

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Jorge Omar Rios**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO)  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS**

**Santa Maria, RS.  
2019**

**Jorge Omar Rios**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO) EMPREGANDO  
MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau **Mestre em Química**.

**Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes**

**Santa Maria, RS  
2019**

Rios, Jorge Omar

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO)  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS / Jorge Omar Rios.-  
2019.

89 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes

Coorientador: Renato Zanella

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

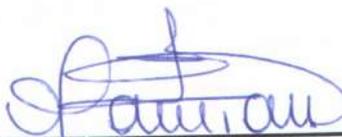
1. preparo de amostra 2. cereais 3. resíduos de  
agrotóxicos 4. cromatografia I. Damian Prestes, Osmar II.  
Zanella, Renato III. Título.

Jorge Omar Rios

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES  
VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO)  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau **Mestre em Química**.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:



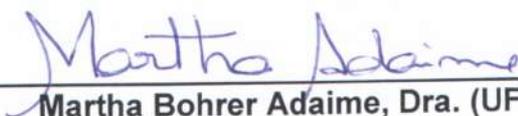
---

Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)



---

Liziara da Costa Cabrera, Dra. (UFFS)



---

Martha Bohrer Adaime, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS.  
2019

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO) EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS

Autor: Jorge Omar Rios

Orientador: Osmar Damian Prestes

**Palavras-chave:** preparo de amostra, cereais, resíduos de agrotóxicos, cromatografia

O arroz é o principal componente da dieta básica da população mundial. Este alimento é de extrema importância para a segurança alimentar mundial. Em função disso, aspectos relacionados à sua produção e consumo devem ser continuamente monitorados e avaliados em profundidade, para que o seu suprimento seja garantido. Os agrotóxicos estão presentes no meio ambiente, incluindo água, solo e alimentos, resultado de sua aplicação na agricultura moderna. Como consequência, os resíduos destes compostos, desempenham um importante papel, uma vez que são utilizados para avaliação da segurança alimentar e dos riscos à saúde humana. O presente trabalho demonstrou o uso de diferentes sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS para a remoção de coextrativos, presentes em extratos de amostras de arroz diferentes variedades. Foram realizados diversos testes com diferentes proporções e combinações de sorventes empregando metodologias distintas para o preparo das amostras e avaliação dos extratos através de técnicas auxiliares, como HPLC-UV/vis e GC-MS/MS (full scan) e avaliação da eficiência de extração, para fins de otimização do método desenvolvido e posterior validação do mesmo empregando LC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados. O método proposto envolve uma etapa de extração com acetonitrila acidificada com 5% (v/v) de ácido fórmico, seguido da partição com 4 g sulfato de magnésio e 1 g cloreto de sódio. Após, 1 mL de extrato foi submetido a etapa de d-SPE com 125 mg de C18. O extrato final, foi diluído 1:1 com fase móvel, filtrado em filtro de nylon de 0,20 µm (13 mm) e injetado no sistema LC-MS/MS. O sorvente C18, apresentou eficiência na limpeza dos extratos, com redução satisfatória dos teores de co-extrativos sem perdas significativas de analitos, tendo em vista que a obtenção de extratos limpos é fundamental para o alcance de resultados confiáveis e para a preservação do sistema cromatográfico. O método QuEChERS original acidificado associado à limpeza do extrato por d-SPE demonstrou ser eficiente para a extração e determinação de resíduos de 28 herbicidas em amostras de arroz branco polido por LC-MS/MS. Os resultados de recuperação obtidos foram satisfatórios, na faixa entre 70 a 120% para os compostos avaliados, com valores de RSD  $\leq$  20%. Este método apresentou bons resultados, com valores de LOD de 6 µg kg<sup>-1</sup> e LOQ 20 µg kg<sup>-1</sup> para todos os compostos analisados. Além disso, o método teve seu escopo de matriz estendido para arroz vermelho e arroz preto.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF HERBICIDE RESIDUES IN DIFFERENT RICE VARIETIES (WHITE, BLACK AND RED) USING QuEChERS AND LC-MS/MS

Author: Jorge Omar Rios

Advisor: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

**Keywords:** sample preparation, cereals, pesticide residues, chromatography

Rice is the main component of the basic diet of the world population. This food is of utmost importance for world food security. Therefore, aspects related to its production and consumption must be continuously monitored and evaluated in depth, so that its supply is guaranteed. Pesticides are present in the environment, including water, soil and food, as a result of their application in modern agriculture. Therefore, the residues of these compounds play an important role as they are used to assess food safety and human health risks. The present work demonstrated the use of different sorbents in the QuEChERS cleanup step for the removal of coextratives present in rice samples extracts. Several tests were performed with different proportions and combinations of sorbents employing different methodologies for sample preparation and extract evaluation by auxiliary techniques such as HPLC-UV/vis and GC-MS / MS (full scan) and extraction efficiency evaluation. , for the purpose of optimization of the developed method and subsequent validation of it using LC-MS / MS to determine the selected pesticides. The proposed method involves an extraction step with acetonitrile acidified with 5% (v / v) formic acid, followed by partitioning with 4 g magnesium sulfate and 1 g sodium chloride. Afterwards, 1 mL of extract was submitted to d-SPE step with 125 mg of C18. The final extract was diluted 1: 1 with mobile phase, filtered through a 0.20  $\mu\text{m}$  (13 mm) nylon filter and injected into the LC-MS / MS system. The C18 sorbent showed efficiency in extract cleaning, with satisfactory reduction of co-extract contents without significant analyte losses, considering that obtaining clean extracts is fundamental for the achievement of reliable results and for the preservation of the chromatographic system. . The original acidified QuEChERS method associated with d-SPE extract cleaning proved to be efficient for extraction and determination of residues of 28 herbicides in samples of polished white rice by LC-MS / MS. The recovery results obtained were satisfactory, ranging from 70 to 120% for the evaluated compounds, with RSD values  $\leq 20\%$ . This method showed good results, with LOD values of  $6 \mu\text{g kg}^{-1}$  and LOQ  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  for all compounds analyzed. In addition, the method had its matrix scope extended to red rice and black rice.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura morfológica do grão de arroz (Prestes, 2007).....	17
<b>Figura 2.</b> Cromatograma de íons totais obtido por LC-MS/MS para uma solução padrão ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada em acetonitrila. em destaque a visualização das transições srm (de quantificação) para os herbicidas bentazone, clorimuron e fenoxaprop-p-butílico.....	49
<b>Figura 3.</b> Percentuais de recuperação e rsd referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS original acidificado. ....	54
<b>Figura 4.</b> Percentuais de recuperação e RSD referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS acetato.....	55
<b>Figura 5.</b> Percentuais de recuperação e rsd referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS citrato.....	56
<b>Figura 6.</b> Comparação visual dos extratos obtidos pelas diferentes versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato e citrato acidificado) aplicadas em amostras de arroz branco, vermelho e preto.....	58
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico obtido a partir da injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade branco) avaliado no método QuEChERS original acidificado.....	60
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico obtido a partir de injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade vermelho) avaliado no método QuEChERS original acidificado.....	61
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico obtido a partir de injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade preto) avaliado no método QuEChERS original acidificado.....	62
<b>Figura 10.</b> Comparação dos cromatogramas em modo full scan (GC-MS/MS), do extrato "branco" de arroz (variedades branco, vermelho e preto) avaliados no método quechers original acidificado. ....	63
<b>Figura 11.</b> Avaliação, por HPLC-UV/vis, da presença de antocianinas provenientes da extração de amostra "branco" de cada variedade de arroz empregando o método quechers original acidificado. ....	65
<b>Figura 12.</b> Comparação dos cromatogramas em modo full scan (GC-MS/MS), do extrato "branco" de arroz (variedades preto) avaliados pelos testes de limpeza t1-t11. ....	66
<b>Figura 13.</b> Avaliação, por HPLC-UV/vis, do perfil cromatográfico de antocianinas presentes no extrato, após realização da etapa de limpeza por d-SPE (C18) para as variedades a) branco, b) vermelho e c) preto.....	67
<b>Figura 14.</b> resultados de efeito matriz obtidos na etapa de validação do método QuEChERS original acidificado.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aplicações do método QuEChERS na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz por técnicas cromatográficas. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos .....	32
<b>Tabela 3.</b> Relação dos agrotóxicos analisados por LC-MS/MS, com informações de grau de pureza, grupo químico, fórmula molecular, classificação toxicológica, pKa, solubilidade.....	36
<b>Tabela 4.</b> Relação dos testes preliminares para avaliação da etapa de limpeza por d-SPE visando a determinação de resíduos de herbicidas em arroz por LC-MS/MS. ....	43
<b>Tabela 5.</b> Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS.....	48
<b>Tabela 6.</b> Herbicidas analisados por LC-MS/MS no modo de aquisição SRM, tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as duas transições monitoradas .....	50
<b>Tabela 7.</b> Percentual de recuperação dos herbicidas em estudo, no nível de 80 µg kg <sup>-1</sup> , em diferentes tipos de arroz após aplicação das diferentes versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato e citrato).....	53
<b>Tabela 8.</b> Resultados de validação do método QuEChERS: linearidade (coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ), efeito matriz (EM %), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para arroz.....	69
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos a partir da extensão do escopo do método QuEChERS para as variedades de arroz vermelho e preto em estudo, com respectivos coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ), recuperações e RSD (%) e efeito matriz (EM). ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – ionização química a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*
- APPI – fotoionização a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure photoionization*
- CI – ionização química, do inglês *chemical ionization*
- CID – dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*
- CV – coeficiente de variação
- DAD – detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
- DC – corrente direta, do inglês *direct current*
- d. i. – diâmetro interno
- d. p. – diâmetro de partícula
- d-SPE – extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*
- ECD – detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*
- EI – ionização por elétrons, do inglês *electron ionization*
- ESI – ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
- FD – Detector de Fluorescência, do inglês *fluorescence detector*
- FE – fase estacionária
- FM – fase móvel
- GCB – carvão grafiteado, do inglês *graphitized carbon black*
- GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*
- GC-MS/MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
- IDA – ingestão diária aceitável
- IAs – ingredientes ativos
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

LD – dose letal

LMR – limite máximo de resíduo

LOD – limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

m/z – Razão massa por unidade carga

MAE – extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave assisted extraction*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

MS/MS – espectrometria de massas em série, do inglês *tandem mass spectrometry*

MSPD – dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid phase dispersion*

NPD – detector de nitrogênio e fósforo, do inglês *nitrogen phosphorus detector*

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

pH – potencial hidrogeniônico

PI – padrão interno

PSA – amina primária secundária, do inglês *primary s amine*

QuEChERS – rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, rugged and safe*

$r^2$  – coeficiente de determinação

RF – rádio frequência

RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

RSD<sub>pi</sub> – desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD<sub>r</sub> – desvio padrão relativo para repetitividade

SANTE – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*

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

SIM – monitoramento do íon selecionado, do inglês *selected ion monitoring*

SPE – extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SRM – monitoramento de reação selecionada, do inglês *selected reaction monitoring*

TIC – cromatograma do íon total, do inglês *total ion chromatogram*

TPP – trifenilfosfato

t<sub>R</sub> – tempo de retenção

UE – União Europeia

UHPLC – cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*

UV – ultravioleta

UV-vis – detecção por absorção molecular na região do ultravioleta-visível

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS .....	15
<u>1.1.1 Objetivo geral</u> .....	15
<u>1.1.2 Objetivos específicos</u> .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE ARROZ .....	16
2.2 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL.....	17
2.3 MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE ARROZ.....	17
2.4 VARIEDADES DE ARROZ .....	18
2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	19
2.6 PRODUÇÃO DE ARROZ NO BRASIL E NO MUNDO .....	20
<u>2.6.1 Importância do cultivo de arroz no mercosul</u> .....	20
2.7 AGROTÓXICOS .....	21
<u>2.7.1 Herbicidas</u> .....	22
<u>2.7.2 Resíduos de agrotóxicos em alimentos</u> .....	23
<u>2.7.3 Uso de agrotóxicos na cultura do arroz</u> .....	23
2.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.....	24
<u>2.8.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas</u> .....	25
2.9 PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....	26
<u>2.9.1 Aplicações do método QuEChERS para extração de herbicidas em arroz e técnicas cromatográficas</u> .....	30
2.10 VALIDAÇÃO .....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	33
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS.....	34
3.3 AMOSTRAS “BRANCO” DE DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ.....	35
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO .....	36
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	37

3.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO e DO PADRÃO DE CONTROLE .....	37
3.7 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ.....	38
<b>3.7.1 Escolha da fase móvel.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS.....</b>	<b>39</b>
3.8 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ.....	39
<b>3.8.1 Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) na determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz .....</b>	<b>39</b>
<b>3.8.2 Avaliação por GC-MS (modo varredura) da presença de coextrativo nos extratos obtidos pelo método QuEChERS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.8.3 Avaliação por HPLC-UV/Vis da presença de antocianinas nos extratos obtidos pelo método QuEChERS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.8.4 Avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS por d-SPE para determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz.....</b>	<b>42</b>
3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS VISANDO DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ POR LC-MS/MS .....	43
<b>3.9.1 Seletividade.....</b>	<b>44</b>
<b>3.9.2 Curva analítica e faixa de trabalho.....</b>	<b>44</b>
<b>3.9.3 LOD e LOQ do método proposto .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9.6 Efeito matriz .....</b>	<b>46</b>
<b>3.10 Aplicação do método em amostras do comércio local .....</b>	<b>47</b>
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	48
4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ.....	48
4.2 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ.....	51
<b>4.2.1 Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) na determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz .....</b>	<b>51</b>
4.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DA ETAPA EXTRAÇÃO .....	58

4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS EMPREGANDO GC-MS (MODO FULL SCAN) .....	59
4.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS EMPREGANDO HPLC-UV/Vis..	64
4.6 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE LIMPEZA POR d-SPE PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ.....	64
4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ POR UHPLC-MS/MS ....	68
<u>4.7.1 Seletividade</u> .....	68
<u>4.7.2 Faixa de trabalho e curva analítica</u> .....	68
<u>4.7.3 Exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)</u>	69
<u>4.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação</u> .....	70
<u>4.7.5 Efeito matriz</u> .....	70
4.8 EXTENSÃO DO ESCOPO VALIDADO PARA OUTRAS VARIEDADES DE ARROZ..	73
4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS REAIS.....	73
5. CONCLUSÕES.....	75
6 REFERÊNCIAS .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, os níveis tecnológicos alcançados pelos produtores rurais brasileiros atingiram patamares expressivos que podem ser mensurados pelo aumento da produtividade no campo. Isso explica, por exemplo, o fato do Brasil ter conseguido dobrar a produção de grãos para os atuais 100 milhões de toneladas, em relação à safra de 50,8 milhões de toneladas obtida no início da década de 80, com a mesma área plantada. Este desempenho no campo é possível graças à utilização de insumos, basicamente sementes, adubos e agrotóxicos de primeira linha, disponíveis para o setor. Hoje, o agronegócio entendido como a soma dos setores produtivos com os de processamento do produto final e os de fabricação de insumos, responde por quase um terço do PIB do Brasil e por valor semelhante das exportações totais do país. Cabe destacar também que o sucesso do agronegócio forma parte de uma estratégia desenhada nos anos 70 que apontou para a resolução de vários problemas estruturais que entravavam o desempenho da agricultura.

O desenvolvimento tecnológico promovido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) é usualmente citado como um dos principais fatores, mas há outros de igual ou maior relevância, como a abertura de fronteiras agrícolas no Cerrado, através de programas de colonização dirigida e as inovações introduzidas nos mecanismos tradicionais de política agrícola no Brasil.

O arroz é o principal componente da dieta básica da população mundial. Portanto, é de extrema importância para a segurança alimentar mundial e, em função disso, aspectos relacionados à sua produção e consumo devem ser continuamente monitorados e avaliados em profundidade, para que o seu suprimento seja garantido.

Os agrotóxicos estão presentes no meio ambiente, incluindo água, solo e alimentos, resultado de sua aplicação na agricultura moderna. Como consequência, os resíduos destes compostos, desempenham um importante papel, uma vez que são utilizados para avaliação da segurança alimentar e dos riscos à saúde humana. Embora o seu uso contribua para o aumento na produção, existe preocupação crescente com seus efeitos adversos no ambiente, tais como, contaminação dos recursos hídricos, impactos em organismos não alvo e na saúde humana. Por esta razão, qualquer pesticida para ser usado no controle de pragas deve possuir registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para cada situação, informando a cultura, a espécie, a praga e as restrições ao ambiente.

O uso de agrotóxicos na agricultura tem resultado na ocorrência destes compostos em produtos agrícolas. Contudo, para um determinado número de culturas, como o arroz, há uma limitação no número de métodos de análise multirresíduo de agrotóxicos. Um dos fatores limitantes, para que isso aconteça, é a grande diversidade de propriedades físico-químicas apresentada pelos agrotóxicos, assim como a complexidade da matriz a ser analisada. O arroz contém em sua composição, componentes não-voláteis de alto peso molecular, como por exemplo lipídios, além de componentes de baixo peso molecular. Estes componentes não-voláteis ao entrarem no sistema cromatográfico podem interagir com o mesmo, resultando na perda da eficiência de separação e induzindo o aumento do efeito matriz.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivos avaliar as diferentes versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato, citrato acidificado) para a determinação multirresíduo de herbicidas em arroz por LC-MS/MS.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar as melhores condições para a determinação dos resíduos de herbicidas por LC-MS/MS;
- Avaliar as versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato, citrato) em relação aos coextrativos extraídos das amostras de arroz; mediante a utilização das técnicas de GC-MS/MS e HPLC-UV/vis como procedimentos complementares de determinação de coextrativos;
- Avaliar a eficiência de diferentes sorventes na etapa de limpeza dos métodos QuEChERS avaliados;
- Validar o método desenvolvido e aplicá-lo na determinação de resíduos de herbicidas em amostras de arroz comercializadas na Região de Santa Maria.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE ARROZ

A Organização Mundial de Alimentação e Agricultura (FAO) tem considerado o arroz como um dos alimentos substanciais para a nutrição da humanidade. O cereal cumpre com a função de satisfazer as demandas energéticas requeridas pelo organismo como também ainda constitui uma fonte de geração de emprego e renda para milhões de pessoas. É um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem, e é uma cultura que apresenta ampla adaptabilidade a diferentes condições de solo e clima. É a espécie que apresenta maior potencial para o combate à fome no mundo (EMBRAPA, 2006).

A agricultura surgiu no Oriente e depois na Europa, onde iniciou-se a cultura de cereais, principalmente o trigo e o centeio (FLANDRIN; MONTANARI, 1998). Quanto ao arroz, não se tem certeza se é originário da Índia ou da China. Mas sabe-se que por volta de 2.800 a.C. esta planta era considerada sagrada pelo imperador da China. A espécie *Oryza sativa* é de origem asiática disseminada primeiramente na Índia, sendo cultivada em solos de terras baixas (FLANDRIN; MONTANARI, 1998; BASSINELLO; CASTRO, 2004).

No Brasil, o arroz foi introduzido pela frota de Pedro Álvares Cabral, porém o seu cultivo em território nacional só foi relatado após 1530, na capitania de São Vicente. Espalhou-se mais tarde por outras regiões do litoral, sempre em pequenas lavouras de subsistência, principalmente na região Nordeste (PEREIRA, 2004). Em 1820 já se plantava o cereal no Rio Grande do Sul, mas apenas em 1904 (no município de Pelotas) é que surgiram as primeiras lavouras empresariais, que utilizavam o método da irrigação por inundação (BASSINELLO; CASTRO, 2004). A partir de 1912, a cultura chegou ao município de Cachoeira do Sul, onde teve um grande impulso com veículos movidos a vapor, os quais acionavam bombas de irrigação facilitando a inundação das lavouras (PEREIRA, 2004).

## 2.2 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

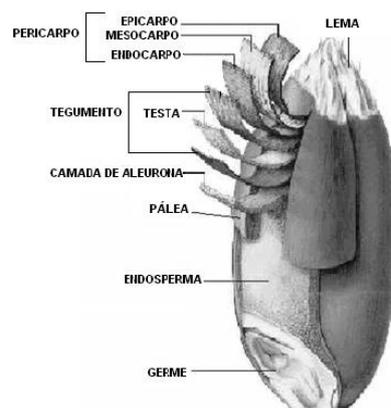
Como fonte de alimento, o arroz representa um grande valor nutricional, de alto potencial energético devido seu conteúdo proteico, sais minerais (fosfato, ferro e cálcio) e vitaminas do complexo B. “... *A proteína do arroz espalha-se por todo o grão, permeando o amido e dando-lhe um alto valor nutricional de fácil digestão*” (BASSINELLO; CASTRO, 2004).

O arroz polido, amostra de interesse deste trabalho, é constituído principalmente por carboidratos (80,4%) e possui proteínas (6,7%), lipídios (0,4%), vitaminas e minerais. A proporção dos nutrientes no grão é influenciada pela variação genotípica, condições do clima, fertilizantes, qualidade do solo, processamento/beneficiamento, armazenamento e cozimento (ZHOU et al, 2002). Este é um cereal com excelente balanceamento nutricional o que resulta numa espécie com alto potencial para o combate à fome no mundo.

## 2.3 MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE ARROZ

O grão inteiro é a forma em que o arroz é mais consumido, em sua estrutura morfológica o arroz é formado diferentes tecidos (pericarpo, tegumento, endosperma etc). Esses tecidos variam em composição química, em estrutura e funções específicas. O arroz é da família das gramíneas, do gênero *Oryza*, que possui cerca de vinte espécies, sendo a mais cultivada a *Oryza sativa* (JULIANO, 1993), a estrutura do grão de arroz pode ser visualizada na Figura 1.

**Figura 1.** Estrutura morfológica do grão de arroz (Prestes 2007).



A Normativa nº 6/2009 (BRASIL, 2009), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define o arroz em casca natural como o produto que, antes do beneficiamento, não passa por qualquer preparo industrial ou processo tecnológico. O arroz beneficiado é o produto maduro que foi submetido a algum processo de beneficiamento e se encontra desprovido, no mínimo, da sua casca.

O arroz descascado ou arroz integral (esbramado), composto pelo endosperma e pelo farelo (camada encontrada entre a casca e o endosperma), é o produto do qual somente a casca foi retirada durante o beneficiamento (BRASIL, 2009). Nele, a presença do farelo atribui ao arroz maior conteúdo de fibras, lipídios, vitaminas e minerais, e valor nutritivo superior ao branco polido. O grão integral contém ácido fítico em suas camadas periféricas, que reduz a biodisponibilidade de minerais como o ferro e o zinco (HUNT; et al., 2002).

Durante o beneficiamento do arroz, são retirados o germe (embrião), o pericarpo e a maior parte da camada interna (aleurona), se tem a variedade polida, forma mais tradicionalmente consumida do arroz. O polimento do grão resulta em redução no teor de nutrientes, exceto o amido, o que ocasiona diferenças na composição entre o arroz polido e o integral (BRASIL, 2009).

O arroz submetido à parboilização (processo hidrotérmico – anterior às etapas de descasque e polimento), no qual o arroz em casca é imerso em água, a uma temperatura acima de 58 °C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido e secagem, é chamado de arroz parbolizado. No processo de parboilização, algumas substâncias hidrossolúveis, como vitaminas e minerais, são transportadas para o centro do grão, aumentando o valor nutritivo deste arroz em relação ao polido (BRASIL, 2009).

#### 2.4 VARIEDADES DE ARROZ

O arroz branco (*Oryza sativa L.*) é a variedade mais conhecida e mais consumida. Porém, há outras variedades, como por exemplo, o arroz vermelho, sendo a variedade mais antiga cultivada no mundo e a que primeiro foi introduzida no Brasil, desde o século XVI na Bahia (PEREIRA 2004).

A designação “vermelho” dada a esta variedade é uma alusão à coloração do seu pericarpo, a qual pode variar desde o vermelho claro até o vermelho escuro. Essa coloração vermelha se deve a uma proantocianina importante para a alimentação

humana à qual se atribuem propriedades antioxidantes e ações repelentes contra alguns patógenos e predadores da cultura do arroz (SHARMA, 2010; SWEENEY et al., 2006). Esta variedade de arroz apresenta cerca de três vezes mais ferro e duas vezes mais zinco em comparação ao arroz branco, apresentando papel de destaque no combate à desnutrição (PEREIRA et al., 2009; AHUJA et al., 2011). O arroz vermelho pode ser classificado em silvestre, vermelho daninho (espontâneo) e arroz vermelho cultivado (PEREIRA, 2004). O arroz vermelho daninho (espontâneo), é considerada planta invasora ou indesejável nas lavouras de arroz branco (PEREIRA, 2004). O arroz vermelho apresenta elevada resistência aos herbicidas, pelo fato de ser frequentemente submetido a tratamentos com herbicidas, visando à sua erradicação (EMBRAPA, 2004).

O arroz preto possui mais proteínas e fibras, dez vezes mais compostos fenólicos (antioxidantes), além de maciez, aroma e sabor acastanhados, apresentando valor calórico inferior, quando comparado ao arroz branco polido.

Os habitantes da região do sudeste asiático desta têm uma longa história de consumo de arroz preto, sendo essa zona geográfica a principal área de produção agrícola desta cultura com mais de 50 variedades modernas cultivadas atualmente na China (HU et al., 2003). A antocianina presente no pericarpo, na película da semente e na fibra exterior do grão, dá à coloração preta a esta variedade de arroz (BASSINELLO et al, 2004).

O grão do arroz integral preto é rico em carboidratos, óleos, proteínas, compostos fenólicos, fibras, cobalto, vitaminas: A, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, pró-vitaminas C e E o que faz dele um alimento de excelentes qualidades nutricionais. Comparado com o arroz branco integral, o arroz preto tem uma quantidade superior de proteínas, de fibras e de carboidrato e menos gordura, dessa forma pode ser armazenado por um período maior do que o arroz branco integral (BERGMAN, 2002).

## 2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O arroz é cultivado e consumido em todos os continentes do mundo, destaca-se pela produção e área cultivada, desempenha um papel estratégico tanto no aspecto de valor econômico quanto social e faz parte da dieta alimentar de grande parte da população mundial. Este grão é considerado o cultivo de maior importância de muitos

países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania. Aproximadamente 81% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia, onde de 60 a 70% do consumo calórico de mais de 2 bilhões de pessoas é proveniente do arroz e seus subprodutos (FAO, 2004).

Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, tem-se observado que, a produção mundial aumenta, aproximadamente, 1,08% ao ano, enquanto a população e o consumo crescem 1,32%. Isso faz com que os estoques mundiais se reduzam continuamente a partir do início do século XXI, alcançando um nível mínimo considerado preocupante nos países importadores do produto.

## 2.6 PRODUÇÃO DE ARROZ NO BRASIL E NO MUNDO

Conforme os dados da Embrapa Arroz e Feijão (2014), adaptados do acompanhamento de safras do Levantamento Sistemático Agrícola (LSPA), do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), no ano agrícola de 2013, a produção total de arroz no Brasil foi 11,8 milhões de toneladas, plantadas em 2,3 milhões de hectares, com uma produtividade média de 5,0 toneladas por hectare.

A safra 2018/19 apresenta uma estimativa nacional de área destinada à rizicultura na ordem de 1.836,5 mil hectares (OBSERVATÓRIO AGRÍCOLA, 2018). Desse total, cerca de 74% (1.365,9 mil hectares) corresponde ao cultivo irrigado de arroz e os outros 26% (470,6 mil hectares) estão relacionados ao sistema de produção em condição de sequeiro.

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima que na safra de 2018/2019 a produção mundial de arroz beneficiado ficará em 491,14 milhões de toneladas. Este volume de produção é menor do que o obtido na safra de 2017/18, esta queda ocorre devido à redução de área plantio na China e a uma menor quantidade de chuvas no período das monções. A China é o principal país produtor, consumidor e importador de arroz do mundo (CONAB, 2018).

### 2.6.1 Importância do cultivo de arroz no mercosul

Os países integrantes do Mercosul deverão produzir, na safra 2018/19, o total de 15,5 milhões toneladas de arroz em casca, sendo o Brasil responsável por 77,45%

da produção do bloco, seguido de Argentina e Uruguai que em conjunto devem produzir cerca de 1,3 milhões de toneladas. Neste contexto, o Paraguai apresenta uma posição bastante importante. Desde a safra 2014/2015, este país possui produção estimada em 1 milhão de toneladas, se caracterizando como principal exportador para o mercado brasileiro (CONAB, 2018).

A fim de garantir a produção necessária e atender a alta demanda por este grão, práticas de manejo modernas associadas a mecanização do campo tem sido amplamente utilizadas. Além disso, o uso de agrotóxicos é frequente, desde o início até o final do ciclo desta cultura.

## 2.7 AGROTÓXICOS

O *Codex Alimentarius* define agrotóxicos como qualquer substância destinada a prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejadas de plantas ou animais durante a produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento de alimentos, produtos agrícolas ou alimentos para animais ou que possam ser administrados a animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias destinadas ao uso como regulador do crescimento de plantas, desfolhante, dessecante, agente de desbaste de frutas ou inibidor de brotação e substâncias aplicadas a culturas antes ou depois da colheita para proteger a mercadoria da deterioração durante o armazenamento e transporte. O termo normalmente exclui fertilizantes, nutrientes para plantas e animais, aditivos alimentares e medicamentos para animais.

A legislação brasileira estabelece na Lei 7.802 do 11 de julho de 1989 no Artigo 2º, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, considera agrotóxicos e afins como: os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também 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; assim como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Em quanto aos componentes são considerados os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins.

Os agrotóxicos têm sido utilizados principalmente para combater pragas e doenças de plantas para que as mesmas possam atingir maior produtividade. Para isso, é necessário que estes produtos apresentem toxicidade intrínseca ao organismo alvo, porém, na maioria das vezes, estes atingem os organismos não-alvo, causando impactos negativos ao meio ambiente, incluindo o homem.

Muitos dos problemas relacionados com o uso de agrotóxicos são decorrentes do desrespeito às normas de segurança para manipulação e a forma de aplicação, tanto como o desconhecimento delas. Como resultado, os alimentos e o ambiente poderão apresentar níveis de resíduos acima daqueles estabelecidos pela legislação (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAUDE, 1996).

De acordo com o Cadastro de Saúde Pública (2014), na última, década o mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu 190%, mais que o dobro do mercado global (93%), colocando ao Brasil no ranking mundial, desde 2008.

### **2.7.1 Herbicidas**

De modo geral, a necessidade do uso de agrotóxicos, pela atividade agrícola, aumenta na seguinte ordem: herbicidas>>inseticidas>fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral, a toxicidade deles é inferior comparada com a dos inseticidas. (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

Geralmente os herbicidas inibem a atividade de uma enzima/proteína na célula desencadeando uma sequência de eventos que impedem o desenvolvimento da mesma e do organismo conseqüentemente (DUKE; DAYAN, 2011).

Com relação à forma de aplicação e ao mecanismo de ação, os herbicidas podem ser classificados em: a) aplicados ao solo – se movem das raízes para as folhas (translocados via xilema); b) aplicados às folhas (contato) – reagem rapidamente no ponto de contato e não se movem nos sistemas internos das plantas (não translocados); c) aplicados às folhas (sistêmicos) – movimentam-se das folhas para os pontos de crescimento das plantas (translocados via floema) (GWYNNE;

MURRAY, 1985). O uso indiscriminado de herbicidas propiciou o desenvolvimento de muitos casos de resistência a tais compostos por diversas espécies daninhas (BURNSIDE, 1992).

### **2.7.2 Resíduos de agrotóxicos em alimentos**

O termo resíduo de agrotóxico faz referência a qualquer substância encontrada em alimentos, produtos agrícolas ou ração animal resultante do uso de um agrotóxico. O termo inclui quaisquer derivados de um agrotóxico, tais como produtos de conversão, metabolitos, produtos de reação e impurezas consideradas de importância toxicológica.

A análise de resíduos de agrotóxicos tem um papel significativo na segurança dos alimentos. Várias pesquisas citam o problema da contaminação por resíduos de agrotóxicos e a avaliação do risco à saúde humana. A nível internacional a FAO em iniciativa conjunta com o *Codex Alimentarius* criou grupos de especialistas para estabelecer limites máximos de resíduos (LMRs) para cada agrotóxico.

#### **2.7.2.1 Limites máximos de resíduos (LMRs)**

O *Codex Alimentarius* estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMRs) de agrotóxicos como o limite máximo de resíduos de um composto (que foi aplicado de acordo com as Boas Práticas Agrícolas) permitido em um determinado alimento. Os LMRs são considerados padrões comerciais para garantir que os alimentos importados e exportados sejam seguros para consumo. Comumente, cada país estabelece seus próprios regulamentos com base nas normas do *Codex Alimentarius*. No Brasil esta responsabilidade está a cargo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

#### **2.7.3 Uso de agrotóxicos na cultura do arroz**

O modelo de agricultura adotado no Brasil faz com que o uso de agrotóxicos seja intensivo. Assim, esta prática está associada a ocorrência de muitos problemas ambientais (STECKERT et al., 2009).

A cultura do arroz conduzida em condições de inundação é apontada como uma atividade de alto potencial poluidor. Herbicidas são potenciais contaminantes da água ambiental, porque são aplicados diretamente no solo ou na irrigação da água. No sistema pré-germinado de cultivo de arroz irrigado frequentemente empregado no Brasil, a drenagem da área após a semeadura pode desencadear sérios problemas ambientais. Além disso, causar a perda de nutrientes e/ou liberação de agrotóxicos que estão em suspensão na água de irrigação. Estudos realizados por Primel (2003) e Machado (2003), confirmaram a ocorrência de alguns herbicidas, de alta persistência em águas fluviais e de irrigação (MACHADO et al., 2006). Nos arrozais, as inundações aumentam as chances de transporte de agrotóxicos (principalmente herbicidas) através da água das chuvas ou escoamento de água da cauda, aumentando o potencial de poluição ambiental. As características das lavouras de arroz, as condições climáticas e o uso de agrotóxicos contribuem para o aumento do risco de poluição das águas superficiais, justificando a necessidade de quantificar o grau de ocorrência destes compostos.

## 2.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

A determinação de resíduos em amostras de tornou-se bastante relevante nos últimos anos e com ela a melhora dos métodos analíticos (em termos de exatidão, precisão, sensibilidade, redução de tempo) (ZANELLA et al., 2009; MILHOME et al., 2011).

Como técnica analítica, a cromatografia tem a finalidade de separar os analitos de interesse os quais realizam diferentes interações entre dois compartimentos: uma fase estacionária e outra fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de modo que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais (MCNAIR; MILLER, 1998).

A capacidade de separar, identificar e quantificar a tornou uma das técnicas analíticas mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, devido à sua adaptabilidade, boa sensibilidade e capacidade de analisar espécies não voláteis e termo-lábeis (TONHL et al., 2002; BHARDWAJ et al., 2015; MA THAMMANA, 2016).

Dentre os métodos cromatográficos destaca-se a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), comparada a outros métodos de separação, a LC é excepcional em termos das seguintes características: i) aplicabilidade quase universal; poucas amostras são excluídas da possibilidade de separação por LC; ii) precisão notável do ensaio ( $\pm 0,5\%$  ou melhor em muitos casos); iii) uma ampla diversidade de equipamentos, colunas e outros materiais está disponível comercialmente, permitindo o uso de desta técnica em diversas aplicações;

### **2.8.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**

Em relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) fornece vantagens significativas. A espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*) é considerada uma poderosa técnica de detecção associada à cromatografia, com características importantes: i) alta sensibilidade a diferentes analitos (detecção em nível de traço); ii) fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos eluídos da coluna e iii) capacidade de distinguir diferentes substâncias na amostra;

O acoplamento LC-MS permite detectar diferentes resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos (SILVA et al., 2014; MACHADO 2017; GRIMALT; DEHOUCK, 2016). Existem vários tipos de espectrômetros de massa, cada um com suas vantagens e limitações. Os componentes básicos de um espectrômetro de massas são: sistema de inserção de amostras, fonte de íons, analisador, detector e sistema de dados.

Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons (positivos ou negativos), os quais são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa. A função do analisador de massa é separar esses íons de acordo com a razão de sua massa/carga elétrica,  $m/z$ .

Os espectrômetros de massas podem ser classificados em várias categorias, dependendo da natureza do analisador de massa. Finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados através de um programa no computador (SILVA, 2013).

Há alguns anos, o acoplamento LC-MS era um desafio, pois seria necessário que as características de cada instrumento fossem compatíveis (CHIARADIA et al,

2008). Houve a necessidade de associar os grandes volumes de solventes utilizados no LC e o alto vácuo ( $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  torr) requerido no MS. Além disso, havia o problema de os compostos separados por LC serem relativamente não voláteis e/ou de termolábeis, de modo que não era possível ionizá-los utilizando as técnicas tradicionais de ionização.

As principais fontes de ionização são baseadas na ionização a pressão atmosférica (API), tais como ionização por *electrospray* (ESI), ionização química por pressão atmosférica (APCI) e fotoionização por pressão atmosférica (APPI).

O processo de ionização ESI ocorre pela aplicação de alta voltagem (3 a 5 kV) à solução contendo o analito passando por um tubo capilar de metal extremamente fino (agulha ESI), com fluxo geralmente de 1 a 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . À medida que o solvente evapora, a densidade de carga da superfície da molécula aumenta até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas similares excedam as tensões superficiais, levando a divisões consecutivas. Das gotículas muito pequenas e altamente carregadas, os íons da amostra são ejetados na fase gasosa por repulsão e finalmente entram no espectrômetro de massas para análise. O processo ESI é afetado por grandes gotas com alta tensão superficial, baixa volatilidade, forte solvatação iônica e alta condutividade porque impedem a boa eletronebulização (BARCELÓ; HENNION, 1997).

No modo de ionização ESI, a energia empregada nessa fonte de ionização não é suficiente para gerar fragmentação do analito. No entanto, durante o processo de eletronebulização, os íons podem formar moléculas  $[M + H]^+$  protonadas ou desprotonadas  $[M-H]^-$ , sendo que a análise pode ser realizada operando em modo positivo ou negativo, dependendo das características do analito (MOLINA et al., 1996).

## 2.9 PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Os métodos de preparo de amostra apresentam grande importância no âmbito das determinações químicas, tendo em vista que possibilitam a eliminação de interferentes que podem estar presentes nas amostras, bem como, contribuem para minimizar o aparecimento do efeito matriz nas análises cromatográficas (LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2007).

Nos últimos anos, tem se buscado o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras que possibilitem a extração de um maior número possível de compostos simultaneamente. Estes métodos são denominados de multirresíduo (PRESTES et al., 2011) e têm sido muito utilizados para extração de agrotóxicos em amostras de arroz, dentre eles pode-se destacar a extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*), (Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2009) a extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*), (Journal of Health Science, 2002) a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*)(*Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control*, 2010) dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) (TSOCHATZIS et al, 2010) e, principalmente, o método QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*) (PAREJA et al, 2011; LI et al, 2011).

Introduzido por Anastassiades e colaboradores em 2003, o método QuEChERS teve como objetivo superar limitações práticas dos métodos multiresíduos existentes, através de uma nova técnica de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos. Dentre as vantagens desse método de extração é possível destacar rapidez, facilidade, economia, robustez, segurança e explorar as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (ANASTASSIADES et al, 2003).

Na proposição do método QuEChERS original, os autores revisaram as condições comumente utilizadas na análise multiresíduo de agrotóxicos e desenvolveram este novo método de preparo de amostra, baseado em três etapas principais: extração com acetonitrila; partição promovida pela adição de sais, por exemplo, sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e cloreto de sódio, e limpeza do extrato empregando a técnica denominada extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) (ANASTASSIADES et al, 2003). A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos. É possível, com a utilização de acetonitrila, a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, e quando acidificada, permite recuperações satisfatórias (70-120%) de analitos que geralmente apresentam problemas de estabilidade (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Diferentemente dos primeiros métodos multiresíduos, que empregam dispersadores de amostras, como o Ultraturrax durante o procedimento de extração, o métodos QuEChERS utiliza procedimento de agitação

manual ou agitadores do tipo vórtex. Esses procedimentos apresentam várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como: possibilidade de realizar a extração a campo, a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista, rapidez, uma vez que não há a necessidade de lavagem do dispersador no intervalo entre uma extração e outra, e redução de contaminação entre as amostras processadas (ANASTASSIADES et al, 2003).

As qualidades do acetonitrila mencionadas anteriormente fazem com que no método QuEChERS, empreguem-se apenas 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 (ANASTASSIADES et al, 2003). Valor considerado baixo se comparado a outros métodos de extração com uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g por 1 mL no extrato final (PRESTES et al, 2009). A etapa de partição, através da adição de sais (não sendo exclusiva do método QuEChERS), promove o efeito “*salting out*”, o que ajuda a induzir a separação de fases e a partição dos compostos, com bons percentuais de recuperação para aqueles compostos com características polares, já que a adição de sais diminui a solubilidade deles na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ANASTASSIADES et al, 2003). A adição de sais como sulfatos de sódio e magnésio melhoram a recuperação de compostos polares. Por outro lado, devido a reação exotérmica, ocorrida durante a hidratação do  $MgSO_4$ , há uma elevação da temperatura da amostra entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição (em quanto se procede à sua agitação vigorosa por 1 minuto), favorecendo a extração, especialmente, dos compostos apolares. A maior capacidade do  $MgSO_4$  de remover a água quando comparado com outras sais, resultou na sua escolha no desenvolvimento do método QuEChERS (mistura de 1 g de NaCl e 4 g de  $MgSO_4$ ) (ANASTASSIADES et al, 2003).

A etapa de limpeza (*clean-up*) consiste na remoção de eventuais interferentes (coextrativos) que possam afetar os resultados em termos de confiabilidade obtidos pelo sistema cromatográfico, como componentes não voláteis da matriz como açúcares, ácidos graxos e pigmentos. Estes compostos podem ficar aderidos no conjunto injetor-insensor, e também na coluna cromatográfica, o que pode levar ao aumento na frequência de manutenções necessárias para o equipamento (HAJSLOVÁ J. et al, 2003). A ideia é usar um sorvente capaz de reter os componentes da matriz, mas não os compostos de interesse.

Juntamente com o método QuEChERS, um novo método de limpeza denominado extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) foi proposto. A d-SPE é baseada na extração em fase sólida, porém o adsorvente é adicionado diretamente ao extrato, sem necessidade de condicionamento em cartuchos. Devido ao uso de pequenas quantidades de sorventes e por não necessitar o uso de cartuchos, a d-SPE é um método que economiza tempo, trabalho, dinheiro e solvente, quando comparada ao método SPE (ANASTASSIADES et al, 2003).

No desenvolvimento do método QuEChERS foi empregado como sorvente de limpeza 25 mg de amina primária-secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) e 150 mg de MgSO<sub>4</sub> anidro. Assim, uma alíquota do extrato (por exemplo 1 mL) é colocada em contato com o material sorvente, seguido de uma agitação vigorosa (vortex), para favorecer a distribuição uniforme do sorvente, por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente, o sorvente é separado por centrifugação, sendo uma alíquota do extrato final retirada para análise (ANASTASSIADES et al, 2003). As pequenas quantidades de sorventes são justificadas pela a pequena porção do extrato que é submetida ao procedimento de limpeza.

O sorvente PSA retém fortemente ácidos graxos livres e outros compostos polares presentes na matriz, uma vez que, apresenta uma estrutura bidentada (pela presença dos grupos amino primário e secundário) conferindo a esse sorvente elevado efeito quelante. Devido a essas propriedades, o PSA é considerado um dos sorventes mais comumente usados no procedimento QuEChERS para análise de agrotóxicos. Porém, dependendo da matriz da amostra, outros sorventes podem ser utilizados na etapa de limpeza como: octadecilsilano (C18) e carvão grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*). O sorvente C18 é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, uma vez que o mesmo é capaz promover uma eficiente remoção de interferentes apolares, como substâncias graxas e lipídios (LEHOTAY, 2007). Por outro lado, o GCB tem elevado potencial para a formação de ligações do tipo ponte de hidrogênio, pela presença de grupos polares na sua superfície, com forte retenção para compostos planares (URAIRAT et al, 2010).

Apesar de a versão original do método QuEChERS ter oferecido excelentes resultados para diferentes tipos de amostras, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz. Desta forma, durante o período de otimização do método,

percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH. (ZANELLA, R. et al, 2015). Assim, Lehotay e colaboradores (2005) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato”, no qual a extração é realizada com acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v) e o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio.

Adicionalmente, em 2007 Anastassiades e colaboradores (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato”, em que o efeito tamponante (pH 5,0-5,5) é promovido pela utilização de uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado.

### **2.9.1 Aplicações do método QuEChERS para extração de herbicidas em arroz e técnicas cromatográficas**

Devido ao uso intensivo de herbicidas, inseticidas e fertilizantes, o método de extração QuEChERS tem sido amplamente aplicado para análise multirresíduo em alimentos. A Tabela 1 apresenta aplicações do método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz.

Tabela 1. Aplicações do método QuEChERS na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz por técnicas cromatográficas.

Agrotóxicos analisados	Matriz	Extração/Etapa de limpeza	Técnica	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Referência
2	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	-	73.0- 86.7	QIN et al., 2017
1	Arroz	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	30	88.1 - 100.6	LEE et al., 2014
12	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	0,015- 0,165	92 - 103	REBELO, 2016
360	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	GC-MS/MS	10	72.3 -107.5	LEE et al., 2017
310	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	UHPLC-MS/MS	10	86.8-96.1	LEE et al., 2018
5	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	24–28	71 - 116	KARTHIKEYAN et al., 2018
13	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	-	45 - 104	KOESUKWIWAT et al., 2008
4	Arroz	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	0.5 - 1	70.2 – 119.8	NI et al., 2018
219	Arroz	QuEChERS	GCMS/MS	5 - 50	70 – 120	ZEYING et al., 2015
58	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	10	82.2–125	Zhenzhen et al., 2017
17	Arroz	QuEChERS modificado	GC - ECD	-	80.7 - 119.7	TELÓ et al., 2017
5	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	10-50	70.3 - 120	CALDAS et al., 2011
108	Arroz	QuEChERS	GC-MS/MS	3,6	70–116	GRANDE-MARTÍNEZ et al., 2015
113	Arroz vermelho	QuEChERS	GC-MS/MS	0,1-25	80–120	CHO et al., 2016.
4	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS GC-MS	10-100	78.9–108	YU et al., 2019.
3	Arroz vermelho	QuEChERS	LC-MS/MS	1 - 50	78 – 114,1	LEE et al., 2016
20	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	0,4–58,8	70-120	REBELO, 2014
26	Arroz	QuEChERS	LC - MS/MS	-	70-120	PAREJA L, et al., 2011
1	Arroz	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	0.1-04	73-94	WU, X, et al. 2013
72	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	0.79-65.74	90-110	MIN et al. 2012

## 2.10 VALIDAÇÃO

A validação é o processo de avaliação que o método analítico sofre para garantir a produção de informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Este processo consiste numa sequência contínua de etapas que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. (RIBANI et al, 2004). A Tabela 2 apresenta as principais figuras de mérito avaliadas na validação de métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Tabela 2. Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Distinção de resposta entre analitos.	Extração de matriz "branco"	INMETRO
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica ( $y = ax + b$ )	INMETRO
Faixa Linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ( $y = ax + b$ )	INMETRO
EfeitoMatriz	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco	SANTE
LOD	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3	INMETRO
LOQ	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	S/R = 10	INMETRO
Precisão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	Repetitividade e Reprodutibilidade	INMETRO
Exatidão		Ensaio de fortificação	INMETRO

INMETRO, 2018; SANTE, 2017

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. O procedimento experimental constituiu na avaliação e validação do método QuEChERS para determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz por LC-MS/MS.

Para a etapa de validação, os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: seletividade, linearidade, efeito matriz, limites de detecção e quantificação do método, exatidão e precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do método foram:

- ✓ Agitador vortex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW 220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Banho ultrassônico Sonorex modelo RK 510 (Bandelin, Alemanha);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga 80-2B (Centribio, Brasil);
- ✓ Estufa com circulação de ar TE-394/2 (Tecnal, Brasil);
- ✓ Lavadora ultrassônica Unique USC-1400A (Sanders do Brasil, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Processador de alimentos Philips Walita, modelo RI1364 (Philips, China);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> (Millipore, França);
- ✓ Sistema GC-MS/MS, modelo Intuvo 9000 (Agilent, EUA), equipado com:
  - Amostrador, modelo 7693 e injetor automático, modelo G4513A (Agilent, EUA);
  - Detector espectrométrico de massas, modelo 7010B;
  - Sistema de aquisição de dados através do software MassHunter (Agilent, EUA);

- Coluna capilar de sílica fundida, 30 m de comprimento; 0,25 mm de d.i. e 0,25  $\mu$ m de espessura de filme (Agilent, EUA).
- ✓ Sistema HPLC-UV/Vis, equipado com:
  - Bomba quaternária, modelo 9010 (Varian, EUA);
  - Detector UV/Vis de comprimento de onda variável, modelo UltiMate VWD-3400RS (Thermo Scientific, EUA);
  - Coluna analítica Microsorb 100-5 C18, com 250 x 4,6 mm e 5  $\mu$ m de diâmetro de partícula (Agilent, EUA);
  - Software para aquisição de dados Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Sistema LC – MS/MS Varian 320-MS, equipado com:
  - Detector MS, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) *Mass Spectrometer* com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA);
  - Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-C, forno para coluna e sistema de desgaseificação (Varian, EUA);
  - Coluna analítica Pursuit XRs Ultra C18 100 x 2.0 mm (i.d) e 2.8  $\mu$ m tamanho de partícula
  - Sistema de aquisição de dados através do Software MS Workstation Version 6.9.2 (Varian, EUA);
  - Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra)
- ✓ moinho analítico IKA A11 Basic.

### 3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

Reagentes, solventes e demais materiais utilizados neste trabalho estão listados abaixo:

- Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich, China);
- Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico >98% (Sigma Aldrich, EUA);

- Água purificada em sistema Milli-Q Direct3UV® com resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Carvão Supelclean ENVI-Carb, dp 105-125 μm (Supelco, EUA);
- Citrato de sódio tribásico dihidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Citrato de sódio dibásico sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio (Merck, Brasil);
- Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm (Vertical, Tailândia);
- Frascos de vidro (*via*), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Gás hélio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Gás nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Gás hidrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Hexano, 95% n-hexano (Panreac, Espanha);
- Iodo ressublimado (Merck, Alemanha);
- Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Padrões sólidos dos agrotóxicos em estudo com pureza de 94,0 a 99,9% (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- Seringas de 3 mL HSW Norm-Ject® (Henk Sass Wolf, Alemanha);
- Sulfato de magnésio anidro (Scharlau, Espanha);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarsted, Alemanha);
- Sorvente Bondesil C18 com dp de 40 μm (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com dp de 40 μm (Agilent, EUA);
- Sorvente Z-Sep+ com dp de 40 μm (Supelco, EUA);
- Vidraria comum de laboratório.

### 3.3 AMOSTRAS “BRANCO” DE DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ

As etapas de avaliação e validação do método foram realizadas empregando amostras “branco” de arroz (branco, vermelho e preto), cultivadas isentas de agrotóxicos, adquiridas em uma empresa localizada na cidade de Santa Maria (RS). Para o processamento, as amostras foram moídas em moinho analítico IKA A11 Basic por 1 min. Após etapa de moagem, as amostras foram armazenadas em potes

individuais de polipropileno devidamente identificados, mantidas em freezer a temperatura  $\leq -10$  °C até o uso.

### 3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

Informações gerais como fórmula molecular, grupo químico e pureza dos padrões analíticos sólidos dos agrotóxicos de diferentes classes selecionados para este estudo, são listadas na Tabela 3. Os herbicidas selecionados para este estudo foram selecionados, principalmente, de acordo com os compostos que possuem valores de LMR estabelecidos pela ANVISA, União Europeia (2016) e *Codex Alimentarius* (2013).

Tabela 3. Relação dos agrotóxicos analisados por LC-MS/MS, com informações de grau de pureza, grupo químico, fórmula molecular, classificação toxicológica, pKa, solubilidade.

Agrotóxicos	Grau de pureza (%)	Grupo químico	Fórmula molecular*	pKa	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
2,4 D	99,5	Ácido ariloxialcanóico	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,4	24.300
Ametrina	98,2	Triazina	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S	10,07	200
Atrazina	98,1	Triazina	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	1,7	35
Bentazona	98,0	Benzotiazinona	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	3,51	7.112
Bispirabaque sódico	98,3	pirimidinil-carboxila	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>8</sub>	3,35	64.000
Cianazina	99,0	Triazina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>	12,9	171
Ciclosulfamuron	99,0	Sulfonilureia	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	5,04	6,52
Clomazone	98,5	Isoxazolidinona	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub>	n.a.	1.102
Clorbromuron	98,3	Urea	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.a.	35
Clorimuron etílico	97,0	Sulfonilureia	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	4,2	1.200
Desmedifan	97,5	Carbamato	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	n.a.	5,6
Dimetanamida	98,0	Cloroacetamida	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	n.a.	1.200
Diuron	97,5	Fenilamida	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	n.a.	35,6
Etoxisulfuron	99,0	Sulfonilureia	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S	5,28	5.000
Fenoxaprop-etílico	99,0	Ariloxifenoxipropionato	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>5</sub>	n.a.	0,9
Fluasifop-p-butílico	97,0	Ariloxifenoxipropionato	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	n.a.	0,93
Fluroxipir	96,5	Composto de piridina	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,94	6.500
Linuron	99,4	Urea	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.a.	63,8
Metobromuron	98,0	Urea	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,0	328
Metolaclo	97,0	Cloroacetamida	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	n.a.	530
Metoxuron	99,5	Urea	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.a.	678
Metribuzim	99,8	Triazinona	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> OS	0,99	1.165
Metsulfuron metílico	99,0	Sulfonilureia	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	3,75	2.790
Monolinuron	99,0	Urea	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.a.	735
Oxifluorfen	98,0	Éter difenílico	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	n.a.	0,116
Pendimetalina	99,5	Dinitroanilina	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2,8	0,33
Pirazosulfuron etílico	98,5	Sulfonilureia	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	3,7	14,5

Agrotóxicos	Grau de pureza (%)	Grupo químico	Fórmula molecular*	pKa	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
Piridato	96,5	Fenilpiridazina	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	n.a.	1,49
Prometrina	99,3	Triazina	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	4,1	33
Propanil	99,0	Anilida	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO	19,1	95,0
Simazina	99,5	Triazina	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	1,62	5
Terbutilazina	99,5	Triazina	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	1,9	6,6
Tiobencarbe	98,0	Tiocarbamato	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ClNOS	n.a.	16,7

\*Solubilidade em água a 20 °C; na: não se aplica

### 3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoque foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> para todos os analitos selecionados, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa pesada de cada padrão sólido foi dissolvida em acetonitrila e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 °C. Após, preparou-se soluções de trabalho em acetonitrila na concentração individual de 10 mg L<sup>-1</sup>. A partir destas soluções, preparou-se em acetonitrila uma mistura contendo todos os compostos na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>.

Para injeção no sistema LC-MS/MS, as soluções analíticas foram preparadas nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg L<sup>-1</sup> para todos os compostos, em acetonitrila e no extrato da variedade de arroz branco.

### 3.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO e DO PADRÃO DE CONTROLE

A seleção do padrão interno (PI) deve obedecer aos seguintes critérios: “idealmente, a substância utilizada como padrão interno deve possuir características físico-químicas similares às substâncias que serão quantificadas, ter tempo de retenção próximo a essas substâncias, não reagir com as substâncias ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e não deve coeluir com os agrotóxicos estudados. Este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico” (LANÇAS, 2004).

Para a escolha dos padrões interno e de controle procurou-se analitos que tivessem características físico-químicas similares aos analitos estudados e que estariam ausentes nas amostras.

Como padrão de controle fez-se uso de atrazina deuterada. Esse composto foi utilizado para avaliar o procedimento de extração, não sendo necessário seu uso como corretor de recuperação para nenhum dos analitos estudados. O composto trifenilfosfato foi escolhido como padrão interno, para verificar as variações do sinal analítico no instrumento, não sendo utilizada a sua resposta para os cálculos de recuperação. Este foi adicionado ao final da etapa de preparo da amostra diretamente no vial antes da injeção cromatográfica, resultando em uma concentração de 100 µg L<sup>-1</sup>.

### 3.7 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ

O método foi construído após a infusão de cada analito desejado, no LC-MS/MS, através de soluções analíticas na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, onde as informações como: íon precursor, íon produto, energia de colisão de cada agrotóxico de interesse foram adquiridas. Os parâmetros como temperatura da fonte, voltagem do capilar e o modo de ionização (ESI +/-), temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente foram avaliados. Após obtenção das melhores condições, injetou-se uma solução na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup> a fim de ajustar o tempo de retenção de cada analito e avaliar a intensidade do sinal dos mesmos.

#### 3.7.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel foi baseada em trabalhos previamente desenvolvidos no LARP-UFSM. As condições empregadas no sistema cromatográfico para a determinação de resíduos de herbicidas avaliados neste estudo estão descritas a seguir:

- ⇒ Fase móvel: solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> (A) e metanol (B);
- ⇒ Vazão da fase móvel: 150 µL min<sup>-1</sup>;
- ⇒ Fonte de ionização: ESI;
- ⇒ Analisador: Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS;

### 3.7.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

Os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS foram otimizados previamente no LARP-UFSM e as condições utilizadas para a otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de arroz estão descritas a seguir.

- ⇒ Temperatura da coluna: 30 °C;
- ⇒ Pressão do gás de nebulização: 20 psi;
- ⇒ Volume de injeção: 10 µL;
- ⇒ Temperatura de dessolvatação: 250 °C;
- ⇒ Vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 40 psi;
- ⇒ Temperatura da fonte: 50 °C.
- ⇒ Pressão do gás de colisão: 1,8 mTorr

Os íons característicos de cada composto foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo (Q3) foi efetuada a varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. Após avaliou-se as transições no modo SRM, para escolher a transição a ser utilizada como quantificação (maior intensidade) e de identificação (de segunda maior intensidade) dos agrotóxicos estudados.

## 3.8 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ

### 3.8.1 Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) na determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz

**Preparo do *slurry* das amostras de arroz:** Porções de 50 g de arroz polido (orgânico) dos três tipos e previamente moído foram homogeneizadas com 50 mL de água ultrapurificada em processador do tipo ultra-turrax por 1 min a 10.000 rpm. A proporção amostra: água (1:1) foi utilizada baseada em trabalho desenvolvido por Cabrera et. al (2012). Este preparo foi realizado para cada uma das variedades de arroz avaliadas. Após preparado o *slurry* foi imediatamente utilizado.

Devido à complexidade da amostra em estudo e aos baixos níveis de concentração que os agrotóxicos podem estar presentes, o preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis (PRESTES, 2009). Devido as vantagens e as diversas aplicações, diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) foram avaliadas na etapa de preparo de amostra das diferentes variedades de arroz estudadas neste trabalho. Os testes realizados na etapa de extração estão abaixo descritos.

**Método QuEChERS original acidificado:** Este teste foi baseado no método QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003). Os experimentos foram realizados através da extração com 10 mL acetonitrila contendo 5% (v/v) de ácido fórmico e partição com 1 g de cloreto de sódio (NaCl) e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), utilizando vórtex para agitação (1 min) e centrifugação a 3400 rpm por 8 min.

**Método QuEChERS acetato:** Este teste foi realizado baseado no método QuEChERS acetato (LEHOTAY et al., 2005). Os experimentos foram realizados através da extração com 10 mL acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v) e partição com 1,7 g acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) utilizando vórtex para agitação (1 min) e centrifugação a 3400 rpm por 8 min.

**Método QuEChERS citrato acidificado:** Este teste foi realizado no método QuEChERS citrato (ANASTASSIADES et al., 2007). Os experimentos foram realizados através da extração com 10 mL acetonitrila e partição com 4 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) e 0,5 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.1,5H<sub>2</sub>O) utilizando vórtex para agitação e centrifugação a 3400 rpm por 8 min.

Cada um dos procedimentos acima descritos foi avaliado em função da eficiência de extração (recuperação% e RSD%). Nesta etapa, realizou-se fortificação da amostra “branco” das diferentes variedades de arroz avaliadas (branco, vermelho e preto) (n=6, para cada herbicida) no nível 80 µg kg<sup>-1</sup>. Após o tempo de contato de 30 min, efetuou-se a etapa de extração utilizando cada uma das versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) conforme anteriormente descrito.

Após realização da etapa de extração, uma alíquota de cada um dos extratos obtidos foi submetida a procedimento de limpeza por d-SPE. Neste experimento, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf de 2 mL, contendo 125 mg C18 e 150 mg MgSO<sub>4</sub>. O tubo foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado (3400 rpm r

10°C). Após, o extrato foi transferido para vial e diluído na proporção 1:1 com solução de fase móvel (item 3.7.1), sendo posteriormente analisado por LC-MS/MS. Avaliou-se a eficiência de extração de cada método testado em função do número de compostos com recuperações entre 70 e 120%, com RSD < 20%.

### **3.8.2 Avaliação por GC-MS (modo varredura) da presença de coextrativo nos extratos obtidos pelo método QuEChERS**

A técnica de GC-MS foi empregada na avaliação qualitativa da presença de coextrativo nos extratos provenientes de cada um dos métodos avaliados. As condições utilizadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, estão descritas a seguir:

- ❖ Vazão: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- ❖ Gás de arraste: hélio
- ❖ Temperatura do injetor: 280 °C
- ❖ Volume e modo de injeção: 1 µL - *splitless* pulsado
- ❖ Temperatura do forno: mantido por 1 min a 60°C, 40°C/min para 170 °C e 10°C/min para 310 °C.
- ❖ Coluna capilar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
- ❖ Temperatura do *transfer line*: 290 °C
- ❖ Temperatura da fonte: 300 °C
- ❖ Temperatura dos quadrupolos MS1 e MS2: 150 °C
- ❖ Modo de ionização: impacto por elétrons
- ❖ Modo de aquisição: varredura (*full scan*)

Avaliou-se a presença e eficiência de remoção dos coextrativo por comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos “branco” (sem etapa de limpeza) com os extratos obtidos após a realização dos testes de limpeza.

### **3.8.3 Avaliação por HPLC-UV/Vis da presença de antocianinas nos extratos obtidos pelo método QuEChERS**

A técnica de HPLC-UV/Vis foi empregada na avaliação qualitativa da presença de pigmentos (especialmente antocianinas, nas variedades de arroz vermelho e preto) nos extratos provenientes do método QuEChERS e da etapa de limpeza melhor avaliadas. A separação cromatográfica foi realizada com o uso do sistema HPLC-UV/Vis e coluna Microsorb 100-5 C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). O software utilizado para controle de instrumentos e processamento de dados foi Chromeleon 6.8. A fase móvel foi composta por ácido fórmico:acetonitrila:água na proporção 10:9:81 (v/v). Foi utilizado modo de eluição isocrático e tempo total de análise cromatográfica de 30 minutos. A vazão e o volume de injeção utilizados foram 1 mL min<sup>-1</sup> e 20 µL, respectivamente. A detecção das antocianinas foi realizada empregando o comprimento de onda de 525 nm. Avaliou-se a eficiência (qualitativa) de remoção dos coextrativo por comparação entre o perfil de separação cromatográfica do extrato sem limpeza com os extratos provenientes dos testes de limpeza.

#### **3.8.4 Avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS por d-SPE para determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz**

Posteriormente aos testes de extração e de avaliação dos coextrativos, avaliou-se a etapa de limpeza empregando a técnica de d-SPE utilizando diferentes tipos e quantidades de sorventes (PSA, C18, sílica, alumina e GCB) comumente utilizados nesta etapa (SLOWIK-BOROWIEC & WALORCZYK, 2016; REJCZAK & TUZIMSKI, 2015; WALORCZYK et al., 2015; LOZANO et al., 2014; CORREIA-SÁ et al., 2012; FERNANDES et al., 2013).

Os extratos provenientes do método QuEChERS que apresentou os melhores resultados de recuperação e precisão (RSD%) foram submetidos a etapa de limpeza. As quantidades de sorventes empregadas e as combinações entre eles estão apresentadas na Tabela 4.

A etapa de limpeza foi realizada em tubos de polipropileno (*ependorf*) de 2 mL utilizando 1 mL de extrato. Nesta etapa, a quantidade (150 mg) de MgSO<sub>4</sub> foi mantida constante em todos os testes uma vez que não interfere na remoção dos coextrativos da matriz.

Tabela 4. Relação dos testes preliminares para avaliação da etapa de limpeza por d-SPE visando a determinação de resíduos de herbicidas em arroz por LC-MS/MS.

Teste	Etapa de limpeza (d-SPE)
T1	1 mL extrato + 25 mg PSA + 125 mg C18 + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T2	1 mL extrato + 125 mg C18 + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T3	1 mL extrato + 125 mg Florisil + 25 mg PSA + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T4	1 mL extrato + 125 mg Florisil + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T5	1 mL extrato + 125 mg alumina + 25 mg PSA + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T6	1 mL extrato + 125 mg alumina + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T7	1 mL extrato + 125 mg sílica + 25 mg PSA + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T8	1 mL extrato + 125 mg sílica + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T9	1 mL extrato + 50 mg PSA + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T10	1 mL extrato + 25 mg PSA + 2,5 mg GCB + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min
T11	1 mL extrato + 25 mg PSA + 7,5 mg GCB + 150 mg MgSO <sub>4</sub> , agitação em vórtex (1 min) e centrifugação a 3400 rpm/8 min

Os extratos obtidos a partir de cada um dos testes descritos na Tabela 4 foram analisados pela técnica de GC-MS/MS (modo *full scan*). Assim, foi possível avaliar a redução da presença de coextrativos em comparação com o extrato sem *clean-up*. Após, o extrato proveniente do teste de limpeza que produziu a maior redução de coextrativos também foi avaliado pela técnica de HPLC-UV/vis, para avaliação do efeito da etapa de limpeza no perfil de antocianinas.

### 3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS VISANDO DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ POR LC-MS/MS

Após definir as melhores condições no sistema LC-MS/MS e qual o método de extração e limpeza mais adequado para as diferentes variedades de arroz avaliadas, realizou-se a validação do método proposto. Os parâmetros a seguir foram avaliados para cada um dos herbicidas estudados: seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária).

### 3.9.1 Seletividade

Avaliar a seletividade é necessário para se confirmar que nenhum analito de interesse seja eluído juntamente com algum componente ou interferente presente na matriz estudada (SANTE, 2017). A seletividade foi avaliada pela injeção de extratos da amostra "branco", de cada uma das variedades de arroz avaliadas. Estas foram comparadas com injeções da amostra "branco" fortificada com solução padrão ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) contendo os herbicidas de interesse. Além disso, também avaliou-se o "branco" dos reagentes, onde durante a etapa de preparo de amostra se substituiu a massa de amostra por igual quantidade de água ultrapurificada.

### 3.9.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva analítica foi avaliada a partir das soluções preparadas nas concentrações de 2; 5; 10; 20; 50, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As curvas foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato de cada uma das variedades de arroz avaliadas, obtido com o método proposto, seguida de diluição 1:1 em fase móvel. As curvas na matriz e no solvente foram injetadas em triplicatas e conforme o INMETRO (2011) determinadas de acordo com a Equação 1:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

x = concentração.

a = coeficiente angular-inclinação da curva analítica = sensibilidade.

b = coeficiente linear-interseção com o eixo y, quando x=0.

Após a injeção das mesmas as áreas foram tabeladas e obteve-se o RSD (%), o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a faixa de linearidade.

### 3.9.3 LOD e LOQ do método proposto

O LOQm foi adotado como o menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com RSD < 20%. O LOD foi determinado através do LOQm dividido por 3,33 (INMETRO, 2018; SANTE, 2017).

### 3.9.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Segundo o INMETRO (2011) a recuperação do analito pode ser estimada através de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em três diferentes níveis de concentração da faixa de aplicação do método, uma baixa, uma média e outra alta. Geralmente a recuperação é expressa em percentagem da quantidade obtida do analito em relação à quantidade do mesmo que foi adicionado à matriz (Ribani et al., 2004).

A determinação da exatidão foi obtida através de ensaios de fortificação utilizando amostra “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos em estudo e para a exatidão do método, avaliando-se, assim, a recuperação dos compostos em estudo (INMETRO, 2018; SANTE, 2017). Os níveis avaliados foram de 20, 50 e 100 µg kg<sup>-1</sup> com seis replicatas para cada nível de concentração. De acordo com o INMETRO (2018) e SANTE (2017), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a equação 2:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C3 = concentração usada para fortificação.

### 3.9.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a equação (INMETRO, 2018; SANTE, 2017):

$$\text{RSD (\%)} = \left( \frac{s}{\bar{x}_m} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Em que:

$s$  = estimativa de desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;

$X_m$  = média das medidas em replicatas;

$n$  = número de medidas.

A precisão do método foi avaliada, em termos de repetitividade (RSDr) através da extração de análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicatas ( $n=6$ ) para cada nível de concentração.

A precisão intermediária (RSDpi) foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco nos níveis de 20, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.9.6 Efeito matriz

É possível observar o efeito matriz quando existe uma diferença considerável na resposta obtida utilizando padrões preparados no solvente e padrões preparados no extrato da matriz (PICÓ; BLASCO; FONT, 2004). De acordo com a SANTE (2015) sua determinação se faz pela comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente e as preparadas na matriz, conforme a equação 4:

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

$X_1$  = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada herbicida, preparadas em extrato da matriz;

$X_2$  = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada herbicida, preparadas em acetonitrila.

Assim, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for  $\geq 20\%$  considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência no desempenho

analítico e, então, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito (SANTE, 2017).

### **3.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DO COMERCIO LOCAL**

O método desenvolvido foi validado e aplicado na determinação de resíduos de herbicidas em 20 amostras de arroz branco, 2 amostras de arroz vermelho e 4 amostras de arroz preto, adquiridas em diferentes mercados da cidade de Santa Maria, RS.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ARROZ

A Tabela 5 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos herbicidas avaliados neste estudo.

Tabela 5. Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS.

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Pursuit XRS C <sub>18</sub> (100 x 2,0 mm d.i, 2,4 µm)
Fase móvel	Formiato de Amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> (A) e Metanol (B)
Gradiente de eluição	75% (A) e 25% (B) de 0 a 2 min; alterando até 5% (A) e 95% (B) em 15 min (permanecendo até 20 min); alternando até atingir 75% (A) e 25% (B) em 25 min (permanecendo até 33 min).
Vazão	0,15 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	10 µL
Fonte de ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS

% A: formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>

% B: metanol

A partir da realização das infusões, de cada um dos compostos, foram determinadas quais as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados utilizando a fonte de ionização na temperatura de 50 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) foi de 250 °C, a pressão do gás de dessolvatação foi de 40 psi, e a pressão do gás de secagem foi de 20 psi.

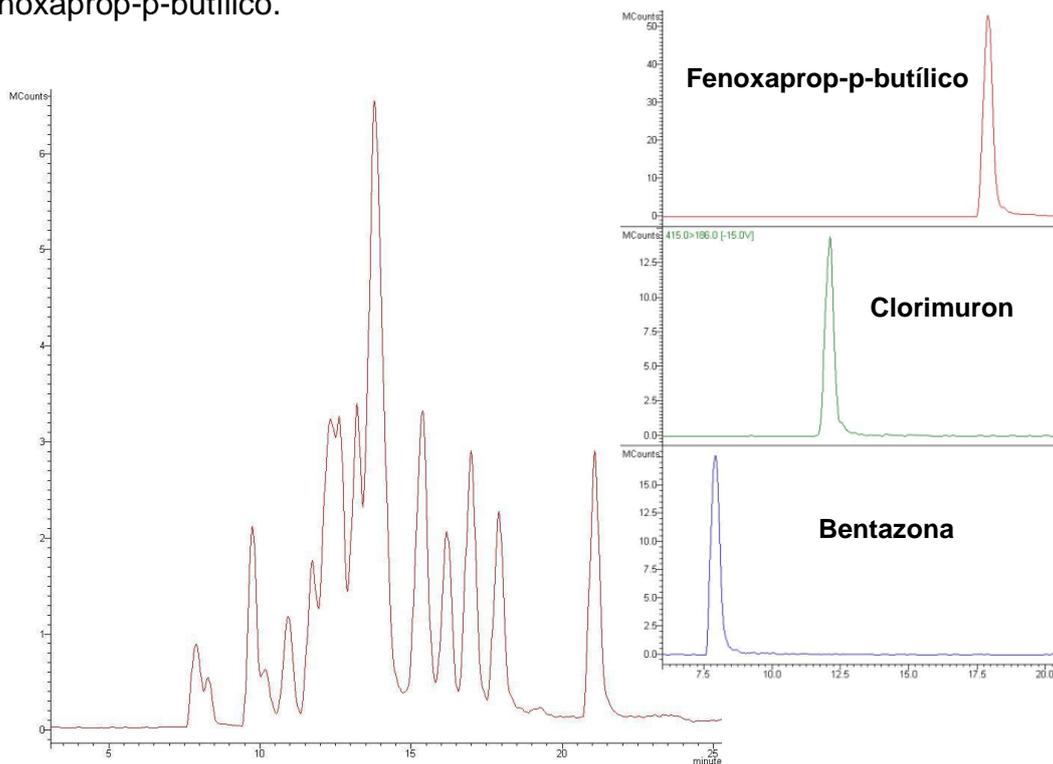
A fonte de ionização API foi empregada com interface ESI, devido à moderada polaridade da maioria dos analitos. ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH. Na ESI ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, a transformação destes em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A Tabela 6 apresenta os herbicidas analisados por LC-MS/MS, íons precursores e íons produtos, energia de colisão das transições monitoradas e tempo de retenção dos compostos estudados. Estas informações foram obtidas usando modo de ionização ESI+ e ESI- (modo de aquisição SRM).

Para cada composto, quando possível, foram selecionadas duas transições características, como apresentado na Tabela 6. A transição mais intensa (mais estável) foi utilizada para a etapa de quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a identificação dos mesmos.

A Figura 2 apresenta um cromatograma de íons totais obtidos por LC-MS/MS para solução padrão de 100 µg L<sup>-1</sup>, preparada em acetonitrila.

Figura 2. Cromatograma de íons totais obtido por LC-MS/MS para uma solução padrão (100 µg L<sup>-1</sup>) preparada em acetonitrila. Em destaque a visualização das transições SRM (de quantificação) para os herbicidas bentazone, clorimuron e fenoxaprop-p-butílico.



Observa-se na Figura 2 que vários herbicidas apresentaram co-eluição cromatográfica, pois obtiveram tempos de retenção muito semelhantes.

Tabela 6. Herbicidas analisados por LC-MS/MS no modo de aquisição SRM, tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as duas transições monitoradas

nº	Compostos	t <sub>R</sub> (min)	+/-	Íon precursor	Capilar (V)	Íon produto	CE(eV)	Íon produto	CE(eV)
1	2,4 D		-	219	35	160,6	11		
2	ametrina	13,47	+	228,2	65	186	17	68	32
3	atrazina	12,09	+	216	60	174	15	103,8	26
4	bentazona	7,89	-	239	70	131,7	25	196,6	19
5	bispiribac sódico	11,58	+	453	31	296,6	18	179	18
6	cianizina	10,05	+	241	31	131,9	21	241	14
7	ciclosulfuron	13,09	+	422,1	50	260,9	16	217,8	26
8	clomazone	13,02	+	240	49	124,9	18	88,9	38
9	clorimuron	10,86	+	415	66	186	15	277,9	15
10	desmedifam	12,39	+	318,2	25	182	13	136	27
11	diuron	12,58	-	231	60	150	24	186	16
12	etoxisulfuron	10,91	+	399,2	50	26,8	16	217,8	25
13	fenoxaprop-p-butil	17,69	+	362,1	65	287,9	17	243,6	22
14	fluroxipir	8,18	-	252,8	40	194,5	11	232,6	60
15	linuron	13,50	+	249,1	30	159,9	16	181,9	13
16	Metalocloro	15,12	+	283,6	32	176,4	22	251,9	13
17	metobromuron	11,99	+	259	35	170	19	148,2	14
18	metoxuron	9,61	+	229,1	65	72	15	156	23
19	metribuzim	10,80	+	215,2	60	186,7	17	49	24
20	metsulfuron metílico	7,97	+	382	50	167,5	12	198,9	19
21	monolinuron	11,50	+	215	25	125,8	15	147,9	12
22	oxifluorfem	17,71	+	362	32	270,8	24	334	11
23	pendimetalina	18,87	+	282	35	194	17		
24	piridato	21,27	+	379,2	30	206,9	14	351	8,5
25	prometrina	14,74	+	242	46	159,9	20		
26	propanil	13,73	+	218	40	127	25	162	15
27	simazina	10,69	+	202	44	131,9	19	123,9	18
28	terbutilazina	13,69	+	230	56	131,9	20	174	12
29	tiobencarbe	17,17	+	258,1	40	100,3	11	125	16

CE: Energia de colisão

A detecção de agrotóxicos e/ou demais analitos em misturas ou em amostras complexas (por exemplo, nos alimentos), pode ser um problema para a LC, principalmente quando associada com detectores tradicionais, como por exemplo, detector UV ou até mesmo detector DAD, os quais não são seletivos suficientes, prejudicando a etapa de quantificação (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ et al., 2004) e identificação. No entanto, o acoplamento da LC com a MS/MS pode contornar estes problemas de separação cromatográfica, pois agrega às vantagens da cromatografia, como a alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas em série, como a informação estrutural e seletividade (VÉKEY, 2001). O emprego do modo de aquisição SRM com as transições apresentadas na Tabela 6 permite a quantificação dos analíticos, mesmo quando os picos cromatográficos estão sobrepostos.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ

### 4.2.1 Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) na determinação de resíduos de herbicidas em diferentes variedades de arroz

As variedades de arroz vermelho e preto, devido à grande quantidade de pigmentos, em especial antocianinas, são consideradas amostras bastante complexas (TACO, 2019; LEHOTAY et al., 2010). Assim, estas matrizes requerem atenção especial na etapa de preparo de amostra.

Com base na literatura, empregou-se acetonitrila acidificada com 5% (v/v) ácido fórmico nos métodos QuEChERS original e citrato. Esta acidificação do solvente de extração, conforme já relatada na literatura, foi realizada a fim de melhorar a eficiência de extração de algumas classes de herbicidas de caráter ácido como fenoxi-ácidos (2,4 D e fluroxipir) e sulfonilureias (ciclosulfuron, clorimuron etílico e etoxisulfuron).

A acetonitrila foi utilizada como solvente de extração pois este solvente proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de herbicidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Destaca-se que a acetonitrila não

é classificada como um agente carcinogênico e não é persistente no meio ambiente e, sua baixa volatilidade diminui a exposição do analista (ANASTASSIADES et al., 2003). Além disso, é mais adequada para trabalhar com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, que acetona ou acetato de etila (PRESTES et al., 2009).

Os ensaios iniciais utilizando o método QuEChERS foram baseados nos procedimentos anteriormente descritos. Nesta avaliação, utilizou-se etapa de limpeza (por d-SPE) empregando 125 mg de C18 e 150 mg de MgSO<sub>4</sub>. O sorvente C18 tem sido bastante utilizado na etapa de limpeza do método QuEChERS, quando os analitos de interesse pertencem a classe dos herbicidas.

Os resultados dos testes referentes a avaliação das amostras fortificadas no nível de 80 µg kg<sup>-1</sup>, empregando as diferentes versões do método QuEChERS estão demonstrados na Tabela 7. Para melhor visualização os dados da Tabela 7 estão apresentados nas Figuras 3, 4 e 5.

Tabela 7. Percentual de recuperação dos herbicidas em estudo, no nível de 80 µg kg<sup>-1</sup>, em diferentes tipos de arroz após aplicação das diferentes versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato e citrato).

Compostos	Original acidificado			Acetato			Citrato		
	branco	vermelho	preto	branco	Vermelho	preto	branco	vermelho	preto
	recuperação (RSD) %			recuperação (RSD) %			recuperação (RSD) %		
2,4 D	85(3)	88(4)	91(5)	<b>34(7)</b>	<b>37(19)</b>	<b>34(11)</b>	97(6)	87(6)	103(10)
Ametrina	75(2)	91(4)	79(4)	86(3)	89(1)	79(1)	90(5)	84(3)	<b>46(3)</b>
Atrazina	70(2)	85(2)	72(4)	90(3)	93(1)	83(2)	83(3)	79(4)	<b>148(6)</b>
Bentazona	71(5)	95(3)	84(4)	78(5)	87(4)	80(4)	93(7)	81(8)	89(5)
Bispiribaque sódico	70(1)	79(2)	75(8)	79(1)	81(1)	78(2)	84(5)	80(7)	<b>50(5)</b>
Cianizina	74(6)	91(3)	71(7)	97(5)	93(1)	97(2)	84(11)	87(6)	108(5)
Ciclosulfuron	75(9)	89(6)	83(3)	91(2)	97(2)	86(1)	90(7)	85(4)	<b>43(5)</b>
Clomazone	77(2)	83(3)	82(3)	93(2)	90(5)	88(3)	91(7)	86(6)	<b>52(4)</b>
Clorimuron	73(8)	94(7)	84(3)	89(1)	95(3)	93(7)	91(10)	94(3)	<b>37(3)</b>
Desmedifam	75(4)	93(3)	83(5)	94(2)	98(1)	91(4)	91(4)	86(6)	<b>55(4)</b>
Diuron	73(7)	82(5)	80(9)	80(4)	89(3)	87(3)	86(9)	83(5)	<b>55(2)</b>
Etoxisulfuron	70(4)	87(8)	83(2)	80(4)	85(3)	85(4)	90(5)	91(1)	<b>39(4)</b>
Fenoxaprop-p-butílico	70(1)	72(4)	73(5)	91(2)	91(1)	84(1)	80(5)	79(7)	<b>44(6)</b>
Fluroxipir	98(4)	108(18)	85(5)	<b>33(03)</b>	<b>32(38)</b>	<b>36(03)</b>	114(19)	87(11)	105(9)
Linuron	74(1)	88(4)	81(1)	88(1)	93(6)	92(2)	86(5)	83(9)	<b>49(3)</b>
Metalocloro	81(6)	88(3)	83(2)	89(6)	96(4)	92(3)	90(6)	88(6)	<b>54(4)</b>
Metobromuron	83(2)	92(6)	80(4)	85(1)	94(4)	95(5)	94(7)	73(5)	95(6)
Metoxuron	75(8)	92(7)	82(7)	87(2)	99(7)	85(7)	94(11)	87(2)	116(4)
Metribuzim	82(3)	97(6)	75(2)	87(2)	104(1)	91(4)	92(9)	97(3)	116(7)
Metsulfuron metílico	74(7)	88(8)	81(1)	86(3)	96(4)	88(3)	92(6)	86(4)	<b>132(4)</b>
Monolinuron	75(3)	92(1)	78(6)	84(3)	95(5)	94(2)	95(7)	89(6)	<b>46(8)</b>
oxifluorfem	<b>186(86)</b>	<b>67(24)</b>	<b>83(69)</b>	<b>53(32)</b>	<b>787(23)</b>	<b>89(85)</b>	<b>80(85)</b>	<b>87(93)</b>	<b>66(62)</b>
Pendimetalina	73(11)	96(11)	89(12)	92(3)	97(18)	105(11)	114(2)	84(4)	73(7)
Piridato	<b>54(4)</b>	70(7)	<b>67(3)</b>	<b>65(2)</b>	70(9)	76(3)	<b>62(7)</b>	72(7)	<b>51(4)</b>
Prometrina	92(5)	94(3)	82(5)	92(6)	85(13)	97(7)	98(12)	108(4)	<b>38(6)</b>
Propanil	72(2)	94(4)	82(1)	83(1)	100(2)	85(4)	93(7)	86(5)	<b>51(3)</b>
Simazina	81(3)	79(1)	81(3)	98(2)	83(1)	84(4)	92(6)	85(6)	92(5)
Terbutilazina	71(1)	84(1)	77(1)	87(1)	89(1)	82(3)	83(6)	80(5)	<b>48(6)</b>
Tiobencarbe	79(1)	87(8)	82(2)	90(2)	90(4)	91(5)	86(5)	70(4)	<b>61(14)</b>

**Figura 3.** Percentuais de recuperação e RSD referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS original acidificado.

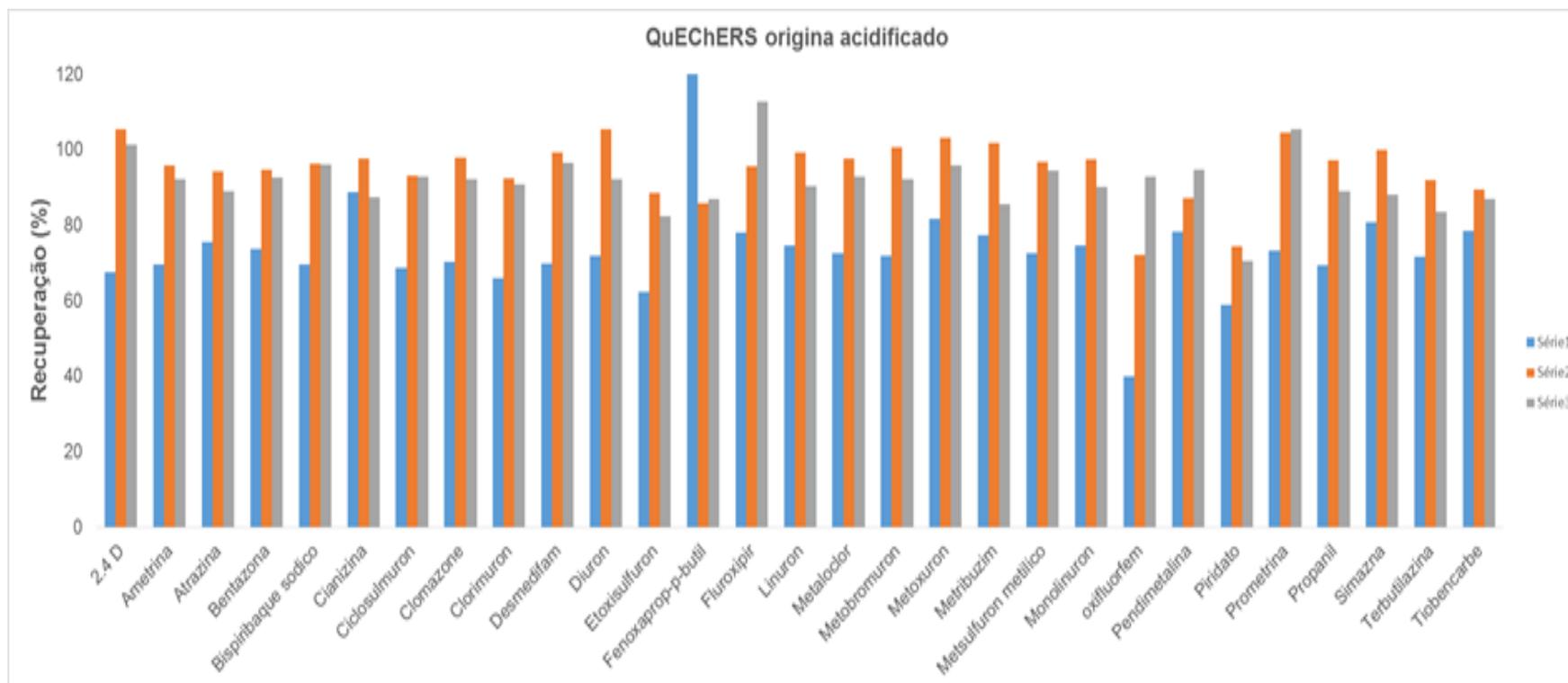
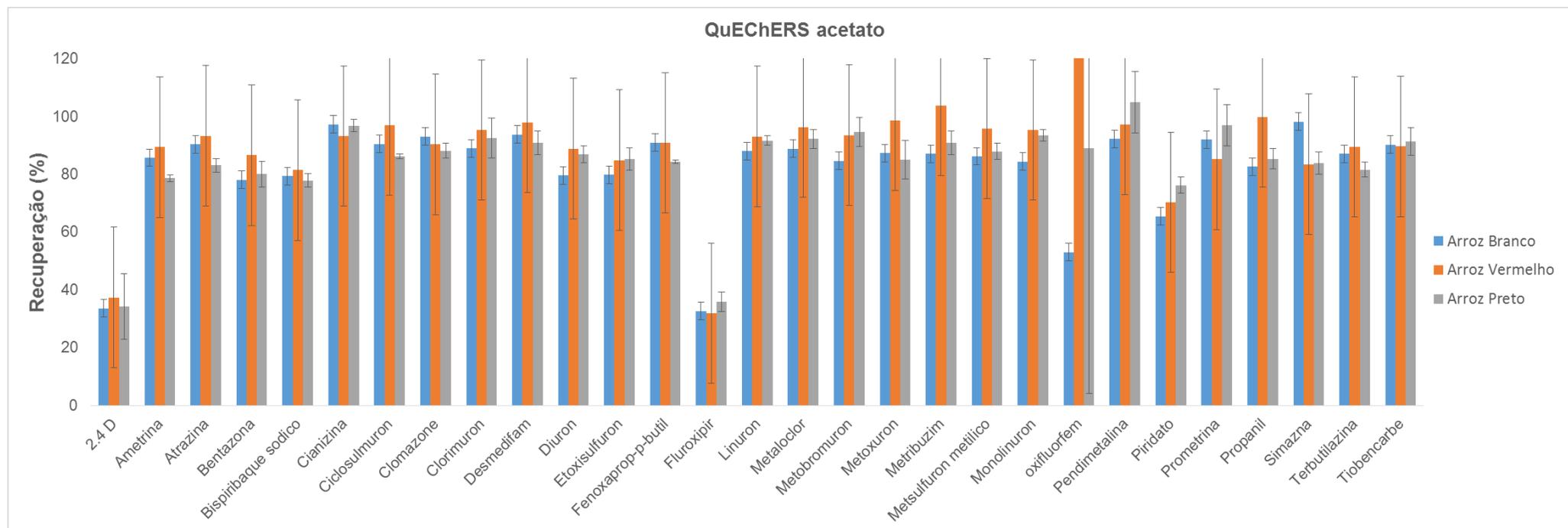
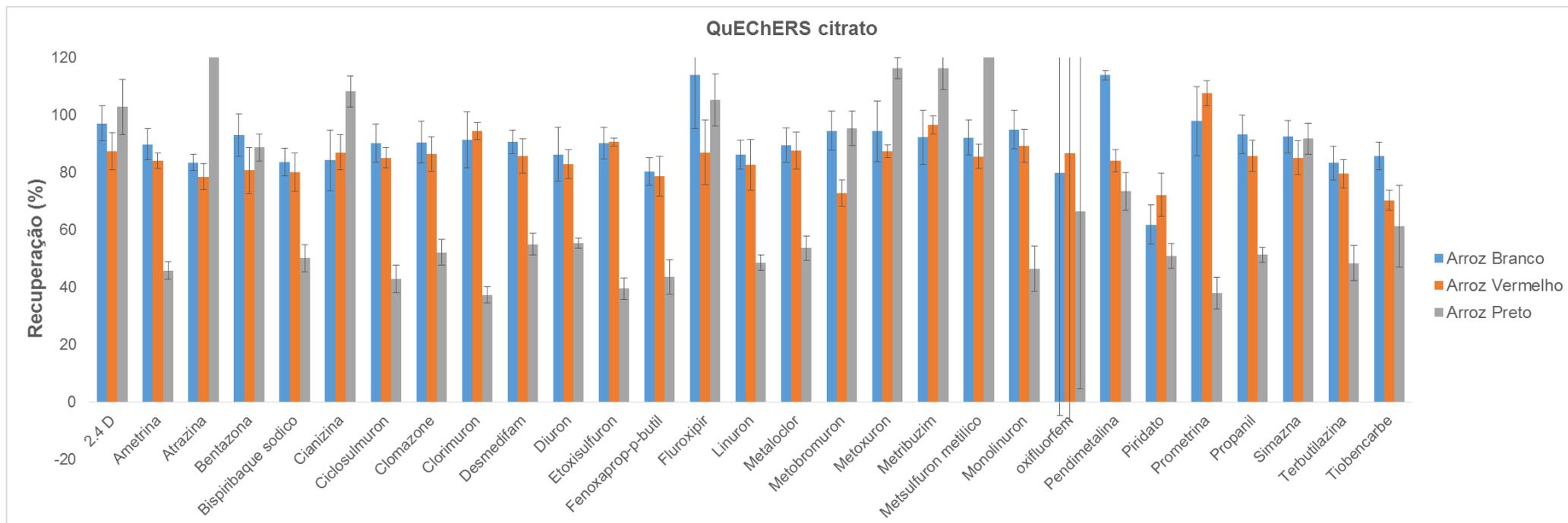


Figura 4. Percentuais de recuperação e RSD referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS acetato.



**Figura 5.** Percentuais de recuperação e RSD referente avaliação de ensaio de fortificação ( $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utilizando método QuEChERS citrato.



Após a realização dos testes preliminares de avaliação das diferentes versões do método QuEChERS, observa-se a seguinte ordem de eficiência de extração: original acidificado > acetato > citrato acidificado.

Os resultados provenientes da avaliação da versão original acidificada (Figura 3), demonstram que somente os compostos oxifluorfen, piridato e fenoxaprop não apresentaram resultados aceitáveis de recuperação (70-120%) e RSD ( $\leq 20\%$ ). O restante dos compostos apresentou resultados aceitáveis para todas as variedades de arroz avaliadas.

Comportamento semelhante foi observado ao avaliar a eficiência de extração/RSD% destes mesmos compostos pelo método QuEChERS acetato (Figura 4). Além destes, 2,4-D e fluroxipir também apresentaram resultados de recuperação/RSD% fora da faixa aceitável. Estes dois herbicidas pertencem a classe dos compostos fenoxi-ácidos que devido à sua natureza polar e a alta solubilidade em água tornam sua extração muito difícil. Uma boa eficiência de extração pode ser observada quando acetonitrila é acidificada com 5% (v/v) de ácido fórmico (método QuEChERS original acidificado).

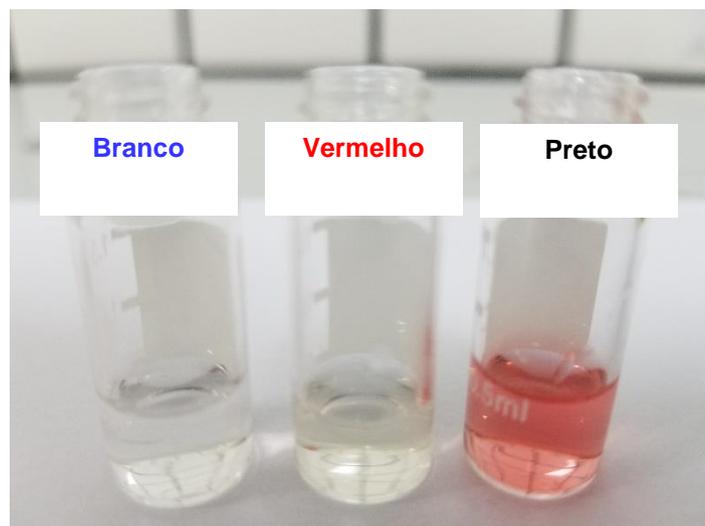
O método QuEChERS citrato acidificado (Figura 5) apresentou resultados aceitáveis de recuperação/RSD% para a maioria dos compostos avaliados nas variedades branco e vermelho, com exceção para oxifluorfen e piridato. Por outro lado, somente 9 herbicidas (2,4-D, bentazona, cianizina, fluroxipir, metobromuron, metoxuron, metribuzim, pendimetalina e simazina) apresentaram resultados de recuperação entre 70-120% e  $RSD \leq 20\%$ . A extração em meio ácido favorece a recuperação de compostos de difícil extractabilidade como 2,4D e fluroxipir. Por outro lado, aumenta a quantidade de coextrativos no extrato. Portanto, estes baixos percentuais de recuperação podem estar associados a influência da matriz no processo de ionização que ocorre na fonte do sistema LC-MS/MS.

Em função dos resultados obtidos optou-se pela escolha do método QuEChERS original como método de extração. Este método foi utilizado para avaliação da presença de coextrativos, limpeza do extrato e validação.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DA ETAPA EXTRAÇÃO

A Figura 6 apresenta a característica visual dos extratos de arroz branco, vermelho e preto obtidos pelo método QuEChERS original acidificado. Visualmente, percebe-se uma quantidade significativa de coextrativos, principalmente para a variedade de arroz preto>vermelho>branco. Conforme discutido anteriormente, a presença de uma maior quantidade de coextrativos está relacionada com a utilização de acetonitrila acidificada (com 5 % (v/v) de ácido fórmico) como solvente de extração. Estes resultados estão em concordância com o descrito por Anastassiades et al. (2007) que após avaliação das três versões do método QuEChERS concluíram que há uma maior extração de coextrativos, gerando extratos mais “sujos”, quanto menor for o pH do meio de extração (LEHOTAY et al., 2005). A coloração observada nos extratos provenientes dos grãos de arroz pigmentados (vermelho e preto) deve-se a presença de antocianinas e de antocianidinas. Além da avaliação visual, os extratos provenientes das 3 variedades de arroz estudadas também foram analisados pelas técnicas de GC-MS/MS (*full scan*) e HPLC-UV/vis, conforme relatado a seguir.

Figura 6. Comparação visual dos extratos obtidos pelas diferentes versões do método QuEChERS (original acidificado, acetato e citrato acidificado) aplicadas em amostras de arroz branco, vermelho e preto.



#### 4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS EMPREGANDO GC-MS (MODO *FULL SCAN*)

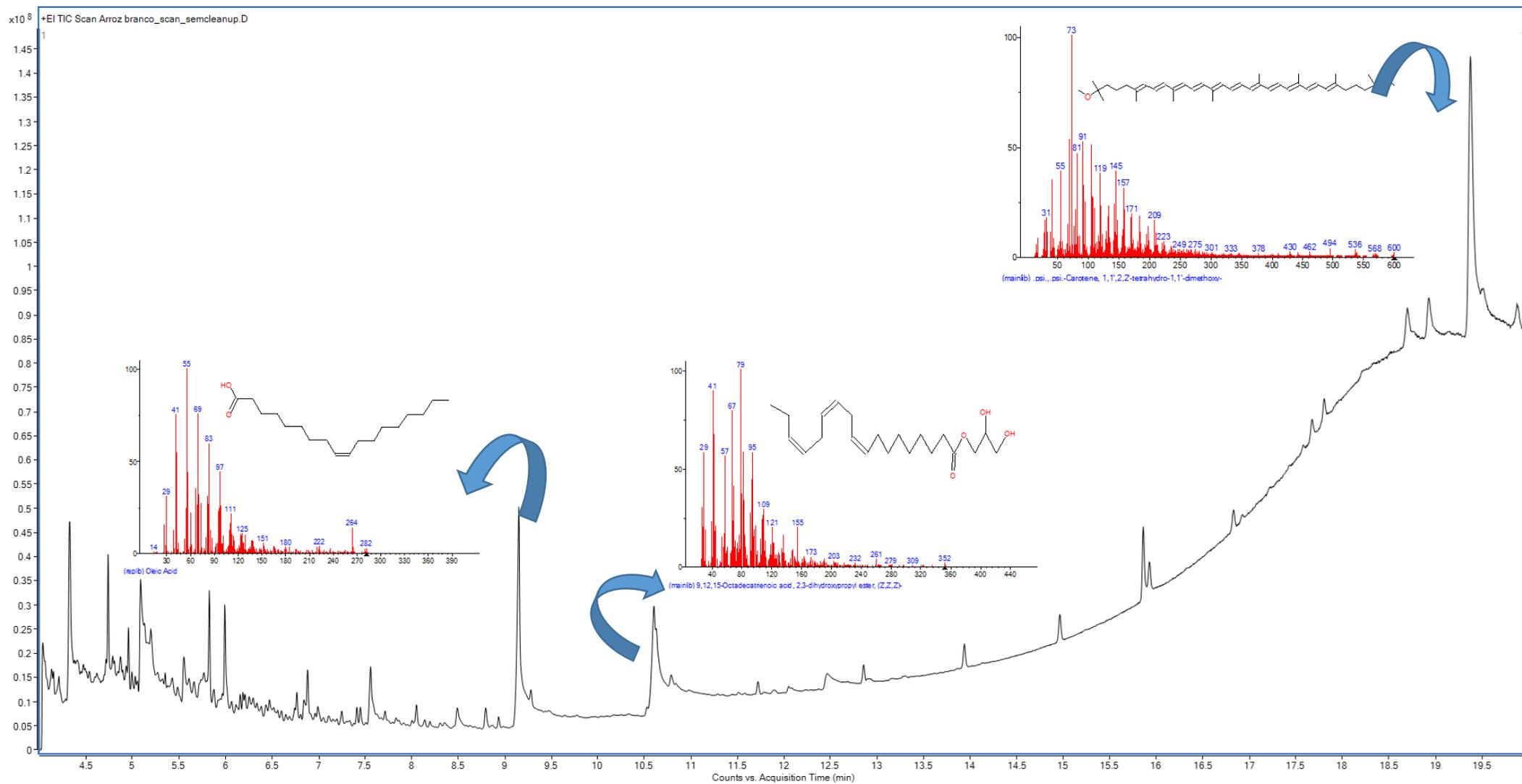
As Figuras 7, 8 e 9, apresentam a avaliação qualitativa do perfil cromatográfico apresentado pelos extratos das três variedades de arroz obtidos pelo método QuEChERS original acidificado. Salienta-se que estes extratos não foram submetidos a nenhuma etapa de limpeza antes da injeção no sistema GC-MS/MS (modo *full scan*)

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de coextrativos presente em cada extrato. Como pode ser observado o perfil cromatográfico é diferente para as três variedades avaliadas, com intensidades bem distintas entre si, onde preto>>>vermelho>>branco (Figura 10).

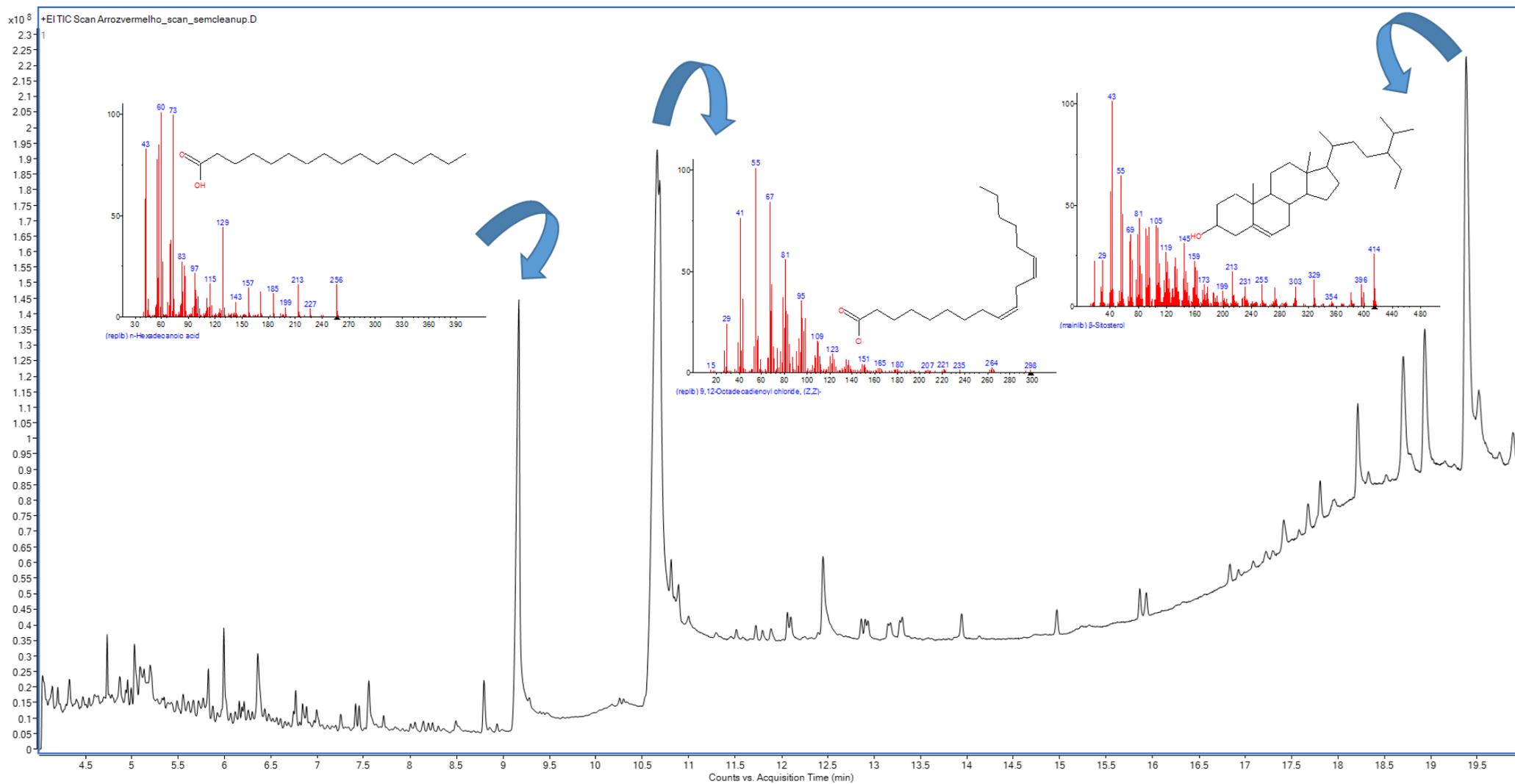
Na avaliação por deconvolução espectral (software *MassHunter*, Agilent Technologies (EUA), o pico cromatográfico entre 9 e 10 min, tem como provável candidato, os ácidos oleico e palmítico (hexadecanoico). De acordo com TAIRA & ITANI, 1988; MANO et al., 1999, estes são os principais ácidos graxos presentes no arroz. Além disso, o pico cromatográfico que aparece a partir de 19,5 min, tem como provável candidato o composto  $\beta$ -sitosterol. Este composto é um dos esteróis que compõem o  $\gamma$ -orizanol (fitoesteróide encontrado em produtos derivados do arroz).

Como descrito anteriormente as variedades pigmentadas (vermelho e preto) de arroz são ricas em compostos fenólicos, principalmente flavonoides (antocianinas). Estes compostos são preferencialmente analisados pela técnica de HPLC-UV/vis. Portanto, esta técnica também foi utilizada como método complementar para avaliação dos coextrativos nos extratos provenientes de cada variedade avaliada.

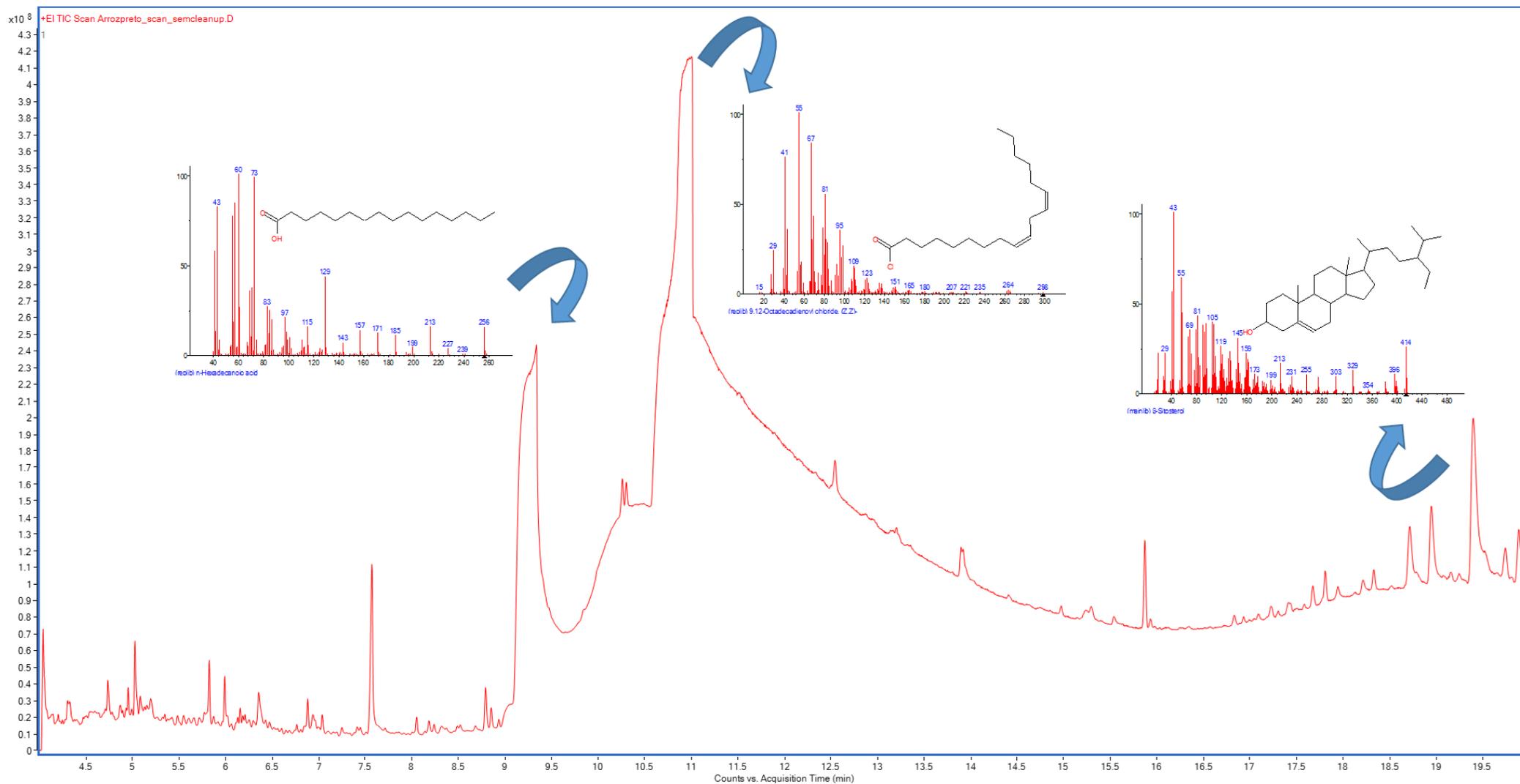
Figura 7. Perfil cromatográfico obtido a partir da injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade branco) avaliado no método QuEChERS original acidificado.



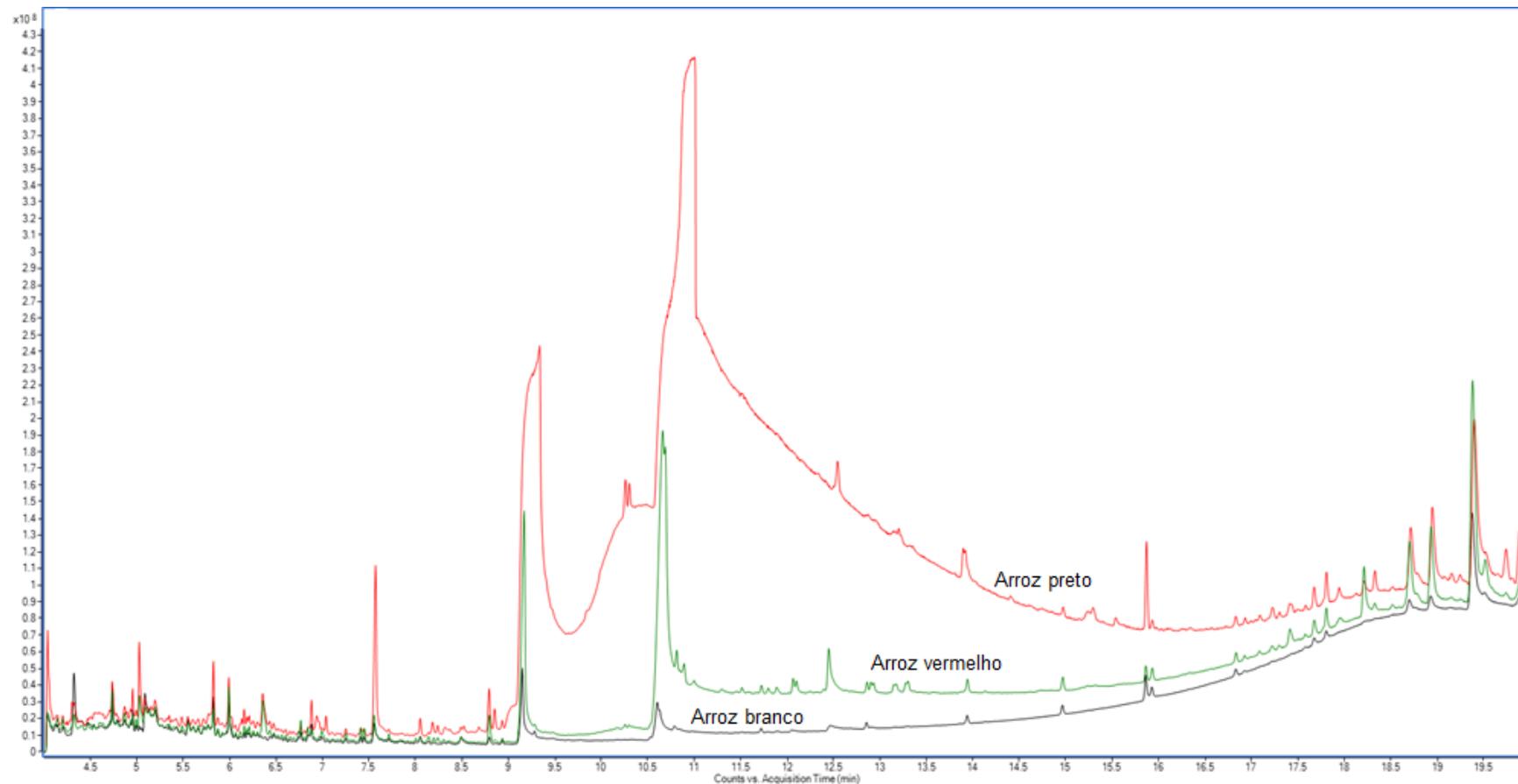
**Figura 8.** Perfil cromatográfico obtido a partir de injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade vermelho) avaliado no método QuEChERS original acidificado.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico obtido a partir de injeção no sistema GC-MS/MS em modo full scan, do extrato "branco" de arroz (variedade preto) avaliado no método QuEChERS original acidificado.



**Figura 10.** Comparação dos cromatogramas em modo full scan (GC-MS/MS), do extrato "branco" de arroz (variedades branco, vermelho e preto) avaliados no método QuEChERS original acidificado.



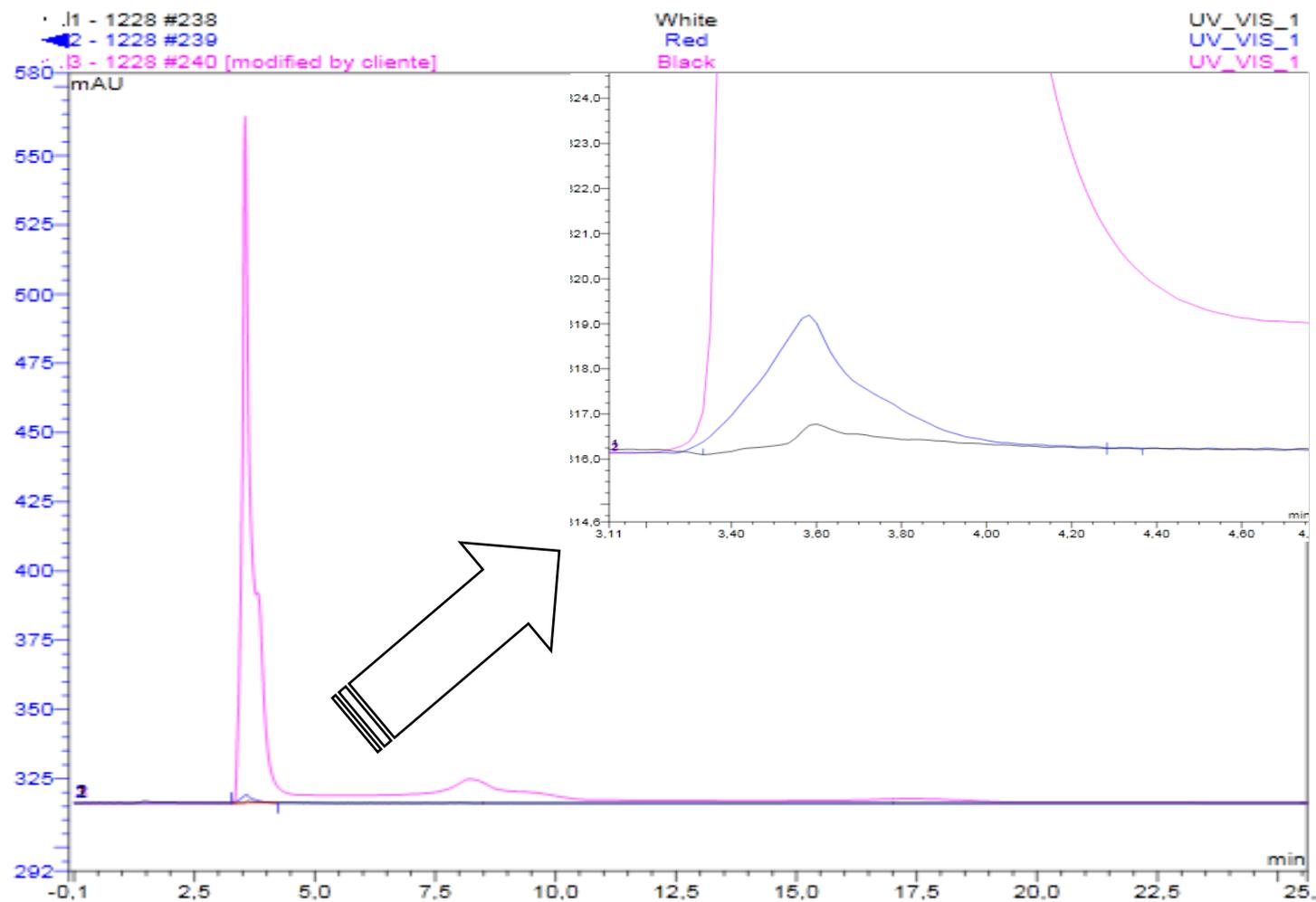
#### 4.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COEXTRATIVOS EMPREGANDO HPLC-UV/Vis

A Figura 11, apresenta os cromatogramas obtidos por HPLC-UV/vis para os extratos de cada uma das variedades de arroz avaliadas com o método QuEChERS original acidificado. O emprego desta técnica se mostrou bastante adequado para a avaliação qualitativa do perfil de coextrativos, uma vez que permitiu o monitoramento de quatro comprimentos de onda simultâneos estudados. Desta forma, permitiu avaliar a presença das principais antocianinas presentes nos extratos de arroz. Ao compararmos os cromatogramas referentes aos testes, percebe-se uma diferença na intensidade do sinal (arroz preto>>> arroz vermelho>>arroz branco) que indica a característica de cada variedade avaliada.

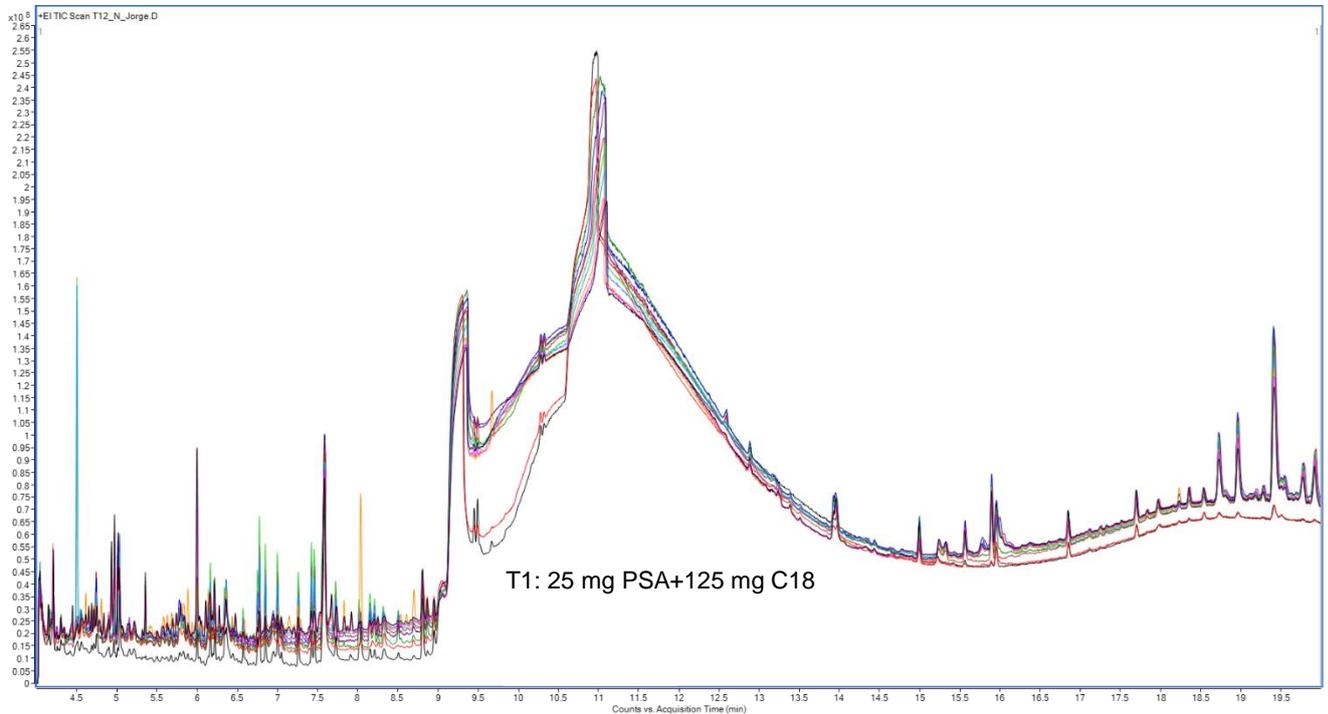
#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE LIMPEZA POR d-SPE PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ

A Figura 12 apresenta uma sobreposição dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS (modo *full scan*) para cada um dos testes de limpeza realizados conforme descritos anteriormente para extrato de arroz negro. Como pode ser observado o perfil cromatográfico é semelhante para a maioria dos testes realizados.

**Figura 11.** Avaliação, por HPLC-UV/Vis, da presença de antocianinas provenientes da extração de amostra “branco” de cada variedade de arroz empregando o método QuEChERS original acidificado.

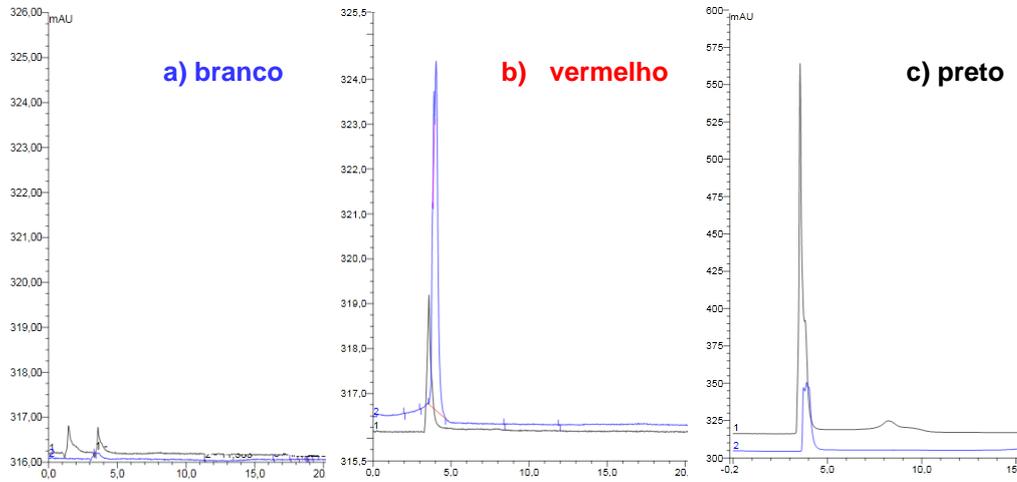


**Figura 12.** Comparação dos cromatogramas em modo full scan (GC-MS/MS), do extrato "branco" de arroz (variedades preto) avaliados pelos testes de limpeza T1-T11.



Conforme observa-se na Figura 12, os testes T1 (25 mg PSA+125 mg C18) e T2 (125 mg C18) apresentaram as melhores eficiências de remoção de coextrativos para extratos provenientes de arroz preto. Por outro lado, para arroz vermelho a diferença entre os diferentes testes avaliados não foi tão perceptível. A combinação PSA e C18 tem sido utilizada com sucesso em diferentes aplicações da d-SPE. Porém, devido a mistura de herbicidas em estudo apresentar vários compostos (fenoxiácidos e sulfonilureias) que podem interagir com o PSA e isto refletir em baixos percentuais de recuperação, a utilização deste sorvente foi descartada. Além disso, o perfil de redução de coextrativos foi muito semelhante ao teste T1, onde somente C18 foi utilizado como sorvente. Portanto, escolheu-se para etapa de limpeza o procedimento descrito no teste T1. Os extratos provenientes deste teste também foram avaliados por HPLC-UV/vis para verificação do perfil de antocianinas presentes nos extratos após etapa de limpeza (Figura 13).

**Figura 13.** Avaliação, por HPLC-UV/Vis, do perfil cromatográfico de antocianinas presentes no extrato, após realização da etapa de limpeza por d-SPE (C18) para as variedades a) branco, b) vermelho e c) preto



Os picos de intensidades maiores correspondem aos extratos sem a etapa de limpeza, os de menores sinais são referentes aos extratos após a etapa de limpeza. Nos cromatogramas b) e c) pode-se observar maior concentração de antocianinas nas variedades de arroz vermelho e preto comparado com o cromatograma a) correspondente ao arroz branco.

Observa-se que após a etapa de limpeza (d-SPE C18) ocorreu uma diminuição na intensidade do perfil cromatográfico referente a presença das antocianinas, indicando a remoção das mesmas devido a presença de C18.

A partir dos testes anteriormente apresentados, o método QuEChERS original acidificado foi escolhido como procedimento de extração associado a etapa de limpeza por d-SPE empregando C18 (125 mg). O método proposto envolve uma etapa de extração com acetonitrila acidificada com 5% (v/v) de ácido fórmico, seguido da partição com 4 g sulfato de magnésio e 1 g cloreto de sódio. Após o extrato foi diluído 1:1 com fase móvel, filtrado em filtro de nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  (13 mm) e injetado no sistema LC-MS/MS.

## 4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ POR UHPLC-MS/MS

O método proposto neste trabalho foi validado de acordo com o guia SANTE 11813/2017(SANTE, 2017). Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) acidificadas com 5% (v/v) de ácido fórmico e no extrato da matriz (arroz, variedade branco) obtidos a partir das amostras “branco”. Para as variedades de arroz vermelho e preto, aplicou-se procedimento de extensão de escopo. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação do método cromatográfico utilizado.

### 4.7.1 Seletividade

O método foi considerado seletivo, uma vez que a injeção do extrato proveniente da amostra “branco” não apresentou picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse. Desta maneira, a amostra “branco” avaliada foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de exatidão e precisão. Os solventes e reagentes empregados no preparo de amostra também foram avaliados através da realização do procedimento de extração sem amostra (“branco” reagente). A Figura 13 apresenta um cromatograma SRM para o herbicida bentazona ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em comparação com o extrato branco da matriz e branco dos reagentes. Observa-se que não há sinal de interferência no tempo de retenção do bentazona. Esta avaliação foi realizada para todos os compostos em estudo. Assim, foi assegurado que os mesmos estavam isentos de contaminantes que poderiam interferir na análise.

### 4.7.2 Faixa de trabalho e curva analítica

A Tabela 8 apresenta os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das equações das curvas analíticas no extrato da matriz (arroz branco). A linearidade foi obtida em curvas preparadas no extrato da matriz e em acetonitrila nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os compostos avaliados apresentaram

coeficientes de determinação ( $r^2$ ) entre 0,9906 e 0,9979. A faixa de trabalho ficou entre 2 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para todos os compostos (Tabela 8). Com exceção do composto metribuzim que não apresentou uma boa linearidade ( $r^2 < 0,99$ ). Portanto, este composto não foi avaliado nos testes posteriores.

Tabela 8. Resultados de validação do método QuEChERS: linearidade (coeficiente de determinação ( $r^2$ ), efeito matriz (EM %), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para arroz.

Compostos	$r^2$	efeito matriz (%)	níveis de fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
			Recuperação (RSD)%			Precisão intermediária (RSD)%		
			20	50	100	20	50	100
2,4 D	0,9963	-18	78(14)	81(8)	75(9)	88(8)	76(7)	72(2)
Ametrina	0,9949	-7	73(6)	74(4)	75(7)	75(5)	81(4)	82(6)
Atrazina	0,9972	-3	71(10)	77(10)	75(7)	70(6)	76(8)	79(6)
Bentazona	0,9907	-29	120(10)	73(5)	118(8)	70(4)	73(4)	120(5)
Bispiribaque sódico	0,9937	-18	75(12)	73(9)	79(8)	80(21)	87(4)	78(15)
Cianizina	0,9964	-8	80(6)	86(7)	82(12)	70(9)	75(9)	70(10)
Ciclosulfuron	0,9976	-18	76(13)	83(8)	83(9)	75(7)	70(6)	75(7)
Clomazone	0,9930	0	98(6)	87(6)	79(11)	72(5)	74(5)	78(10)
Clorimuron	0,9979	-3	87(20)	88(10)	91(10)	77(9)	106(9)	89(8)
Desmedifam	0,9968	-7	70(5)	75(6)	79(6)	86(6)	92(7)	97(5)
Diuron	0,9955	-30	105(7)	101(11)	91(17)	70(5)	82(12)	79(17)
Etoxisulfuron	0,9963	-2	73(18)	82(7)	81(3)	73(11)	73(7)	73(5)
Fenoxaprop-p-butilico	0,9968	18	74(12)	72(9)	73(12)	109(8)	78(5)	70(9)
Fluroxipir	0,9918	-7	119(12)	116(4)	107(9)	80(15)	85(18)	72(19)
Linuron	0,9934	-15	95(13)	103(7)	99(18)	72(7)	73(7)	75(15)
Metaloclor	0,9962	-15	107(5)	87(4)	80(8)	78(5)	72(5)	70(7)
Metobromuron	0,9914	-6	107(9)	112(4)	92(11)	80(7)	82(4)	73(11)
Metoxuron	0,9947	-5	85(5)	84(3)	82(9)	70(5)	76(3)	89(8)
Metsulfuron metílico	0,9972	-18	74(18)	78(8)	79(11)	70(19)	78(6)	90(18)
Monolinuron	0,9906	-3	85(6)	86(12)	77(19)	75(6)	97(10)	81(18)
oxifluorfem	0,9976	19						
Pendimetalina	0,9921	-7	92(15)	73(11)	71(12)	101(18)	86(8)	83(10)
Piridato	0,9946	16						
Prometrina	0,9944	-11	95(7)	70(19)	75(7)	95(19)	83(13)	73(10)
Propanil	0,9903	-14	98(10)	70(10)	101(17)	80(6)	97(9)	70(14)
Simazina	0,9969	-8	87(14)	71(11)	79(4)	70(6)	78(8)	119(3)
Terbutilazina	0,9936	-3	72(9)	75(5)	79(8)	70(5)	74 (4)	75(6)
Tiobencarbe	0,9931	-4	75(6)	71(7)	71(8)	103(18)	86(14)	96(5)

#### 4.7.3 Exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Na Tabela 8, estão apresentados os valores das médias dos percentuais de recuperação ( $n=6$ ) e  $RSD_r$  (repetibilidade) para os agrotóxicos avaliados em amostra “branco” de arroz nos níveis de 20, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A recuperação foi calculada a partir da curva analítica preparada no extrato da matriz (arroz branco), segundo os

critérios de aceitação de recuperação entre 70-120% e RSD  $\leq$  20%, estabelecidos na SANTE, 2017.

O método validado forneceu resultados (70-120%) de recuperação e precisão para a maioria dos compostos estudados em todos os níveis de fortificação. Os compostos oxifluorfen e piridato não apresentaram valores de recuperação satisfatórios ( $>120\%$  ou  $<70\%$ ). Portanto, estes compostos não foram considerados validados. A Tabela 8, também apresenta os dados de precisão intermediária e como pode ser observado todos os compostos foram reavaliados nos níveis de 20, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os resultados mostram que todos os compostos apresentaram os critérios de aceitação de recuperação entre 70-120% e RSD  $\leq$  20%, estabelecidos na SANTE, 2017.

#### **4.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação**

Para o limite de quantificação (LOQ), foi considerado o nível de concentração com exatidão e precisão aceitáveis (SANTÉ, 2017). Assim, todos os compostos validados apresentaram LOQ de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e respectivo LOD de 6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Estes valores contemplam os LMR estabelecidos pela legislação brasileira para os compostos avaliados. Dessa forma, mostra que o método proposto apresenta boa aplicabilidade em rotinas laboratoriais, como também demonstra a habilidade de realizar determinações a níveis traço.

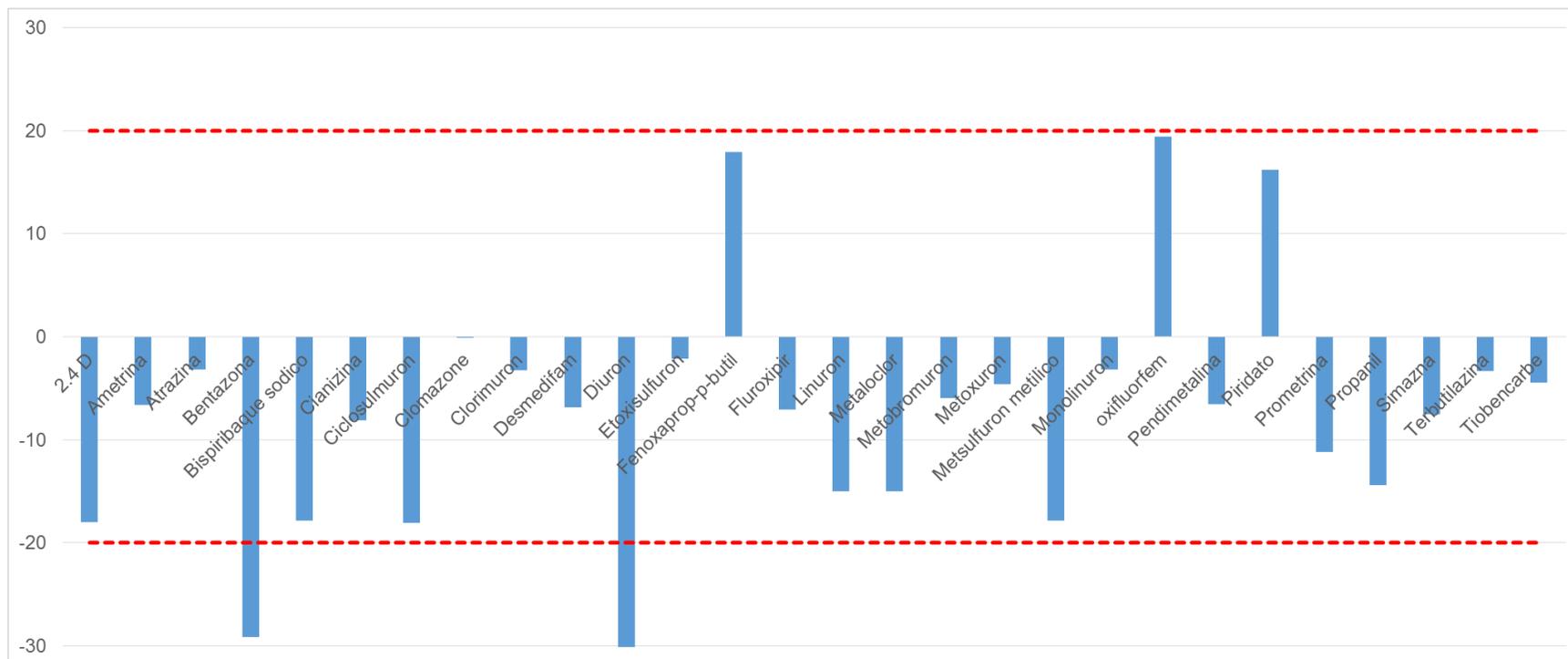
#### **4.7.5 Efeito matriz**

Neste trabalho, o efeito matriz (EM) foi calculado através da comparação da inclinação das curvas analíticas obtidas no solvente e no extrato da matriz (arroz branco). De acordo com Oshita & Jardim (2015) o EM é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector, que pode causar alterações negativas ou positivas no sinal analítico, devido à supressão iônica ou acréscimo de sinal, respectivamente. Além disso, considera-se que quando essas variações nas respostas do detector estiverem entre -20 a +20% não há efeito matriz. Valores superiores a  $\pm 20\%$  podem significar que há presença de coextrativos presentes no extrato “branco” da matriz, influenciando de maneira significativa na análise

cromatográfica levando, entre outras coisas a erros de quantificação (BERNARDI et al., 2017).

Os valores obtidos de EM para o método QuEChERS original acidificado estão apresentados na Tabela 8. A Figura 14 ilustra estes resultados. Os valores obtidos foram prioritariamente negativos, ou seja, indicam efeito de supressão do sinal cromatográfico. De acordo com Oshita & Jardim (2015), quando ocorre supressão de sinal cromatográfico é comum assumir que os compostos co-eluídos, oriundos da matriz, competem com os analitos na ionização. Neste caso, a ionização será favorecida para as moléculas que são mais ionizáveis e estão em maiores concentrações na amostra, provocando uma diminuição do sinal dos analitos. Os compostos fenoxaprop-p-butílico, oxifluorfen e piridato apresentaram efeito matriz positivo. O efeito matriz depende da complexidade das amostras, ou seja, do número e quantidade de substâncias que estão na sua composição e que podem vir a interferir na determinação analítica. Portanto, é importante determinar a extensão deste efeito. No caso de efeito pronunciado ( $EM > 20\%$ ), todo o processo de validação deve ser pensado de forma a se trabalhar no extrato da matriz “branco”, a fim de que o efeito seja minimizado (Oshita & Jardim (2015). Pode se apreciar o efeito matriz negativo pronunciado por abaixo de  $-20\%$  para os herbicidas Bentazona e Diuron, enquanto que para o resto dos herbicidas analisados os valores da resposta do detector estão dentro do intervalo  $-20\% - 20\%$  com baixo efeito matriz.

**Figura 14.** Resultados de efeito matriz obtidos na etapa de validação do método QuEChERS original acidificado.



#### **4.8 EXTENSÃO DO ESCOPO VALIDADO PARA OUTRAS VARIEDADES DE ARROZ**

A fim de verificar a aplicabilidade do método validado para outras variedades de arroz (vermelho e preto), avaliou-se a possibilidade de uma extensão do escopo (SANTE, 2017). Para todas as matrizes, construiu-se uma curva analítica de 2 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  no solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” de cada matriz. Para a avaliação da exatidão, foi realizada etapa de fortificação no nível de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Também, foram avaliados linearidade, precisão e efeito matriz. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 9.

Todos os compostos foram considerados validados para arroz vermelho e arroz preto, uma vez que os resultados (recuperação e RSD (%) e linearidade) obtidos foram satisfatórios. Apesar da complexidade de constituintes em que cada amostra estudada apresenta, foi possível validar para cada uma das amostras, um número considerável de herbicidas. Dessa forma, pode-se afirmar que o método validado para arroz teve boa aplicabilidade para as demais matrizes.

#### **4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS REAIS**

Foram analisadas 26 amostras de arroz (20 amostras de arroz branco, 2 amostras arroz vermelho, 4 amostras de arroz preto) coletadas na região de Santa Maria. Não foram encontrados resíduos dos herbicidas em estudo. No período de 2013 à 2015, o programa PARA da ANVISA, analisou 746 amostras de arroz, das quais 715 amostras foram consideradas satisfatórias, sendo que 412 não apresentaram resíduos de agrotóxicos dentre os pesquisados e 303 apresentaram resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao LMR. Em somente duas amostras detectou-se a presença de de resíduos de herbicidas herbicidas. O composto detectado foi o triclorfom que não possui uso autorizado para a cultura do arroz no Brasil.

Tabela 9. Resultados obtidos a partir da extensão do escopo do método QuEChERS para as variedades de arroz vermelho e preto em estudo, com respectivos coeficiente de determinação ( $r^2$ ), recuperações e RSD (%) e efeito matriz (EM).

Compostos	Arroz vermelho			Arroz preto		
	$r^2$	Recuperação (RSD) (%)	EM (%)	$r^2$	Recuperação (RSD) (%)	EM (%)
2,4 D	0,9961	75(3)	-15	0,9992	85 (14)	-12
ametrina	0,9973	75 (16)	-16	0,9943	79 (14)	-13
atrazina	0,9965	76 (10)	-18	0,9992	106 (8)	-10
bentazona	0,9997	73 (3)	-23	0,9971	98 (8)	-5
bispiribac sódico	0,9999	97 (15)	-45	0,9910	86 (18)	-9
cianizina	0,9980	95 (2)	-35	0,9981	108 (7)	-19
ciclosulfuron	0,9952	96(4)	-29	0,9950	95 (7)	-32
clomazone	0,9994	88(4)	-14	0,9989	111 (6)	-36
clorimuron	0,9946	87(3)	-12	0,9988	96 (9)	-38
desmedifam	0,9928	86(10)	-10	0,9966	94 (7)	-40
diuron	0,9959	76(18)	-8	0,9995	96 (10)	-16
etoxisulfuron	0,9904	79(20)	-5	0,9955	100 (14)	-18
fenoxaprop-p-butílico	0,9985	98 (13)	-4	0,9967	96 (12)	-40
fluroxipir	0,9996	100 (12)	-26	0,9956	95 (9)	-12
linuron	0,9943	75(3)	-32	0,9986	78(9)	-13
metalocloro	0,9992	94 (13)	-14	0,9964	95 (7)	-12-
metobromuron	0,9991	79(15)	-12	0,9954	104 (10)	-19
metoxuron	0,9960	91 (14)	-48	0,9976	102 (12)	-17
metribuzim	0,9984	76(15)	-43	0,9986	102 (5)	-19
metsulfuron metílico	0,9902	100 (8)	-15	0,9955	94 (7)	-25
monolinuron	0,9998	86 (4)	-16	0,9944	86 (3)	-29
oxifluorfem	0,9997	101 (12)	-18	0,9932	94 (7)	-30
pendimetalina	0,9996	72 (6)	-20	0,9983	93 (18)	-15
piridato	0,9976	96 (3)	-20	0,9970	89 (10)	-32
prometrina	0,9996	103 (11)	-15	0,9989	78(6)	-40
propanil	0,9995	75(9)	-16	0,9987	98 (8)	-15
simazina	0,9996	107(12)	-18	0,9956	108 (10)	-20
terbutilazina	0,9930	102 (7)	-20	0,9985	102 (4)	-32
tiobencarbe	0,9956	91 (17)	-32	0,9964	89 (10)	-15

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o uso de diferentes sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS para a remoção de coextrativos, presentes em extratos de amostras de arroz diferentes variedades. O sorvente C18, apresentou eficiência na limpeza dos extratos, com redução satisfatória dos teores de coextrativos sem perdas significativas de analitos, tendo em vista que a obtenção de extratos limpos é fundamental para o alcance de resultados confiáveis e para a preservação do sistema cromatográfico.

Para isto, foram realizados diversos testes com diferentes proporções e combinações de sorventes empregando metodologias distintas para o preparo das amostras e avaliação dos extratos através de técnicas auxiliares, como HPLC-UV/vis e GC-MS/MS (*full scan*) e avaliação da eficiência de extração, para fins de otimização do método desenvolvido e posterior validação do mesmo empregando LC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados. As técnicas complementares utilizadas se mostraram adequadas para o monitoramento de testes no desenvolvimento de novas metodologias analíticas.

O método QuEChERS original acidificado associado à limpeza do extrato por d-SPE demonstrou ser eficiente para a extração e determinação de resíduos de 28 herbicidas em amostras de arroz branco polido por LC-MS/MS. Os resultados de recuperação obtidos foram satisfatórios, na faixa entre 70 a 120% para os compostos avaliados, com valores de RSD  $\leq 20\%$ . Este método apresentou bons resultados com valores de LOD de  $6 \mu\text{g kg}^{-1}$  e LOQ  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os compostos analisados. Além disso, o método teve seu escopo de matriz estendido para arroz vermelho e arroz preto.

As soluções analíticas, utilizadas para a construção das curvas de calibração e consequente obtenção dos resultados de precisão e exatidão, foram preparadas no extrato da matriz, devido ao método ter evidenciado efeito matriz significativo, com a finalidade de descontar as interferências provenientes da matriz e, assim, evitar falsos resultados.

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos 28 herbicidas estudados em mais de 26 amostras de arroz adquiridas no comércio local. As amostras não apresentaram resíduos dos compostos estudados, nos níveis avaliados neste estudo.

O método QuEChERS original acidificado utilizado neste estudo apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros e perdas, além de ser relativamente barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos.

Portanto, conclui-se que o método desenvolvido é adequado à análise de resíduos de herbicidas em arroz, o mesmo teve seu escopo estendido para outras variedades e pode ser utilizado em análises de rotina de laboratórios, visto que, os resíduos de herbicidas analisados foram encontrados por abaixo dos limites permitidos e todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS

AHUJA, U.; AHUJA, S. C.; CHAUDHARY, N.; THAKRAR, R. Red rices: past, present and future. Haryana. Disponível em: <<http://www.agri-history.org/pdf/RedRices-UmaAhuja.pdf>>. Acesso em: 02 dezembro 2018.

ANASTASSIADES, M., SHERBAUM, E., TASELEN, B., STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa, H.M.H., Lee, P.W. (eds), Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH Verlag GmbH – Co: KGaA, . 439-458, 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de agrotóxicos. 2018. [http:// portal.anvisa.gov.br/](http://portal.anvisa.gov.br/) Acesso em: 02 dezembro 2018.

BARCELÓ D.; HENNION M. C. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Amsterdam: Elsevier. 1997.

BASSINELLO, P. Z.; GARCIA, J. S.; SOARES, L. A.; KOAKUZU, S. N.; MOURA NETO, F. P.; FERREIRA, R. A.; MENDONÇA, J. A.; SANTIAGO, C. M.; RANGEL, P. H. N. ARROZ PRETO: nova opção culinária para o Brasil. **Comunicado Técnico**, n. 147, p. 1-8, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008.

BASSINELLO, P. Z.; ROCHA, M. S.; COBUCCI, R. de M. A. Avaliação de diferentes métodos de cocção de arroz de terras altas para teste sensorial. **Comunicado Técnico**, n. 84, p. 1-8, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004.

BERGMAN, C. J. Characterizing and enhancing rice bran fractions with potential health benefits and industrial uses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E

TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: SBCTA, 2002. 1 CD-ROM.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Cenário Mundial Favorece Exportações Brasileira de Arroz. 2007. Disponível em: <[www.conab.gov.br/conaweb](http://www.conab.gov.br/conaweb)>. Acesso em: 02 dezembro 2018.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R.; Avaliação de risco crônico na ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CALDAS, S.S; BOLZAN, C.M; CERQUEIRA, M.B; TOMASINI, D; FURLONG, E. B; FAGUNDES, C; PRIMEL, E. G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11918–11926, 2011.

CHIARADIA, M. C., COLLINS C. H., JARDIM I. C. F. S. O. Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acopladas à espectrometria de massas na análise de alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHO, J.; LEE, J.; UK, C.; AHN, J. Quantification of pesticides in food crops using QuEChERS approaches and GC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants**, v. 33, n. 12, p. 1803–1816.

DUKE S. O.; DAYAN F. E. Bioactivity of herbicides, in *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edition, ed. by Murray M-Y. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 23–35, 2011.

E, J.; KIM, L.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, E.; Moon, J. K.; KIM, J. H. Rapid and Simultaneous Analysis of 360 Pesticides in Brown Rice, Spinach, Orange, and Potato Using Microbore GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 3387–3395, 2017.

EMBRAPA. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil. Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/Cap01.htm>>. Acesso em: 07/05/2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA Arroz e Feijão). [www.embrapa.br/arroz-e-feijao](http://www.embrapa.br/arroz-e-feijao), Acesso em 12/03/19.

EU Pesticides database active substances Regulation (EC) No 1107/2009

EUROPEAN COMMISSION. Legislation on Maximum Residue Levels – 2018. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules/mrls\\_2018\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules/mrls_2018_en). Acesso em: 02 dezembro 2018.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004. Disponível em <http://www.fao.org/rice2004/es/rice-us.htm>. Acesso em 11/09/2018.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), CODEX Alimentarius. Pesticides Residues in Food and Feed. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticides/en/>.

FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. (Orgs.). História da Alimentação. Tradução de: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade, 1998.

GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos, **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GRIMALT, S., DEHOUCK, P., Review of Analytical methods for the Determination of Pesticide Residues in Grapes. **Jornal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23. 2016.

HAMILTON, D. J.; AMBRUS, A.; DIETERLE, R. M.; FELSOT, A. S.; HARRIS, C. A.; HOLLAND, P. T.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; LINDERS, J.; UNSWORTH, J.; WONG, S. S. Regulatory limits for pesticide residues in water. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1123-1155, 2003.

HE, Z.; WANG, L.; PENG, Y.; LUO, M.; WANG, W.; LIU, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method. **Food Chemistry**, v. 169, p. 372-380, 2015.

HEINEMANN, R. J. B.; FAGUNDES, P. L.; PINTO, E. A.; PENTEADO, M. V. C.; LANFER-MARQUEZ U. M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 287-296, 2005.

HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W. H.; KITTS, D. D. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5271-5277, Aug. 2003.

HUNT, J. R.; JOHNSON, L. K.; JULIANO, B. O. Bioavailability of zinc from cooked Philippine milled, undermilled, and brown rice, as assessed in rats by using growth, bone zinc and zinc-65 retention. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5229-5235, 2002.

Informe de cadena de valor AÑO 2 - N° 33 – Noviembre 2017. Subsecretaría de Programación Microeconómica. Secretaría de Política Económica. Ministerio de Hacienda Presidencia de la Nación Argentina.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
[www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br) . Acesso em: 02 dezembro 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático Agrícola (LSPA) 2013.

JULIANO, B.O. Rice in human nutrition. Rome: FAO, 1993. Capturado em 01 dez. 2006. Online. Disponível na internet: <http://www.fao.org>.

KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B. One-Step QuEChERS-Based Approach to Extraction and Cleanup in Multiresidue Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Cereals by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 147–160, 2017.

KARTHIKEYAN, S.; SUGANTHI, A.; BHUVANESWARI, K.; KENNEDY, J.S. Validation and quantification of neonicotinoid insecticide residues in rice whole grain and rice straw using LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v.16, p.1-8, 2019.

KIM, H. K.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S. W.; Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466-473, 2006.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEWA, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 10–20, 2008.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, 1663-1683, 2007.

LEE, J. H.; Identification and Quantification of Anthocyanins from the Grains of Black Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 391-397, (2010).

LEE, J.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, B. J.; KIM, J. H. Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. **Chemosphere**, v. 207, p. 519-526, 2018.

LEE, Y. J.; CHOI, J. H.; EL-ATY, A. M. A.; I. M., S. J.; RAHMAN, M. M.; KIM, S. W.; SHIM J. H. Residue analysis of orthosulfamuron herbicide in fatty rice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Advanced Research**. v. 6, p. 511–516, 2015.

LEE, Y. J.; RAHMAN, M. M.; EL-ATY, A. M. A.; CHOI, J. H.; CHUNG, H. S.; KIM, S. W.; ATY, A.M.A; SHIN, H. C.; SHIM, J. H. Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 442–450, 2016.

LI J.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; YUANBO L.; SHAN, W.; ZHENG Y. Enantioselective determination of triazole fungicide simeconazole in vegetables, fruits, and cereals using modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, p. 127–135, 2011.

LIU, Z.; QI, P.; WANG, X.; WANG, Z.; XU, X.; CHEN, W.; WU, L.; ZHANG, H.; WANG, Q.; WANG, X. Multi-pesticides residue analysis of grains using modified magnetic nanoparticle adsorbent for facile and efficient cleanup. **Food Chemistry**, v. 230, p. 423–431, 2015.

MA, C.; LIU, X.; WU, X.; DONG, F.; XU, J.; ZHENG, X. Simultaneous Determination of Foramsulfuron and Orthosulfamuron in Four Common Grains Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 11, p.1789–1796, 2018.

MACHADO, S. L. de O.; MARCHEZAN, E.; RIGHES, A.A.; CARLESSO, R.; VILLA, S.C.C. & CAMARGO, E.R. Water use and nutrients and sediments losses on the initial water drainage on flooded rice. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, 2006.

MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; AVILA, L. A.; CAMARGO, E. R.; MACHADO, S. L. O.; MACEDO, V. R. M. Rice herbicide monitoring in two brazilian rivers during the rice growing season. **SciELO Agriculture**, v. 64, n. 2, p. 131-137, 2007.

MARTÍNEZ, A. G; ARREBOLA, F. J; MARTÍNEZ, J. L; HERNÁNDEZ, M. E; GARRIDO, A. Optimization and Validation of a Multiresidue Pesticide Method in Rice and Wheat Flour by Modified QuEChERS and GC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 548–563, 2016.

MASSART, D. L.; DIJKSTRA, A.; KAUFMAN, L. (eds). Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. Amsterdam, 1978).

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.

MCNAIR H. M.; MILLER J. M. Basic Gas Chromatography. New York: John Wiley & Sons. 1998.

MILHOME M.; SOUSA A.S.; DUAVI W.C.C.; CAVALCANTE, R.; NASCIMENTO, R. F., Estimated of level of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in superficial water of Ceará- Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96: p.90-95, 2016.

MILHOME M.; SOUSA P.L.R., KEUKELEIRE D.; NASCIMENTO R. F. Multiresidue methods for determination of pesticides using SPME and SPE followed by GC-NPD system: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2048-2055, 2011.

MIN, Z. W.; HONG, M. S. ; YANG, I. C.; KWON, H. Y.; KIM, T. K.; KIM, D. H. Analysis of Pesticide Residues in Brown Rice using Modified QuEChERS Multiresidue Method Combined with Electrospray Ionization-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Detection. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, p. 769–775, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Brasil: projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 6, DE 16 DE FEVEREIRO DE 2009.

MOLINA C.; GRASSO P.; BENFENATI E.; BARCELÓ D. Automated sample preparation with extraction columns followed by Liquid Chromatography-ion spray mass spectrometry interference, determination and degradation of polar organophosphorus pesticides in water sample. **Journal Chromatography A**, v. 737, p. 47-58, 1996.

NI, Y.; YANG, H.; ZHANG, H.; HE, Q.; HUANG, S.; QIN, M.; CHAI, S.; GAO, H.; MA, Y. Analysis of four sulfonylurea herbicides in cereals using modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe sample preparation method coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1537, 27-34.

NI, Y.; YANG, H.; ZHANG, H.; HE, Q.; HUANG, S.; QIN, M.; CHAI, S.; GAO, H.; MA, Y. Analysis of four sulfonylurea herbicides in cereals using modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe sample preparation method coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1537, p. 27–34, 2018.

NIELL, S.; PAREJA, L.; GEIS ASTEGGIANTE L.; CESIO, M.V.; HEINZEN, H. Comparison of extraction solvents and conditions for herbicide residues in milled rice with liquid chromatography-diode array detection analysis (LC-DAD). **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 2, p. 206-211, 2010.

OBSERVATORIO AGRICOLA. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA V.5 – SAFRA 2017/2018 – N 11-Decimo primeiro levantamento. Agosto 2018.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. de C. O. da C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 30-35, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Manual de Vigilância da saúde de populações exposta a agrotóxicos. Brasília, DF, 1996. 69 p. Disponível em: [www.opas.org.br](http://www.opas.org.br).

PALOU; RANZENBERGER; LARIOS. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas 100 preguntas sobre resistências, FAO 2007.

PAREJA, L.; CESIO, V.; HEINZEN, H.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 83, p. 1613-1622, 2011.

PEREIRA, J. A. As variedades de arroz vermelho brasileiras / José Almeida Pereira e Orlando Peixoto de Moraes. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2014.

PEREIRA, J. A. O arroz e outros elementos culturais da Guiné-Bissau. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 77, 2008.

PEREIRA, J. A. O arroz-vermelho cultivado no Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2004. 90 p.

PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CUTRIM, V. dos A.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre características agrônômicas, culinárias e nutricionais em variedades de arroz branco e vermelho. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 243-248, 2009.

PEREIRA, J. A.; MORAIS, O. P. de; BRESEGHELLO, F. Análise da heterose de cruzamentos entre variedades de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 9, p. 1135-1142, 2008.

Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, n. 5, p. 423-427, 2009.

PRESTES O. D.; FRIGGI C. A.; ADAIME M. B.; ZANELLA R.; QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de

pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620–1634, 2009.

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. 117 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

PRESTES, O. D.; FRIGGI C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O. M.; MARCHEZAN, E.; Poluição das Águas por Herbicidas Utilizados no Cultivo do Arroz Irrigado na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica e Monitoramento, **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.

QIN, M; CHAI, S; MA, Y; GAO, H; ZHANG, H; HE, Q. Determination of pyriminobac-methyl and bispyribac-sodium residues in rice by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on QuEChERS. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 35, p. 719-723, 2017.

REBELO, A. M.; DOLZAN, M. D.; HELLER, M.; DESCHAMPS, F. C.; ABATE, G.; MICKE, G. A.; GRASSI, M. T. Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 186-193, 2016.

REBELO, A.M.; HELLER, M; DOLZAN, M. D; DESCHAMPS, F.C; ABATE, G; MICKEC, G.A; AND GRASSI, M.T. Determination of twenty pesticides in rice by

employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 6, 9469-9476, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SHARMA, S. D. Domestication and diaspora of rice. In: SHARMA, S. D. (Ed.). Rice: origin, antiquity and history. Boca Raton: CRC Press; New Hampshire: Science Publishers, 2010. cap. 1, p. 1-24.

SILVA, R. O. Otimização e validação de métodos empregando LC-ESI-MS/MS e QuEChERS para determinação de agrotóxicos em caju. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará. 2013.

STECKERT, A. V.; SCHNACK, C. E.; SILVANO, J.; DAL-PIZZOL, F. & ANDRADE, V. M. Markers of pesticide exposure in irrigated rice cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n 23, p. 11441-11445, 2009.

SWEENEY, M. T.; THOMSON, M. J.; PFEIL, B. E.; MCCOUCH, S. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 283-294, 2006.

TELÓ, G. M.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; PEIXOTO, S. C.; PRESTES, O. D.; OLIVEIRA DE, M. L. Fungicide and insecticide residues in rice grains. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 1, p. 9-15, 2017.

THAMMANA, M. A. Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Research & Reviews. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 22-28, 2016.

TONHL, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 5, p. 616-623, 2002.

TSOCHATZIS, E. D.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; KARPOUZAS, D. G.; TZIMOU-TSITOURIDOU, R.; A multi-residue method for pesticide residue analysis in rice grains using matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2181-2190, 2010.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M.; Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2010.

WU, X.; XU, J.; LIU, X.; DONG, F.; WU, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y. Determination of Herbicide Propisochlor in Soil, Water and Rice by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Method Using by UPLC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 917-921, 2013.

WU, Y.; CHENA, R.; ZHUA, Y.; ZHAO, J.; YANG, T. Simultaneous determination of sixteen amide fungicides in vegetables and fruits by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 989, p. 11-20, 2015.

YANSONG, W.; SHIHUA, F.; XIANGYONG, C.; MINGRUI, H.; FENGQING, Z. A sensitive and selective method for the determination of flumorph residues in vegetables and fruits by HPLC–ESI-MS/MS. **Talanta**, v. 86, p. 221-226, 2011.

YU, Q.; Zhang, P.; He, Y.; Xu, Z.; HE, X.; HU, Y.; ZHANG, H.; HE, L. Dissipation dynamics and residue of four herbicides in paddy fields using HPLC-MS/MS and GC-MS. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 236, n. 16, p. 1-15, 2019.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACHADO, S. L. O.; GONÇALVES, F. F.; MARCHEZAN, E. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water

samples by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, v. 55, p. 573-577, 2002.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 849-868, 2002.