



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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM
PLANTAS DE ARROZ EMPREGANDO QuEChERS
MODIFICADO E GC-ECD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Pivetta Cogo

Santa Maria - RS, Brasil

2008

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM
PLANTAS DE ARROZ EMPREGANDO QuEChERS
MODIFICADO E GC-ECD**

por

Juliana Pivetta Cogo

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM PLANTAS DE
ARROZ EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD**

elaborada por
Juliana Pivetta Cogo

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof^ª. Dr^ª. Martha Bohrer Adaime (co-orientadora, UFSM)

Prof. Dr. Natalício Ferreira Leite (TECPAR)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2008

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Carlos e Lenira
à quem devo a minha vida e tudo o que sou até hoje.

Eles que sempre desistiram dos seus sonhos
em prol do meus sonhos.

Pai e Mãe !!!

Obrigado por tudo!

Pela dedicação, pelo apoio,
pelo carinho, pelo incentivo,
pela compreensão, pelo amor.

Amo muito muito vocês!

“Sempre desprezei as coisas mornas,
as coisas que não provocam ódio nem paixão,
as coisas definidas como mais ou menos.
Um filme mais ou menos, um livro mais ou menos.
Tudo perda de tempo.
Viver tem que ser mais perturbador,
é preciso que nossos anjos e demônios
sejam despertados,
e com eles sua raiva, seu orgulho,
seu asco, sua adoração ou seu desprezo.
O que não faz você mover um músculo,
o que não faz você estremecer,
suar, desatinar,
não merece fazer parte de sua biografia.

Martha Medeiros

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação neste trabalho, incentivo e compreensão em todos os momentos; que mesmo sempre muito atarefado consegue ajudar seus alunos. Agradeço também por ter acreditado na minha capacidade dando-me a oportunidade de fazer parte do LARP.

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela orientação desde a época de iniciação científica até o fim deste trabalho. Agradeço também sua compreensão e apoio em todos os momentos sempre sabendo usar a palavra certa para confortar em todos os momentos de angústias. Obrigado pela amizade, pelo carinho, pela ajuda, por ter acreditado no meu potencial. Devo a ti minha gratidão e admiração eterna. Tenho em ti um exemplo.

Ao Prof. Dr. Natalício Ferreira Leite pela sua valiosa participação na defesa da dissertação, contribuindo com excelentes sugestões e questionamentos para melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva que se dispôs a participar do exame de qualificação. Obrigada pelas sugestões que muito contribuíram para o trabalho.

As minhas amadas amigas Sandra e Michele, não tenho como agradecer o apoio que me deram para a realização desta conquista. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo companheirismo, pela paciência em todos os momentos, pelos conselhos e principalmente pela ajuda “prática” inigualável. Serei eternamente grata. Muito obrigada! Muito sucesso para nós.

Aos demais colegas e amigos do LARP, Osmar, Caroline, Gisele, Guilherme e Mateus agradeço por toda ajuda, apoio e atenção dispensados, e pelo convívio e os momentos de descontração durante todo esse tempo no LARP. Agradeço, ao pequeno Mateus pela sua boa disposição e preocupação em me ajudar em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Érico Flores e seus alunos, pelo empréstimo da centrífuga, indispensável pela realização deste trabalho.

Agradeço a minha amiga Dai pela amizade, pelos bons momentos de descontração, pela energia positiva e pelos bons conselhos, além de seus vários empréstimos.

À minha irmã Andréia, que não é apenas minha irmã, é minha amiga, minha conselheira, minha confidente. E ao meu irmão do coração Moisés. Obrigada pelo incentivo, pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e pela compreensão. Amo vocês!

À minha maninha Aracélli, a quem não tenho palavras para agradecer nesses vários anos de amizade, pela compreensão, pela paciência, pelo carinho e principalmente pela disposição em me ouvir e dividir, em qualquer momento, minhas alegrias e, principalmente minhas angústias. Obrigado pela amizade, pela confiança, pelo companheirismo, pelas boas risadas e boas festas compartilhadas.

À minha grande amiga Karla, que foi de grande importância durante esta etapa, tendo paciência em me escutar e me confortar. Obrigada pela amizade, pela confiança, pelo carinho, pela convivência, sem esquecer dos bons momentos de alegrias divididos. Muito obrigada!

Ao meu amigo Gustavo que sempre esteve disposto e bem humorado a qualquer hora que fosse, para me ajudar a sanar minhas dúvidas “agronômicas” e, além disso, por ser meu colaborador direto para obtenção das amostras para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

Ao Grupo de Pesquisa em Arroz e Uso Alternativo de Várzea da UFSM um agradecimento especial pela condução dos experimentos de campo que forneceram as amostras e brancos necessários para a execução deste trabalho.

À minha querida amiga Giovana que compartilhou comigo muitas angústias, aflições, dúvidas, alegrias e realizações.

À Sandra Botega, pela companhia agradável e divertida desde os tempos da minha iniciação científica.

À Márcia Botega pela sua disposição e boa vontade em ajudar a resolver e sanar qualquer dúvida. E principalmente pelo bom humor e boas risadas compartilhadas neste período.

À todos os meus demais amigos e a todos da minha Família Pivetta, os quais não pude mencionar nestes agradecimentos, a cada um que de alguma forma torceu por mim e assim ajudou-me a fortalecer e concretizar esse sonho.

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

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela gentileza, disposição e atenção para com os alunos.

À Deus pelo dom da vida, pela saúde e por mostrar-me sempre o melhor caminho, fazendo com que eu chegasse até aqui. Muito Obrigado Senhor pela força que me deste sempre nos momentos em que eu mais precisei e pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM PLANTAS DE ARROZ EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD

AUTORA: JULIANA PIVETTA COGO
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de dezembro de 2008

A cultura do arroz é uma atividade de importância cada vez maior pela sua utilização na alimentação humana, garantindo alimento suficiente e de qualidade para a população. A grande preocupação é o uso intensivo de pesticidas; principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas, e os resíduos decorrentes desta prática. Neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se um procedimento analítico, utilizando o método de extração QuEChERS modificado e Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD) para a determinação residual dos inseticidas bifentrina e lambda-cialotrina e dos fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina em plantas de arroz. O método QuEChERS modificado consistiu em uma etapa de extração inicial utilizando 3,0 g de plantas de arroz na qual foi adicionado 15 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, seguida por uma etapa de partição após a adição de uma mistura de sais anidros (3 g de sulfato de magnésio e 1,7 g de acetato de sódio). Na seqüência foi realizada a etapa de *clean-up* de 4 mL de extrato com 20 mg de carvão ativado vegetal e 600 mg de sulfato de magnésio e a análise por GC-ECD utilizando-se coluna apolar DB-5. Na validação do método determinou-se LOD, LOQ, linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, avaliada pela recuperação. Os valores de LOQ do método foram 1,0 mg kg⁻¹ para azoxistrobina e 0,05 mg kg⁻¹ para lambda-cialotrina, bifentrina e trifloxistrobina. As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,01 e 1,0 mg L⁻¹, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,993. O método apresentou boa precisão, com valores de RSD inferiores a 19,0%, e boa exatidão, com recuperações entre 71,2 e 103,6%. O método foi considerado adequado à análise dos pesticidas em plantas de arroz, visto que todos os parâmetros de validação atendem os limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos. Após ser validado, o método foi aplicado em um estudo da concentração residual dos pesticidas em plantas de arroz, oriundas de lavoura de arroz irrigado de um experimento realizado no Campus da UFSM, onde foram aplicados separadamente os pesticidas azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina, na safra 2007/2008. Todos os pesticidas em estudo foram detectados até aproximadamente 20 dias após a sua aplicação.

Palavras-chave: resíduos de pesticidas; arroz, plantas de arroz; GC-ECD, QuEChERS

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN RICE PLANTS USING MODIFIED QuEChERS AND GC-ECD

AUTHOR: JULIANA PIVETTA COGO
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: December 19th, 2008, Santa Maria

Rice culture is an activity that has currently been gaining more importance due to its use in human feeding, allowing enough food and acceptable quality to the population. There is a great concern regarding the intensive use of pesticides, the main strategy employed in the countryside to combat and prevent plagues, as well as the residues resulting from such practice. This paper has been developed and validated on an analytical procedure, using the QuEChERS modified extraction approach and gas chromatography with electron-capture detection (GC-ECD) for the determination of residual insecticides lambda-cyhalothrin and bifenthrin and azoxystrobin fungicides and trifloxystrobin in rice plants. The QuEChERS modified method was applied in an initial stage of extraction using 3.0 g of rice plants in which was added 15 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) acetic acid, followed by a partition step after the addition of a mixture of anhydrous salts (3 g of magnesium sulphate and 1.7 grams of sodium acetate). Next, the clean-up stage was carried out 4 mL extract using 200 mg of activated charcoal and 600 mg of magnesium sulfate and the analysed by GC-ECD using an apolar DB-5 column. During method validation, LOD; LOQ; linearity; precision (repeatability and intermediate precision); and accuracy, evaluated in terms of recovery, were determined. Using this method, LOQ quantities were 1 mg kg⁻¹ for azoxystrobin and 0.05 mg kg⁻¹ for lambda-cyhalothrin, bifenthrin and trifloxystrobin. The analytical curves presented linearity between 0.01 and 1.0 mg L⁻¹, with coefficient of determination greater than 0.993. The method had shown good precision, with RSD values smaller than 19.0%, and accuracy, with recoveries between 71.2 and 103.6%. The method was considered adequate to the analysis of pesticides in rice plants, considering that all validation parameters meet the levels required for validation of chromatographic methods. After being validated, the method was applied to the study of the residual concentration of pesticides in rice plants, from rice crops irrigated with an experiment carried through at the UFSM Campus; where the pesticides azoxystrobin, bifenthrin, lambda-cyhalothrin, and trifloxystrobin were individually applied in 2007/2008 harvest. All pesticides in this study were detected up to approximately twenty (20) days after being applied.

Keywords: residues of pesticides; rice; rice plants; GC-ECD, QuEChERS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xviii
LISTA DE APÊNDICES	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Arroz	3
2.1.1 Histórico do arroz.....	3
2.1.2 Principais características do arroz.....	4
2.1.3 Estrutura e composição do arroz.....	6
2.1.4 Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz.....	7
2.1.5 Produção de arroz mundial, no Brasil e no Rio Grande do Sul.....	9
2.2 Pesticidas	15
2.2.1 Histórico.....	15
2.2.2 Definição.....	16
2.2.3 Toxicidade.....	17
2.2.4 Pesticidas selecionados neste estudo.....	18
2.2.4.1 Azoxistrobina.....	19
2.2.4.2 Bifentrina.....	20

2.2.4.3 Lambda-cialotrina	21
2.2.4.4 Trifloxistrobina	22
2.2.5 Aspectos gerais dos inseticidas e fungicidas	23
2.3 Determinação de pesticidas empregando métodos cromatográficos.....	24
2.3.1 Métodos de extração de pesticidas	25
2.4 Efeito Matriz.....	29
2.5 Validação de métodos cromatográficos de análise	30
2.5.1 Curva analítica e linearidade	31
2.5.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	32
2.5.3 Precisão	33
2.5.4 Exatidão (Recuperação).....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Instrumentação.....	35
3.2 Gases Utilizados.....	36
3.3 Materiais.....	36
3.4 Solventes e Reagentes	36
3.5 Padrões analíticos dos pesticidas estudados	37
3.6 Seleção do Padrão Interno	38
3.7 Otimização das condições cromatográficas.....	38
3.8 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em plantas de arroz.....	39
3.8.1 Escolha das amostras para a etapa de validação	39
3.8.2 Otimização do método de extração	40
3.8.2.1 Ensaio nº 1	40
3.8.2.2 Ensaio nº 2	40

3.8.2.3 Ensaio nº 3	41
3.8.3 Otimização da etapa de <i>clean-up dispersivo</i>	41
3.8.3.1 Seleção da quantidade de carvão ativado para a etapa de <i>clean-up</i>	42
3.8.3.2 Verificação da recuperação na etapa de <i>clean-up</i>	43
3.9 Validação do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em plantas de arroz.....	43
3.9.1 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas	44
3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação	44
3.9.3 Ensaios de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado para avaliação da precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão	45
3.10 Avaliação do efeito matriz nos extratos das plantas de arroz	50
3.11 Aplicação do método	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1 Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos pesticidas em estudo por GC-ECD	55
4.2 Seleção do padrão interno	58
4.2.1 Bromofós-metílico	58
4.3 Otimização da etapa de extração com acetonitrila	59
4.4 Otimização da etapa de <i>clean-up</i>.....	59
4.5 Método de extração otimizado	61
4.6 Validação do Método QuEChERS modificado	64
4.6.1 Curva analítica	65
4.6.2 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	65
4.6.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	67

4.6.4 Efeito matriz	70
4.7 Aplicação do método	72
5 CONCLUSÕES	78
TRATAMENTO DE RESÍDUOS	80
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICES.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de uma planta de arroz da espécie <i>Oryza sativa</i>	05
Figura 2 - Produção mundial de arroz nos anos de 2005-2007.....	09
Figura 3 - Mapa das regiões arrozeiras do Rio Grande do Sul.....	10
Figura 4 -Classificação toxicológica dos pesticidas.....	17
Figura 5 - Representação gráfica do estabelecimento dos valores de LOD e LOQ.....	45
Figura 6 - Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e <i>clean-up</i> do método QuEChERS modificado.....	47
Figura 7 - Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em plantas de arroz.....	48
Figura 8 - Lavoura experimental de arroz irrigado localizada no Campus da UFSM.....	51
Figura 9 - Cromatograma obtido para uma solução analítica no extrato da matriz contendo bromofós-metílico (P.I.), trifloxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e azoxistrobina na concentração de 0,5 mg L ⁻¹ , obtidos nas condições descritas no item 4.1.....	57
Figura 10 - Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em plantas de arroz, utilizando o método de extração com acetonitrila.	63
Figura 11 - Cromatograma obtido por GC-ECD para o extrato “branco” das plantas de arroz, obtido nas condições cromatográficas do item 4.1.....	64
Figura 12 - Cromatograma de uma amostra fortificada com a mistura dos pesticidas no nível de 2,5 mg kg ⁻¹ , obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	70
Figura 13 - Curvas analíticas dos pesticidas lambda-cialotrina, bifentrina, trifloxistrobina e azoxistrobina preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato	

da matriz das plantas de arroz branco.....	71
Figura 14 - Concentrações residuais dos pesticidas trifloxistrobina, lambda-cialotrina, azoxistrobina e bifentrina em plantas de arroz irrigado.....	73
Figura 15 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T1, contendo resíduos do pesticida azoxistrobina na concentração de 1,22 mg kg ⁻¹ , obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	74
Figura 16 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T2, contendo resíduos do pesticida bifentrina na concentração 0,22 mg kg ⁻¹ , obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	75
Figura 17 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T3, contendo resíduos do pesticida lambda-cialotrina na concentração de 0,55 mg kg ⁻¹ , obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	76
Figura 18 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T4, contendo resíduos do pesticida trifloxistrobina na concentração de 0,62 mg kg ⁻¹ , obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido.....	07
Tabela 2 - Comparativo de área, produtividade e produção de arroz das safras 2006/2007 e 2007/2008.....	12
Tabela 3 - Importações brasileiras de arroz em toneladas (base casca), por origem, entre março e julho de 2005 a 2008.....	13
Tabela 4 - Exportações brasileiras de arroz em toneladas (base casca), por destino, entre março e julho de 2005 a 2008.....	14
Tabela 5 - Padrões analíticos dos pesticidas em estudo.....	37
Tabela 6 - Adsorventes utilizados para otimização do <i>clean-up</i>	42
Tabela 7 - Quantidade de carvão ativado utilizado para cada teste.....	43
Tabela 8 - Pesticidas aplicados em experimento na lavoura de arroz irrigado , realizado na safra 2007/2008.....	52
Tabela 9 - Dose aplicada, identificação e produto formulado dos pesticidas das amostras de plantas de arroz.....	53
Tabela 10 - Pesticidas analisados com seus respectivos t_R e fórmula molecular...	57
Tabela 11 - Recuperações médias dos pesticidas utilizando 15 e 20 mg de carvão ativado para 4 mL de extrato.....	61
Tabela 12 - Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato das plantas de arroz e analisados por GC-ECD.....	65
Tabela 13 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método	66
Tabela 14 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método.	68
Tabela 15 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ACN - acetonitrila
- AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAS - *Chemical Abstracts Service*
- CL₅₀ - Concentração Letal Média para 50% da população em estudo
- C₁₈ - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈
- DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano
- d.i. - diâmetro interno
- DL₅₀ - dose letal média para 50% da população em estudo (via oral ou dérmica)
- ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPC - Controle Eletrônico de Fluxo, do inglês *Electronic Pneumatic Control*
- EPA - Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês
Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FE - Fase Estacionária
- FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GCB - Carbono grafitizado
- GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography Electron Capture Detection*
- GC-FID - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama, do inglês *Gas Chromatography Flame Ionization Detection*
- GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês
Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

ha - hectare

HAc - ácido acético

ICH - Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

LARP - Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

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

LMR - Limite Máximo de Resíduos, do inglês *Maximum Residues Limit*

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

PI - Padrão Interno

PSA - Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS - Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

r^2 - Coeficiente de determinação

rpm - rotações por minuto

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_r - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

SBSE - Extração Sortiva com Barra Magnética, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

SOSBAI - Sociedade Sul-brasileira de Arroz Irrigado

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

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*

t_R - tempo de retenção

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria

v/v - Volume por volume

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Fluxograma da otimização do clean-up com carvão vegetal ativado	89
APÊNDICE B - Ensaio de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado.....	90
APÊNDICE C - Concentrações residuais dos pesticidas estudados nas plantas de arroz cultivadas na safra 2007/2008.....	91

1 INTRODUÇÃO

O arroz é uma das culturas mais importantes no mundo sendo a principal fonte nutricional para pessoas que moram em países em desenvolvimento (CHANG & LUH, 1991). De acordo com dados da FAO (2006), entre os continentes, a Ásia é o maior produtor mundial (90,5%), seguido das Américas (5,9%), África (3,0%), Europa (0,5%) e Oceania (0,1%). O Brasil é o nono produtor mundial de arroz e o primeiro fora do continente asiático (FAO, 2006).

A agricultura brasileira tem se destacado com números cada vez mais expressivos, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo. Tal crescimento leva também à utilização de maiores quantidades de pesticidas na produção agrícola, colocando o Brasil como segundo maior consumidor mundial (ANVISA, 2006).

O arroz, durante todo o seu ciclo, é afetado por doenças que reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos. O controle destas doenças visa minimizar os prejuízos na produtividade, com a redução da taxa de infecção a níveis toleráveis, dessa maneira, a utilização de pesticidas é necessária para este propósito.

Para ser usado na agricultura, todo pesticida deve ser registrado para a cultura e para a praga alvo. A eficácia do pesticida no controle de pragas, doenças e plantas daninhas dependem muito da sua aplicação. Sua utilização indevida pode causar muitos malefícios para o homem, animais silvestres, peixes e outros organismos desejáveis que habitam ou visitam os campos de arroz para se alimentar.

A preocupação com a presença de pesticidas nos alimentos e no meio ambiente é tão antiga quanto a introdução destes produtos químicos no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. Apesar disso, somente mais recentemente, o avanço do conhecimento científico e as novas tecnologias da área laboratorial, vêm permitindo a avaliação da qualidade dos alimentos que chegam à mesa da população.

Os níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos e no meio ambiente dependem de diversos fatores, como: tecnologia de aplicação, volume de produto aplicado, fatores

ambientais (luz, temperatura, umidade e algumas propriedades físicas e químicas do solo), período de carência ou intervalo de segurança e características físico-químicas dos pesticidas (MIDIO & MARTINS, 1997).

O monitoramento de resíduos de pesticidas não é um trabalho simples e a definição dos limites aceitáveis nos alimentos e no meio ambiente (água, solo, plantas) é um conceito em constante mudança. Há 20 anos a falta de tecnologias mais eficientes fazia dos níveis toleráveis de pesticidas em alimentos uma verdadeira incógnita. Atualmente, as taxas aceitáveis são revistas frequentemente (ANVISA, 2006).

Sabendo-se dessa problemática, este trabalho teve como objetivos: (i) a otimização e validação de um método de extração utilizando o Método QuEChERS modificado e Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD) para determinar resíduos dos pesticidas azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina em plantas de arroz irrigado e (ii) realizar um estudo de acompanhamento da concentração residual destes fungicidas e inseticidas em amostras de plantas de arroz, devido à utilização dos restos das plantas, após a colheita de arroz, para a alimentação de animais, principalmente bovinos, contribuindo assim para o estabelecimento de limites seguros para alimentação animal e preservação do ambiente.

O uso destes fungicidas e inseticidas na cultura do arroz irrigado tem sido intensificado nas últimas safras devido à elevação da ocorrência de doenças e pragas causando prejuízo econômico em momentos muito próximos à colheita, destacando-se assim, a importância do desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação residual destes pesticidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz

2.1.1 Histórico do arroz

O arroz pertence à divisão angiosperma, à classe das monocotiledôneas, à ordem glumiflora, à família das gramíneas e à subfamília *Bambusoideae* ou *Oryzoideae*. As gramíneas, provavelmente, originaram-se na era Mesozóica e evidências circunstanciais sugerem que tenha sido em clima tropical e, então, uma série de linhas evoluíram e adaptaram-se a vários habitat (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

Acredita-se que o arroz asiático (*Oryza sativa* L.) seja originário da Ásia. Segundo alguns historiadores, sua origem deu-se provavelmente na Índia, mais precisamente ao sul, onde se encontram condições de solos mais favoráveis para o seu cultivo. Escritos índicos de 1300 a 100 anos a.C. descrevem certas práticas agronômicas, exibindo uma classificação agronômica e alimentícia do arroz (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

Atualmente, admite-se que o arroz se propagou desde o sudeste asiático e Índia, até a China, há cerca de 3000 anos a.C., da China o arroz foi introduzido na Coreia e depois no Japão. É igualmente provável que, do sul da China, o arroz foi introduzido nas Filipinas, onde é cultivado há 2000 anos. Paralelamente, através do sul da Índia, pela rota da Malásia, o arroz foi propagado pela Indonésia, onde documentos comprovam seu cultivo há 1800 anos a. C. Também, a partir da Índia, o arroz chegou ao Ceilão, onde foi cultivado primeiramente no sistema de sequeiro (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

A introdução do *Oryza sativa* L. na Ásia Ocidental e no Mediterrâneo é mais recente e deu-se durante o Império Persa. A continuação de sua implantação estendeu-se à Turquia e Síria. A chegada deste cultivo na Grécia, Irã e Babilônia, segundo alguns

historiadores, deu-se em consequência das invasões de Alexandre Magno, no ano 320 a.C. (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

A expansão do cultivo pelos árabes foi muito importante, sendo levado para o Marrocos e Espanha, de onde se espalhou para vários países vizinhos. Posteriormente, foi introduzido na América pelos espanhóis e, no Brasil, pelos portugueses, onde se tornou um dos principais alimentos de consumo interno (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

Alguns autores apontam o Brasil como o primeiro país a cultivar esse cereal no continente americano. O arroz era o "milho d'água" (abati-uaupé) que os tupis, muito antes de conhecerem os portugueses, já colhiam nos alagados próximos ao litoral. Consta que integrantes da expedição de Pedro Álvares Cabral, após uma peregrinação por cerca de 5 km em solo brasileiro, traziam consigo amostras de arroz, confirmando registros de Américo Vespúcio que trazem referência a esse cereal em grandes áreas alagadas do Amazonas. Em 1587, lavouras arrozeiras já ocupavam terras na Bahia e, por volta de 1745, no Maranhão (EMBRAPA, 2006).

Em 1766, a Coroa Portuguesa autorizou a instalação da primeira descascadora de arroz no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, aconteceu em meados do século XVIII e daquela época até a metade do século XIX, o país foi um grande exportador de arroz (EMBRAPA, 2006).

2.1.2 Principais características do arroz

O Arroz (gênero *Oryza*), Figura 1, é tolerante ao deserto e a condições de umidade e calor, persiste em áreas alagadas, secas e frescas; além de crescer em solo fisiológico, solos ácidos e alcalinos. O gênero *Oryza* possui 23 espécies, duas são cultivadas: *Oryza sativa* que teve origem nos trópicos úmidos da Ásia, e *Oryza glaberrima*, a partir da África Ocidental (FAO, 2004).



Figura 1- Ilustração de uma planta de arroz da espécie *Oryza sativa* (FAO, 2004)

O arroz é uma gramínea anual adaptada ao ambiente aquático. Esta adaptação é devida à presença de aerênquima no colmo e nas raízes da planta, que possibilita a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera.

Para expressão de seu potencial produtivo, a cultura requer temperatura ao redor de 24 a 30 °C e radiação solar elevada, considerando que a disponibilidade hídrica não é um fator limitante quando cultivada em condição de solo inundado (YOSHIDA, 1981).

O ciclo de desenvolvimento do arroz pode ser dividido em três fases principais, a saber: plântula, vegetativa e reprodutiva, conforme escala proposta por COUNCE *et al.* (2000). A duração de cada fase é função da cultivar, época de semeadura, região de cultivo e das condições de fertilidade do solo. A duração do ciclo varia entre 100 e 140 dias para a maioria dos cultivares utilizadas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, sendo que a maior parte da variação entre cultivares ocorre na fase vegetativa (SOSBAI, 2007).

2.1.3 Estrutura e composição do arroz

O grão de arroz consiste da cariopse e de uma camada protetora, a casca. A casca, composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, corresponde à cerca de 20% do peso do grão. A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam 5-8% da massa do arroz integral. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos protéicos) e os corpos lipídicos. O embrião está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídios, e representa 2-3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94% do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos protéicos (JULIANO & BECHTEL, 1985).

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento, produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas (ZHOU *et al.*, 2002).

Os nutrientes oriundos do arroz não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibras, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. Dessa forma, o polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral e o polido (WALTER *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido

Constituinte	Arroz integral	Arroz branco polido	Arroz parboilizado polido
Amido total	74,12	87,58	85,08
Proteínas	10,46	8,94	9,44
Lipídios	2,52	0,36	0,69
Cinzas	1,15	0,30	0,67
Fibra total	11,76	2,87	4,15
Fibra insolúvel	8,93	1,05	1,63
Fibra solúvel	2,82	1,82	2,52

Fonte: Adaptado de STORCK (2004)

2.1.4 Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo caracterizando-se como principal alimento para mais de metade da população mundial, principalmente na América Latina e Ásia. Em alguns países asiáticos, este cereal é responsável pelo suprimento de 80% das calorias constituintes da dieta alimentar da população (IRRI, 1994).

No caso de países que tem como hábito o consumo de arroz, esse é considerado um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, pode fornecer 20% da energia e 15% das proteínas da dieta do indivíduo. O arroz é uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, sendo considerado a espécie de maior potencial de aumento de produção para o combate da fome no mundo (FAO, 2006a).

Na Ásia, onde há o maior consumo de arroz, mais de 2 bilhões de pessoas obtêm entre 60 e 70 por cento de sua energia na dieta diária de arroz e seus subprodutos. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido neste continente (FAO, 2006a).

Este cereal é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. Sua importância destaca-se principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. A produção mundial de arroz anualmente é de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com 13.140.900 t (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não asiático entre os 10 maiores produtores (FAO, 2006b).

Segundo a FAO, quase um bilhão de famílias na Ásia, África e Américas dependem dos sistemas de arroz para a sua principal fonte de emprego e de subsistência. A produção de arroz na África Subsaariana está agora expandindo mais rápido do que qualquer outra cultura (FAO, 2006a).

Apesar de todo o esforço que vem sendo feito no sentido de controlar a natalidade, no ano 2025 estima-se que a população brasileira será de 237 milhões de pessoas; isto significa que será necessário aumentar a produção de arroz em 61% em relação aos atuais 13 milhões de toneladas produzidas, isso somente pensando em atender o consumo interno (IRRI, 1994).

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial.

A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo. Assim como na Ásia, este cereal é um produto importante na economia de muitos dos países latino-americanos pelo fato de ser item básico na dieta da população, como nos casos do Brasil, Colômbia e Peru, ou por ser um produto importante no comércio internacional, como no de Uruguai, Argentina e Guiana, como exportadores, e de Brasil, México e Cuba, entre outros, como importadores (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

2.1.5 Produção de arroz mundial, no Brasil e no Rio Grande do Sul

A cultura do arroz é uma atividade de importância cada vez maior por ser uma opção na abertura de novas áreas de cultivo e pela sua utilização na alimentação humana (RICHETTI, 2005).

Segundo os dados da FAO (2005), os dez maiores produtores mundiais de arroz são: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão. Estes países respondem a mais de 86,2% da produção mundial deste cereal (WANDER, 2006). Na Figura 2, estão demonstrados os maiores produtores de arroz.

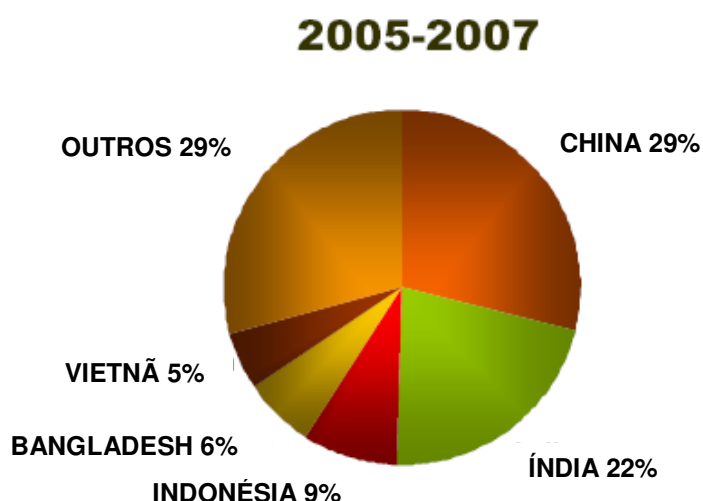


Figura 2 - Produção mundial de arroz nos anos de 2005-2007 (FAO, 2008)

Hoje o Estado do Rio Grande do Sul é responsável por 61% da produção nacional e por 50% da produção do Mercosul, figurando entre os maiores produtores mundiais de arroz. Essa produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: irrigado e de sequeiro (IRGA, 2008).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no território gaúcho a área de plantação de arroz cresceu de 566 mil hectares para cerca de 1,067 milhão de hectares nos últimos 30 anos, o que elevou a participação do

Estado na área nacional de 9,6% na safra de 1977/1978 para 37% na safra de 2007/2008. Já nos demais Estados Brasileiros, a área cultivada recuou de pouco mais de 5,426 milhões de hectares na safra 1977/78 para cerca de 1,815 milhão de hectares na safra 2007/08 (IRGA, 2008).

A Figura 3 demonstra as regiões arroteiras do Rio Grande do Sul.



- 1 - REGIÃO DA FRONTEIRA OESTE
- 2 - REGIÃO DA CAMPANHA
- 3 - REGIÃO DA DEPRESSÃO CENTRAL
- 4 - REGIÃO DA PLANÍCIE COSTEIRA INTERNA À LAGOA DOS PATOS
- 5 - REGIÃO DA PLANÍCIE COSTEIRA EXTERNA À LAGOA DOS PATOS
- 6 - REGIÃO DA ZONA SUL

Figura 3 - Mapa das regiões arroteiras do Rio Grande do Sul (IRGA, 2008a)

O incremento da produção de arroz no Rio Grande do Sul também decorre dos importantes investimentos em pesquisa e tecnologia, o que permitiu uma participação cada vez mais efetiva na safra nacional (IRGA, 2008). Além da modernização pela qual passou nos últimos tempos em aspectos como a introdução de novas variedades com maior potencial produtivo, manejo, sistemas produtivos e gerenciamento, que acrescentaram rentabilidade a esta lavoura (ATLAS, 2006).

A Tabela 2 mostra um comparativo entre área, produtividade e produção de arroz em todas as regiões do Brasil nas safras de 2006/2007 e 2007/2008, demonstrando-se

dessa maneira que a região centro-sul é responsável por mais de 80% da produção de arroz no Brasil, afirmando mais uma vez a importância da região sul no efetivo de produção de arroz neste país.

Tabela 2 - Comparativo de área, produtividade e produção de arroz das safras 2006/2007 e 2007/2008

Região	Área (em mil ha)		Produtividade (em kg ha ⁻¹)		Produção (em mil t)	
	Safra 06/07	Safra 07/08	Safra 06/07	Safra 07/08	Safra 06/07	Safra 07/08
NORTE	495,9	434,4	2.250	2.363	1.116,0	1.026,6
RR	22,3	22,2	5.100	5.667	113,7	125,8
RO	71,1	71,4	2.060	2.025	146,5	144,6
AC	22,1	12,7	1.310	1.484	29,0	18,8
AM	13,4	4,8	1.500	1.900	20,1	9,1
AP	2,9	2,9	780	1.164	2,3	3,3
PA	207,4	163,3	1.913	1.821	396,8	297,4
TO	156,7	157,1	2.601	2.721	407,6	427,5
NORDESTE	746,3	709,6	1.403	1.664	1.047,3	1.180,5
MA	511,4	477,6	1.390	1.465	710,8	699,7
PI	153,4	143,3	884	1.582	135,6	226,7
CE	32,5	33,6	2.186	2.976	71,0	100,0
RN	1,5	2,2	2.377	3.599	3,6	7,9
PB	6,9	7,3	690	1.277	4,8	9,3
PE	5,0	5,0	5.100	5.490	25,5	27,3
AL	3,2	3,4	4.378	4.300	14,0	14,6
SE	11,5	11,5	4.630	4.678	53,2	53,8
BA	20,9	25,7	1.380	1.602	28,8	41,2
CENTRO-OESTE	442,6	375,5	2.667	2.953	1.180,4	1.109,0
MT	280,3	238,9	2.620	2.850	734,4	680,9
MS	42,1	35,4	5.020	5.319	211,3	188,3
GO	120,0	101,1	1.950	2.371	234,0	239,7
DF	0,2	0,1	3.653	1.300	0,7	0,1
SUDESTE	115,0	94,4	2.387	2.534	274,5	239,2
MG	85,0	67,5	2.200	2.126	187,0	143,5
ES	2,8	2,0	2.900	2.926	8,1	5,8
RJ	2,6	2,3	3.400	3.437	8,8	8,0
SP	24,6	22,6	2.870	3.626	70,6	81,9
SUL	1.167,6	1.266,9	6.593	6.751	7.697,7	8.552,7
PR	57,3	47,2	3.130	3.666	179,3	172,9
SC	155,9	153,2	7.050	6.650	1.099,1	1.018,1
RS	954,4	1.066,6	6.726	6.902	6.419,3	7.361,7
Norte/Nordeste	1.242,2	1.143,9	1.741	1.929	2.163,3	2.207,0
Centro-Sul	1.725,2	1.736,8	5.305	5.701	9.152,6	9.900,9
Brasil	2.967,4	2.880,7	3.813,4	4.203,1	11.315,9	12.107,9

Fonte: CONAB - Levantamento: set/2008

Em relação às importações, 2008 têm apresentado o menor índice dos últimos anos. Entre março e julho foram adquiridos do exterior 191,7 mil t, enquanto no ano de 2007, no mesmo período, as aquisições totalizaram 400,9 mil t, indicando uma redução de 52,2%. Uruguai, Argentina e Paraguai permanecem como principais exportadores de arroz para o Brasil, com participação de 99,6% em 2008 (IRGA, 2008). A Tabela 3, mostra as importações brasileiras de 2005 a 2008, confirmando ser o Uruguai em absoluto o principal exportador de arroz para o Brasil nos últimos anos.

Tabela 3 - Importações brasileiras de arroz em toneladas (base casca), por origem, entre março e julho de 2005 a 2008

Origem	Março a julho 2005	Março a julho 2006	Março a julho 2007	Março a julho 2008
Uruguai	133.217	123.371	174.719	81.238
Argentina	111.001	116.217	171.058	78.407
Paraguai	22.421	28.094	51.331	31.235
Itália	438	500	390	477
Estados Unidos	173	142	217	166
Tailândia	136	77	13	137
França	3	3	2	10
Índia	2	-	1	9
Espanha	-	-	4	2
Chile	-	37	-	-
Holanda	741	-	-	-
Suriname	-	-	3.234	-
Total (t)	268.131	268.440	400.969	191.681
US\$ (mil)	50.877	48.672	88.919	71.790

Fonte: MDIC, 2008

Em relação às exportações em 2008, o Brasil está tendo um grande sucesso no mercado de exportadores de arroz no mundo. Isso se deve a valorização do produto, decorrente dos baixos estoques mundiais e da restrição às exportações realizadas por

países como Índia, Vietnã e Egito, o setor orizícola do sul do país ampliou as vendas ao exterior, atingindo 275,8 mil t (base casca) entre março e julho de 2008. Comparado ao período anterior, houve um incremento de 155,8% no volume comercializado (Tabela 4).

Tabela 4 - Exportações brasileiras de arroz em toneladas (base casca), por destino, entre março e julho de 2005 a 2008

Destino	Março a julho 2005	Março a julho 2006	Março a julho 2007	Março a julho 2008
Benin	-	11.003	-	83.913
Senegal	96.253	98.090	39.251	34.336
Guiné	-	-	-	26.332
Suíça	16.862	24.374	22.897	25.506
Panamá	-	-	-	14.118
Gâmbia	2.117	34.545	29.497	10.613
Chile	1.103	735	711	10.450
Trinidad e Tobago	3.448	5.136	7.465	9.842
África do Sul	1.320	24	391	9.196
Itália	-	-	-	7.999
Bélgica	-	-	-	7.126
Bolívia	223	55	222	5.979
Venezuela	-	-	-	4.414
Nigéria	-	-	-	4.057
Reino Unido	-	-	9	3.883
Demais países	6.843	39.599	7.367	18.071
Total (t)	128.169	213.561	107.809	275.825
Total (mil US\$)	17.814	30.687	17.955	102.314

Fonte: MDIC, 2008

Além de Benin e Senegal, outros países africanos iniciaram a aquisição de arroz do Brasil, com destaque para Guiné, Gâmbia, África do Sul e Nigéria. Os dois últimos merecem especial atenção, pois a África do Sul normalmente adquire produtos de

melhor qualidade, remunerando mais do que os demais países do continente; e a Nigéria, que disputa com Filipinas o posto de maior importador de arroz do mundo, superando dois milhões de toneladas. Outros destinos importantes foram o Panamá, Chile, Bolívia e Venezuela, nas Américas e Itália, Bélgica e Reino Unido na Europa (IRGA, 2008).

2.2 Pesticidas

2.2.1 Histórico

Há mais de 2 mil anos os agricultores utilizavam substâncias para prevenir os danos causados por pragas. A qualidade da produção agrícola sempre foi e ainda é intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas. Desta forma, torna-se necessária a utilização de agrotóxicos ou pesticidas de diversas classes químicas.

Um dos primeiros recursos utilizados foi o enxofre. No século XV, outras substâncias tóxicas, como arsênio, mercúrio e chumbo, foram incorporadas no combate às pragas. Já no século XVII, o sulfato de nicotina, extraído das folhas de tabaco, também passou a ser adotado como arma contra insetos (JONATAN, 1989; ANVISA, 2006).

No Brasil, o uso de pesticidas industrializados já tem mais de meio século. Uma das primeiras substâncias utilizadas nas lavouras brasileiras foi o DDT (2,2 bis[p-clorofenil]-1,1,1-tricloroetano), considerado um dos primeiros pesticidas modernos. A substância foi sintetizada em 1874, porém, somente no início da segunda guerra mundial é que começou a ser utilizada no combate de pragas, especialmente do mosquito transmissor da malária. O DDT, bem como alguns outros pesticidas organoclorados foram banidos no Brasil tendo em vista os efeitos nocivos detectados após a introdução do seu uso (ANVISA, 2006).

2.2.2 Definição

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, define pesticidas e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Pela definição do *Codex Alimentarius* os pesticidas incluem os inseticidas, fungicidas, herbicidas, desinfetantes ou toda e qualquer outra substância que tenha como objetivo prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal e que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas (FAO, 2005).

Vale salientar uma diferença importante entre as duas definições, já que aquela efetuada pelo *Codex Alimentarius* contempla substâncias que possam vir a serem utilizadas não apenas diretamente durante o plantio, mas em todas as etapas do cultivo propriamente dito e também após a colheita, como nas etapas de armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento (TOMLIN, 2004).

O termo “agrotóxico” ao invés de “defensivo agrícola” passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana. São ainda genericamente denominados praguicidas ou pesticidas (OPAS/OMS, 2008).

2.2.3 Toxicidade

Em lavoura de arroz irrigado, é utilizada uma grande quantidade de pesticidas que, dependendo da sua persistência no ambiente e toxicidade, podem contaminar corpos d'água e afetar organismos vivos.

Atualmente, os pesticidas autorizados para uso na lavoura arrozeira são bastante diversificados, muitos deles com níveis de toxicidade muito baixos e com degradação rápida no ambiente. Todavia, existem também aqueles produtos que oferecem altos riscos ambientais e que se encontram disponíveis no mercado, apesar de ser necessário um processo oficial de liberação/comercialização (REIMCHE *et al.*, 2008).

Por determinação legal, tais produtos devem apresentar, nos rótulos, uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica: Classe I Extremamente tóxicos - faixa vermelha, Classe II Altamente tóxicos - faixa amarela, Classe III Medianamente tóxicos - faixa azul, Classe IV Pouco tóxicos - faixa verde, Figura 4. Esta classificação também está relacionada à ação e ao grupo químico ao qual pertencem.

Classe I	Rótulo Vermelho – Extremamente tóxico	*DL₅₀ = 0-50 mg kg⁻¹
Classe II	Rótulo Amarelo – Altamente tóxico	*DL₅₀ = 50-500 mg kg⁻¹
Classe III	Rótulo Azul – Medianamente tóxico	*DL₅₀ = 500-5000 mg kg⁻¹
Classe IV	Rótulo Verde – Pouco tóxico	*DL₅₀ > 5000 mg kg⁻¹

*DL₅₀ - quantidade de uma determinada substância que é necessário ingerir ou administrar para provocar a morte a pelo menos 50% da população em estudo

Figura 4 - Classificação toxicológica dos pesticidas (CIT, 2007; LARINI, 1999)

O risco potencial que os pesticidas oferecem ao homem através da alimentação, devido a uma exposição crônica diária, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMR) que é a concentração máxima de pesticidas legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg⁻¹) (ANVISA, 2006).

Estes LMR's foram estabelecidos para diferentes produtos agrícolas e pesticidas, sendo freqüentemente revisados. Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de pesticidas, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental (STEPAN *et al.*, 2005).

2.2.4 Pesticidas selecionados neste estudo

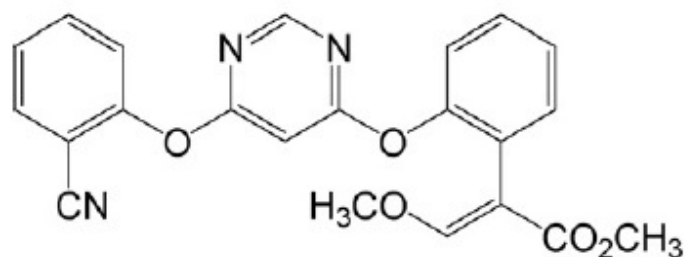
Dentre os principais pesticidas empregados em larga escala na orizicultura brasileira, optou-se por desenvolver um método para determinar resíduos de azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina.

A escolha destes compostos foi devido ao uso relativamente recente, porém intenso, de formulações técnicas de agroquímicos que os contém nas lavouras arrozeiras no Brasil. O estudo de fungicidas e inseticidas nas lavouras arrozeiras são de grande importância, pois o uso destes se amplia a cada ano, na medida em que se observa elevação da ocorrência de doenças.

As propriedades físico-químicas dos compostos abaixo apresentadas foram obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003), e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006).

2.2.4.1 Azoxistrobina

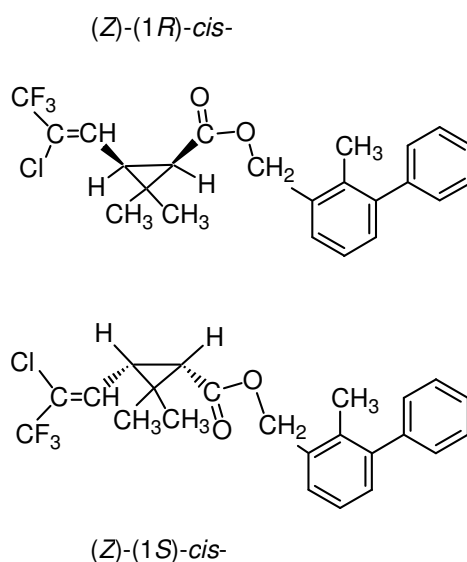
- ◆ Fórmula estrutural:



- ◆ Grupo químico: Estrobilurina
- ◆ Classe: Fungicida
- ◆ Classificação toxicológica: Classe III, medianamente tóxico
- ◆ Nome químico: metil (E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi) pirimidi-4-iloxi] fenil}-3-metoxiacrilato
- ◆ Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 131860-33-8
- ◆ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg kg⁻¹ de peso corporal
- ◆ Massa molar: 403,4 g mol⁻¹
- ◆ Ponto de ebulição: 116 °C
- ◆ Pressão de vapor: 1,1 x 10⁻⁷ mPa (20 °C)
- ◆ K_{ow}: log P = 2,5 (20 °C)
- ◆ Modo de ação: fungicida com propriedades preventivas, curativas, erradicativas, translaminares e sistêmicas. Inibe a germinação e o crescimento micelial dos esporos, e também mostra atividade antiesporulante
- ◆ Solubilidade em água: 6 mg L⁻¹ (20 °C)
- ◆ Dose letal: DL₅₀ > 5000 mg kg⁻¹ (oral em ratos e camundongos); DL₅₀ > 2000 mg kg⁻¹ (pele e olhos de ratos); CL₅₀ (4h de inalação, apenas pelo nariz) em ratos fêmeas = 0,60 mg L⁻¹ e em ratos machos = 0,96 mg L⁻¹

2.2.4.2 Bifentrina

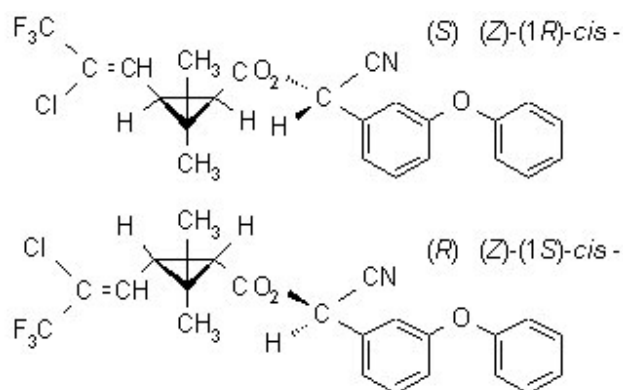
- ◆ Fórmula estrutural:



- ◆ Grupo químico: Piretróide
- ◆ Classe: Inseticida, formicida e acaricida
- ◆ Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico
- ◆ Nome químico: 2-metilbifenil-3-ilmetil(Z)-(1RS,3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato
- ◆ Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 82657-04-03
- ◆ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg kg⁻¹ de peso corporal
- ◆ Massa molar: 422,9 g mol⁻¹
- ◆ Ponto de ebulição: 68 – 70,6 °C
- ◆ Pressão de vapor: 0,024 mPa (25 °C)
- ◆ K_{ow}: log P > 6
- ◆ Modo de ação: inseticida de contato e com ação no estômago
- ◆ Solubilidade em água: < 1 µg L⁻¹
- ◆ Dose letal: DL₅₀= 54,5 mg kg⁻¹ (oral em ratos); não teratogênico em ratos ≤ 2 mg kg⁻¹ diariamente

2.2.4.3 Lambda-cialotrina

◆ Fórmula estrutural:

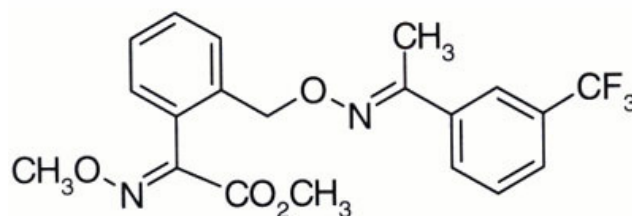


- ◆ Grupo químico: Piretróide
- ◆ Classe: Inseticida
- ◆ Classificação toxicológica: Classe III, medianamente tóxico
- ◆ Nome químico: (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil(Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato e (R)- α -ciano-3-fenoxibenzil(Z)-(1S,3S)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato, em iguais concentrações
- ◆ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 91465-08-6
- ◆ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,05 mg kg⁻¹ de peso corporal
- ◆ Massa molar: 449,9 g mol⁻¹
- ◆ Ponto de ebulição: 49,2 °C
- ◆ Pressão de vapor: 2,0 x 10⁻⁴ mPa (20 °C), 2,0 x 10⁻¹ mPa (60 °C)
- ◆ K_{ow}: log P = 7 (20 °C)
- ◆ Modo de ação: inseticida não sistêmico, de contato e com ação no estômago. Possui propriedades repelentes
- ◆ Solubilidade em água: 0,005 mg L⁻¹ (20 °C)

- ◆ Dose letal: $DL_{50} = 79 \text{ mg kg}^{-1}$ para ratos machos e $DL_{50} = 56 \text{ mg kg}^{-1}$ para ratos fêmeas (oral); $DL_{50} = 632\text{-}696 \text{ mg kg}^{-1}$ (pele e olhos de ratos); CL_{50} (4h de inalação) em ratos = $0,06 \text{ mg L}^{-1}$

2.2.4.4 Trifloxistrobina

- ◆ Fórmula estrutural:



- ◆ Grupo químico: Estrobilurina
- ◆ Classe: Fungicida
- ◆ Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico
- ◆ Nome químico: éter metílico do ácido (E,E)- metoxiimino- {2-{1-(3-trifluorometil-fenil)-etilideno-amino-oximetil}-fenil}-acético
- ◆ Número no Chemical Abstracts Service (CAS): 141517-21-7
- ◆ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal
- ◆ Massa molar: $408,4 \text{ g mol}^{-1}$
- ◆ Ponto de ebulição: $72,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- ◆ Pressão de vapor: $3,4 \times 10^{-3} \text{ mPa}$ ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- ◆ K_{ow} : $\log P = 4,5$ ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- ◆ Modo de ação: fungicida de largo espectro, mesostêmico, possui atividade preventiva e curativa ou erradicante; redistribuído por circulação de vapor superficial e também possui atividade translaminar

- ◆ Solubilidade em água: $610 \mu\text{g L}^{-1}$ (25 °C)
- ◆ Dose letal: $\text{DL}_{50} > 5000 \text{ mg kg}^{-1}$ (oral em ratos); $\text{DL}_{50} > 2000 \text{ mg kg}^{-1}$ (pele e olhos de ratos); $\text{CL}_{50} > 4646 \text{ mg m}^{-3}$ em ratos (inalação)

2.2.5 Aspectos gerais dos inseticidas e fungicidas

O grande desafio de especialistas têm sido evitar perdas na agricultura para garantir alimentos em quantidade e qualidade adequados para uma população em plena expansão. Este fato contribui para a classificação do Brasil como o 2º maior consumidor de pesticidas no mundo e o primeiro no âmbito da América Latina, muito provavelmente devido a extensão da área cultivada e/ou da grande produção (BRASIL, 2003). Muitos pesticidas tiveram seu uso proibido devido a sua alta toxicidade e/ou persistência no ambiente.

Os pesticidas do grupo dos piretróides, são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (NASUTI, 2003; SPENCER, 2001). As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos devido a sua ação sob uma vasta variedade de insetos e à baixa toxicidade em mamíferos, quando em circunstâncias de uso adequado. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia no controle de pragas da agricultura e de outros insetos (CHEN & WANG, 1996). O uso dos piretróides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 1970 após mudança estrutural introduzida nas piretrinas, para modificar a estrutura química com o intuito de se obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida. Assim, a inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e átomos de halogênios às piretrinas solucionou os problemas de estabilidade relacionados às substâncias naturais, enquanto manteve relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos (SODERLUND *et al.*, 2002).

Em virtude das vantagens de seu uso, os piretróides tornaram-se um sucesso e tiveram seu uso aumentado e ampliado para outros fins como por exemplo, uso doméstico (aerossóis), também são aplicados para impregnação de tecidos,

mosquiteiros e criadouros. Isto porque os piretróides, além de inseticidas, apresentam propriedade de repelência. Dessa maneira, levando, conseqüentemente, à exposição de organismos não alvos aos seus efeitos tóxicos (VALENTINE, 1990). No meio ambiente, os piretróides, assim como outros pesticidas, podem ser utilizados como modelo para o estudo da ecotoxicologia, pois contaminam o ar, a terra e a água provocando efeitos adversos que atingem desde uma bactéria até o homem (GRISOLIA, 2005).

Os pesticidas do grupo das estrobilurinas são uma nova classe dos fungicidas incluídos dentro do grupo dos Inibidores da quinona (QoI). Eles possuem um novo modo de ação e são muito seguros do ponto de vista ambiental. Este grupo inclui compostos sintéticos como azoxistrobina, metominostrobin, cresoxime-metil, trifloxistrobina e, mais recentemente, picoxistrobina, dimoxistrobina e piraclostrobina, que atuam em um modo similar natural para o estrobilurina A, produzido pelo fungo *Strobilurus tenacellus* (BARTLETT *et al.*, 2002).

A eficácia do grupo das estrobilurinas se dá através da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c₁ (complexo III), interferindo na formação de adenosina trifosfato (ATP) (VENÂNCIO *et al.*, 1999). Estas apresentam, ainda, ação preventiva, curativa e erradicante e antiesporulante, sendo algumas delas, como a azoxistrobina que é inibidora da germinação de esporos e dos estágios iniciais de desenvolvimento dos fungos, o que proporciona a eliminação e/ou destruição eficiente dos fungos.

Possivelmente, nenhum fungicida em escala comercial apresente este espectro de ação com altos níveis de atividade intrínseca em baixas doses (SOUZA & DUTRA, 2003). No entanto, estes pesticidas podem deixar resíduos, que devem ser controlados por razões de segurança alimentar.

2.3 Determinação de pesticidas empregando métodos cromatográficos

A utilização dos pesticidas em escala mundial possibilita sua detecção em vários compartimentos ambientais. Como conseqüência, muitos deles podem ser encontrados

em baixas concentrações necessitando que métodos analíticos, com alta sensibilidade e confiabilidade, sejam desenvolvidos para aplicação nas mais diversas matrizes (PEIXOTO, 2007).

Os métodos analíticos empregados devem ser capazes de medir resíduos a níveis muito baixos e devem fornecer provas inequívocas tanto para confirmar a identidade, como a concentração do pesticida detectado. Técnicas cromatográficas, principalmente Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) têm sido usualmente aplicadas para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Estas técnicas baseiam-se na distribuição diferencial das substâncias entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa ou líquida). Estas técnicas são muito importantes na análise de compostos presentes em uma amostra em função de sua capacidade de efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies. Podem ser empregados detectores seletivos como espectrômetro de massas (EM), por captura de elétrons (ECD), ionização em chama (FID), ultravioleta-visível (UV) entre outros (COLLINS *et al.*, 2006).

2.3.1 Métodos de extração de pesticidas

A separação de resíduos de pesticidas da matriz envolve etapas subseqüentes de preparo de amostras para determinação analítica e é um problema para o qual muito esforço tem sido aplicado na área do desenvolvimento de métodos. Os métodos analíticos usados para o monitoramento de resíduos de pesticidas requerem a extração e isolamento dos pesticidas da matriz de estudo e uma determinação final com métodos cromatográficos (TEKEL & HATRIK, 1996).

No caso de matrizes complexas, tal como os vegetais, a presença de interferentes pode encobrir o sinal analítico dos compostos em estudo e, portanto, o tratamento prévio das amostras é necessário, utilizando etapas de *clean-up* para reduzir o limite de detecção do método e evitar resultados inexatos e imprecisos das determinações cromatográficas (VIDAL *et al.*, 2002). As etapas de preparo de amostra

são determinadas de acordo com as propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade em solventes) dos compostos que serão analisados e as características da matriz da amostra (TEKEL & HATRÍK, 1996).

Embora muitas das técnicas instrumentais cromatográficas tenham evoluído e de a automação ser atualmente bastante utilizada, o preparo da amostra é ainda considerado lento, laborioso e eventualmente um entrave no processo laboratorial (MAJORS, 2001).

Um pré-tratamento eficiente das amostras é a chave para o sucesso das análises. Muitos métodos de preparo de amostras tem sido usados por décadas sem nenhuma modificação essencial ao longo dos anos. Sabendo-se que essa etapa é responsável por mais de 80% do tempo de consumo das análises e que o sucesso das mesmas é determinado pela qualidade no preparo das amostras, principalmente de matrizes complexas, a melhoria neste procedimento é considerada urgente (HYÖTYLÄINEN, 2007).

Métodos clássicos para a determinação de pesticidas em alimentos são usualmente procedimentos que exigem muitos passos, normalmente, baseados na extração exaustiva da matriz, com etapas posteriores de *clean-up* para a remoção dos materiais co-extraídos, antes da análise instrumental. Essas técnicas exigem uma grande quantidade de amostra, sorventes e solventes orgânicos de alta qualidade, além de muita manipulação dos extratos. Estes métodos são caros, em termos de tempo e de consumo de material, para responder com qualidade aos desafios modernos da análise de alimentos. O desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes, visando baixo custo e menos contaminação ambiental são, portanto, uma exigência necessária (KRISTENSON *et al.*, 2006).

As novas tendências em preparo de amostras são o desenvolvimento de métodos os quais aumentem a precisão, a reprodutibilidade e a relação custo-benefício (HYÖTYLÄINEN, 2007).

A determinação de resíduos de pesticidas em produtos agrícolas e amostras de interesse ambiental é importante devido ao risco que estes compostos oferecem a saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência a bioacumulação. Algumas etapas básicas, fazem parte da seqüência da análise de

resíduos de pesticidas, entre elas podemos citar, extração com solventes orgânicos, extração líquido-líquido (LLE), etapas de *clean-up* e pré-concentração, e finalmente a separação cromatográfica seguida da determinação dos analitos (PICÓ *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, novos procedimentos analíticos para a determinação de pesticidas tem sido usados. As novas técnicas têm vantagens sobre os métodos convencionais no que diz respeito a consumo de solvente, tempo de análise, quantidade de amostra e facilidades de automação.

As técnicas de preparo de amostras mais difundidas atualmente são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva com barra magnética (SBSE), entre outras.

Sendo assim, procurando se adequar às necessidades que o mercado de análise de resíduos de pesticidas exige, ANASTASSIADES *et al.*, (2003) desenvolveram um método para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS (do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Este método utiliza acetonitrila para extração e partição líquido-líquido dos pesticidas, obtida pela adição de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). Após a etapa de centrifugação, 1 mL de extrato, é transferido para tubo contendo o adsorvente PSA (amina primária secundária) e $MgSO_4$, depois de agitado e centrifugado o extrato está em condições de ser analisado por GC. Porém, a degradação de certos pesticidas, como por exemplo, folpete, captana, diclofluanida e clorotalonil, pode ocorrer durante a etapa de extração devido ao meio básico. A fim de minimizar este problema, uma etapa de tamponamento do extrato foi adicionada, proporcionando uma melhoria nos resultados obtidos para aqueles pesticidas difíceis de serem analisados (SCHENCK *et al.*, 2002). O método QuEChERS com etapa de tamponamento envolve a extração com acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v) e simultaneamente partição líquido-líquido promovida pela adição de acetato de sódio (NaAc) e $MgSO_4$, o qual é conhecido como método QuEChERS modificado (LEHOTAY *et al.*, 2005; CEN, 2006).

Desde sua introdução, o método QuEChERS tem sido muito bem aceito por analistas de resíduos de pesticidas. Algumas modificações no método QuEChERS

original foram necessárias para assegurar a eficiência da extração de compostos dependentes de pH (ácidos fenoxialcanóicos, por exemplo), para minimizar a degradação de compostos sensíveis (por exemplo, pesticidas base e ácido labéis) e de ampliar o espectro de matrizes que podem ser submetidos ao mesmo (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A introdução de tampões com sais de citrato, foi usada na primeira etapa de extração/partição para ajustar o pH para uma faixa de 5 a 5,5, onde os pesticidas ácido e base labéis são suficientemente estabilizados. Além disso, para melhorar a estabilidade dos compostos básicos nos extratos da amostra, uma pequena quantidade de ácido fórmico é adicionado no final da etapa de *clean-up* utilizando PSA, enquanto que os pesticidas com caráter ácido são diretamente analisados a partir do extrato antes da etapa de *clean-up* com PSA (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2005).

Quando se trabalha com matrizes que possuem altos teores de clorofila, o procedimento de *clean-up* é melhorado pela adição de GCB (carbono grafitizado) ao PSA (LEE *et al.*, 2008).

Amostras que apresentam matrizes secas, tais como cereais, frutos secos ou chás, exigem a adição de água antes da extração a fim de enfraquecer as interações dos pesticidas com a matriz, e para assegurar uma partição adequada. Mesmo amostras com uma elevada carga lipídica, tais como abacate ou óleos vegetais podem ser empregados. No entanto, pesticidas não-polares apresentam baixas recuperações (<70%). Assim, os co-extraídos dos extratos lipídicos podem ser removidos, em um grau elevado, por um passo de congelamento ou *clean-up* com C₁₈ (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2005).

A principal desvantagem do método QuEChERS é que a relação amostra:extrato final, de 1 g mL⁻¹, é mais baixa do que 2-5 g mL⁻¹ obtida pela maioria dos métodos tradicionais de extração (LEHOTAY *et al.*, 2005). Portanto, se a matriz não for uma fonte limitante de ruído nas análises, isto pode conduzir a uma redução da sensibilidade analítica.

2.4 Efeito Matriz

O fenômeno do efeito matriz foi citado primeiramente por ERNEY *et al.* (1993).

Efeito matriz é fenômeno que consiste no aumento ou decréscimo da resposta do detector, para um determinado composto presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o mesmo composto diluído em solvente orgânico, e analisado em condições idênticas.

Este efeito ocorre durante a etapa de injeção, quando pesticidas são injetados na ausência da matriz; podendo resultar picos cromatográficos com menor resposta devido aos analitos serem suscetíveis a degradação e/ou absorção no sistema de injeção do cromatógrafo, no entanto, a intensidade e forma dos picos dos compostos pode ser melhorada quando forem injetados na presença de uma matriz complexa (carboidratos, proteínas e/ou lipídios). Este efeito é provavelmente o mais discutido, impactando de uma maneira geral, na quantificação e precisão de determinados analitos em cromatografia gasosa (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

O potencial da matriz em promover tal efeito deve ser avaliado no método em estudo. Este efeito é extremamente variável na ocorrência e intensidade, mas algumas técnicas em particular estão mais propensas. Se as técnicas utilizadas não são isentas do efeito matriz, a validação deve ser feita levando-se em consideração a matriz, e esta deve ser, de preferência, da mesma natureza que a amostra (SANCO, 2007).

O efeito matriz, devido à supressão de íons, é notoriamente variável na ocorrência e intensidade. Em geral, este efeito matriz é compensado quando utilizado para a confecção das curvas analíticas, soluções padrões preparadas na matriz da amostra (MARTÍNEZ VIDAL *et al.*, 2005). Este método é usado para compensar o efeito matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Sua principal vantagem é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Apesar de se obter uma calibração confiável com curvas analíticas preparadas na matriz, este método é somente uma forma de compensar este efeito. No entanto ele não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de

interferentes na matriz pode diferir de uma matriz ou amostra para outra (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003).

2.5 Validação de métodos cromatográficos de análise

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir à decisões desastrosas e à prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2007).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Os instrumentos e métodos analíticos devem ser validados antes do uso de rotina, após manutenção e em intervalos de tempos regulares (LANÇAS, 2004).

A validação também é parte integrante de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, Estados Unidos e outros países, quando se pretende obter o registro de métodos usados para a quantificação de produtos. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003; SANCO, 2007; RIBANI, 2004).

É de fundamental importância, que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as

características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2007).

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los (INMETRO, 2007).

Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (SANCO, 2007; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2007).

2.5.1 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (PRIMEL, 2003). A precisão e a exatidão podem ser comprometidas sem um bom procedimento de calibração (ZANELLA *et al.*, 2003; PIMENTEL & NETO, 1996).

A curva de calibração pode ser construída preparando-se as soluções analíticas padrões dos pesticidas, em solvente ou extrato da matriz. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a concentração do analito, sem considerar a interferência da matriz.

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização

interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2007).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis, pode ser descrita pela Equação 1 da regressão linear.

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

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

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

A linearidade refere-se à capacidade do método cromatográfico de gerar resultados proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica específica. Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de determinação (r^2) do gráfico analítico (PEIXOTO, 2007).

2.5.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004). O método para determinação do LOQ deve ser considerado com a incerteza da medida de um componente dentro de um intervalo linear. Para métodos de separação, isto normalmente significa usar a área para construção da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2007).

Em análises onde são realizadas determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos, é imprescindível que medidas sejam feitas no intervalo do LOD e LOQ (RIBANI *et al.*, 2007).

2.5.3 Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). Ou ainda a precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a precisão intermediária, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão relativo - RSD% (INMETRO, 2007).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; com repetições efetuadas em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos, entre outros (INMETRO, 2007).

A repetitividade e a precisão intermediária são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida.

Em cromatografia, a precisão pode ser determinada por meio da injeção de padrões analíticos certificados das substâncias em estudo.

2.5.4 Exatidão (Recuperação)

A exatidão de um método analítico expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004) ou ainda expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007). Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Mas como na análise de compostos orgânicos, normalmente estes materiais certificados são pouco disponíveis, a exatidão é avaliada por ensaios de recuperação.

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1996) e a Resolução nº 899 do Brasil (2003) estabelecem que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser realizado. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2007).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos, geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999), inclusive para análise de resíduos de pesticidas (HUBER, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento deste trabalho está descrita a seguir:

- ⇒ Sistema GC-ECD: Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, Estados Unidos) equipado com:
 - Amostrador automático CP 8410 (Varian, Holanda);
 - Injetor modelo 1079 com Controle Pneumático Eletrônico (EPC);
 - Coluna capilar DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento; 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme (J & W Scientific, Reino Unido);
 - Detector por Captura de Elétrons, isótopo ⁶³Ni (Varian, Estados Unidos);
 - Sistema de aquisição de dados através do *software Star Workstation* 6.0 (Varian, Estados Unidos);
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q - resistividade 18,2 mΩ cm, Millipore (Molsheim, França);
- ⇒ Balança analítica com precisão de 4 casas decimais HR-120 (A & D Company, Japão);
- ⇒ Agitador Vortex – Biomixer Modelo QL 901 (Microtécnica, Brasil);
- ⇒ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ⇒ Centrífuga de Bancada Microprocessada NT 810 (Nova Técnica, Brasil);
- ⇒ Centrífuga 12 x 15 mL (Centribio, Brasil);
- ⇒ Processador de alimentos (Braun, Alemanha).

3.2 Gases Utilizados

- ⇒ Gás de arraste: Hélio 99,999% de pureza (White Martins e Air Products, Brasil);
- ⇒ Gás *make up* do detector ECD: Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil).

3.3 Materiais

- ⇒ Tubos de polipropileno com tampas rosqueadas, capacidades de 50 e 15 mL (BD Labware, França);
- ⇒ Vidraria comum de laboratório analítico;
- ⇒ Detergente neutro e alcalino - Extran® (Merck, Brasil).

3.4 Solventes e Reagentes

- ⇒ Tolueno, grau pesticida (Mallinckrodt, Estados Unidos);
- ⇒ Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, Estados Unidos);
- ⇒ Ácido acético p.a. (Merck, Alemanha);
- ⇒ Acetato de sódio anidro p.a. (CAQ, Brasil);
- ⇒ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ⇒ Carvão vegetal ativado p.a. (Labsynth, Brasil);
- ⇒ Florisil 60-100 mesh (Mallinckrodt, Estados Unidos);
- ⇒ C₁₈ com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, Estados Unidos);
- ⇒ PSA com tamanho de partículas de 40 µm - Bondesil (Varian, Estados Unidos);
- ⇒ Sílica (Merck, Alemanha);
- ⇒ Ciano - sílica modificada com cianopropilsilano (Analytichem International, Estados Unidos);
- ⇒ Diol - sílica modificada com diolsilano - Adsorbex® (Merck, Alemanha);
- ⇒ Padrões sólidos dos pesticidas, conforme Tabela 5.

3.5 Padrões analíticos dos pesticidas estudados

A Tabela 5 apresenta o grau de pureza e classe dos padrões analíticos dos pesticidas utilizados neste trabalho.

Tabela 5 - Padrões analíticos dos pesticidas em estudo

Pesticida	Grau de pureza (%)	Classe
Azoxistrobina	99,0	Fungicida
Bifentrina	99,5	Acaricida/Formicida/Inseticida
Bromofós-metílico (P.I.)*	98,5	Inseticida
Lambda-cialotrina	98,2	Inseticida
Trifloxistrobina	99,0	Fungicida

* P.I. - Padrão Interno

Preparou-se, individualmente, 10 mL da solução estoque 1000 mg L⁻¹ de cada pesticida em tolueno, partindo da dissolução do padrão sólido de referência considerando a sua pureza e efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido a ser pesado, sendo os mesmos armazenados em frasco âmbar e estocados a temperatura de -18 °C.

Após, foram preparadas soluções analíticas individuais de cada pesticida em estudo, na concentração de 100 mg L⁻¹, em tolueno. Em seguida, preparou-se 10 mL de uma mistura de concentração 100 mg L⁻¹ contendo todos os pesticidas a serem estudados. Para isso, transferiu-se 1000 µL de cada solução “estoque” para balão volumétrico de 10 mL já contendo um pequeno volume de tolueno, sendo posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. Esta solução também foi armazenada em frasco âmbar a temperatura de -18 °C

A partir desta solução foram preparadas soluções analíticas de concentrações 10 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ em acetonitrila, utilizadas para a construção das curvas analíticas de cada composto. Para o estudo de linearidade foram feitas diluições destas soluções nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹, tanto em solvente (acetonitrila) como no extrato da matriz (plantas de arroz). Estas soluções também

foram utilizadas para a fortificação da amostra nos ensaios de recuperação. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Seleção do Padrão Interno

A seleção de um padrão interno deve obedecer aos seguintes critérios: “Idealmente, a substância usada como padrão interno deve apresentar características físico-químicas similares às substâncias a serem 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, quando cromatografada não coeluir com os pesticidas estudados da amostra. Este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico” (KRULL & SWARTZ, 1998; CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001; LANÇAS, 2004).

Visto isso, a substância escolhida para ser usada como padrão interno não deve estar disponível no mercado, dessa maneira, não se encontrando presente nas amostras encaminhadas para análise.

3.7 Otimização das condições cromatográficas

Para a otimização das condições cromatográficas foram injetadas $1\text{ }\mu\text{L}$, individualmente, das soluções analíticas dos pesticidas selecionados para este estudo na concentração de $1,0\text{ mg L}^{-1}$, observando-se o tempo de retenção de cada composto. Após, foi preparada uma solução contendo todos os pesticidas em estudo, na concentração de $1,0\text{ mg L}^{-1}$, para verificar a separação cromatográfica dos mesmos.

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos desenvolvidos por PRESTES (2007) no *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*, Ministério da Agricultura da Holanda.

3.8 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em plantas de arroz

A partir do método QuEChERS modificado apresentado por PRESTES (2007), foram realizados testes para obter melhor extração dos compostos em estudo, das amostras de plantas de arroz.

3.8.1 Escolha das amostras para a etapa de validação

As amostras utilizadas para a etapa de validação foram obtidas de um experimento conduzido no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (Safrá 2007/2008), onde foram coletadas as plantas que não foram submetidas a nenhum tratamento com pesticidas e estavam em área isolada das outras plantas de arroz que foram submetidas a tratamento com pesticidas. Logo após a coleta, as mesmas foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas em freezer até a etapa de extração para o processo de validação.

Estas amostras, denominadas “amostras branco” não devem apresentar nenhum resíduo de qualquer pesticida em estudo ou outro interferente no tempo de retenção destes pesticidas, para assim serem utilizadas para o preparo das curvas analíticas (no extrato da matriz) e para as fortificações, na qual avalia-se o percentual de recuperação apresentado pelo método de extração.

As plantas de arroz foram trituradas com a ajuda de um processador de alimentos até tornarem-se finamente divididas.

Sendo assim, preliminarmente, as amostras foram submetidas ao processo de extração e *clean-up* e os extratos foram injetados no sistema GC-ECD para obter-se a confirmação da ausência dos pesticidas em estudo.

3.8.2 Otimização do método de extração

3.8.2.1 Ensaio nº 1

Para os testes iniciais no qual se avaliou a eficiência do método de extração, triturou-se as amostras de plantas de arroz até tornarem-se finamente divididas. Após pesou-se $5,0 \pm 0,1$ g da mesma, diretamente em tubo de polipropileno com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Logo após, adicionou-se, com pipeta volumétrica, 40 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, em cada tubo, e após fechá-los, efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 minuto.

Em seguida, acrescentou-se 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e efetuou-se a agitação manual por 20 segundos. Logo após, adicionou-se 1,7 g de acetato de sódio anidro, tomando cuidado para que estes sólidos não ficassem nas bordas superiores dos tubos que prejudicaria o contato com o líquido, e novamente foi repetida a agitação manual por 1 minuto, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos.

Logo após, os tubos foram levados para centrifugação a 3300 rpm, por 8 minutos. Sendo em seguida, submetidos à etapa de *clean-up*, a qual também foi otimizada.

3.8.2.2 Ensaio nº 2

A partir do método descrito no item anterior, realizou-se alterações em relação à quantidade de amostra e de solvente para extração, mantendo-se as quantidades de sais.

Dessa maneira, pesaram-se $3,0 \pm 0,1$ g das plantas de arroz finamente divididas, diretamente em tubos de polipropileno com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Logo após, adicionou-se, com pipeta volumétrica, 15 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, em cada tubo e, após fechá-los efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 minuto.

Em seguida, acrescentou-se 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e efetuou-se a agitação manual por 20 segundos. Logo após, adicionou-se 1,7 g de acetato de sódio anidro e novamente foi repetida a agitação manual por 1 minuto.

Na seqüência, os tubos foram levados para centrifugação a 3300 rpm, por 8 minutos e em seguida submetidos à etapa de *clean-up* que será descrita a seguir, no item 3.8.3.

Estes dois ensaios foram realizados com "amostras branco"; sem ser efetuada qualquer fortificação, apenas para verificar o aspecto do extrato da matriz, já que essas plantas apresentam uma grande quantidade de clorofila, apresentando um extrato com uma coloração verde escura que é bem problemática para a etapa de *clean-up*.

3.8.2.3 Ensaio nº 3

Na realização do ensaio 3, manteve-se todas as especificações do item anterior, apenas foi feita uma diluição de 20 vezes (500 µL de extrato em balão volumétrico de 10 mL completando seu volume com acetonitrila).

Esta diluição foi testada antes e após a etapa de *clean-up*.

3.8.3 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo

Para otimizar a etapa de *clean-up* dispersivo, foram realizados vários ensaios com diferentes adsorventes tais como: florisil, amina primária secundária (PSA), sílica, diol, ciano, C₁₈ e carvão vegetal ativado. Deste modo, foi possível avaliar o adsorvente mais eficiente e se não estão ocorrendo perdas dos analitos.

Novamente, esses ensaios foram realizados apenas para se verificar visualmente a coloração do extrato da matriz após o *clean-up*, visto a dificuldade de remover a grande quantidade de clorofila presente na amostra.

Esta avaliação foi realizada transferindo-se diretamente 4 mL do extrato líquido, resultante dos ensaios realizados nos itens 3.8.2.1 e 3.8.2.2, para um tubo de

polipropileno (capacidade de 15 mL) já contendo os adsorventes que foram testados, sendo novamente realizada uma agitação vigorosa e manual por 1 minuto e, logo após, centrifugados a 3300 rpm por 8 minutos.

Os adsorventes testados neste ensaio, bem como suas respectivas quantidades utilizadas, estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Adsorventes utilizados para otimização do *clean-up*

Ensaio de extração	Adsorvente	Quantidade
Ensaio nº 1	Florisil	500 mg
Ensaio nº 2	PSA/C ₁₈	100 mg/500 mg
Ensaio nº 3	Sílica	500 mg
Ensaio nº 4	Diol	500 mg
Ensaio nº 5	Ciano	500 mg
Ensaio nº 6	MgSO ₄ /C ₁₈	500 mg/600 mg
Ensaio nº 7	Carvão ativado/MgSO ₄	100 mg/600 mg

Após a verificação visual dos extratos, observou-se que o *clean-up* que utilizava carvão ativado e sulfato de magnésio (ensaio nº 7) como adsorventes apresentou um extrato mais limpo; possível de ser injetado no sistema GC-ECD, sem causar danos ao sistema.

3.8.3.1 Seleção da quantidade de carvão ativado para a etapa de *clean-up*

Após ser realizada a escolha do adsorvente para a etapa de *clean-up*, o próximo passo foi selecionar a quantidade de carvão ativado que apresenta um extrato efetivamente mais límpido sem acarretar perdas dos pesticidas em estudo.

Dessa maneira, a Tabela 7, apresenta as quantidades de carvão ativado que foram testados para este propósito.

Tabela 7 - Quantidade de carvão ativado utilizado para cada teste

Carvão ativado		
Teste de clean-up	Quantidade / mL extrato	Total (4 mL de extrato)
Teste A	5 mg	20 mg
Teste B	10 mg	40 mg
Teste C	15 mg	60 mg
Teste D	20 mg	80 mg
Teste E	25 mg	100 mg

3.8.3.2 Verificação da recuperação na etapa de *clean-up*

Para avaliar a recuperação na etapa de *clean-up*, foi realizada uma fortificação antes do *clean-up*. Para isso, utilizou-se 4 mL do extrato centrifugado ao qual foi adicionado 400 μL de uma solução contendo todos os pesticidas em estudo na concentração de 5 mg L^{-1} , obtendo-se a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ dos pesticidas no extrato final. Esta avaliação foi realizada utilizando-se 10, 15 e 20 mg de carvão ativado juntamente com 600 mg de MgSO_4 em 4 mL do extrato.

O Fluxograma no Apêndice A, demonstra esquematicamente todo o processo de otimização do método em estudo.

3.9 Validação do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em plantas de arroz

Após serem definidas as melhores condições de separação cromatográfica dos pesticidas estudados, o método de extração e *clean-up*, a etapa seguinte foi à validação do método analítico.

Neste trabalho, os parâmetros analíticos utilizados para a validação do método foram: curva analítica e linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho, e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.

3.9.1 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas

A linearidade das curvas analíticas foram avaliadas a partir das soluções analíticas preparadas conforme descrito no item 3.5, no extrato das plantas de arroz e no solvente acetonitrila, nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹. Cada curva analítica foi injetada 6 vezes e cada uma das repetições das curvas foi precedida pela injeção de acetonitrila, para limpeza do sistema.

Logo após, realizou-se a confecção das curvas analíticas para cada composto em estudo analisado por GC-ECD, obtendo-se os cálculos da média das áreas do pico cromatográfico, do RSD (%), da equação da curva analítica, bem como do coeficiente de determinação (r^2). As curvas analíticas foram obtidas com o auxílio do programa Microsoft Office[®] Excel 2003.

3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Neste trabalho, o LOD e o LOQ foram estabelecidos com base na razão do sinal do composto pelo ruído analítico, conforme representado na Figura 5. O Limite de detecção corresponde à concentração do analito que resulta um sinal 3 vezes o ruído da linha de base ($LOD = 3S/R$) e o Limite de Quantificação corresponde à concentração do analito que produz uma relação sinal-ruído superior a 10 ($LOQ = 10S/R$).

Para a medida do sinal foi utilizada a altura do pico cromatográfico, sendo medida a partir da média da oscilação do ruído.

O limite de detecção e quantificação instrumentais, LOD_i e LOQ_i respectivamente, são expressos em $mg L^{-1}$. Já o limite de detecção e quantificação do método, LOD_m e LOQ_m respectivamente, são obtidos multiplicando-se o valor de LOD_i e LOQ_i pelo fator obtido pelo método de extração, obtendo-se os valores de LOD_m e LOQ_m em $mg kg^{-1}$.

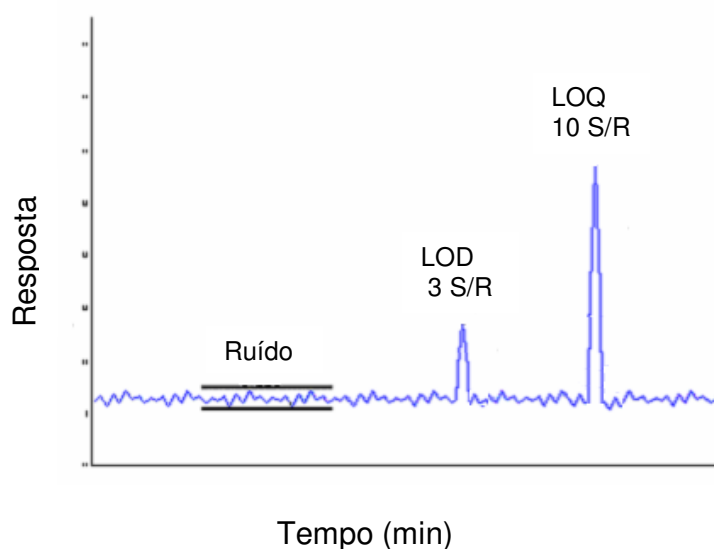


Figura 5 - Representação gráfica do estabelecimento dos valores de LOD e LOQ (Adaptado de MISTURA, 2003)

3.9.3 Ensaio de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado para avaliação da precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão

Para avaliar a exatidão do método foram empregados ensaios de fortificação, avaliando-se assim, as recuperações dos pesticidas em estudo.

Segundo LANÇAS (2004), a recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado em triplicata, para cada um dos níveis de fortificação e para isso, utilizaram-se amostras “branco”,

sendo que cada nível de fortificação foi injetado 2 vezes, obtendo-se um $n= 6$ (3 extrações x 2 injeções).

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, pesou-se $3,0 \pm 0,1$ g das plantas de arroz devidamente trituradas e homogeneizadas, diretamente em tubos de polipropileno com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Logo após, efetuou-se a fortificação em 4 níveis, utilizando-se micropipetadores automáticos, nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,25; 2,50 mg kg^{-1} . Os volumes das soluções analíticas, contendo todos os pesticidas analisados por GC-ECD, adicionadas a cada nível de fortificação, estão demonstrados no Apêndice B.

Adicionou-se, através de pipeta volumétrica, 15 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v), em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 minuto cronometrado. Em seguida, acrescentou-se 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e efetuou-se a agitação manual por 20 segundos cronometrado. Logo após, adicionou-se 1,7 g de acetato de sódio anidro, novamente foi repetida a agitação manual por 1 minuto, também cronometrados, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos.

Em seguida, os tubos foram levados para centrifugação a 3300 rpm, durante 8 minutos. Posteriormente, para a etapa de *clean-up* dispersivo transferiu-se diretamente 4 mL do extrato líquido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), já contendo 20 mg de carvão ativado e 600 mg de MgSO_4 , sendo novamente agitados vigorosa e manualmente por 1 minuto, e também centrifugados como citado anteriormente.

Após, em *vial* com capacidade para ± 2 mL, foram adicionados 1,425 mL do extrato obtido após o *clean-up* dispersivo e 75 μL de uma solução analítica do padrão interno na concentração de 10 mg L^{-1} , obtendo-se a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ do padrão interno que foram posteriormente analisados pelo sistema GC-ECD.

As Figuras 6 e 7 exemplificam as etapas efetuadas durante procedimento de extração e *clean-up*.

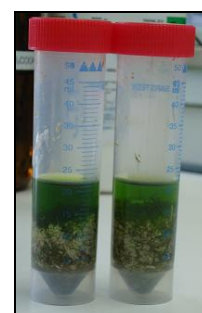
EXTRAÇÃO



1.

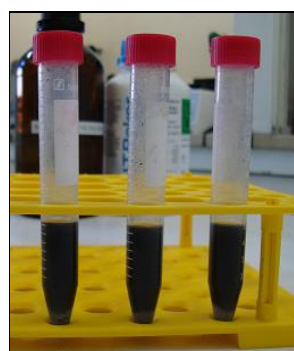


2.



3.

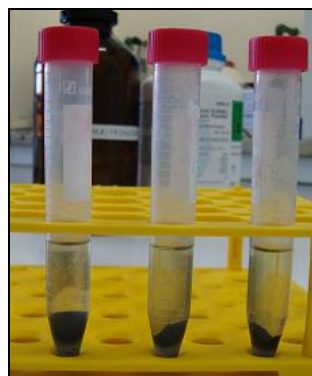
CLEAN-UP



4.



5.



6.

Figura 6 - Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e *clean-up* do método QuEChERS modificado; 1. tubos para extração com amostra de plantas de arroz e o solvente, 2. frascos contendo a amostra, o solvente e os sais para a etapa de partição, 3. extrato após centrifugação, 4. frascos para etapa de *clean-up* antes da centrifugação, 5. centrifuga e 6. extrato do *clean-up* após a centrifugação

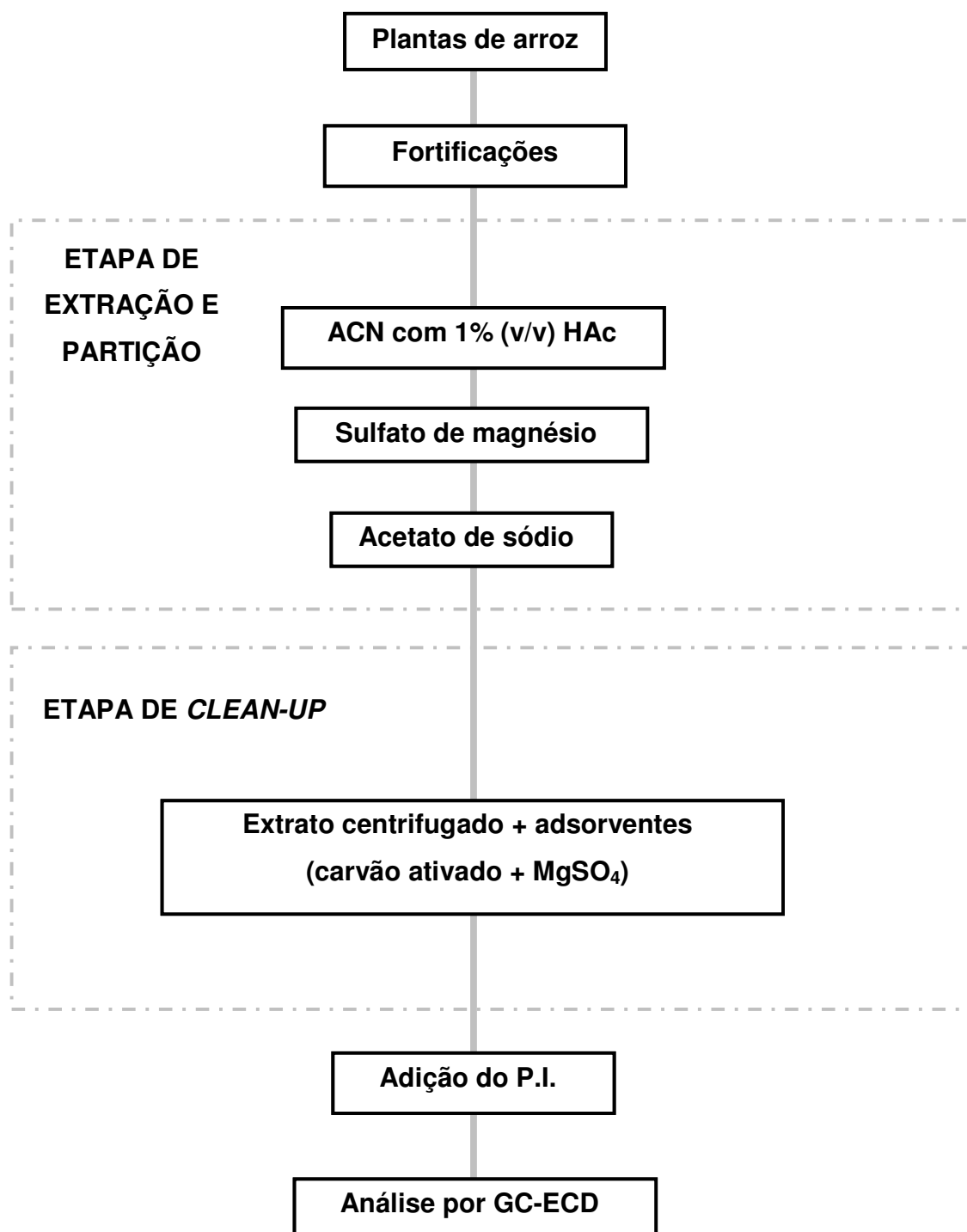


Figura 7 - Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em plantas de arroz

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1996; INMETRO, 2007).

A expressão da precisão, em métodos de análise de traços ou impurezas, é dada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), sendo aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão do instrumento foi avaliada através do RSD obtido das seis injeções da curva analítica no sistema GC-ECD.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e cada extrato injetado 2 vezes.

Para avaliar a precisão intermediária (RSD_{pi}) do método por GC-ECD, realizou-se o procedimento completo em 2 dias diferentes. Efetuou-se a fortificação, extração e análise das amostras fortificadas em quatro níveis diferentes de concentração, resultando em $n=6$ (3 extrações x 2 injeções cada) para cada nível de fortificação.

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Os volumes das soluções analíticas adicionados em cada nível de fortificação, contendo todos os pesticidas analisados por GC-ECD, estão demonstrados no Apêndice B, como já citado anteriormente.

A exatidão foi calculada pela Equação 2, é expressa em percentagem (INMETRO, 2007):

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

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = concentração teórica na amostra fortificada

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o Teste Q que é usado quando o número de medidas é igual ou inferior a 10, e rejeita valores críticos, com um nível de confiança de 90 a 96%.

3.10 Avaliação do efeito matriz nos extratos das plantas de arroz

Para a avaliação da existência de efeito matriz dos extratos de plantas de arroz nas análises por GC-ECD, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato das plantas de arroz. O cálculo foi efetuado através da Equação 3:

$$EfeitoMatriz(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (3)$$

onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada pesticida, preparadas na matriz;

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada pesticida, preparadas em solvente;

Dessa maneira, 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 acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001).

3.11 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado no estudo da concentração residual dos pesticidas azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina em plantas de arroz. O experimento de campo foi conduzido na safra de 2007/2008, na área de várzea do Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria-RS, Figura 8.



Figura 8 - Lavoura experimental de arroz irrigado localizada no Campus da UFSM, no Departamento de Fitotecnia

O experimento foi conduzido com a aplicação de 4 produtos, constituído de dois fungicidas (azoxistrobina e trifloxistrobina) e dois inseticidas (lambda-cialotrina e bifentrina), mais utilizados atualmente na cultura do arroz irrigado.

Na Tabela 8 estão descritos os pesticidas utilizados neste estudo bem como a regulamentação de cada produto na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, descrevendo a modalidade de aplicação dos produtos, LMR (limite máximo de resíduo) no grão de arroz e o intervalo de segurança para cada pesticida.

Tabela 8 - Pesticidas aplicados em experimento na lavoura de arroz irrigado , realizado na safra 2007/2008

Pesticidas aplicados	Modalidade de Aplicação	LMR no grão de arroz (mg kg ⁻¹)	Intervalo de Segurança (dias)
Trifloxistrobina	Foliar	0,2	15
Azoxistrobina	Foliar	0,1	30
Lambda-Cialotrina	Foliar	0,05	30
Bifentrina	Produtos armazenados*	0,6	30

*Os agrotóxicos empregados no trabalho foram aplicados na parte aérea das plantas, mesmo que o seu registro na ANVISA não estivesse regulamentado para este tipo de aplicação.
 FONTE: AGROFIT, 2008

Os fungicidas e inseticidas foram aplicados no estágio R0 (início da diferenciação da panícula) de desenvolvimento da cultura (segundo escala de COUNCE *et al.*, 2000). A aplicação dos produtos foi efetuada com um pulverizador costal pressurizado a CO₂ com pontas leque 11002, aplicado à vazão recomendada para cada produto; segundo as recomendações do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA, 2008).

Em cada parcela isolada, foi feita a aplicação dos pesticidas nas plantas de arroz na dose recomendada (Tabela 9), para assim poder-se avaliar o efeito e a concentração residual de cada um, sem qualquer interação entre eles. Portanto, para melhor entendimento, cada tratamento das plantas de arroz com a aplicação dos pesticidas em estudo recebeu uma identificação conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Dose aplicada, identificação e produto formulado dos pesticidas das amostras de plantas de arroz

Amostras de plantas de arroz			
Pesticida	Dose aplicada (g ha ⁻¹)	Identificação	Produto formulado (Marca Comercial)
Azoxistrobina	100	T1	Priori Extra [®]
Bifentrina	15	T2	Talstar [®]
Lambda-cialotrina	10	T3	Karate Zeon [®] 50 CS
Trifloxistrobina	94	T4	Stratego [®] 205EC

A semeadura do arroz foi realizada no dia 09 de novembro de 2007 em parcelas isoladas com taipas e irrigação individualizada em cada parcela para não haver contaminação entre os produtos.

A cultivar utilizada foi IRGA 417, na densidade de 100 kg ha⁻¹. Cada parcela possuía 11 linhas espaçadas em 0,17 m, com 7 m de comprimento. A adubação de base foi efetuada conforme indicado pela análise de solo e recomendado pela Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (SOSBAI, 2007). O nitrogênio aplicado foi na forma de uréia e dividido em três épocas, a primeira (15 kg ha⁻¹) por ocasião da semeadura, a segunda aplicação (70 kg ha⁻¹) no início do perfilhamento e a terceira (30 kg ha⁻¹) na diferenciação do primórdio floral. O controle das plantas invasoras foi realizado com aplicação do herbicida bispiribaque-sódico na dose de 125 mL de ingrediente ativo por ha⁻¹ do produto comercial Nominee[®], quando as plantas daninhas apresentaram de 2 a 3 folhas.

A irrigação definitiva foi efetuada um dia após a aplicação do herbicida para o controle de plantas daninhas, permanecendo com lâmina d'água de aproximadamente 0,05 m de altura. Conforme o desenvolvimento da cultura, a mesma foi aumentada e estabilizada quando alcançou 0,10 m de altura, permanecendo constante durante todo o ciclo da cultura.

Para cada parcela individual, foi feita a análise de resíduos dos pesticidas; para isso, foram coletadas três plantas de arroz na mesma linha de semeadura de cada

parcela, com as amostragens feitas no 1º, 3º, 5º, 7º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º, 35º e 40º dias após a aplicação dos pesticidas.

As plantas de arroz foram coletadas e acondicionadas separadamente em papel alumínio e armazenadas a temperatura de -5 °C, logo após foram recebidas no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da UFSM, para posterior realização das análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos desenvolvidos por PRESTES (2007) para determinação de resíduos de pesticidas em grão de arroz.

4.1 Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos pesticidas em estudo por GC-ECD

Para a otimização das condições cromatográficas utilizadas na separação dos pesticidas selecionados, foram preparadas soluções analíticas contendo uma mistura dos princípios ativos dos pesticidas em estudo, observando dessa maneira o tempo de retenção e o perfil de separação destes pesticidas.

As condições cromatográficas utilizadas para o sistema GC-ECD neste experimento, para análise validada dos 4 compostos em plantas de arroz foram:

- Programação de temperatura do injetor por vaporização com temperatura programada (PTV): temperatura inicial de 80 °C (0,1 min), com incremento de temperatura de 200 °C min⁻¹ até 300 °C (7,2 min), após diminuição da temperatura até 80 °C, permanecendo até o final da corrida cromatográfica;
- Injeção *splitless* com programação da válvula do injetor PTV: inicialmente válvula do *split* aberta na razão de 1/20, após 0,01 min válvula do *split* fechada, e após 2,0 min válvula do *split* aberta na razão 1/20;
- Volume de injeção: 1 µL;
- Programação da temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 80 °C (1,0 min), com incremento de temperatura de 25 °C min⁻¹ até 215 °C,

e posteriormente de 5 °C min⁻¹ até 300 °C, totalizando em 30 min de corrida cromatográfica;

- Gás de arraste: Hélio na vazão inicial de 1,3 mL min⁻¹;
- Programação da pressão do gás de arraste: pressão inicial de 16,4 psi mantida por 1,0 min, após incremento de pressão de 0,20 psi min⁻¹ até 21 psi;
- Vazão do gás *make-up*: Nitrogênio ultra-puro na vazão de 28 mL min⁻¹;
- Coluna capilar: apolar DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme;
- Temperatura do detector: 300 °C.

A Figura 9 apresenta o cromatograma obtido para uma solução analítica no extrato da matriz contendo azoxistrobina, bifentrina, bromofós-metílico (P.I.), lambda-cialotrina e trifloxistrobina empregando-se as condições cromatográficas selecionadas. A Tabela 10 demonstra o tempo de retenção de cada composto e sua fórmula molecular.

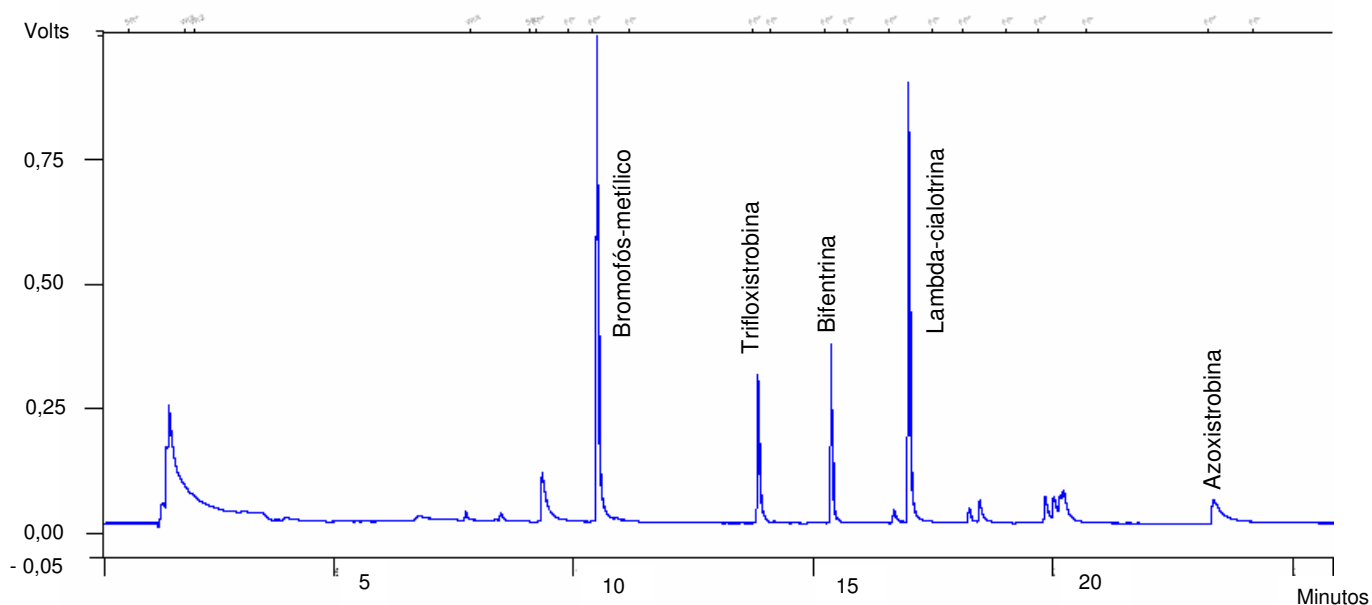


Figura 9 - Cromatograma obtido para uma solução analítica no extrato da matriz contendo bromofós-metílico (P.I.), trifloxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e azoxistrobina na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtidos nas condições descritas no item 4.1

Tabela 10 - Pesticidas analisados com seus respectivos t_R e fórmula molecular

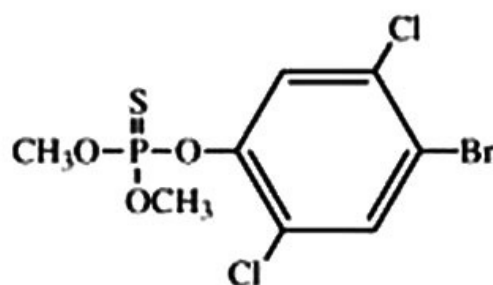
Pesticidas	Tempo de retenção (t_R) em min	Fórmula molecular
Azoxistrobina	23,5	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$
Bifentrina	15,5	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{O}_2$
Bromofós-metílico (P.I.)	10,7	$\text{C}_8\text{H}_8\text{BrCl}_2\text{O}_3\text{PS}$
Lambda-cialotrina	17,1	$\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{NO}_3$
Trifloxistrobina	13,9	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$

4.2 Seleção do padrão interno

O pesticida selecionado como padrão interno foi o bromofós-metílico em função de ter o padrão disponível e ser adequado para este procedimento, conforme critérios já descritos no item 3.6.

4.2.1 Bromofós-metílico

- ◆ Fórmula estrutural:



- ◆ Grupo químico: Organofosforado
- ◆ Classe: Inseticida
- ◆ Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico
- ◆ Nome químico: *O*-4-bromo-2,5-diclorofenil *O,O*-dimetil fosforotioato
- ◆ Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 2104-96-3
- ◆ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,04 mg kg⁻¹
- ◆ Massa molar: 366,0 g mol⁻¹
- ◆ Ponto de ebulição: 53 – 54 °C
- ◆ Pressão de vapor: 17 mPa (20 °C)
- ◆ Modo de ação: inseticida não sistêmico, de contato e com ação no estômago
- ◆ Solubilidade em água: 0,7 mg L⁻¹ (20 °C) e 40 mg L⁻¹ (25 °C)

4.3 Otimização da etapa de extração com acetonitrila

Segundo descrito no item 3.8.2, nos ensaios 1, 2 e 3 foi observado apenas o aspecto visual do extrato da matriz após a extração, visto que o extrato dessas plantas apresenta uma coloração verde causada pela presença de clorofila, de difícil remoção.

Dessa maneira, o procedimento de extração escolhido foi o ensaio 2, pois demonstrou um extrato mais límpido, sendo possível, posteriormente obter-se um *clean-up* mais efetivo deste extrato.

O ensaio 3 (item 3.8.2.3) no qual empregou-se uma diluição de 20 vezes do extrato da matriz, não foi satisfatório, pois acarretou perda de sensibilidade no sistema GC-ECD, tanto na diluição antes e após o *clean-up*, aumentando os níveis de LOD e LOQ.

4.4 Otimização da etapa de *clean-up*

Na etapa de *clean-up*, o ensaio escolhido foi o ensaio nº 7 (item 3.8.3) que utiliza como adsorventes carvão ativado adicionado de sulfato de magnésio (100 mg e 600 mg, respectivamente). O sulfato de magnésio foi adicionado para promover a retirada de água do extrato.

Quando porções de extrato foram limpas por extração em fase sólida dispersiva com carvão ativado, a maior parte da cor em cada extrato foi removida. Já que o carvão ativado é utilizado para remover eficientemente pigmentos e interferentes deste tipo de matriz, enquanto que o PSA é utilizado para remoção principalmente de açúcares e polifénóis de diversas matrizes.

Os outros adsorventes testados (ensaios de nº 1 a 6), descritos no item 3.8.3, não conseguiram apresentar a mesma eficiência no *clean-up*, apresentando extratos ainda com coloração verde.

A utilização do carvão ativado na remoção de clorofila tem demonstrado bons resultados, mas as perdas de certos compostos como os pesticidas de baixa polaridade

e pesticidas com estrutura planar podem ocorrer durante o *clean-up* dispersivo em fase sólida (DÍEZ *et al.*, 2006).

Foram também analisados extratos de amostras branco (não fortificados) contendo diferentes quantidades de carvão ativado para o *clean-up* (item 3.8.3.1), para o qual o Teste A (20 mg para 4 mL de extrato) foi o que apresentou um satisfatório *clean-up* dos extratos, não sendo necessário utilizar maiores quantidades de carvão ativado, mesmo que essas quantidades melhorassem o *clean-up*, pois poderiam também aumentar as perdas dos pesticidas nesta etapa.

O passo seguinte foi testar os efeitos do carvão ativado sobre a remoção de clorofila a fim de apurar a quantidade adequada de carvão ativado utilizada no passo de *clean-up* que possa remover, tanto quanto possível clorofila das plantas de arroz, sem haver perdas significativas dos pesticidas utilizados.

Foram testados 10, 15 e 20 mg de carvão ativado contendo 600 mg de sulfato de magnésio cada um, em 4 mL de extrato, para verificar a ocorrência ou não de perda dos pesticidas. Foi utilizada uma solução analítica na concentração de 5 mg L⁻¹ contendo todos os pesticidas para a fortificação e logo após foi calculado os valores de recuperação de cada pesticida, em porcentagem.

A utilização de 10 mg de carvão ativado não demonstrou um *clean-up* efetivo, sendo insuficiente para remover grande parte da clorofila das plantas de arroz, verificado pelo aspecto do extrato com coloração verde clara. Dessa maneira, não foi injetado no sistema GC-ECD, evitando-se assim contaminação do mesmo.

Os resultados de recuperação dos pesticidas analisados, utilizando 15 e 20 mg de carvão ativado em 4 mL de extrato estão demonstrados na Tabela 11. Foram realizadas 2 injeções de cada extrato.

Tabela 11 - Recuperações médias dos pesticidas utilizando 15 e 20 mg de carvão ativado para 4 mL de extrato

Pesticida	Carvão ativado	
	15 mg	20 mg
Recuperação (%)		
Azoxistrobina	88,7	90,6
Bifentrina	76,0	73,3
Lambda-cialotrina	83,1	87,7
Trifloxistrobina	84,5	88,1

Observando-se os resultados da Tabela 11, podemos verificar que os valores de recuperação ficaram próximos, mas os melhores resultados foram obtidos no *clean-up* com 20 mg de carvão ativado, ficando entre 73,3 e 90,6% de recuperação nestes extratos, demonstrando, desse modo, a menor perda dos pesticidas em estudo nesta etapa.

Além disso, foi constatado visualmente um extrato mais límpido utilizando 20 mg de carvão ativado em comparação com o extrato que utilizava 15 mg de carvão ativado; sendo possível a remoção significativa de pigmentos vegetais das amostras de plantas de arroz. Por estes motivos, a quantidade de 20 mg de carvão ativado foi a escolhida para a etapa de *clean-up* dispersivo neste trabalho.

4.5 Método de extração otimizado

A partir dos testes previamente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método e para a determinação da concentração residual dos pesticidas nas amostras de plantas de arroz.

O procedimento de extração otimizado está descrito no item 3.9.3. O método envolve uma etapa de extração com acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético,

uma etapa de partição com os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio e uma etapa de *clean-up* dispersivo com carvão ativado e sulfato de magnésio.

Para a etapa de validação do método QuEChERS modificado utilizado neste trabalho, foram necessárias amostras branco e foram realizadas fortificações em 4 níveis (0,25; 0,5; 1,25; 2,5 mg kg⁻¹). As amostras de plantas de arroz obtidas do experimento a campo foram extraídas em duplicata, utilizando o método descrito e logo após, injetados no sistema GC-ECD.

A Figura 10 demonstra todas as etapas do método de extração otimizado (QuEChERS modificado).

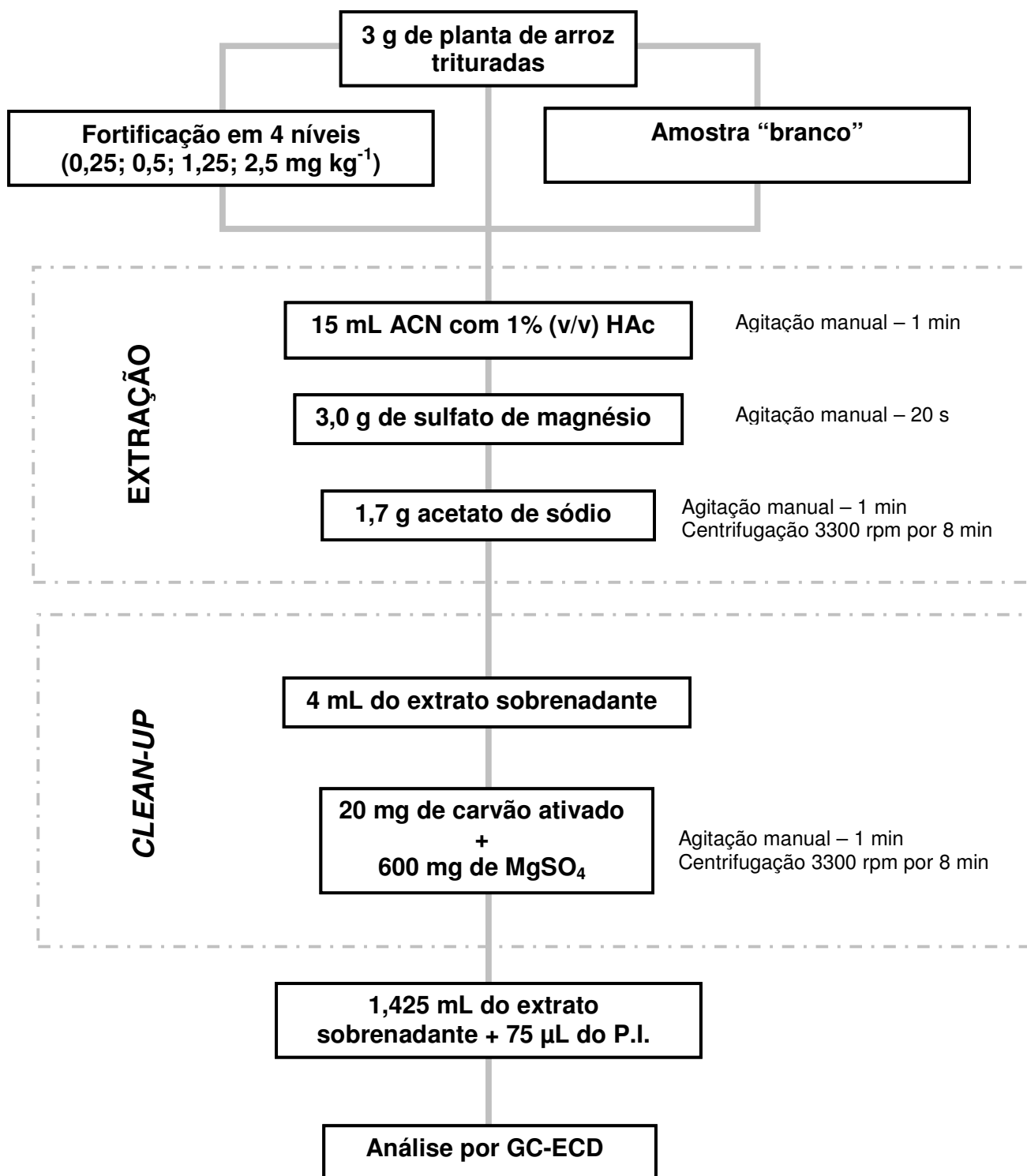


Figura 10 - Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em plantas de arroz, utilizando o método de extração com acetonitrila

4.6 Validação do Método QuEChERS modificado

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas no extrato das plantas de arroz, dessa maneira sendo possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz, na determinação dos valores de LOD e LOQ (instrumento e método), e da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação). Também foram preparadas soluções no solvente (acetonitrila) para verificar o efeito matriz, visto que este pode influenciar os resultados, dependendo dos compostos analisados, da técnica cromatográfica e da matriz empregada.

A Figura 11 apresenta o cromatograma obtido por GC-ECD de um extrato de planta de arroz “branco” onde, percebe-se a inexistência de qualquer pico nos tempos de retenção dos compostos em estudo. Sendo assim, foi possível sua utilização para o processo de validação do método QuEChERS modificado.

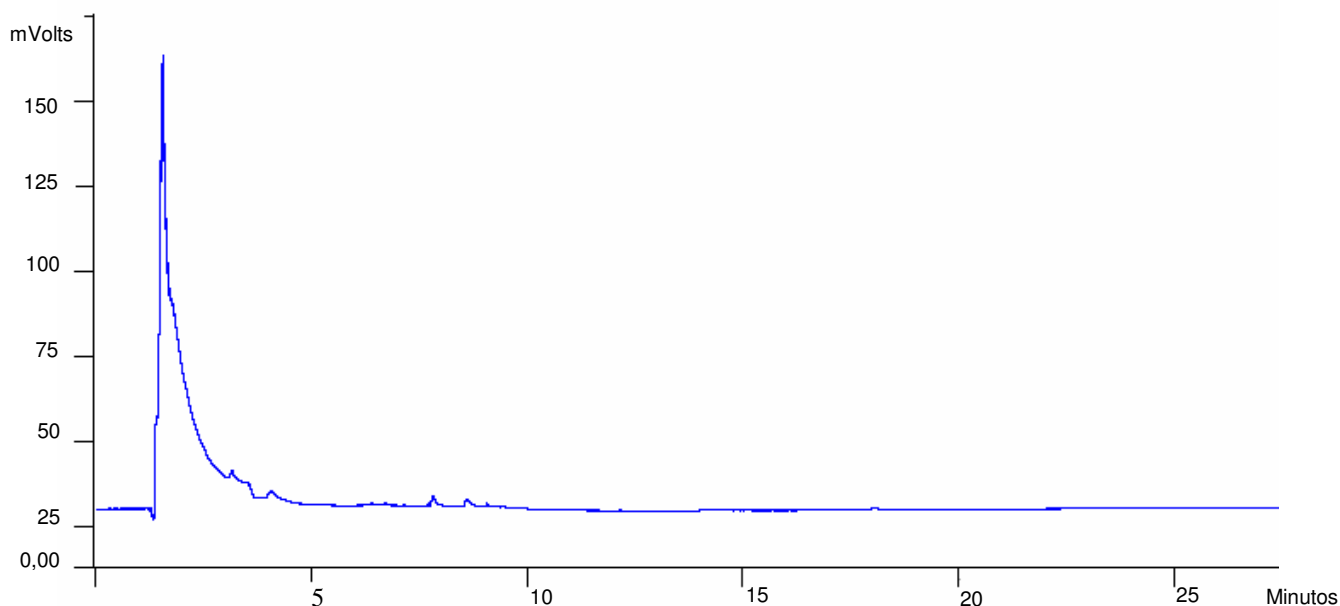


Figura 11 - Cromatograma obtido por GC-ECD para o extrato “branco” das plantas de arroz, obtido nas condições cromatográficas do item 4.1

4.6.1 Curva analítica

A Tabela 12 abaixo apresenta as equações da curva analítica (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹), coeficiente de determinação (r^2) e intervalo linear.

Tabela 12 - Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato das plantas de arroz e analisados por GC-ECD

Pesticida	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear (mg L ⁻¹)
Azoxistrobina	$y = 969,54x - 51,731$	0,9936	0,05 – 1,00
Bifentrina	$y = 1713x + 7,233$	0,9995	0,01 – 0,75
Lambda-cialotrina	$y = 3024,2x - 53,511$	0,9952	0,01 – 0,75
Trifloxistrobina	$y = 1708x + 20,34$	0,9998	0,01 – 0,75

A partir dos resultados das equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que o r^2 foi maior que 0,993 para todos os compostos em estudo, o que é satisfatório segundo a literatura (INMETRO, 2007).

4.6.2 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação do método e do instrumento estão demonstrados na Tabela 13 para os pesticidas selecionados para este estudo. As soluções analíticas utilizadas para este fim foram preparadas no extrato da matriz.

Os valores foram obtidos através da relação sinal/ruído como apresentados no item 3.9.2.

Tabela 13 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método

Pesticida	Limites do instrumento (mg L ⁻¹)		Limites do método (mg kg ⁻¹)	
	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
Azoxistrobina	0,02	0,05	0,1	0,25
Bifentrina	0,004	0,01	0,02	0,05
Lambda-cialotrina	0,004	0,01	0,02	0,05
Trifloxistrobina	0,004	0,01	0,02	0,05

Os valores de LOD e LOQ dos pesticidas bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina foram os mesmos, pois estes pesticidas apresentam uma boa resposta no sistema GC-ECD, conseguindo alcançar limites de detecção e quantificação mais baixos, quando comparados com o pesticida azoxistrobina, que não possui uma resposta no sistema de detecção tão boa quanto aos dos outros pesticidas estudados. A explicação para isso está relacionada à estrutura química dos pesticidas e ao detector ECD em uso, pois este é especialmente sensível a moléculas que contém halogênios, carbonilas conjugadas e nitrocompostos (compostos eletrofílicos) (COLLINS *et al.*, 2006).

Sabendo disso, constata-se então que a azoxistrobina apresentou limites de detecção mais altos devido a sua estrutura química não apresentar moléculas que contenham halogênios, tais como cloro e flúor, diminuindo a sua sensibilidade de detecção frente aos outros pesticidas bifentrina, trifloxistrobina e lambda-cialotrina que possuem uma estrutura química mais compatível com este detector, devido à presença de halogênios em sua estrutura.

Estes limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios de acordo com o método apresentado e validado, comparado a técnicas cromatográficas mais sensíveis como a técnica GC-MS (LEE *et al.*, 2008). Além disso, na legislação brasileira não foram encontrados valores de limites máximos de resíduos permitidos para nenhum destes compostos em plantas de arroz.

4.6.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O procedimento de validação do método QuEChERS modificado proposto está descrito nos itens 3.9.3 e 4.5.

As Tabelas 14 e 15 apresentam a precisão do método em termos de precisão intermediária (RSD_{pi}) e repetitividade (RSD_r), respectivamente, levando em consideração os níveis de concentração utilizados na elaboração das curvas analíticas no extrato da matriz e os ensaios de fortificação.

Para o estudo da precisão intermediária, o ensaio foi realizado empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos da repetitividade.

Os valores para o estudo da repetitividade dos pesticidas ficaram entre 5,3 e 16,4% e para o estudo da precisão intermediária ficaram entre 8,5 e 19,0%.

As Tabelas 14 e 15 também apresentam os valores de recuperação obtidos nas fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os fungicidas e inseticidas em estudo, utilizando-se o procedimento descrito no item 3.9.3.

As recuperações para os pesticidas ficaram entre 71,2 e 103,6%, avaliando-se desta maneira a exatidão do método, o qual apresentou resultados satisfatórios.

Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% e, para a faixa de trabalho avaliada, a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (RIBANI *et al.* 2004; SANCO, 2007). Além disso, para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (HUBER, 2001).

Dessa maneira, todos os resultados obtidos apresentaram-se dentro desses intervalos e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros cromatográficos sugeridos.

Vale salientar que todos os valores de áreas dos picos dos pesticidas, usados para cálculos de recuperação, foram submetidos ao Teste Q, conforme descrito no item 3.9.3; sendo que nenhum valor de área foi rejeitado, demonstrando que os valores

estão dentro de um nível de confiança de 96%, e, portanto são aceitos para cálculos de recuperação.

Tabela 14 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método

Pesticida	Nível de Fortificação*			
	2,5 mg kg ⁻¹	1,25 mg kg ⁻¹	0,5 mg kg ⁻¹	0,25 mg kg ⁻¹
Recuperações ±RSD (%)				
Azoxistrobina	76,8±8,2	71,7±12,1	85,4±10,8	96,3±14,9
Bifentrina	72,4±6,3	73,1±7,4	81,2±9,1	76,7±10,0
Lambda-cialotrina	83,6±11,8	77,9±14,8	83,3±14,6	71,2±5,3
Trifloxistrobina	87,5±16,4	85,3±10,5	89,6±13,4	73,8±7,9

* 3 extrações × 2 injeções de cada extrato

Tabela 15 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método

Pesticida	Nível de Fortificação*			
	2,5 mg kg ⁻¹	1,25 mg kg ⁻¹	0,5 mg kg ⁻¹	0,25 mg kg ⁻¹
Recuperações ±RSD (%)				
Azoxistrobina	74,2±13,4	75,3±18,5	72,4±19,0	84,7±17,0
Bifentrina	98,2±19,0	101,2±15,4	87,4±15,0	96,3±18,9
Lambda-cialotrina	81,3±10,8	73,2±14,3	74,6±15,3	95,9±13,1
Trifloxistrobina	92,6±11,7	103,6±8,5	89,6±17,1	91,4±17,9

* 3 extrações × 2 injeções de cada extrato

O cromatograma da Figura 12 exemplifica uma amostra fortificada no nível de 2,5 mg kg⁻¹.

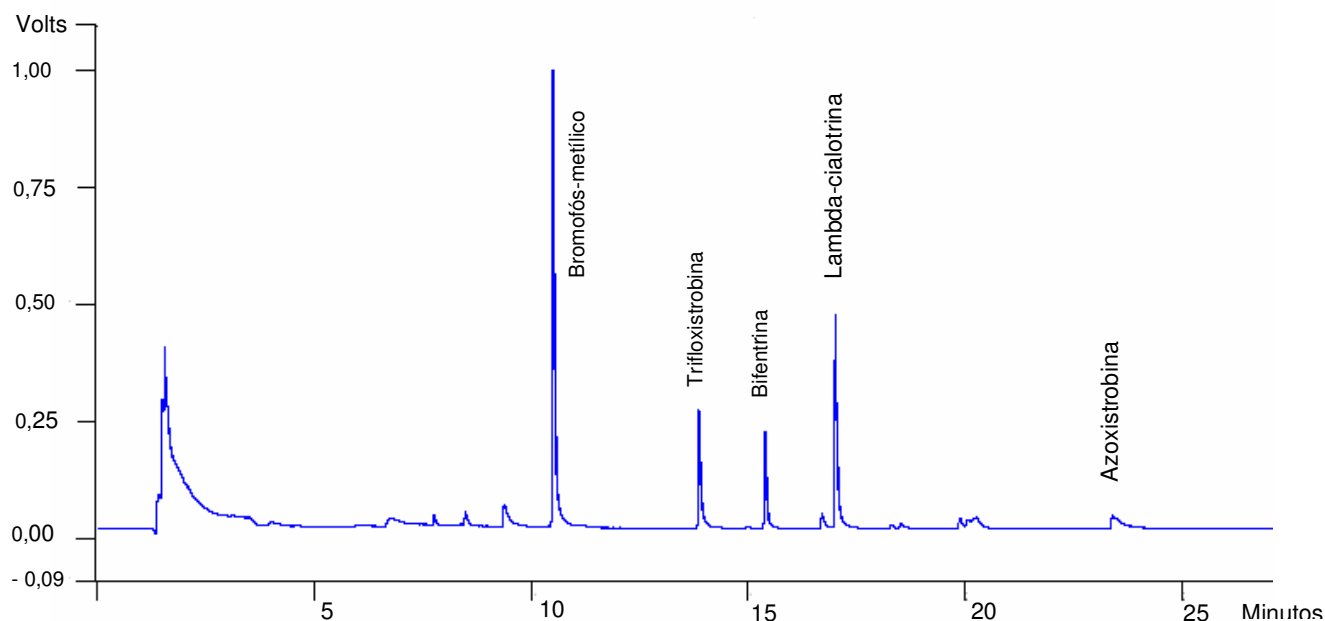


Figura 12 - Cromatograma de uma amostra fortificada com a mistura dos pesticidas no nível de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

4.6.4 Efeito matriz

A Figura 13 mostra o efeito matriz para cada pesticida em estudo, confirmando dessa maneira a importância de utilizar-se curvas analíticas preparadas na matriz evitando-se assim, resultados errôneos.

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina.

Conforme apresentado na Figura 13, pode-se observar que todos os pesticidas estudados apresentaram um efeito matriz positivo significativo em relação aos obtidos pelo método de extração com acetonitrila, que pode ser devido aos fenômenos de adsorção e/ou degradação dos pesticidas no sistema de injeção.

Assim sendo, neste trabalho foram utilizadas curvas analíticas preparadas no extrato da matriz.

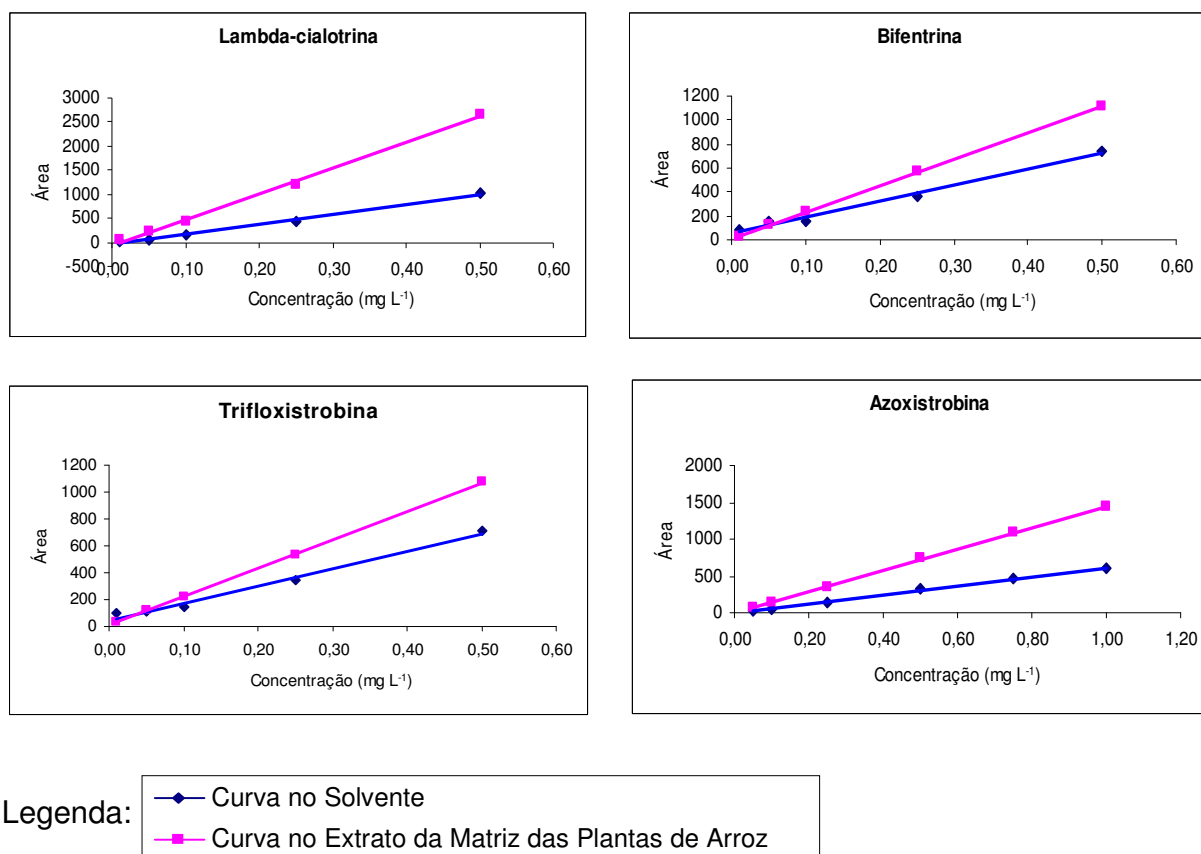


Figura 13 - Curvas analíticas dos pesticidas lambda-cialotrina, bifentrina, trifloxistrobina e azoxistrobina preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz das plantas de arroz branco

4.7 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado à análise de plantas de arroz da lavoura de arroz irrigado do experimento conduzido na várzea experimental do Campus da Universidade Federal de Santa Maria, na safra de 2007/2008.

Neste experimento, foi avaliada a persistência dos pesticidas trifloxistrobina, lambda-cialotrina, bifentrina e azoxistrobina em plantas de arroz irrigado, coletadas em diferentes dias (1^o, 3^o, 5^o, 7^o, 10^o, 15^o, 20^o, 25^o, 30^o, 35^o e 40^o) após a aplicação dos mesmos.

As amostras foram preparadas conforme o método validado (itens 3.9.3 e 4.5) e os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 14, para a safra 2007/2008.

No período da safra de 2007/2008 a lavoura de arroz foi submetida a uma temperatura média de 21,6 °C, com umidade média de 74,9%, com radiação solar média de 1019,7 kJ m⁻² e as chuvas durante toda a safra somaram aproximadamente 1126 mm. Vale salientar que os meses que apresentaram maiores precipitações foram os de outubro, dezembro, março e abril.

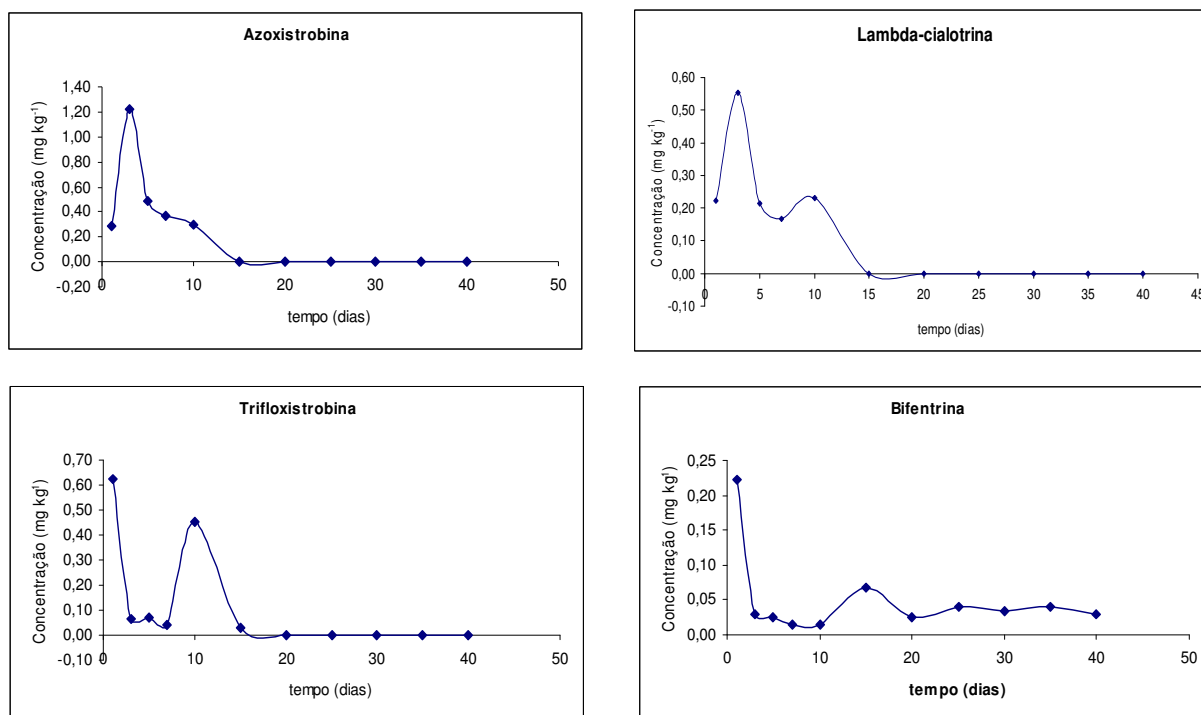


Figura 14 - Concentrações residuais dos pesticidas trifloxistrobina, lambda-cialotrina, azoxistrobina e bifentrina em plantas de arroz irrigado

Observando o perfil residual demonstrado pela Figura 14, pode-se perceber que os quatro pesticidas são detectados nas plantas de arroz até aproximadamente 20 dias após a sua aplicação. No Apêndice C, estão demonstradas as concentrações residuais de todos os pesticidas nos diferentes dias de coleta.

Os inseticidas bifentrina e lambda-cialotrina apresentaram as maiores concentrações residuais nas plantas de arroz nos 1^o e 3^o dias após as aplicações dos mesmos na lavoura arroteira, que foram 0,22 e 0,55 mg kg⁻¹, respectivamente.

Já os fungicidas trifloxistrobina e azoxistrobina, apresentaram concentração residual máxima de 0,62 e 1,22 mg kg⁻¹, respectivamente, no 1 e 3^o dias de coleta após a aplicação dos pesticidas.

Vale salientar que todos os pesticidas em estudo apresentaram concentração máxima residual até o 3^o dia de coleta, sendo que nas coletas posteriores a concentração residual foi decrescendo até encontrar-se abaixo do LOD do método, não

podendo assim, ser detectado nenhum resíduo dos pesticidas em estudo, após esse período.

O intervalo de segurança apresentado na Tabela 8 (item 3.11) que se refere aos grãos de arroz, também pode ser aplicado às plantas de arroz, pois após esse tempo determinado (15 a 30 dias) não foi detectado até o LOD do método, nenhum resíduo destes pesticidas nas amostras analisadas. Além disso, de acordo com a Tabela 9 (item 3.11) o pesticida azoxistrobina que foi aplicado na maior dose nas plantas, também foi o que apresentou maior concentração residual.

Nas Figuras 15 a 18, estão apresentados os cromatogramas obtidos por GC-ECD; nas condições cromatográficas descritas no item 4.1; das amostras das plantas de arroz contendo resíduos dos pesticidas azoxistrobina, trifloxistrobina, lambda-cialotrina e bifentrina da safra 2007/2008.

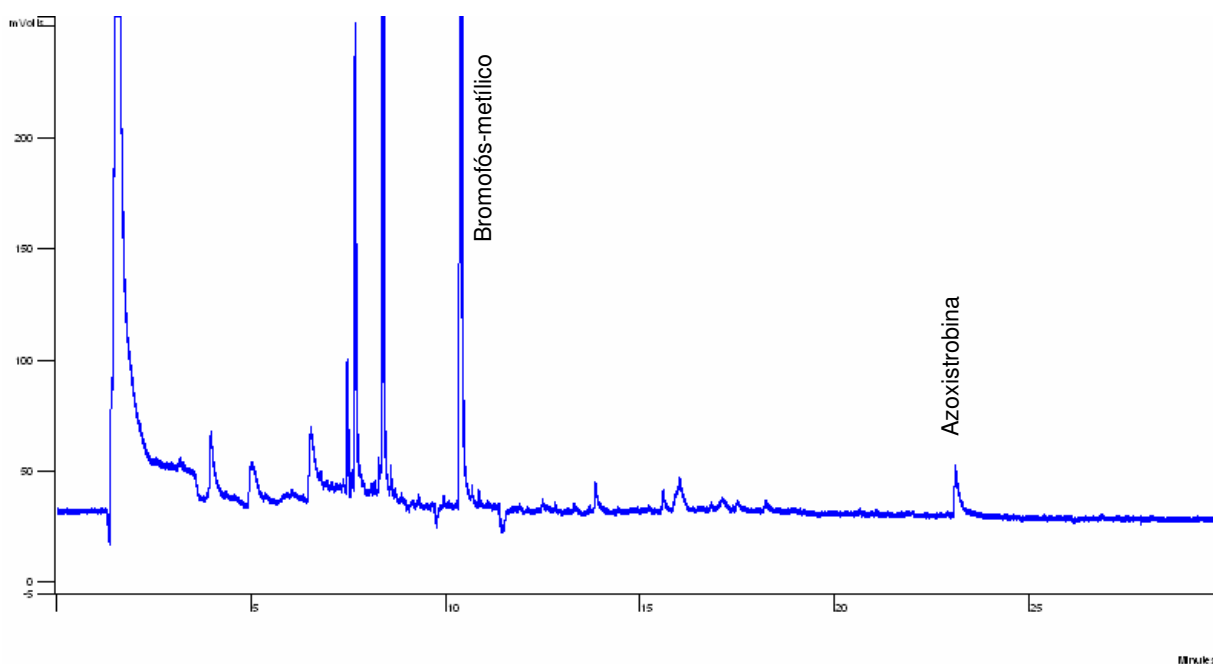


Figura 15 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T1, contendo resíduos do pesticida azoxistrobina na concentração de $1,22 \text{ mg kg}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

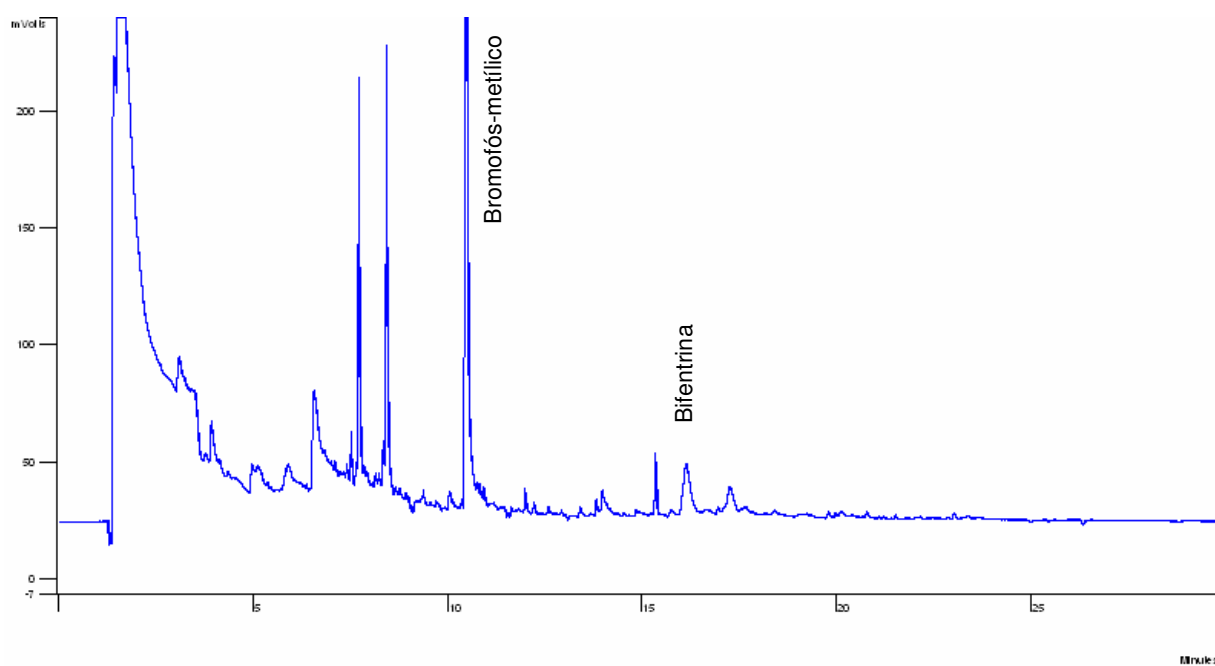


Figura 16 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T2, contendo resíduos do pesticida bifentrina na concentração $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

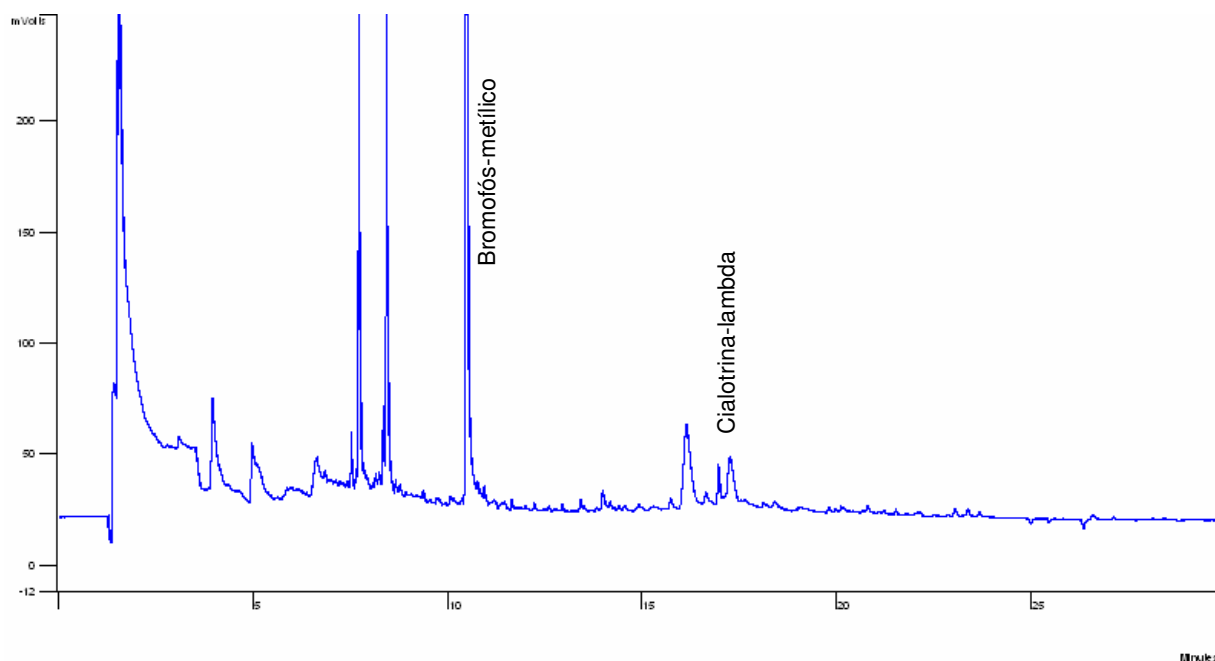


Figura 17 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T3, contendo resíduos do pesticida lambda-cialotrina na concentração de $0,55 \text{ mg kg}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

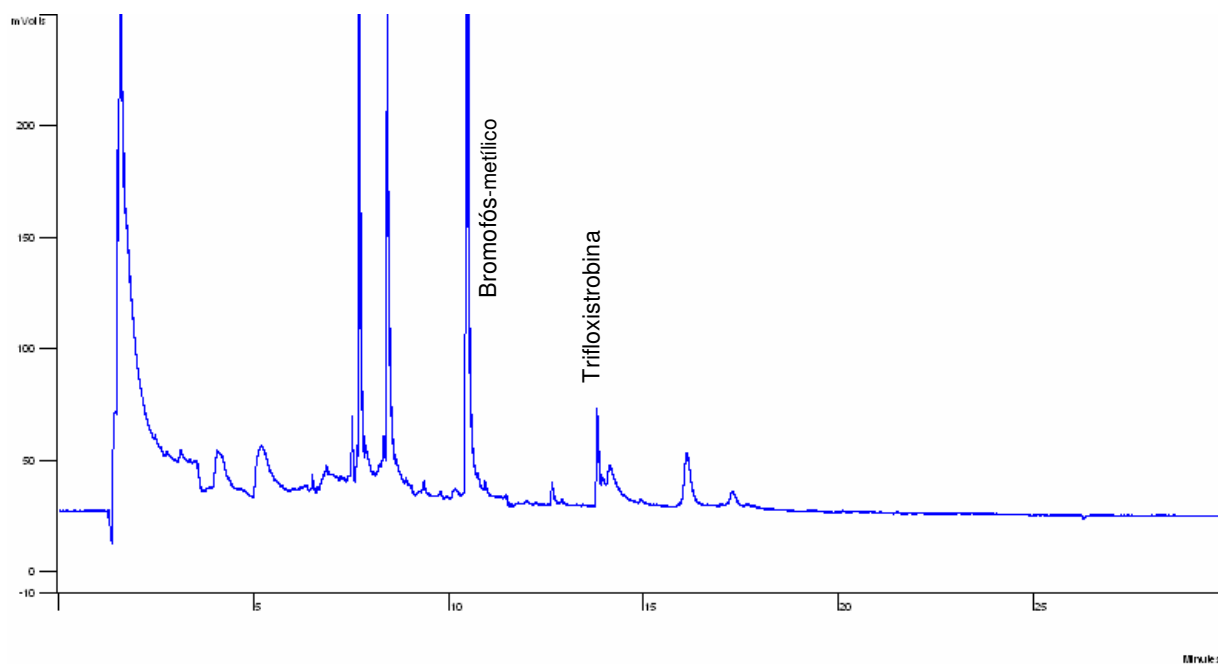


Figura 18 - Cromatograma da amostra de planta de arroz T4, contendo resíduos do pesticida trifloxistrobina na concentração de $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

5 CONCLUSÕES

O método de extração QuEChERS modificado, otimizado para este trabalho, tem como vantagens a utilização de pouca quantidade de solvente, baixo custo, não necessita equipamentos ou vidraria especializada; além da simplificação de etapas lentas e trabalhosas, geralmente empregadas em outros métodos de extração.

A etapa de *clean-up* dispersivo, a qual utilizou-se carvão ativado e sulfato de magnésio como adsorventes, nas quantidades de 20 e 600 mg, respectivamente, em 4 mL de extrato; apresentou-se adequada e eficiente, conseguindo remover a grande quantidade de clorofila interferente presente nas plantas de arroz, sendo esta uma das principais dificuldades encontradas neste trabalho, a purificação dos extratos para injeção no sistema GC-ECD.

O método de extração QuEChERS modificado utilizado para a extração dos pesticidas das plantas de arroz, demonstrou ser um método eficiente apresentando bons resultados de recuperação entre 71,2 a 103,6%. Este método validado está de acordo com a literatura para a validação de métodos cromatográficos, que sugere a necessidade das recuperações estarem entre 70 e 120%, comprovando a confiabilidade do método desenvolvido.

Os valores de precisão obtidos ficaram entre 5,3 e 19,0%, encontrando-se dentro dos limites aceitáveis (RSD < 20%).

Os valores de limites de quantificação de 1,0 mg kg⁻¹ para a azoxistrobina e 0,05 mg kg⁻¹ para os demais pesticidas bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina, permitem que sejam determinados resíduos destes pesticidas em amostras de plantas de arroz com grande confiabilidade.

O método validado contribui para o estabelecimento de limites seguros para a alimentação animal e preservação do ambiente, além da possibilidade de identificação dos pesticidas com menor persistência na planta de arroz e no ambiente para aplicação em final do ciclo da cultura.

As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,01 e 1,0 mg L⁻¹, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,993, também apresentando resultados adequados segundo a literatura (INMETRO, 2003).

As soluções analíticas, para a confecção das curvas de calibração, foram preparadas em extratos da matriz para a realização dos cálculos de precisão (repetitividade e precisão intermediária), devido ao método ter evidenciado um significativo efeito matriz positivo, ou seja, um aumento de sinal constatando-se dessa maneira, a necessidade de se utilizar curvas preparadas no extrato da matriz e não em solvente, evitando-se assim, resultados falsos nas análises.

O método validado foi aplicado para o estudo da concentração residual dos pesticidas azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina em plantas de arroz de um experimento realizado no Campus da UFSM, nas safras 2007/2008.

Os fungicidas e inseticidas em estudo apresentaram concentrações máximas residuais no 1º e 3º dias de coleta, sendo que após 20 dias de coleta nenhum dos pesticidas foi detectado levando em consideração o LOD do método. Sabendo-se disso, após o período de 20 dias após a aplicação dos pesticidas, as plantas de arroz podem ser utilizadas para alimentação animal, principalmente de bovinos, sem acarretar prejuízos ou efeitos maléficos aos animais, desde que aplicados nas doses recomendadas. Vale salientar que isso é correto apenas para os pesticidas validados neste trabalho (azoxistrobina, bifentrina, lambda-cialotrina e trifloxistrobina), tendo sempre o cuidado de seguir a dose de aplicação para cada composto.

Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise dos pesticidas em plantas de arroz, podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises de resíduos de pesticidas, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste estudo foram recolhidos, colocados em recipientes, separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados para o Almoxarifado, responsável pelo tratamento final dos resíduos gerados, no Departamento de Química da UFSM.

Já os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos, devidamente rotulados e em seguida, também encaminhados ao Almoxarifado do Departamento de Química da UFSM, responsável pelo destino em Aterro Industrial, autorizado pela FEPAM.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

→ Determinação, na planta de arroz, de outros pesticidas também utilizados na lavoura arrozeira;

→ Estudo a campo e no laboratório da estabilidade dos inseticidas lambda-cialotrina e bifentrina e dos fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, amostras de grãos de arroz e em amostras de solo, com o objetivo de traçar o perfil de persistência destes pesticidas no sistema de produção de arroz irrigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS) Consulta de Ingrediente Ativo. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 06 nov. 2008.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.86, p.412-431, 2003.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

ATLAS SOCIO-ECONÔMICO DO RIO GRANDE DO SUL, 2006. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/ATLAS/atlas.asp?menu=264>>. Acesso em 15 out. 2008.

BARTLETT, T.C. *et al.* Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology NY**, v. 4, p. 278-293, 2002.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em 01 nov. 2008.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 set. 2008.

CEN (COMITÉ EUROPEEN DE NORMALISATION), CEN/TC 275/WG 4 N 0224, Foods of plant origin – **Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS (/MS) following acetonitrile extraction/partitioning – QuEChERS Method**, 2006.

CHANG, T.T.; LUH, B.S. Overview and prospects of rice production. In: LUH, B. S. (Ed.) **Rice Production**, 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 1-11.

CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatography methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 367-395, 1996.

CIT, CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/v2/nova/?p=p_109&sName=ano-2003>. Acesso em 27 set. 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006, 453 p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Indicadores da Agropecuária – Agosto/Setembro de 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 12 out 2008.

COUNCE, P. A; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. **Crop Science**, v.40, n. 2, p.436-443, 2000.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 620-636, 2001.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* Correction function on biased results due to matrix effects Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n. 2, p. 281-301, 2003.

DÍEZ, C. *et al.* Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **A cultura do Arroz no Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm> >. Acesso em: 13 out. 2008.

ERNEY, D. R. *et al.* Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, p. 57-63, 1993.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), Rice is life. Italy, 2004 Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/aboutrice.htm>>. Acesso em: 12 out. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/375/default.aspx>>. Acesso em 23 nov 2008.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em:<<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), Rice is life - International Rice Commission meets in Peru Italy/Peru, 2006a. Disponível em:<<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000267/index.htm>>. Acesso em 12 out. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Statistical databases, FAO 2006b. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 13 out 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em 12 out. 2008.

GARP. ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. 1999, p. 66-73.

GOMES, A. S.; MAGALHÃES, A. M. J. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Pelotas: Editora Embrapa Clima Temperado, 2004, 900 p.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005, 392 p.

Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of chromatography. A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

Hiemstra, M.; Kok, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1154, p. 3-25, 2007.

Huber, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. **LC-GC Europe**, v. 11, p 96-105, 1998.

Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy. 2001. Disponível em <<http://www.labcompliance.com>>. Acesso em 05 nov. 2008.

Hyötyläinen, T. Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 14-28, 2007.

ICH; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 2QB (CPMP/ICH/281/95), 1996.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – Revisão 02. Brasília, 2007. 24 p.

IRGA (INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ). Lavoura Arrozeira, v. 56, 2008. Disponível no site <<http://www.irga.rs.gov.br>> Acesso em 14 set. 2008.

IRGA (INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ). Mapa das regiões arrozeiras, IRGA, 2008a. Disponível em : <http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=pub_mapa>. Acesso em 14 set. 2008.

IRRI (International Rice Research Institute). Rice facts. Manila, Philippines, 1994.

Jonatan, T. **Introduction of environmental studies**. 3rd ed. New York: Saunders College, 1989, 304 p.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, cap.2, p.17-57, 1985.

KRISTENSON, E. M., RAMOS, L., BRINKMAN, U. A. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 96–111, 2006.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Quantitation in Method Validation. **LC – GC**, v. 16, n. 12, p. 1084-1090, 1998.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999. 230 p.

LEE, G. H. *et al.* A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 1, p. 67-74, 2008.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, A. R.; LIGHTFIELD, J. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.88,n. 2, p.615-629, 2005.

MAJORS, R. E. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa, 2001. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com>>. Acesso em 12 jul. 2008.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) Disponível em : < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em 12 set. 2008.

MARTINEZ VIDAL, L. *et al.* Selection of a Representative Matrix for Calibration in Multianalyte Determination of Pesticides in Vegetables by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 61, n. 3-4, p. 127-131, 2005.

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

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. *Herbicidas em Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997, 108 p.

MDIC (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR). Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/>> . Acesso em 21 set. 2008.

MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem Capingui, RS empregando GC-ECD e GC-MS**. 2003. 208f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

NASUTI, C. *et al.* Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n.2-3, p. 233-244, 2003.

OPAS/OMS (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE) Disponível em: <<http://www.opas.org.br/>>. Acesso em 24 out. 2008.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas Carbofurano e Quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD**. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PICÓ, Y., *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117–131, 2007.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D., Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

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. 108f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PRIMEL, E. G. **Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**. 2003. 170 f. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS

REIMCHE *et al.* Persistência na água e influência de herbicidas utilizados na lavoura arrozeira sobre a comunidade zooplancônica de Cladocera, Copepoda e Rotifera. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 7-13, 2008.

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

RIBANI, M., *et al.* Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201–205, 2007.

RICHETTI, A.; HECKLER, J. C. **Estimativa do custo de produção de arroz irrigado e de terras altas, safra 2005/06, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso** (Comunicado Técnico, 107). Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005, 6 p.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131**. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 3^a ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SCHENCK, F. J.; CALLERY, P.; GANNET, P. M.; *et al.* Comparison of Magnesium Sulfate and Sodium Sulfate for Removal of Water from Pesticide Extracts of Foods Comparison of Magnesium Sulfate and Sodium Sulfate for Removal of Water from Pesticide Extracts of Foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.85, n.5,p. 1177-1180, 2002.

SODERLUND, D. M. *et al.* Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n.1, p. 3-59, 2002.

SOSBAI; SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO; **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Pelotas: Gráfica e Editora Pallotti, 2007, 161 p.

SOUZA, P. E.; DUTRA, M.R. Fungicidas sistêmicos. In: Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas. Lavras: UFLA, 2003, cap.9, p. 89-142.

SPENCER, C. L. *et al.* Actions of pyrethroids insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 1067-1082, 2001.

STEPAN, R., TICHA, J., HAJŠLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.12, p. 1231-1242, 2005.

STORCK, C. R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 397-410, 1996.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TOMLIN, C. D. S., **The e-Pesticide Manual**, The British Crop Protection Council, versão eletrônica 3.0, 2004.

VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p.375-382, 1990.

VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SÁNCHEZ, M. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 959, p. 203–213, 2002.

VENANCIO, W. Z.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L. Novos fungicidas I: Produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. **Revisão Anual de Patologia das Plantas**, v.7, p. 103-149, 1999.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; ÁVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1184-1192, 2008.

WANDER, A. E., **Custos e @gronegocio on line**, v.2, p.1-14, 2006.

YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. **The international rice research institute**, p. 227, 1981.

ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. **Jounal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.

ZHOU, Z. *et al.* Composition and functional properties of rice. **Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

ZROSTLÍKOVÁ, J. *et al.* Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v.937, n. 1-2, p.73-86, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Fluxograma da otimização do *clean-up* com carvão ativado

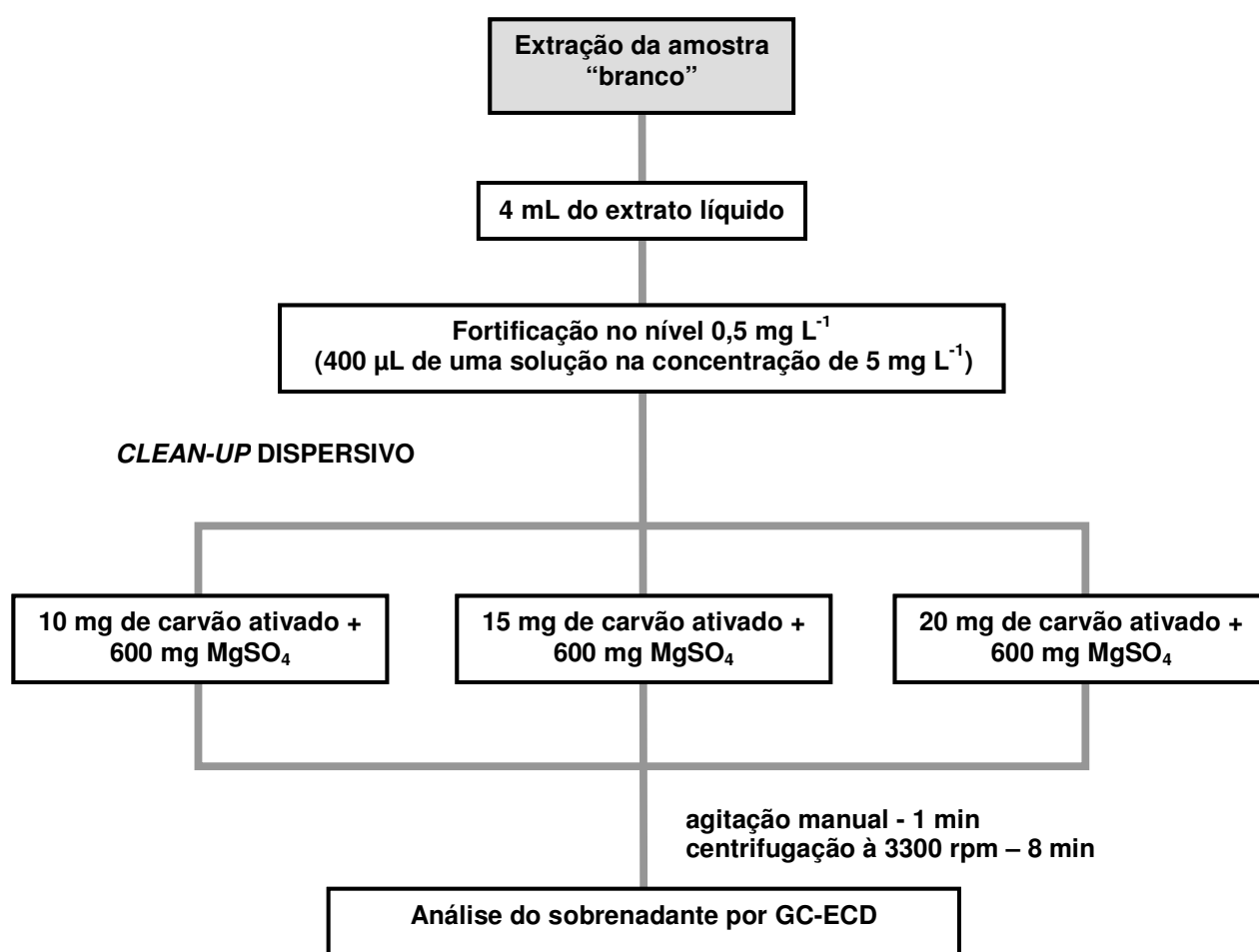


Figura 1 – Esquema da etapa de otimização do *clean-up* do item 3.8.3.2

APÊNDICE B - Ensaio de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado

Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)	Concentração da solução de fortificação (mg L ⁻¹)	Volume adicionado da solução (µL)	Quantidade de plantas arroz (g)	Volume de solvente (mL)	* Fator
2,50	10	750	3,0	15	5
1,25	10	375	3,0	15	5
0,50	10	150	3,0	15	5
0,25	1	750	3,0	15	5

* Fator = volume do solvente /quantidade de amostra

APÊNDICE C - Concentrações residuais dos pesticidas estudados nas plantas de arroz cultivadas na safra 2007/2008

Dias*	Pesticidas (mg kg ⁻¹)			
	Azoxistrobina	Bifentrina	Lambda-cialotrina	Trifloxistrobina
1º	0,28	0,22	0,22	0,62
3º	1,22	0,03	0,55	0,07
5º	0,49	0,02	0,21	0,07
7º	0,36	0,01	0,17	0,04
10º	0,30	0,01	0,23	0,45
15º	nd	0,07	nd	0,03
20º	nd	0,03	nd	nd
25º	nd	0,04	nd	nd
30º	nd	0,03	nd	nd
35º	nd	0,04	nd	nd
40º	nd	0,03	nd	nd

*Dias de coleta após a aplicação dos pesticidas