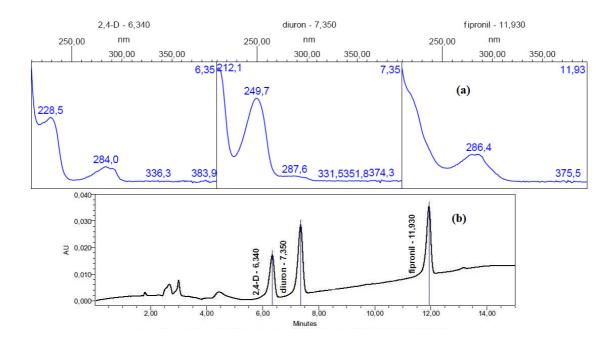


Figura 11. (a) Espectro de absorção característico para cada analito no LC-DAD. (b) Cromatograma de uma solução contendo 5 mg L⁻¹ da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD

Os agrotóxicos 2,4-D, diurom e fipronil apresentam diferentes propriedades físico-químicas e polaridades distintas e terão diferentes interações com a fase móvel e a fase estacionária.

O 2,4-D é um agrotóxico de caráter ácido, cujo pka é 2,6, apresenta alta solubilidade em água (20,0 g L⁻¹) a 20 °C em pH 5,0. No entanto a solubilidade em água deste é diminuída em pH mais ácido (em pH 1,0 = 0,31 g L⁻¹). É o mais polar, e consequentemente fica menos retido, uma vez que apresenta menor interação com a fase estacionária, principalmente com a acidificação da fase móvel.

O diurom é um herbicida ureíco mediamente polar, apresenta grupamentos mais polares, como amida. Menor solubilidade em água (0,036 g L⁻¹), comparando-se com o 2,4-D. Consequentemente, este agrotóxico interage mais com a fase estacionária que o 2,4-D.

O fipronil é um inseticida do grupo químico pirazol e a presença de halogênios em sua estrutura química confere menor polaridade, sendo este o mais apolar. As propriedades físico-químicas também indicam que este agrotóxico terá uma maior interação com a fase estacionária C18, apresentando baixa solubilidade em água 0,0019 g L⁻¹.

Além das propriedades citadas, o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) também explica a ordem de eluição mostrada em todos cromatogramas já citados, sendo 2,5 (2,4-D); 2,85 (diurom) e 4,0 (fipronil). Da literatura, sabe-se que agrotóxicos com valores de K_{ow} maiores ou que 4,0 são menos polares e consequentemente estes tem maior interação com a fase estacionária C18 que é apolar (SILVA & FAY, 2004).

Para o 2,4-D que é um agrotóxico ácido com pKa de 2,6 (SILVA *et al.*, 2007), o ajuste do pH da água para 3,0 proporcionou melhor separação. Agrotóxicos ácidos têm diferentes interações entre a FE e a FM de acordo com o valor de pH. Utilizando fase móvel acidificada, tais substâncias têm maior interação com a FE, ficando mais tempo retidos conforme Figura 12a, pois em FM neutras estas substâncias praticamente não têm interação com a FE, e acabam eluindo rapidamente (CALDAS, 2009), conforme mostrado na Figura 12b. Quando a água não é acidificada ocorre a co-eluição do 2,4-D com o pico do solvente, porque a eluição do 2,4-D dá-se próximo ao tempo de retenção do solvente.

Durante todo o procedimento de otimização da separação cromatográfica no LC-DAD, acetonitrila não foi testada como fase móvel, uma vez que o preço do solvente no mercado era superior ao do metanol.

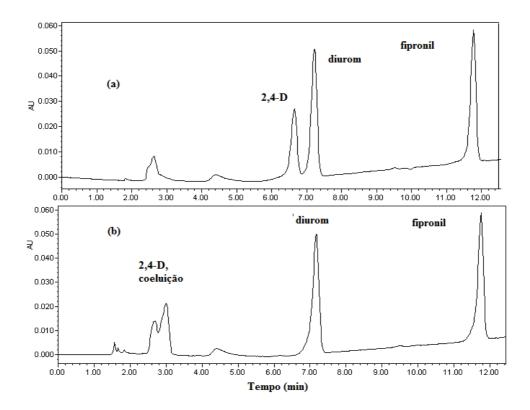


Figura 12. Cromatogramas de uma solução analítica da mistura dos agrotóxicos na concentração 10 mg L⁻¹ em MeOH, usando como fase móvel metanol:água ultrapura pH 3,0 (a) e metanol:água ultrapura em modo de eluição por gradiente (b)

5.1.2 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção

Nas condições cromatográficas otimizadas, o perfil dos espectros de absorção molecular dos agrotóxicos, injetados individualmente no sistema LC-DAD na concentração 10 mg L⁻¹, pode ser observado na Figura 13. Os espectros de absorção obtidos no LC-DAD para soluções individuais dos agrotóxicos foram utilizados para confirmar a identidade dos analitos e foram comparados os espectros obtidos para os padrões e os espectros obtidos para as amostras, na faixa de 190 a 400 nm.

Com base nos espectros, foi escolhido um comprimento de onda, no qual foram quantificados os agrotóxicos. Para o 2,4-D, conforme mostrado na Figura 13 a, este possui absorção forte em 220 nm, o qual foi escolhido como comprimento de onda para quantificação, bem como para o fipronil, embora

este apresenta alta absorção em 280 nm, Figura 13c. No entanto a área relativa ao pico do analito foi maior no comprimento de onda de 220 nm.

Já o diurom absorve com alta intensidade no comprimento de onda de 250 nm, conforme mostrado na Figura 13b, o qual foi escolhido para quantificação.

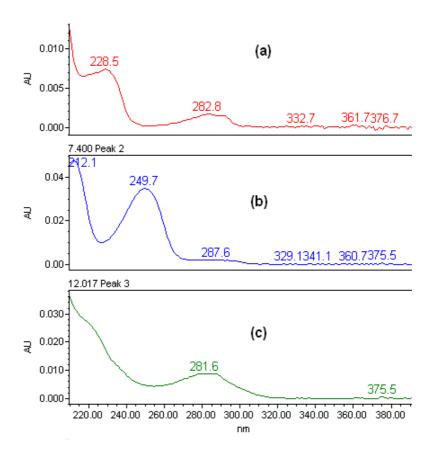


Figura 13. Espectros de absorção característicos obtidos por LC-DAD de uma solução analítica contendo 10 mg L^{-1} de cada agrotóxico: (a) 2,4-D , (b) diurom e (c) fipronil

Resumidamente, as melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e quantificação dos agrotóxicos no sistema LC-DAD estão na Tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas otimizadas para as determinações por LC-DAD

Thermo Hyperclone BDS C18 5 µm 130Å Coluna Analítica (250 x 4,6 mm d.i.) Fase móvel MeOH:Água pH 3,0 1,0 mL min⁻¹ Vazão da fase móvel 20 μL Volume de injeção **PDA** Detector Comprimento de onda para 220 nm (2,4-D e fipronil) 250 nm quantificação (diurom) Identificação t_R e espectro de absorção

5.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

As condições empregadas no sistema cromatográfico para determinação dos agrotóxicos 2,4-D, atrazina, simazina, carbofurano, clomazona, fipronil, imazapique, imidacloprido, diurom e tiametoxam foram: volume de injeção (10 μL) não foi otimizado por já estar estabelecido no laboratório, a fase móvel era composta por metanol:água 0,1% ácido fórmico (65:35, v/v), modo de eluição isocrático, vazão 0,2 mL min⁻¹. Todos analitos eluíram em tempo de retenção menor que 8 min. A fase estacionária era composta por coluna analítica XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 μm).

5.2.1 Acidificação da fase móvel

Após a definição de que a proporção MeOH:água acidificada (65:35, v/v) em modo de eluição isocrático era adequada para determinação dos analitos, dentre os ácidos orgânicos testados (ácido fórmico e ácido acético), os melhores resultados foram obtidos ao utilizar o ácido fórmico, uma vez que, para todos os agrotóxicos foi observada uma área relativa maior.

O ácido fórmico é um ácido mais forte, com valores de constante de ionização ácida (Ka) 1,77.10⁻⁴. Já o ácido acético é um ácido mais fraco, com

(Ka) 1,77.10⁻⁵. Sendo um ácido mais forte, o ácido fórmico se ioniza com mais facilidade, liberando o próton com mais facilidade, o que pode ter influenciado, principalmente porque a maioria dos analitos se ioniza no modo de ionização positiva.

A acidificação da fase móvel também é importante para agrotóxicos como 2,4-D em função de suas propriedades físico-químicas como baixos valores de log de K_{ow} e pka e alta solubilidade em água em pH acima de 3,0, conforme características mostradas na Tabela 16 no anexo 1. O pH menor proporciona maior interação entre estes analitos e a fase estacionária que é mais apolar, aumentando a retenção da substância.

5.2.2 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas

A fonte de ionização à pressão atmosférica foi empregada com interface por eletronebulização, a qual é a interface mais indicada para substâncias neutras ou polares, que podem ser protonados ou deprotonados em condições apropriadas de pH (ARDREY, 2003; CALDAS, 2009). Conforme as propriedades físico-químicas apresentadas na Tabela 16 do anexo 1, a maioria dos agrotóxicos selecionados são polares e alguns mediamente polares.

A maioria dos analitos apresentaram sensibilidade para ionização e fragmentação pelo modo positivo, com a adição de 1 próton. A adição de 1 próton, normalmente se deve a adição de 1 próton de hidrogênio [M+H]⁺, o qual provém da fase móvel (DEMOLINER, 2008), com exceção do 2,4-D e fipronil cuja ionização ocorreu no modo negativo. As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram temperatura de 100 °C na fonte; temperatura do gás N₂ (gás de dessolvatação) de 450 °C, vazão para a dessolvatação da amostra de 550 L h⁻¹ e para o cone de seleção dos íons a 50 L h⁻¹ e energia do capilar foi 3,5 kV. Algumas condições iniciais foram baseadas no trabalho desenvolvido por DEMOLINER (2008).

A Tabela 6 mostra as transições monitoradas no modo ESI (+) e no modo ESI (-), modo de aquisição MRM, energia de colisão, voltagem do cone e tempo de retenção dos analitos estudados.

Tabela 6. Condições de fragmentação para determinação dos agrotóxicos no capactrêmetro do magaza

espectrômetro de massas

Agrotóxicos	MRM transição (<i>m/z</i>)		Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)	t _R (min)
Tiametoxam	292>181 292>122	Quantificação Identificação	30 31	23 23	1,46
Imidacloprido	256>209 256>175	Quantificação Identificação	14 14	30 30	1,54
Imazapique	276>185 276>231	Quantificação Identificação	30 20	40 40	1,81
Carbofurano	222>123 222>165	Quantificação Identificação	20 20	25 25	2,15
Simazina	202>124 202>132	Quantificação Identificação	18 18	35 35	2,33
Atrazina	216>146 216>174	Quantificação Identificação	22 20	35 33	2,94
Diurom	233>72 233>160	Quantificação Identificação	20 25	28 28	3,20
Clomazona	240>125 240>100	Quantificação Identificação	20 15	25 30	3,46
2,4-D*	219>161 219>89	Quantificação Identificação	30 20	15 15	3,83
Fiproni*l	435>250 435>330	Quantificação Identificação	26 15	25 30	7,66

Dwell Time: 0,3 s

Para cada analito foram selecionados dois fragmentos característicos, como apresentado na Tabela 6, sendo vantagem fornecida por um analisador de massas em série. O fragmento mais intenso (mais estável) foi escolhido para quantificação e o segundo fragmento, menos intenso, para confirmação ou identificação do mesmo. A vantagem de obter dois fragmentos está na especificidade e com isto é possível obter informações estruturais e maior distinção de interferentes da matriz.

A Figura 14 ilustra os cromatogramas no modo MRM para a transição escolhida para a quantificação de cada analito no sistema LC-ESI-MS/MS.

^{*}Transições monitoradas no Modo ESI (-)

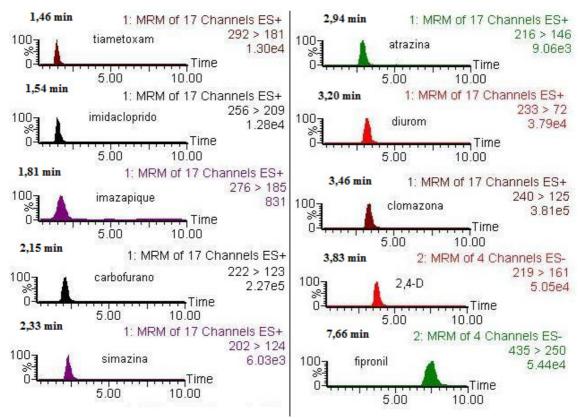


Figura 14. Cromatogramas no modo MRM contendo a fragmentação monitorada para quantificação

5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA

Na sequência, serão apresentados os resultados dos testes realizados durante o processo de otimização do método QuEChERS para amostra de melado e caldo de cana. Todos os resultados de otimização foram obtidos utilizando a determinação por LC-DAD e no nível de fortificação de 5 mg kg⁻¹ para o melado. Para o caldo de cana foi avaliada etapa de *clean-up*, utilizando PSA e MgSO₄. Todos os testes para o caldo de cana foram realizados no nível de fortificação de 2,5 mg L⁻¹, utilizando também o LC-DAD como determinação.

5.3.1 Massa de amostra

Os resultados da avaliação da massa de amostra são apresentados na Figura 15. Embora os resultados de recuperação (93,3-96,3% com RSD menor que 7,3%) para os analitos estudados sejam melhores utilizando a massa de 5,0 g, a massa de 10,0 g foi escolhida visando obter uma razão 2:1 (w/v), 2 partes de massa de amostra para 1 parte de volume do solvente de extração

(acetonitrila), uma vez que esta relação permitiu a pré-concentração dos analitos e, consequente a diminuição dos níveis de fortificação, porque o método original QuEChERS é somente para extração, e também para evitar etapas posteriores de evaporação e reconstituição em outro solvente. Para a massa de 10,0 g resultados satisfatórios de exatidão e precisão (80,4-95,1 com RSD menor que 5,8%.) também foram obtidos.

O método QuEChERS original empregou 10 g de amostra para 10 mL de solvente e muitos outros trabalhos vêm realizando modificações nesta relação, como o trabalho desenvolvido por WALORCZYK (2009) na determinação de agrotóxicos em cereal e ração. Neste trabalho foram utilizados 5 g de amostra, dissolvidas em 10 mL de água ultrapura e 15 mL de acetonitrila. No entanto uma etapa de evaporação do extrato final e reconstituição em tolueno foi necessária. BARAKAT *et al.*, (2007) para determinação de agrotóxicos em mel utilizaram 5 g de amostra de mel dissolvidas em 10 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético, o extrato final do método, também foi evaporado e reconstituído em solvente adequado.

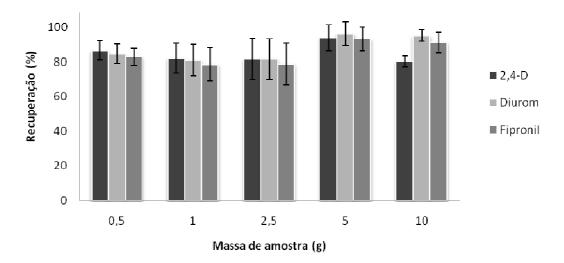


Figura 15. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando diferentes massas de amostra; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%

5.3.2 Seleção do solvente de extração

Foram avaliados metanol, acetona, acetonitrila e acetato de etila. Ao utilizar metanol, um sistema bifásico não foi observado, além do que, o sobrenadante continha sólidos não dissolvidos. Acetato de etila apresentou baixos percentuais de recuperação (23,9-56,4%) para agrotóxicos com características polares como o 2,4-D e o diurom, provavelmente em função da menor polaridade do acetato de etila em comparação a outro solvente como a acetonitrila. Com o uso da acetona, um sistema bifásico foi observado, mas o volume do extrato sobrenadante foi maior do que o volume de solvente adicionado. Usando acetonitrila recuperações aceitáveis para todos os analitos foram obtidas. Além disso, a acetonitrila não extrai muito material lipofílico como ceras, graxas e pigmentos lipofílicos (ANASTASSIADES et al., 2003). Na prática, foi observado um sistema trifásico, porque entre a fase orgânica e a fase aguosa, uma interface de material lipofílico era formada. Ao utilizar acetonitrila, o extrato sobrenadante, além de conter praticamente todo o volume de solvente adicionado, era um extrato sem sólidos insolúveis, mas apresentava cor, provavelmente, pigmentos da matriz que eram extraídos com acetonitrila (LEHOTAY et al, 2005).

Desta forma, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método, usando 5 mL de solvente para 10,0 g de amostra, resultando em uma razão de 1,0 g de amostra para 0,5 mL de solvente sem etapa de evaporação. Resultados satisfatórios foram obtidos usando acetonitrila (93,0-96,1%) com RSD menor que 8,2%, conforme ilustra o gráfico da Figura 16.

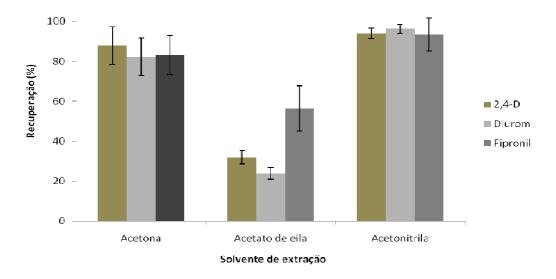


Figura 16. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando diferentes solventes de extração; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg⁻¹); 5,0 mL de solvente. As barras de erro indicam valores de RSD%

5.3.3 Influência da adição NaCl na recuperação dos analitos

Na Figura 17 são apresentados os resultados percentuais de recuperação, do QuEChERS com e sem o uso de NaCl na etapa de partição para o melado. O método QuEChERS original e o método estabelecido por BARAKAT *et al.*, (2007) utilizaram cloreto de sódio em combinação ao sulfato de magnésio, na proporção 1,0 g de NaCl para 4,0 g de MgSO₄.

Resultados semelhantes foram obtidos para todos os agrotóxicos, com e sem a adição de NaCl. Ao utilizar NaCl, foi observado um pequeno aumento nas recuperações para agrotóxicos mais polares (2,4-D e diurom), sendo as recuperações na faixa 81,1-100,0% com RSD menor que 3,6%. O uso do NaCl na etapa de partição é importante uma vez que a adição deste diminui a solubilidade dos agrotóxicos mais polares na fase aquosa.

Sem o uso de NaCl, as recuperações foram de 89,1-95,2% com RSD menor que 3,1%, sendo resultados não significantes ao nível de confiança de 95,0% conforme o programa estatístico para os analitos 2,4-D e diurom. Então, preferiu-se não utilizar NaCl na etapa de extração, diminuindo o consumo de reagentes.

Para o fipronil, que é o analito mais apolar, os resultados tiveram diferenças significantes, o que confirma que o uso de NaCl propicia melhores recuperações para agrotóxicos mais polares.

Assim, somente a adição de sulfato de magnésio foi utilizada para o método aplicado neste trabalho. O MgSO₄ possui alta capacidade de remover água, e é extremamente importante na etapa de partição, uma vez que, a adição deste induz a formação de um sistema bifásico.

RODRIGUES (2010) desenvolveu um método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS, onde foram utilizados 10,0 g de amostra, 4,0 g de MgSO₄ anidro e 10,0 mL de acetonitrila. Neste trabalho também não foi utilizado NaCl e os resultados de recuperação (83,3 – 120,4%) foram satisfatórios.

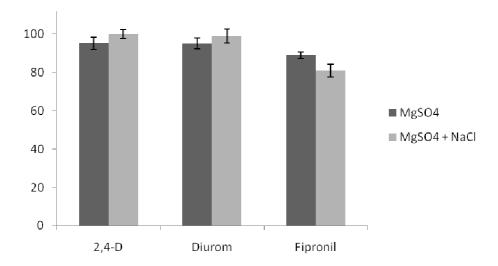


Figura 17. Recuperações (%) para os agrotóxicos empregando QuEChERS com e sem NaCl; 1 h de interação pós-fortificação (nível de 5,0 mg kg⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%

5.3.4 Avaliação da influência da etapa de *clean-up* na exatidão do método

A etapa de *clean-up* foi avaliada para ambas matrizes, ao utilizar o PSA, com o objetivo de remover interferentes da matriz. Tanto para o melado quanto para o caldo de cana, a utilização de PSA permitiu uma redução na pigmentação do extrato além de reter alguns interferentes da matriz. No entanto estes compostos não interferem na quantificação dos analitos o que foi

avaliado através do extrato branco da matriz. O *clean-up* reteve os compostos que eluem no início dos cromatogramas gerados, provavelmente compostos que causam pigmentação ao extrato como clorofila, fenóis, polifenóis, etc.

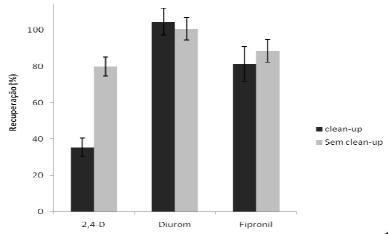


Figura 18. Método QuEChERS modificado, no nível de 5,0 mg kg⁻¹, com e sem emprego da etapa de *clean-up* para a matriz de melado. (nível de 5,0 mg kg⁻¹); 5,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD%

De acordo com os resultados de recuperação apresentados na Figura 18, é possível verificar que os valores de recuperação foram menores para os analitos avaliados, ao utilizar a etapa de *clean-up*, principalmente para o 2,4-D. Para o método com etapa de *clean-up* recuperações de 35,4 e 104,4% foram obtidas, e quando etapa de *clean-up* não foi empregada recuperações na faixa de 80,0 e 100,7% foram alcançadas. Considerando que as possíveis interferências da matriz são compensadas pelo emprego de calibração externa por superposição da matriz, neste trabalho foi estabelecido o desenvolvimento do processo sem etapa de *clean-up* para tornar o procedimento de preparo da amostra ainda mais rápido e diminuir o consumo de reagentes.

Para ambas matrizes, a não utilização da etapa de *clean-up* deve-se ao fato de que para o 2,4-D (t_R 6,7 min) apresentou recuperações insatisfatórias, no caso da matriz de caldo (12,2%) ao utilizar o PSA.

Na Figura 19 (a) é apresentado um cromatograma do extrato branco de caldo de cana extraído por QuEChERS, em (b) o extrato do procedimento QuEChERS sem a etapa de *clean-up* e em (c) com *clean-up*. Com isto pode-se observar que para o 2,4-D a área do pico foi bem inferior ao utilizar PSA, provavelmente porque o PSA retém grupamentos ácidos, uma vez que

apresenta características alcalinas, possuindo grupamentos de amina primária e secundária e pka 10,1 e 10,9, respectivamente. Em trabalho desenvolvido por AMAKURA *et al.*, (2000), o sorvente PSA foi usado no método de extração em fase sólida com objetivo de reter ácidos fenólicos em sucos de frutas.

Tanto para melado quanto para caldo de cana o uso do PSA diminuiu a pigmentação do extrato, mas proporcionou baixas recuperações para o 2,4-D, conforme dito anteriormente, sendo a etapa excluída.

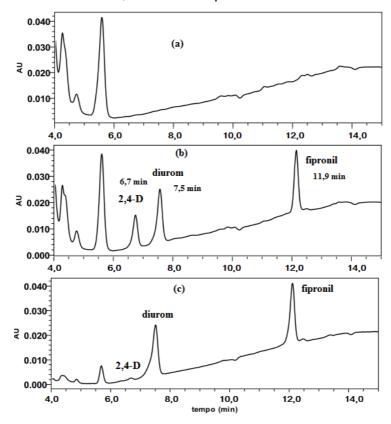


Figura 19. (a) Cromatogramas do extrato branco da matriz caldo de cana extraído por QuEChERS; (b) Cromatogramas obtidos para a mistura dos analitos no nível 2,5 mg L⁻¹ após QuEChERS sem *clean-up*; (c) Procedimento QuEChERS com *clean-up*;

5.3.5 Influência da temperatura

O teste de influência da temperatura permitiu observar que, após o aquecimento da amostra de melado a 105 °C, e posterior resfriamento para extração, as áreas referentes aos picos dos analitos 2,4-D e diurom diminuíram comparadas às áreas obtidas na extração sem aquecimento. Um pequeno

aumento no valor da área foi observado para o fipronil, conforme resultados apresentados na Figura 20.

Aplicando-se o programa estatístico para os resultados observou-se que para as recuperações dos analitos 2,4-D e diurom diferenças significantes foram observadas, ao nível de confiança de 95%, o que confirma a diminuição nas áreas destes após o aquecimento. Para o fipronil, o leve aumento na área não foi significante de acordo com o programa estatístico.

O experimento simulou o aquecimento usado na produção do melado e mostrou que, mesmo após o aquecimento e resfriamento para extração, os analitos foram detectados e as áreas dos picos quantificadas, o que também contribui com o trabalho, no sentido de que é importante este tipo de teste no desenvolvimento de método para determinar agrotóxicos em alimentos processados.

A determinação de agrotóxicos em alimentos processados utilizando o método QuEChERS é reportada no trabalho de KOLBERG *et al.*, (2010) os quais desenvolveram um método para determinação de agrotóxicos em amostras comerciais de pão utilizando QuEChERS e GC-MS, e este método foi aplicado à amostras comerciais de pão, e em algumas amostras, resíduos de pirimifos-metil (88,2 e 283,3 µg kg⁻¹) e fenitrotiona (26,3 µg kg⁻¹) foram detectados e quantificados, ambos agrotóxicos usados no armazenamento dos grãos de trigo, o que comprova que agrotóxicos usados no armazenamento do trigo podem permanecer nos derivados de trigo. Tanto o pão como o melado são alimentos processados, sendo assim é importante o desenvolvimento de métodos para a determinação de agrotóxicos em alimentos que passam por aquecimento em seu beneficiamento.

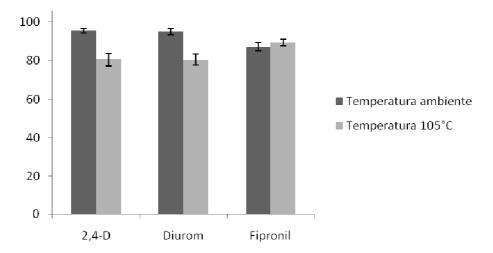


Figura 20. Comparação entre o método QuEChERS modificado, no nível de 5,0 mg kg⁻¹, com a amostra aquecida a 105 °C, resfriada a temperatura ambiente e extraída e a amostra extraída sem aquecimento anterior. As barras de erro indicam valores de RSD%

5.3.6 Efeito de matriz empregando QuEChERS modificado

No método QuEChERS modificado e determinação por LC-ESI-MS/MS foi verificado efeito matriz para as amostras analisadas, o qual na literatura é descrito por alguns autores ser causado por componentes da matriz que competem no processo de ionização na fonte e que pode causar enriquecimento ou supressão do sinal (KRUVE *et al.*, 2008). Por serem matrizes complexas, foi observado para a maioria dos analitos efeito de matriz.

Para os agrotóxicos atrazina, simazina, imazapique, tiametoxam, imidacloprido e 2,4-D foi observado supressão do sinal. Para os agrotóxicos diurom e clomazona foi observado enriquecimento do sinal. Para os agrotóxicos fipronil e carbofurano o efeito de matriz não foi pronunciado, conforme Figura 21, uma vez que a avaliação do efeito de matriz foi realizada conforme KRUVE *et al.*, (2008) e segundo esta referência alcançando resultados percentuais que ao serem iguais a 100% não indicam alteração na eficiência da ionização; maiores que 100% indicam enriquecimento da ionização e menores que 100% supressão da ionização (KRUVE *et al.*, 2008).

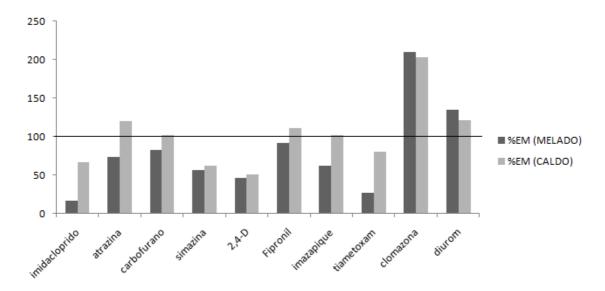


Figura 21. Percentual de efeito matriz (%EM) para o método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/ MS para determinação de agrotóxicos em melado e em caldo de cana , concentração esperada 1 mg L⁻¹

No caso do detector DAD não foi observado efeito matriz pronunciado, uma vez que no DAD as interferências da matriz são mais visíveis nos cromatogramas gerados, além do que, no DAD é possível, além da separação cromatográfica adequada, injetar o extrato branco para acompanhar os possíveis interferentes e avaliar, se estes estão próximos do tempo de retenção dos analitos estudados.

A Figura 22 ilustra o efeito de matriz para a concentração de 1 mg L⁻¹ para os analitos extraídos por QuEChERS modificado e determinação por LC-DAD em melado e caldo de cana.

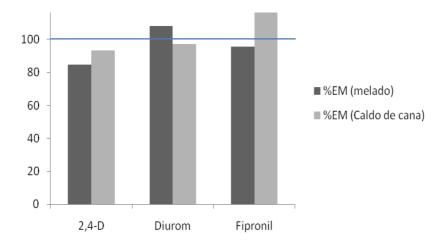


Figura 22. Comparação do percentual de efeito matriz (EM%) na concentração de 1,0 mg L⁻¹, utilizando QuEChERS modificado e determinação por LC-DAD em melado e caldo de cana.

Na Figura 23 é mostrado o cromatograma de íons total (TIC) na concentração esperada de 1 mg L⁻¹ no solvente e no extrato de melado. No modo de ionização positiva (a) foi observado efeito de matriz pronunciável e uma supressão no sinal principalmente para os agrotóxicos que eluem no início do cromatograma.

Para os analitos que se ionizam no modo de ionização negativa (b), como pode ser observado o efeito de matriz causa supressão no sinal do 2,4-D e para o fipronil o efeito de matriz não é pronunciado.

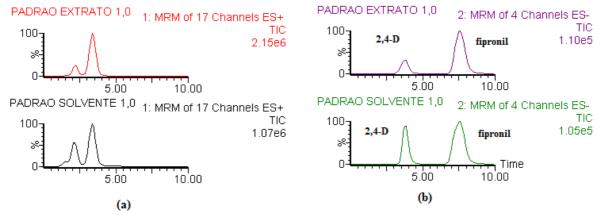


Figura 23. Cromatograma do íon total (TIC) para a mistura dos 10 agrotóxicos na concentração de 1 mg L⁻¹ (a) modo de ionização positiva (ESI +) (b) modo de ionização negativa (ESI -)

5.3.7 Procedimento QuEChERS otimizado

O procedimento otimizado consistiu na pesagem de 10 g de amostra e/ ou medida do volume de 10 mL de caldo de cana em tubo de PTFE de 50 mL (Figura 24A), um volume conhecido da mistura dos agrotóxicos foi adicionado à amostra na etapa de fortificação (Figura 24B). O tempo de fortificação era de 1 h. Após, 10 mL de água foram adicionados ao melado e para ambas amostras os passos seguintes foram: agitação em vortex até a formação de uma solução aquosa de melado. Após as amostras de caldo e de melado eram acidificadas a pH 2,0 com ácido fosfórico 1:1 (v/v), ilustrados em 24C. Seguido da adição de 5 mL de acetonitrila (Figura 24d) e agitação em vortex por 15 s. 4 g de MgSO₄ eram adicionados às amostras e agitação em vortex por 1 min (Figura 24E e 24F). O passo seguinte era centrifugação a 5000 rpm durante 2 min (24G).

Assim, por último uma alíquota do sobrenadante era injetada no sistema cromatográfico (Figura 24H).

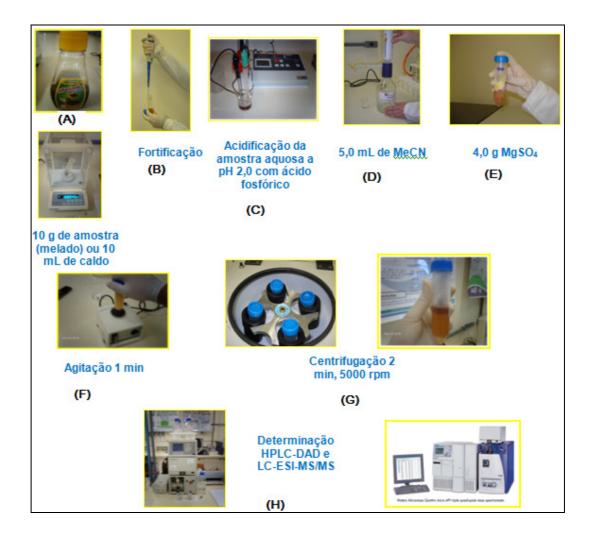


Figura 24. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS modificado

5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

5.4.1 Curva analítica e linearidade

Os parâmetros de linearidade obtidos através de calibração externa e superposição na matriz para os métodos QuEChERS e determinação por LC-DAD e QuEChERS e determinação por LC-ESI-MS/MS para ambas matrizes apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-DAD para ambas matrizes

Agrotóxicos	Curva analítica no solvente r	Curva analítica na matriz (melado) R	Curva analítica na matriz (caldo) r
2,4-D	$Y=4,28.10^4x-1,77.10^3$	$Y=3,2.10^4x-6,36.10^3$	$Y=4,33.10^4 x-9,23.10^2$
	0,9991	0,9995	0,9980
Diurom	$Y=1,02.10^5x+5,41.10^3$	$Y=9,17.10^4x-3,38.10^2$	$Y=1,04.10^5 x-4,79.10^2$
	0,9990	0,9996	0,9991
Fipronil	$Y=6,19.10^5x+6,91.10^3$	$Y=5,44.10^4x+7,7.10^3$	$Y=2,26.10^4x-1,89.10^3$
	0,9992	0,9993	0,9977

A comparação das equações das retas, na matriz e no solvente, permite avaliar que alguns analitos apresentaram coeficientes angulares bem diferentes, como os analitos imidacloprido, tiametoxam, 2,4-D, imazapique. Para estes, observou-se uma supressão do sinal, provavelmente porque estes agrotóxicos eluem no início dos cromatogramas gerados, e componentes coextraídos da matriz competem com os analitos no processo de ionização. Agrotóxicos como diurom e clomazona apresentaram enriquecimento no sinal, e os demais apresentaram uma menor diferença. No entanto, durante a a avaliação da exatidão do método, todos os cálculos foram efetuados com os padrões analíticos preparados no extrato branco da matriz, como forma de compensar o efeito de matriz. Caso os cálculos fossem realizados com os padrões analíticos no solvente, os resultados seriam superestimados, e recuperações acima de 120% ou abaixo de 60% seriam observadas.

Tabela 8. Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-ESI-MS/MS para ambas matrizes

Agrotóxicos	Curva analítica no solvente r	Curva analítica na matriz (melado) R	Curva analítica na matriz (caldo) R
2,4-D	Y=45027x-360,0	Y=21302x+110,8	Y=25010x -39,6
	0,998	0,999	0,998
Diurom	Y=51178x-750,8	Y=70481x+1044,1	Y=56881x-4,7
	0,996	0,997	0,998
Atrazina	Y=11209x-127,0	Y=8318,3+186,8	Y=9890,5x+9,5
	0,998	0,999	0,994
Carbofurano	Y=274638x-2736	Y=235459x +2478	Y=298295x +326
	0,997	0,998	0,997
Fipronil	Y=90227x+1240,9	Y=83004x+2545,2	Y=115079x+108,9
	0,999	0,996	0,991
Clomazona	Y=49496x-4777,4	$Y=1.10^6x+20390$	$Y=1,22.10^5x+970,8$
	0,997	0,997	0,990
Tiametoxam	Y=18539x-169,7	Y=3764x+1183,8	Y=16104x+3,7
	0,998	0,9993	0,997
Imidacloprido	Y=9244,4x+6,1	Y=1907x-125,4	Y=6200x-16,5
	0,999	0,993	0,997
Simazina	Y=5561,5x-3097	Y=3155,2x+86,4	Y=1190,5x-8,8
	0,999	0,997	0,993
Imazapique	Y=814,2-17,1	Y=533,01+306,19	Y=821,9 + 15,7
	0,992	0,995	0,993

A Figura 25 apresenta curvas analíticas na matriz de melado e no solvente no LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos 2,4-D, diurom e fipronil. Mostrando as situações de supressão (Figura 25 a), pouca diferença nas curvas (Figura 25 b) e enriquecimento (Figura 25 c)

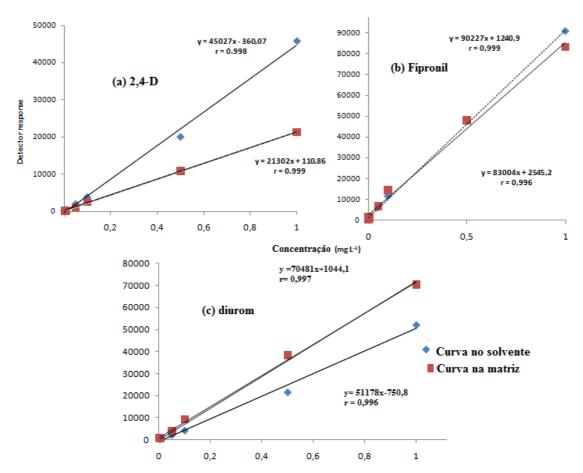


Figura 25. Comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas no extrato branco da matriz de melado e no solvente (a) 2,4-D (b) fipronil (c) diurom

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas no LC-DAD e LC-ESI-MS/MS é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,990, estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam r igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente.

5.4.2 Limites de detecção e limites de quantificação

Na Tabela 9 são apresentados os limites de detecção (LDi) e quantificação (LQi) do instrumento, apresentados em mg L⁻¹, e os limites de detecção (LDm) e quantificação (LQm) dos métodos, apresentados em mg kg⁻¹ para o melado e em mg L⁻¹ para o caldo dos agrotóxicos estudados no LC-DAD.

Tabela 9. Limites de detecção e quantificação instrumental (mg L⁻¹) e dos métodos (mg kg⁻¹ melado e mg L⁻¹ caldo)

Agrotóxico	LD _i LQ _i	LD _m	LQ _m	LD _m	LQ _m	
, ig. o. o.n.oo	,	,	Melado		Caldo	
2,4-D	0,033	0,1	0,104	0,3125	0,033	0,1
Diurom	0,016	0,05	0,016	0,05	0,0083	0,025
Fipronil	0,033	0,1	0,033	0,1	0,016	0,05

Na legislação brasileira, não há limites máximos de resíduos para agrotóxicos em alimentos derivados da cana-de-açúcar, apenas limites máximos de resíduos são estabelecidos para a cana-de-açúcar. Para os analitos determinados por QuEChERS modificado LC-DAD os limites máximos de resíduos são, respectivamente 0,1 mg kg⁻¹(2,4-D e diurom) e 0,03 (mg kg⁻¹). Alcançar limites de quantificação menores depende da matriz, do preparo de amostra, das propriedades físico-químicas dos analitos e do detector. Para monitoramento de agrotóxicos na matriz de melado, os limites de detecção do método foram menores ou iguais aos limites estabelecidos pela ANVISA. Já para a matriz de caldo de cana, os limites foram menores, em função de que o caldo de cana é uma matriz menos complexa que o melado. O melado tem um conteúdo de açúcares, vitaminas, minerais, flavonóides maior que o caldo, uma vez que o produto é derivado do caldo, através de método de concentração.

No LC-ESI-MS/MS, os limites de quantificação do método são apresentados na Tabela 10, e foram inferiores aos limites máximos de resíduos estabelecidos para a cana-de-açúcar, conforme a ANVISA.

O codex alimentarius, da Food and Agriculture Organization (FAO) dos Estados Unidos indica limites máximos de resíduos para apenas dois agrotóxicos: o 2,4-D (0,05 mg kg⁻¹) e o carbofurano (0,1 mg kg⁻¹) na cana-deaçúcar. Para o fipronil, o valor estabelecido é 0,2 mg kg⁻¹, sendo este valor resíduos deste agrotóxico em beterraba, enquanto que a União Européia não indica limites máximos de resíduos para estes agrotóxicos em cana-de-açúcar.

Tabela 10. Limites de detecção e quantificação do método (mg kg⁻¹) melado, mg L⁻¹ (caldo) e limites máximos de resíduos (mg kg⁻¹) para os agrotóxicos em cana-de-açúcar, de acordo com a ANVISA

Analito	LQm (mg kg ⁻¹) e mg L ⁻¹ (caldo)	LDm (mg kg ⁻¹) mg L ⁻¹ (caldo)	LMR (mg kg ⁻¹)	
2,4-D	0,0025	0,00083	0,1	
Atrazina	0,005	0,0016	0,25	
Carbofurano	0,0025 (melado) 0,0005 (caldo)	0,00083 0,00016	0,1	
Clomazona	0,0005	0,00016	0,05	
Diurom	0,0025	0,00083	0,1	
Fipronil	0,0005	0,00016	0,03	
Imazapique	0,05	0,016	0,1	
Imidacloprido	0,005	0,0016	0,05	
Simazina	0,05	0,016	0,02	
Tiametoxam	0,025	0,025 0,0083		

5.4.3 Exatidão

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico são: uso de materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI *et al*, 2004).

Neste trabalho, a exatidão foi avaliada em função de ensaios de recuperação. Para os ensaios de recuperação diferentes níveis de concentração do analito foram empregados, já que a eficiência do método pode variar em função da quantidade da substância adicionada.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos de contaminantes geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de ± 20% (RIBANI *et al.*, 2004; CALDAS, 2009; PRESTES, 2007; SANCO, 2009). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de ± 15% (GARP, 1999). A recuperação é

dependente da matriz, do procedimento de extração e da concentração do analito (GONÇALVES, 2007).

Os ensaios de recuperação foram realizados de acordo com o item 4.9.3 e os valores de recuperação e de RSD para as determinações por QuEChERS e LC-DAD; e QuEChERS e LC-ESI-MS/MS são apresentados nas Tabelas 11 e 12; e 13 e 14, respectivamente. Os valores de recuperação e RSD% foram adequados para determinação de agrotóxicos melado e caldo de cana. Exceto para algumas substâncias como o 2,4-D e o imazapique valores de recuperação foram inferior a 70%, principalmente nos menores níveis de fortificação, no entanto em função da complexidade das amostras estes valores são aceitáveis para determinação de analitos traço em matrizes complexas.

5.4.4 Precisão

A precisão dos métodos empregando QuEChERS modificado foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária, conforme mencionado no item 4.9.4.

A avaliação da repetibilidade para alguns analitos como atrazina e imidacloprido foi realizada a partir de dois níveis e para o imazapique, simazina, tiametoxam em um nível de concentração usando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS. Isto porque estes agrotóxicos apresentaram sensibilidades no sistema LC-ESI-MS/MS com relação aos outros. apresentando limite de quantificação mais elevado que os outros analitos, bem como, para o agrotóxico 2,4-D utilizando QuEChERS e LC-DAD para a matriz caldo de cana. Isto porque, como o trabalho foi realizado utilizando matrizes complexas, alguns componentes da matriz que são co-extraídos podem influenciar no sistema de detecção e consequente diminuir a sensibilidade do método, uma vez que, para alguns agrotóxicos a resposta do equipamento na matriz é diferente daquela obtida no solvente.

A precisão intermediária e a repetibilidade foram adequadas para métodos que quantificam elementos traços em matrizes complexas, uma vez que, apresentaram valores de RSD<20% (RIBANI *et.al.*, 2004).

Tabela 11. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) do método empregando QuEChERS e LC-DAD para os agrotóxicos (2,4-D, diurom e fipronil) em amostras de melado e caldo de cana fortificadas em diferentes níveis

Agrotóxico	Nível de	R (%)	RSDr (%)	Nível de	R (%)	RSDr
	fortificação			fortificação		(%)
	(mg kg ⁻¹)			(mg L ⁻¹)		
	(Melado)			(caldo de		
				cana)		
2,4-D	0,25	-	-	0,05	-	-
	0,5	63,3	5,7	0,1	109,0	10,3
	1,0	88,4	10,0	0,25	88,1	7,4
Diurom	0,25	95,1	7,9	0,05	92,8	3,8
	0,5	114,7	4,4	0,1	79,1	11,0
	1,0	103,1	8,5	0,25	83,6	8,1
Fipronil	0,25	84,8	5,8	0,05	97,1	12,2
	0,5	87,9	6,6	0,1	120,0	9,2
	1,0	95,3	11,0	0,25	68,0	15,1

Os resultados para a precisão intermediária, foram avaliados em três determinações para um nível de fortificação, para a matriz de melado correspondente ao nível de fortificação de 0,5 mg kg⁻¹ e para a matriz de caldo de cana no nível de 0,25 mg L⁻¹. E os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Recuperação R(%), precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-DAD para os agrotóxicos (2,4-D, diurom e fipronil) em amostras de melado e caldo de cana

Agrotóxico	Agrotóxico Nível de fortificação 0,5 mg kg ⁻¹ (melado) R (%)		RSDpi (%) Nível de fortificação 0,25 mg L ⁻¹ (caldo de cana) R (%)	
2,4-D	67,9	4,4	106,6	10,0
Diurom	97,3	6,7	99,2	9,3
Fipronil	81,2	11,9	115,0	10,4

Tabela 13. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os

agrotóxicos em amostras de melado fortificadas em diferentes níveis

	toxicos em amostras de meiado fortilicadas em diferentes niveis				
Agrotóxico	Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)	R (%)	RSDr (%)	R(%)	RSDpi (%)
2,4-D	0,0025	90,4	5,3	*	*
	0,005	118,6	18,9	86,5	4,8
	0,05	91,2	10,4	71,9	16,4
Atrazina	0,0025	-	-	*	*
	0,005	110,02	16,14	94,5	16,8
	0,05	90,03	3,69	97,9	18,0
Simazina	0,0025	-	-	*	*
	0,005	-	-	-	-
	0,05	75,60	11,68	65,7	12,9
Fipronil	0,0025	93,3	2,5	*	*
	0,005	119,1	20,0	103,0	8,0
	0,05	91,3	4,0	83,8	11,5
Imidacloprido	0,0025	-	-	*	*
	0,005	72,67	12,48	86,7	15,3
	0,05	84,33	17,83	79,2	10,6
Imazapique	0,0025	-	-	*	*
	0,005	-	-	-	-
	0,05	60,00	5,4	71,1	11,7
Carbofurano	0,0025	70,0	10,43	*	*
	0,005	106,67	6,17	95,7	5,6
	0,05	105,6	6,5	91,1	1,0
Clomazona	0,0025	88,39	5,12	*	*
	0,005	110,64	3,97	95,5	4,1
	0,05	97,17	4,85	83,3	9,8
Diurom	0,0025 0,005 0,05	93,3 120,0 95,9	3,1 13,6 8,1	* 88,8 77,9	8,7 15,0
Tiametoxam	0,0025	-	-	*	*
	0,005	-	-	-	-
	0,05	85,22	4,26	70,5	14,3

^{*}Neste nível não foi avaliado a precisão intermediária

Tabela 14. Recuperação R (%), repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi) do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de caldo de cana fortificadas em diferentes níveis

Nível de fortificação R (%) RSDr (%) R(%)

Agrotóxico

(mg kg⁻¹) 0.0025 75,1 7,7 2,4-D 87,4 7,3 0.005 83,7 13,7 0,05 95,9 7.6 82,6 4,3 Atrazina 0,0025 86,5 0,005 72,7 20,4 15,6 0,05 79,9 9,3 89,1 7,9 Simazina 0,0025 0,005 0,05 84,5 17,8 75,8 20,4 Fipronil 0,0025 83,9 5,9 0,005 84,8 8,5 84,9 6,1 0,05 103,2 7,0 82,1 2,9 Imidacloprido 0,0025 73,7 77,8 0,005 20,0 20,3 0,05 98.2 10,3 90,9 8,8 Imazapique 0,0025 0,005 0,05 94,3 20,2 104,8 12,5 Carbofurano 0,0025 99,8 8,0 0,005 99,7 19,4 87,0 1,9 0,05 101,7 4,9 93,4 4,5 5,2 Clomazona 0,0025 86,0 0,005 88,1 8,8 92,6 8.0 0,05 119,5 10,9 85,8 1,6 93.5 17,1 Diurom 0.0025 0,005 89.0 16,2 75,1 8,1 102,4 0,05 8,9 91,0 2,1 * Tiametoxam 0,0025 0,005 93,9 8,3 5,9 0,05 79,1

^{*}Neste nível não foi avaliado a precisão intermediária

5.4.5 Robustez

O método empregando QuEChERS e LC-DAD e LC-ESI-MS/MS mostrou ser robusto para determinação de agrotóxicos nas diferentes matrizes estudadas (melado e caldo de cana) apresentando exatidão e precisão satisfatórias.

5.5 APLICABILIDADE

O método empregando QuEChERS, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS, após ser validado, foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos selecionados. As amostras de melado e caldo de cana foram coletadas de um supermercado e de um restaurante de Santo Antônio da Patrulha- RS, resíduos de agrotóxicos não foram encontrados nos limites de detecção do método estabelecido.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o método empregando QuEChERS modificado, LC-DAD para a determinação dos agrotóxicos 2,4-D, diurom e fipronil em melado e caldo de cana e LC-ESI-MS/MS para determinação dos agrotóxicos atrazina, diurom, simazina, fipronil, 2,4-D, imazapique, imidacloprido, tiametoxam, carbofurano e clomazona em melado e caldo de cana são eficientes, rápidos, precisos e exatos.

O método QuEChERS modificado foi robusto e reprodutível para matrizes de caldo e melado, uma vez que, boas recuperações foram alcançadas empregando o procedimento proposto. Além disso, o procedimento de extração é extremamente rápido e o analista tem pouco contato com solvente de extração.

No método QuEChERS modificado não necessitou emprego da etapa de purificação dos extratos, uma vez que o extrato era límpido, sem sólidos não dissolvidos.

Entretanto, os componentes da matriz afetaram a eficiência da ionização para a maioria dos analitos por LC-ESI-MS/MS, o que evidencia a importância

fundamental de estudar o efeito matriz. Por LC-DAD o efeito de matriz também foi estudado, no entanto a separação cromatográfica adequada permitiu que os analitos fossem separados dos interferentes da matriz co-extraídos pelo solvente extrator, uma vez que no LC-DAD as interferências da matriz são mais visíveis nos cromatogramas gerados.

A determinação dos agrotóxicos por LC-ESI-MS/MS foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-ESI-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos agrotóxicos em estudo, em um tempo de análise menor que 8 min.

Na validação dos métodos foram obtidos resultados adequados. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de fortificação para estiveram na faixa de 63,3 a 114,7% para QuEChERS e determinação por LC-DAD para a matriz de melado e na faixa 68,0-120,0 para a matriz de caldo de cana, com valores de RSD% menores que 15,1% em ambos procedimentos. Os limites de detecção dos métodos usando o detector DAD para o melado e caldo de cana variaram na faixa de 0,016 a 0,104 mg kg⁻¹ e 0,0083 a 0,033 mg kg⁻¹, respectivamente. Por LC-ESI-MS/MS na determinação de agrotóxicos em melado os valores de recuperação ficaram na faixa 60,0-120,0, com RSD menor que 20,01% e os limites de detecção na faixa 0,00016-0,0083 mg kg⁻¹, para o caldo de cana os valores de recuperação ficaram na faixa 72,7-119,5, com RSD menor que 20,4% e os limites de detecção na faixa 0,00016-0,0083 mg L⁻¹, sendo bem menores que os LMR's estabelecidos para estes agrotóxicos em cana-deaçúcar.

O trabalho desenvolvido pode ser utilizado para monitoramento de agrotóxicos em caldo de cana e melado, uma vez, que mostrou ser robusto para as matrizes avaliadas. Os limites de quantificação foram mais baixos utilizando o detector massas que o detector DAD para a matriz de melado. No entanto, é importante que a quantificação seja executada sempre com os padrões analíticos preparados no extrato branco da matriz, como foi o caso.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

-Aplicação dos métodos validados para monitoramento de identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em melado e caldo de cana produzidos no município de Santo Antônio da Patrulhas e de outras cidades do Rio Grande do Sul e demais estados brasileiros;

- Otimização e validação de métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em outras derivados de cana-de-açúcar (rapadura, açúcar mascavo, etc);

8. TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos do método QuEChERS modificado e os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição. Além disso, estão sendo desenvolvidos e otimizados no LACOM trabalhos com o objetivo de degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

9. REFERÊNCIAS

AGROBYTE- Disponível em: http://www.agrobyte.com.br/cana.htm/. Acesso em 11 set.2010.

AMAKURA, Y., *et al.* Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 183-188, 2000.

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, p. 412-431, 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Resolução RE nº 899*,de 29/05/2003 ANVISA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos.** Brasília. 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br

ARDREY, R.E. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 276 p.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL (ANDEF). Disponível em http://www.andef.com.br/defensivos/index.asp?cod=3. Acesso em 19 set.2010.

- BAIRD, C. Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARAKAT, A. A., *et al.* Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey. **Journal of Food, Agriculture & Environment** . v. 5, p. 97-100, 2007.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 21 set 2010.
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 23 jun. 2009.
- CALDAS, S.S, Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Água subterrânea. 2009. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química) FURG, Rio Grande, RS.
- CALDAS, S.S., *et al.* Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid—liquid microextraction with liquid chromatography—tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, p. 55-62, 2010.
- CAPPELINI, L. T. D. Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diurom e fipronil em amostras de água do Ribeirão do Feijão- São Carlos- SP. 2008. 83 p. Dissertação (Mestrado em Química) USP, São Carlos, SP.
- CARVALHO, R. F. Beneficiamento dos derivados da cana-de-açúcar (melado e açúcar mascavo)- Dossiê técnico- Rede de Tecnologia da Bahia, 2007
- CHEN, H., *et al.*, Dispersive liquid—liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 80-85, 2009.
- CHIARADIA, M. C. *et al.*, O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CIESLIK, E., *et al.* Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. **Food Chem.**, *in press*, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS- Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysys and Sampling. Disponível em:

http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html. Acesso em 29 out. 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CNNPA - **Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos**. Resolução CNNPA nº 12, de 1978. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_melaco.htm/ Acesso em 10 set. 2010

DEMOLINER, A., Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

DEMOLINER, A., *et al.* Development and Validation of a Method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Classes of Pesticides and Metabolites in Water Sample. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1424-1433, 2010.

DIONÍSIO, A., *et al.* Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 19-29, 2010.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** Disponível em: https://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html/. Acesso em 04 nov.2010.

ERENO, D. Plástico renovável: Etanol e bactérias são as matérias-primas utilizadas por empresas para fabricar produtos substitutos dos derivados de petróleo. Disponível em: http://www.endeavor.org.br/ Acesso em 01 out. 2010.

EUROPA – O portal da União Européia. Disponível em:

http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/l21289 _pt.htm. Acesso em 15 out.2010.

FAO - **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação.** Summary of world food and agricultural statistics 2005. Disponível em: http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=156&year=2005. Acesso em 11 set.2010.

FARHADI, K., *et al.* LC Determination of trace amounts of Phenoxyacetic Acid Herbicides in Water after Dispersive Liquid–Liquid Microextraction, **Chromatographia.**, v. 69, p. 45-49, 2009.

- FARIA, L. J. S. Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado) UNICAMP, Campinas, SP.
- FAVA, A. R. Atletas ingerem garapa para repor energia. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2004/ju250pag8a.html. Acesso em 29 out.2010.
- FERNANDEZ-ALBA, A. Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.
- FOLHA DE SÃO PAULO, **Santa Catarina registra 19 casos da doença de chagas.** Disponível em http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u107034.shtml. Acesso em 15 out. 2010.
- FONSECA, M. B. *et al.* The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (Leporinus obtusidens). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 416–420, 2008.
- FURLANI, R., *et al.* Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection, **Food Chem.**, v. 11, *in press*, 2010.
- GARBELLINI, G. S, **Determinação eletroquímica de pesticidas em amostras dos principais derivados da cana-de-açúcar**, 2005. 164 p. Dissertação (Mestrado em Química) IQSC, São Carlos, SP.
- GARP Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas ; **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.
- GIL, Y., *et al.* Emission of pesticides to the air during sprayer application: a bibliographic review . **Atmospheric Environment**, V. 39, 5183–5193, 2005.
- GOMEZ, M.J.; SINFORT, C., *et al.* Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography—tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of Chromatography A**, V. 1114, 224–233, 2006.
- GONÇALVES, F. F, Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado. 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Química) UFSM, Santa Maria, RS.
- GOU, Y., *et al.* Automated in-tube solid-phase microextraction—high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 137–147, 2000.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de janeiro: LTC Editora, 2008. 855 p.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro v.20, p.1-80, 2008.
- IBRAC- Instituto Brasileiro da Cachaça. Disponível em http://www.ibraccachacas.org/. Acesso em 11 out. 2010.
- INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35 p.
- JARDIM, I.C.S.F., *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, No.4, p. 996-1012, 2009.
- JIMÉNEZ, J.J., *et al.* Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1187, p. 40-45, 2008.
- KOLBERG, D.I. S, Desenvolvimento e validação de método multirresíduo empregando GC-MS (NCI-SIM) para a determinação de pesticidas em grãos de trigo e seus produtos processados, 2008. 150 p. Tese (Doutorado em Química) UFSM, Santa Maria, RS.
- KOLBERG, D., *et al.* A New Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) Method for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Bread. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 21, No. 6, 1065-1070, 2010.
- KRUVE, A., *et al.* Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.
- KURZ, M. H. S, Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinação deresíduos de pesticidas em águas e degradação a campo. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) UFSM, Santa Maria, RS.
- KUSTER, M., *et al.* Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, **Mass Spectrometry Reviews**; v. 25, p. 900-916, 2006.
- LANÇAS, F. M. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 183-197, 2003.
- LEHOTAY, S.J., *et al.* Validation of a Fast and Easy Method for the determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, vol. 88, p. 412-431, 2005.

- LEHOTAY, S.J., Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study., Vol. 90, No. 2, p. 485-520, 2007. **Journal of AOAC International**
- MAIA, P. P., *et al.* Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection. **Food Chemistry**, vol. 109, p. 212-218, 2008.
- MALDANER, L., *et al.* Fases estacionárias modernas para Cromatografia Líquida de Alta eficiência. Química Nova, vol. 33, p. 1559-1568, 2010.
- MATUSZEWSKI, B. K., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytica Chemistry**, vol. 75, p. 3019-3030, 2003.
- PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008.** Brasília, 15 de abril de 2009. Disponível em:
- http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm. Acesso em 16 de out. de 2010
- PIRARD, C., *et al.* Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, V. 1152, P. 116–123, 2007.
- PIZZUTTI, I., Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without *clean-up*, by liquid chromatography—tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v.1142, p.123-136, 2007.
- PRATI, P., *et al.* Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas, **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**,v. 25(1): 147-152, 2005.
- PRESTES, O.D. Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Arroz Polido utilizando Método QuEChERS Modificado, *Clean-Up* Dispersivo e GC-MS (NCI-SIM). 2007. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química) UFSM, Santa Maria, RS.
- PRESTES, O.D., *et al.* QuEChERS Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.
- PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; FERREIRA, F.A.; **Manejo de plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar.** Viçosa, Editora Genesis, 2003. 150 p.
- RADIŠIC,M., *et al.* Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Food Chemistry.**, v. 113, p. 712-719, 2009.

RANCAN, M., *et al.* Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by highperformance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. **Journal of Chromatography A.,** v. 1123, p. 60-65, 2006.

RAVELO-PÉREZ, L., *et al.* Ionic liquid based dispersive liquid—liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas, **Journal of Chromatography A.,** v. 1216, p. 7336-7345, 2009.

RAYTON,M., *et al.* Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation, **Environ. Sci. Technol**, v. 40, n.13, p. 4151-4157, 2006.

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

RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T. S; A química dos agrotóxicos: Impacto sobre a saúde e meio ambiente, **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 10, n. 14, p. 149-158, jul./dez. 2009

RIDWAY, K., *et al.* Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 36-53, 2007.

RODRIGUES,S., *et al.* A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography—tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 82-89, 2010

RODRIGUES, S.A, Otimização e Validação de Métodos Empregando MSPD, QuChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em cebola. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

SANCHES, S.M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água, **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANCO, COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2009/10684. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** 4ª ed., Bruxelas, Bélgica. 01/01/2010.

SANTOS,R. V., *et al.* Composição química da cana-de-açúcar e das silagens com diferentes aditivos em duas idades de corte, **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 3, p. 1184-1189, 2006

SECCIA, S., et al. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v.1214, p. 115-120, 2008.

- SHIMELIS, O., *et al.* Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis, **Journal of Chromatography A**; v. 1165, p. 18-25, 2007.
- SIA SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE AGROTÓXICOS, 2003. Disponível em: http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp. Acesso em: 24 abr. 2009.
- SILVA, F., et al. Pequenas Indústrias Rurais de Cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo, EMBRAPA, v. 1, p. 155, 2003.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas Brasília, 2004, 400 p.
- SILVA, T., et al. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contamined soil, **Brazilian Journal of Microbiology**; v. 38, p. 522-525, 2007.
- SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). **Brasil supera EUA no uso de agroquímicos.** Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php. Acesso em 29 out.2009.
- SINDAG, (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). **Comunicação por e-mail** com o Sr. Ivan Amâncio Sampaio, Gerente de Informação, agosto de 2010
- SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography**. Chrom-Ed Book Series library4science, LLC, 2003a. Disponível em: http://www.library4science.com/>. Acesso em: 04 out 2010.
- SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography Detectors**. Chrom-Ed Book Series library4science, LLC, 2003b. Disponível em: http://www.library4science.com/>. Acesso em: 04 out 2010.
- SONAGLIO, E. Padronização de extratos hidroalcoolicos de, **Caderno de Farmácia –UFRGS**, v. 2 , p. 55-74, 1986.
- SPADOTTO, C.A., *et al.* Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. (Documentos, 42) Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004. 29 p.
- SKOOG, A., *et al.* **Princípios de Análise Instrumental.** 6. ed. Porto Alegre:Bookman, 2009. 1023 p.
- TFOUNI, S., *et al.* Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas** v. 27 (1): p. 76-82, 2007.
- TFOUNI, S., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice, **Food Chem.**, v. 116, p. 391-394, 2009.

- TOMLIN, C. D. S. The e-Pesticide Manual, Thirtheen Edition, Version 3.0. Londres, 2003. CD-ROM.
- TOPUZ, S., *et al.* Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD, **Food Control.**, v. 16, p. 87-92, 2005.
- TSAI, W., *et al.* Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, **Journal of Chromatography A.**, v. 1216, p. 2263-2269, 2009.
- TSENG, S., *et al.* Determination of Simazine Residue in Sugarcane by Application of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Extraction Technique, J. Food and Drug Analysis, Vol. 12, No. 1, p. 74-78, 2004.
- VÁSQUEZ, P., *et al.* Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. **Analytica chimica acta**, v. 607, p. 74–82, 2008.
- VÉKEY, 2001 Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A.** v. 921, p.227, 2001
- WALORCZYK, S., Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography—tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6522–6531, 2009.
- WAISSMANN, W., Health surveillance and endocrine disruptors, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro: v.18, n.2, mar./abr. 2002.
- WANG, S., *et al.* Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD. **Journal of Chromatography B.,** v. 877, p. 2961–2966, 2009.
- WANG, Y., *et al.* Determination of triazines in honey by dispersive liquid—liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.,** v. 1217, p. 4241–4246, 2010.
- WILKOWSKA, A., BIZIUK, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry.**, v. 125, p. 803–812, 2011.
- ZANELLA, R., et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.
- ZARZUELA, J.L.; ARAGÃO, R.F.**Química Legal e incêndios**. Editora Sagra Luzzato Porto Alegre, 1999, 467 p.

ZUIN, V., et al. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice, **J. Chromatogr.**, **A.**, v. 1114, p. 180-187, 2006.

UNICA- **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/. Acesso em 11 set.2010

10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

Sampaio, Maicon R.F.; Tomasini, Débora; Cardoso, Liziane; Rodrigues, Sherol; Caldas, S.S.; Primel, E.G. **Otimização de método para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar.** XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-SUL), 2009. Rio Grande-RS.

Sampaio, Maicon R.F.; Tomasini, Débora; Cardoso, Liziane; Caldas, S.S.; Primel, E.G. Validação de método empregando extração com acetonitrila e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em melado. XVIII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-SUL), 2010. Curitiba-PR.

Sampaio, Maicon R.F.; Tomasini, Débora; Cardoso, Liziane; Caldas, S.S.; Primel, E.G. **Avaliação do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em melado por HPLC-DAD e LC-MS.** XII Encontro de Pós-Graduação, 2010. Rio Grande - RS XVIII Encontro de Química da Região Sul

Sampaio, Maicon R.F.; Tomasini, Débora; Cardoso, Liziane; Caldas, S.S.; Primel, E.G. **Determinação de agrotóxicos em melado de cana-de-açúcar por DSPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.** IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO), 2010. Campos do Jordão-SP

Sampaio, Maicon R.F.; Tomasini, Débora; Cardoso, Liziane; Caldas, S.S.; Primel, E.G. **Avaliação do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em melado por HPLC-DAD e LC-MS.** 1° Fórum Integrado Acadêmico de Química-FURG, 2010. Rio Grande

ANEXO 1.

Tabela 15. Classe, grupo químico, LMR e intervalo de segurança para os agrotóxicos selecionados para estudo.

Agrotóxico	Classe	Grupo químico	LMR (mg kg ⁻¹) CODEX	LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA	Intervalo de segurança (dias)
Atrazina	Herbicida	Triazina	-	0,25	1
Carbofurano	Cupinicida, acaricida, nematicida	Metilcarbamato de benzofuranila	0,1	0,1	90
Clomazona	Herbicida	Isoxazolidinona	-	0,05	1
Diurom	Herbicida	Uréia	-	0,1	150
Fipronil	Formicida e cupinicida	Pirazol	-	0,03	30 (solo) 1 (foliar)
Imazapique	Herbicida	Imidazolinona	-	0,1	150
Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	-	0,05	1
Simazina	Herbicida	Triazina	-	0,02	1
Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	-	0,02	205
2,4-D	Herbicida	Ácido fenoxiacético	0,05	0,1	3

Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	pk _a	log K _{ow}	Solubilidade em água (g L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
Atrazina	1,7	2,5	0,033	0,0385 (25 °C)
Carbofurano	*	1,52	0,32	0,072 (25 °C)
Clomazona	*	2,5	1,1	19,2 (25 °C)
Diurom	*	2,85	0,0364	0,011 (25 °C)
Fipronil	*	4,0	0,0019 (pH 5), 0,0024 (pH 9)	0,00037 (25 °C)
Imazapique	2	0,393	2,15	<0,01 (60 °C)
Imidacloprido	*	0,57	0,61	4 x10 ⁻⁷ (20 °C); 9 x 10 ⁻⁷ (25 °C)
Simazina	1,62	2,1	0,0062	0,294 (25 °C)
Tiametoxam	*	-0,13 (25 ℃)	4,1	6,6x10 ⁻⁶ (25 °C)
2,4-D	2,73	2,5-2,8 (pH 1)	20,0	1,86x10 ⁻² (25 ℃)

Fonte: TOMLIN, 2003

Estruturas químicas dos agrotóxicos estudados

2,4-D

Massa molar: 221,04 g mol⁻¹

Simazina

CI NHCH₂CH₃

Massa molar: 201,7 g mol⁻¹

Atrazina

Massa molar: 215,7 g mol⁻¹

Diurom

Massa molar: 233,1 g mol⁻¹

Fipronil

$$F_3C$$
 CI
 N
 CF_3
 CF_3

Massa molar: 437,2 g mol⁻¹

Imidacloprido

Massa molar: 255,7 g mol⁻¹

Tiametoxam

Massa molar: 291,7 g mol⁻¹

Carbofurano

Massa molar: 221,3 g mol⁻¹

Clomazona

$$H_3C$$
 N
 H_2C
 N

Massa molar: 239,7 g mol⁻¹

Imazapique

Massa molar: 275,3 g mol⁻¹