

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**Bárbara Diana Jänisch**

**DETERMINAÇÃO MULTIRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM  
CAMAS BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA  
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**Santa Maria – RS**

**2018/2**

**Bárbara Diana Jänisch**

**DETERMINAÇÃO MULTIRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM CAMAS  
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Química  
Bacharelado da Universidade Federal de  
Santa Maria, como requisito parcial para  
obtenção do grau em **Bacharela em  
Química.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS

2018

**Bárbara Diana Jänisch**

**DETERMINAÇÃO MULTIRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM CAMAS  
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Química  
Bacharelado da Universidade Federal de  
Santa Maria, como requisito parcial para  
obtenção do grau em **Bacharela em  
Química.**

**Aprovado em 03 de dezembro de 2018**

---

**Profª Drª Ionara Regina Pizzutti (UFSM)  
(Professora Orientadora)**

---

**Drª Catiucia de Sousa Vareli (UFSM)**

**Santa Maria – RS**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe Sulani, meu pai Francisco e minha irmã Djeimi, por todo o incentivo, pelos conselhos e por apesar da distância estarem sempre presentes, por sempre me recepcionarem com aquele caloroso abraço que fazia resolver todos os problemas. Por me fazerem sempre seguir em frente, por mais difícil que fosse a caminhada e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

Agradeço também a minha avó Fridalina, que infelizmente não está mais entre nós, mas que foi aquela segunda mãe, e apesar do tempo lembro-me sempre de seus ensinamentos e de sua garra e persistência que sempre teve.

Agradeço ao meu sobrinho Bernardo, que apesar dele ainda não saber ler o que aqui escrevo, mas que sempre me dá aquela dose de ânimo quando o vejo.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre estiveram comigo em todos os momentos, me apoiando e dando forças, em especial ao Aliar, que foi o presente que a química e a UFSM me deram, por ser aquele irmão para todas as horas que sempre estive ao meu lado quando mais precisei. E a Jéssica, que desde 2014 esta me 'aturando' e sendo aquela irmã de todas as horas.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara, por ter acreditado em mim e me ensinado não apenas o conteúdo necessário, mas sim sempre me mostrado a querer saber sempre mais e também a ser uma profissional de caráter.

Agradeço a todos os colegas do CEPARC, tanto atuais quanto antigos, por todo o companheirismo e aprendizado constante.

Enfim, só tenho a agradecer por todas as pessoas que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

**José de Alencar**

## RESUMO

Os agrotóxicos são mundialmente empregados no controle de pragas e doenças nas mais diversas culturas, com o intuito de evitar prejuízos, aumentando assim a produção.

Considerando a toxicidade dos agrotóxicos, tanto para o meio ambiente como para a saúde, existe uma legislação específica que regulamenta a produção, o comércio, o transporte até o gerenciamento final dos resíduos. No Brasil, existe a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe de todas as especificações necessárias para que os agrotóxicos sejam manuseados corretamente, desde a produção até o destino final dos resíduos e embalagens.

Porém, em relação a derramamentos acidentais, descarte de água da lavagem dos pulverizadores entre outros, até pouco tempo atrás, não existia nenhum procedimento para evitar esse tipo de contaminação. Foi quando surgiu na Suécia as camas biológicas (*biobeds*) com o intuito de evitar maiores contaminações ao meio ambiente. Essas camas biológicas foram sendo adaptadas em diversos outros países, entre ele o Brasil.

Assim, sendo necessário um método para avaliar a eficácia da degradação dos pesticidas desse sistema, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método multiresidual para a determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas.

Foram avaliados os seguintes agrotóxicos: captana, sendo quantificada a partir do seu produto de degradação tetrahidroftalimida, clorpirifós, clorotalonil, fenitrotiona, metidationa, fosmete e tebuconazol em camas biológicas utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

O método de extração utilizado foi uma adaptação do método de mini-Luke.

Para o estudo de validação do método foram avaliados os seguintes critérios: precisão e exatidão, precisão intermediária, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), linearidade, faixa linear, seletividade e efeito matriz.

Como resultado obteve-se LOD do método de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o clorpirifós, fosmete e metidationa, já para a tetrahidroftalimida (produto de degradação da captana), clorotalonil e tebuconazol o limite de detecção foi de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O LOQ para todos os agrotóxicos foi de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## ABSTRACT

Pesticides are used worldwide to control pests and diseases in various crops in order to avoid losses, thus increasing production.

Considering the toxicity of pesticides, both for the environment and for health, there is a specific law that regulates the production, trade and the transport to the final waste management. In Brazil, there is the Law No. 7802 of July 11, 1989, which has all the necessary specifications to ensure that pesticides are handled properly, from production to final destination of waste and packaging.

However, in relation to accidental spills, water discharge from the washing of sprayers, etc., until very recently there was no procedure to avoid this type of contamination. In order to avoid this kind of environmental contamination, *biobeds* were created in Sweden. These biological beds were being adapted in several other countries, among them Brazil.

Since it is necessary a method to evaluate the efficacy of pesticide degradation of this system, this work aimed the development and validation of a multiresidual method for the determination of pesticide residues in biological beds.

The following pesticides were evaluated: captan, being quantified from its degradation product tetrahydroftalimida, chlorpyrifos, chlorothalonil, fenitrothion, methidathion, phosmet and tebuconazole in biological beds using gas chromatography-mass spectrometry.

The extraction method used was an adaptation from the of Dutch New mini-Luke method.

To study the validation of the method the following criteria were evaluated: precision and accuracy, intermediate precision, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), linearity, linear range, selectivity and matrix effects.

As a result there was obtained LOD from the method of  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  for chlorpyrifos, phosmet and methidathion; as for tetrahydroftalimida (a captan degradation product), tebuconazole and chlorothalonil the detection limit was  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . The LOQ for all pesticides was  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema dos componentes da cama biológica original desenvolvida na Suécia.....	9
Figura 2	Modelos de Biobeds, (a) com a adição de uma camada de argila (b) com uma camada natural de argila e (c) com o sistema isolado.....	9
Figura 3	Modelos de sistemas de camas biológicas - Original da Suécia, que não possui isolamento. Phytobac, com um sistema de mais de um ciclo na biomistura e no fim sofre evaporação. Sistema fechado, onde no fim o resíduo é coletado, e o sistema com biofiltros	10
Figura 4	Componentes da cama biológica. (A) Biomistura; (B) Cobertura vegetal; (C) Camada de cascalho; (D) Sistema de impermeabilização; (E) Sistema de recirculação; (F) Teto de proteção; (G) Sistema de suporte para o implemento agrícola.....	12
Figura 5	Fungo da podridão branca.....	14
Figura 6	Esquema do procedimento de extração do método multirresidual <sup>2</sup> , utilizado nos ensaios de fortificação e recuperação de agrotóxicos em camas biológicas.....	33
Figura 7	Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para análise de (A) extrato branco dos reagentes e solventes e (B) do “branco” da biomistura.....	36
Figura 8	- Resíduos das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS/MS (modo MRM), para os agrotóxicos (A) Tetrahydroftalimida, (B) Tebuconazol, (C) Fosmete, (D) Metidationa, (E) Clorpirifós, (F) Clorotalonil, (G) Fenitrotiona.....	39
Figura 9	Cromatograma total obtido a partir de uma solução analítica preparada em extrato “branco” de biomistura, na concentração de 250 µg kg <sup>-1</sup> , representando os sete agrotóxicos avaliados e o produto de degradação tetrahydroftalimida, obtido por GC-MS/MS (modo MRM). Cujos picos estão numerados de acordo com o tempo de retenção de cada agrotóxico: Tetrahydroftalimida (1), clorotalonil (2), fenitrotiona (3), clorpirifós (4), metidationa (5),	44

tebuconazol (6) e fosmete (7).....

Figura 10 Cromatograma total obtido por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada na concentração de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , apresentando os seis agrotóxicos estudados e o produto de degradação tetrahydroftalimida, numerados de acordo como tempo de retenção: 1-tetrahydroftalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete..... 48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	6
Tabela 2	Agrotóxicos estudados nos métodos individual e multirresidual, com suas respectivas classes, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.....	27
Tabela 3	Agrotóxicos estudados, tempos de retenção e parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos por GC-MS/MS.....	29
Tabela 4	Valores médios de RSD% obtidos por GS-MS/MS (modo MRM) para análise de biomistura "branco" fortificadas com os agrotóxicos estudados nas concentrações 100 e 200 µg kg <sup>-1</sup> e extraídas empregando o método 1 (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v)(n=3).....	37
Tabela 5	Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS, através da análise de biomistura "branco" fortificada com os agrotóxicos avaliados no método multirresidual, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 µgkg <sup>-1</sup> e extraídas empregando o método 2(acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) (n=3).....	38
Tabela 6	Parâmetros das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) e em extrato "branco" de biomistura, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).....	39
Tabela 7	Faixa linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método para os agrotóxicos estudados.....	43
Tabela 8	Efeito matriz calculado pela diferença da inclinação das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato "branco" de biomistura, em oito concentrações, injetadas sete vezes cada (n=7), para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS.....	46

Tabela 9	Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ , no estudo da exatidão e precisão do método multirresidual.....	46
Tabela 10	Valores médios de recuperação e RSD, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ , no estudo da precisão intermediária do método multirresidual (n=7).....	49
Tabela 11	Comparação entre os valores médios de recuperação e RSD (n=7) obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ , realizadas por dois analistas, no intervalo de três dias, no estudo da precisão intermediária.....	49

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 AGROTÓXICOS.....	3
<b>2.1.1 Definições</b> .....	3
<b>2.1.2 História dos agrotóxicos</b> .....	4
<b>2.1.3 Classificação</b> .....	6
2.2 CAMAS BIOLÓGICAS .....	8
<b>2.2.1 Componentes das camas biológicas</b> .....	11
<b>2.2.2 Componentes da biomistura</b> .....	13
<b>2.2.3 Fatores que afetam a eficiência das camas biológicas</b> .....	15
2.3 MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS	16
<b>2.3.1 Método de extração Luke e Mini-Luke</b> .....	16
<b>2.3.2 Método cromatográfico</b> .....	18
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO .....	20
<b>2.4.1 Seletividade</b> .....	21
<b>2.4.2 Curva analítica e linearidade</b> .....	22
<b>2.4.3 Limite de detecção</b> .....	22
<b>2.4.4 Limite de quantificação</b> .....	23
<b>2.4.5 Precisão</b> .....	23
<b>2.4.6 Exatidão</b> .....	25
<b>2.4.7 Robustez</b> .....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	26
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	26
3.2 GASES.....	27

3.3 REAGENTES E SOLVENTES .....	27
3.4 AGROTÓXICOS ESTUDADOS .....	28
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	28
3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS .....	29
<b>3.6.1 Condições cromatográficas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.2 Controle de qualidade.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6.3 Otimização do método de extração multirresidual .....</b>	<b>31</b>
<i>3.6.3.1 Otimização dos parâmetros de extração .....</i>	<i>31</i>
<i>3.6.3.2 Procedimento de extração do método 1.....</i>	<i>32</i>
<i>3.6.3.3 Procedimento de extração método 2.....</i>	<i>31</i>
<b>3.6.4 Validação do método multirresidual.....</b>	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1 MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS .....	36
<b>4.1.1 Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2 Otimização do método cromatográfico .....</b>	<b>38</b>
<i>4.1.2.1 Seleção do método de extração .....</i>	<i>38</i>
<b>4.1.3 Validação do método multirresidual.....</b>	<b>40</b>
<i>4.1.3.1 Curva analítica e linearidade .....</i>	<i>39</i>
<i>4.1.3.2 Limites de detecção e de quantificação .....</i>	<i>45</i>
<i>4.1.3.3 Efeito matriz .....</i>	<i>46</i>
<i>4.1.3.4 Exatidão e precisão .....</i>	<i>47</i>
<i>4.1.3.5 Precisão intermediária .....</i>	<i>49</i>
<i>4.1.3.6 Controle de qualidade .....</i>	<i>51</i>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são definidos como substâncias provenientes de diferentes processos como químicos, biológicos ou físicos, sendo utilizados para diversas finalidades, como por exemplo, no controle de pragas e doenças, a fim de evitar prejuízos e aumentar a produção agrícola. Sendo considerados danosos à saúde e ao meio ambiente, é necessário uma legislação específica tanto para produção e comercialização, transporte até o gerenciamento dos resíduos. (SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E IRRIGAÇÃO)

O Brasil tem sido considerado um grande produtor, devido às diversas atividades agrícolas existentes em diversas regiões do país, gerando assim um crescimento de 21% do Produto Interno Bruto (PIB), visto que o uso de agrotóxicos tem contribuído para esse crescimento na cadeia produtiva. (NOBREGA)

Tendo em vista que a aplicação de agrotóxicos é uma atividade onde a contaminação proveniente tanto da produção como do ambiente de trabalho é considerada intencional, deve-se levar em consideração a contaminação gerada para todo o meio. (ABRASCO, 2014)

Após a aplicação de agrotóxicos, seja na lavoura para o controle de pragas e doenças ou até mesmo no controle de ervas daninhas, tanto na lavoura como em pátios residenciais, com acapina química, essas substâncias permanecerão no meio ambiente, podendo sofrer algumas transformações como degradações biológicas ou decomposições químicas. Estes podem ainda serem transportados no ambiente por lixiviação, volatilização e carreamento superficial, levando a contaminação de águas, solo, e todo um ecossistema envolvido. (AGEITEC)

Além desta problemática, há ainda a questão dos maquinários envolvidos na aplicação destes agrotóxicos, pois entre diferentes aplicações, há a necessidade de lavar estes maquinários, com isso gerando resíduos os quais necessitam de um correto descarte. E existe ainda o risco de derramamento de agrotóxicos durante a diluição, sendo neste caso mais alarmante devido à alta concentração deste.

Dentre as possíveis transformações que podem ocorrer com os agrotóxicos no meio ambiente, dentre as mais importantes destaca-se a degradação biológica. Uma vez que se conhece sua importância e a capacidade dos

microrganismos de interagirem tanto física quanto quimicamente levando a quebra de moléculas até uma total degradação.

Originalmente desenvolvida na Suécia, as camas biológicas (*biobeds* na Europa) foram criadas como uma alternativa para evitar uma maior contaminação do meio ambiente com resíduos de agrotóxicos gerados com derramamentos acidentais e água de lavagem dos pulverizadores. Considerada, dentre os diferentes métodos de degradação de agrotóxicos, uma alternativa viável.

As camas biológicas são constituídas de compostos orgânicos, também chamado de biomistura, onde solo, palha, turfa, fungos lignolíticos que são responsáveis pela formação de enzimas como as peroxidases e as lactases, entre outras espécies de bactérias que podem ser benéficas para a degradação, são colocados em leitos impermeabilizados ou não e mantidos em teores adequados de umidade para permitir a sobrevivência bem como o desenvolvimento das bactérias.

Desta forma caso haja o derramamento da água contaminada sobre a cama biológica, esta será lixiviada através de todas as camadas, havendo assim a degradação dos contaminantes.

No Brasil, os estudos iniciais de testes e adaptação, relacionados às camas biológicas ainda estão em desenvolvimento, porém, o fato de ser um país de clima tropical, isto favorece a atividade e sobrevivência dos microorganismos, bem como a eficácia deste processo, que até o presente momento vem se mostrando eficaz. (GEBLER)

Desta forma, para avaliar a eficácia das camas biológicas são necessárias métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos. Assim, os métodos multiresiduais de extração em conjunto com técnicas avançadas de análise, como a cromatografia acoplada à espectrometria de massas vem se mostrando muito eficiente na detecção e quantificação de agrotóxicos.

Portanto o presente trabalho teve como objetivo a validação de um método analítico para determinação multirresidual de captana, clorotalonil, clorpirifós, fenitrotiona, metidationa, fosmete e tebuconazol em camas biológicas empregando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

## 2 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AGROTÓXICOS

#### 2.1.1 Definições

Tendo em vista a expansão da população mundial prevista pela ONU para 2050, que deve atingir a faixa de 9,8 bilhões de pessoas, havendo uma estabilização em 2100 com o número de aproximadamente 11,2 bilhões de pessoas no mundo, para suprir as necessidades mundiais, a produção de alimentos deve crescer cerca de 70%. (FAO)

Os obstáculos são grandes, visto que o território estará super ocupado e a produção agrícola deverá crescer mais que o dobro da atual. Com isso, o desenvolvimento de novas espécies, que produzem mais em menos tempo e até mesmo em regiões onde a disponibilidade hídrica e nutricional é decadente, é um campo em grande ascensão. Outra questão é o aumento do uso de agrotóxicos, visto que a demanda alimentar será grande, então a perda de produtividade por ataque de pragas e doenças será um ponto crítico.

Segundo a Lei Federal 7.802 de 11 de julho de 1989, agrotóxicos ou afins são definidos como:

a) os produtos e os agentes do processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

Uma denominação mais ampla é dada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) onde agrotóxico é definido como sendo qualquer substância utilizada com o intuito de prevenir, destruir ou controlar pragas, incluindo vetores de doenças humanas ou animais, que possam causar prejuízo ou interferir de alguma forma na produção, elaboração, armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos da madeira. Este termo inclui ainda, substâncias que são destinadas ao uso como reguladores de crescimento da planta, desfolhantes, dessecantes, agentes para desbaste de frutos ou que previnam a queda prematura de frutos, além das substâncias que são aplicadas nas diversas culturas, para proteger o produto da degradação durante o armazenamento e transporte, sendo estas aplicadas antes ou depois da colheita.

Outra questão dos agrotóxicos é quanto aos resíduos deixados tanto em alimentos sejam eles “in natura”, processados ou ainda em ração animal. Estes resíduos devem estar em concentrações o mais baixo possível a fim de garantir a segurança alimentar aos consumidores. Sendo que limite máximo de resíduos (LMR) é considerado como o nível de concentração mais alto de um determinado resíduo de agrotóxico que é legalmente tolerado seja em alimentos ou em ração levando em consideração a correta aplicação de agrotóxico nas cultivares baseado nas boas práticas agrícolas. (CODEX)

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras, como por exemplo, de acordo com a praga a que é destinado o uso, como por exemplo, acaricida, fungicida, inseticida, herbicida, rodenticida, nematicida, raticida. Ou ainda como agentes, dessecantes, desfolhantes, antibrotante e conservador de madeira. (ALMEIDA, W., FIÚZA, J., MAGALHÃES, C. M., JUNGER, C. M.).

Outras classificações levam em consideração a toxicidade ou ainda o registro de propriedade industrial. (VELASCO, L. O. M., CAPANEMA, L. X. L.)

### **2.1.2 História dos agrotóxicos**

Desde a antiguidade a humanidade vem sofrendo com as perdas causadas por pragas agrícolas. Relatos bíblicos dão conta de que houveram períodos de escassez devido a grandes invasões de gafanhotos nas plantações.

Além de muitas mortes decorrentes de fome, devido a doenças que acometiam plantações inteiras que serviam de alimento para toda uma população, como por exemplo, em 1845 na Irlanda, onde a doença requeima-da-batata devastou os batatais da região.

No Brasil, em regiões da Bahia, na época de início do inverno, a cultura do cacau foi devastada devido à doença conhecida como vassoura-de-bruxa, que ocorre pelo desenvolvimento de um fungo que pode acometer toda a planta. Este fato além de resultar em consequências econômicas, ocasionou o êxodo rural e desemprego, além de problemas ecológicos, com a destruição de parte da Mata Atlântica. (FLORES, A. V., RIBEIRO, J. N., NEVES, A. A., QUEIROZ, E. L. R.)

Ao longo dos tempos, o homem sempre buscou meios para combater pragas que assolavam suas plantações. Apesar do pouco conhecimento que tinham sobre a natureza bem como das pragas que atacavam suas plantações, o homem sempre buscou maneiras para tentar exterminar as pragas. Nesta busca, ele acabou descobrindo por meio de observação, diversos compostos químicos com eficácia para o extermínio ou prevenção de algumas pragas.

Em 2500 a. C. os sumérios utilizavam o enxofre no combate a insetos. Em 400 a. C., partir das flores secas de plantas do gênero *Chrysanthemum cinerariifolium* era extraído o piretro utilizado para controlar piolhos. Já no século XIV, eles começaram a utilizar ervas, óleos e cinzas no tratamento de sementes e grãos armazenados, como também compostos à base de arsênico e mercúrio no combate a piolhos e outras pragas. (BRAIBANTE, M. E. F., ZAPPE, J. A.)

Com o início da produção de inseticidas orgânicos sintéticos no final do século XIX e início do XX, que teve como marco a síntese de uréia a partir de cianato de amônio, descoberta pelo químico alemão Friedrich Wöhler.

Durante a segunda guerra mundial, os inseticidas orgânicos sintéticos começaram a se desenvolver, visto que foram muito usados para proteger os soldados de pragas como a transmissora da doença-do-sono, malária entre outros. Nesse período ainda, foram desenvolvidos diversos inseticidas, usados até os dias atuais. Entre eles o DDT, que é classificado como um organoclorado, que devido as características deste grupo de compostos, como por exemplo, a insolubilidade em água e solubilidade em líquidos apolares, como óleos e gorduras, acaba ocasionando o acúmulo destes no tecido adiposo dos organismos vivos, houve a

necessidade de se desenvolver outros compostos menos persistentes/perigosos. Foi então que surgiram os organofosforados e os carbamatos. (BRAIBANTE, M. E. F., ZAPPE, J. A.)

### **2.1.3 Classificação**

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras, quanto ao grupo químico, à natureza da praga a ser controlada, aos efeitos à saúde humana, entre outros.

Quanto à natureza da praga a ser controlada, os agrotóxicos podem ser classificados como, inseticida, sendo utilizado no controle de insetos, como por exemplo, o DDT, Aldrin que são classificados ainda como organoclorados, o Paration, Malation, Fenitrothion que são organofosforados, os carbamatos como por exemplo, o Carbofuran, Aldicarb, Carbaril, entre outras classificações existentes.

Para o controle de fungos são usados os fungicidas, como Mancozeb, Tiram, Metiram que fazem parte do grupo químico dos ditiocarbamatos, as fentalamidas, onde fazem parte o Captafol, Captana. Os herbicidas são aplicados nas culturas para o controle de planta daninhas, como exemplo tem-se o Profam, Cloroprofam, Bendiocarb pertencentes ao grupo químico dos carbamatos, o Round-up pertencente ao grupo do glifosato.

Já os desfoliantes são usados com o intuito de inibir ou destruir o crescimento de folhas, como por exemplo, o Diquat, o Paraquat que pertencem ao grupo químico dos dipiridilos. Outros exemplos são ainda os fumigantes, utilizado no combate a bactérias do solo, os rodenticidas, moluscocidas, nematicidas, acaricidas, etc. (PERES, F., MOREIRA, J. C., DUBOIS, G. S.)

Levando em consideração a toxicologia dos agrotóxicos, no Brasil o Ministério da Saúde os classifica segundo sua dose letal 50, ou seja, quantos miligramas do produto tóxico por quilo de peso são necessários para levar a óbito 50% dos animais de teste. Desta maneira, a cor da faixa do rótulo traz essa informação, como pode ser visto no quadro abaixo:

Tabela 1- Classificação toxicológica dos agrotóxicos

<b>Classe Toxicológica</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Dose Letal (50%)</b>	<b>Faixa Colorida</b>
I	Extremamente tóxico	< 5 mg/kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
III	Medianamente tóxico	entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	entre 500 e 5000 mg/kg	Verde

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), para um novo agrotóxico ser produzido, exportado, importado, comercializado e ainda utilizado, estes devem estar registrado em algum órgão federal, respeitando as diretrizes e exigências impostas por órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, da agricultura e do meio ambiente.

Cabe ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) realizar a avaliação de todos os agrotóxicos que são registrados no Brasil e, do potencial de periculosidade ambiental destes. (MMA)

Segundo o artigo 3º da lei Nº 7.802 de 11 de julho de 1989, é proibido o registro de agrotóxicos bem como de seus componentes e afins que:

a) para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;

b) para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;

c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;

d) que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;

e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;

f) cujas características causem danos ao meio ambiente.

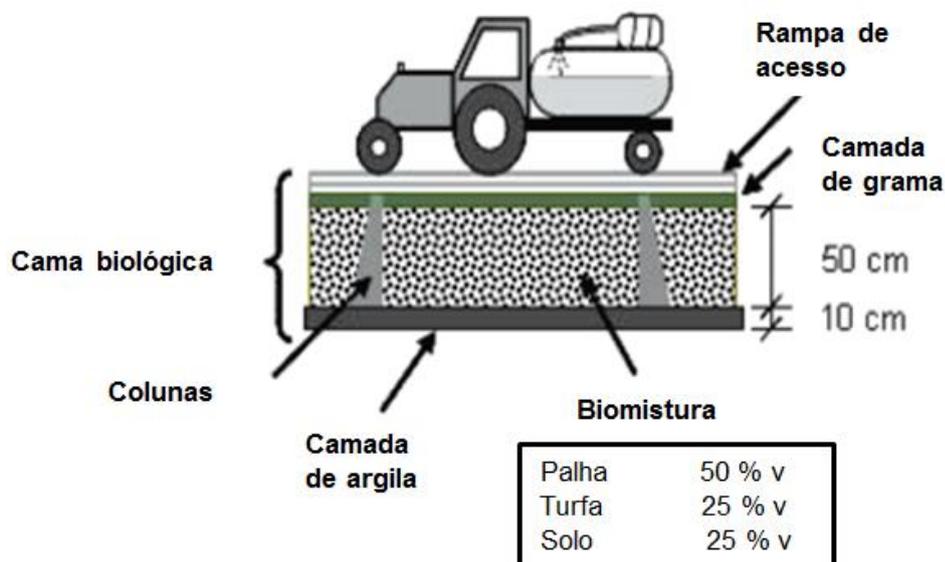
## 2.2 CAMAS BIOLÓGICAS

Visto que no Brasil não existe nenhuma legislação a respeito do descarte de resíduos de agrotóxicos provenientes da lavagem de pulverizadores ou de derrames acidentais, não se tem também informações sobre limites máximos toleráveis de resíduos das mesmas. No Brasil ainda não se tem estudos indicando a real eficiência do sistema, mas a Embrapa Uva e Vinho, localizada em Vacaria, RS está realizando os primeiros estudos com esse intuito. (CARNIEL, L. S. C.)

Desenvolvido na Suécia na década de 90, e desde então adaptado em outros países, como Dinamarca, Noruega, França, Bélgica, Inglaterra entre outros países (FOGG, P., BOXALL, A. B. A., WALKER, A.), o sistema de camas biológicas é uma maneira simples e barata de destinar corretamente os resíduos de agrotóxicos gerados na agricultura. A finalidade do sistema é de evitar que estes resíduos cheguem ao solo e cursos de águas, retendo e degradando as moléculas de agrotóxicos.

O modelo original consiste de três componentes básicos, argila que preenche 10 cm do fundo deste poço, uma biomistura composta de palha, turfa e solo em uma proporção de 2:1:1 (50:25:25 vol%), que está disposta sobre todo o espaço restante do poço, e por fim, é colocado uma camada de grama para cobrir. Para que o produtor consiga dispor os resíduos de sua propriedade sobre este leito, é possível ainda que ele construa uma rampa sobre este, a fim de que ele possa tanto dispor o resíduo final como também fazer a diluição do agrotóxico sobre a cama biológica como pode ser visto na figura 1 (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM)

Figura 2 - Esquema dos componentes da cama biológica original desenvolvida na Suécia



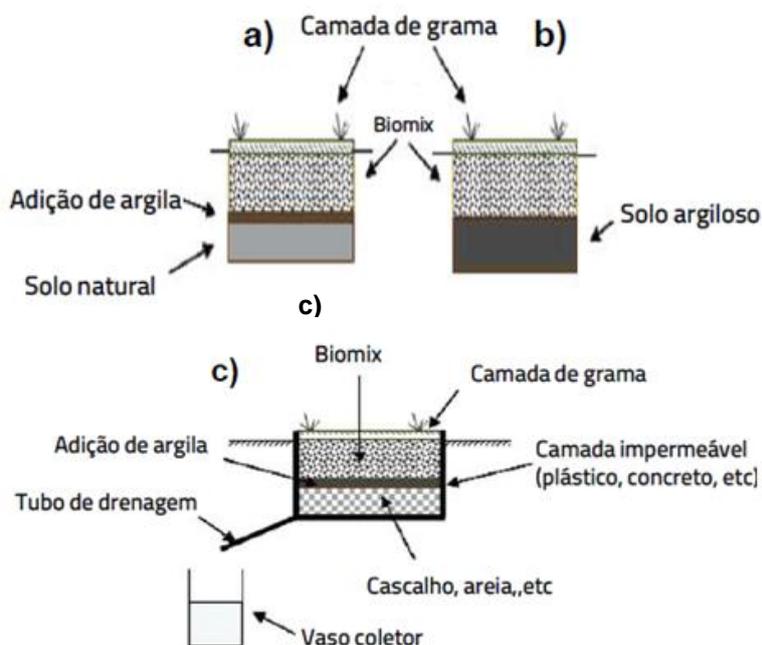
FONTE: CASTILLO,M.P.,TORTENSSON,L,STENSTRÖM

Os resíduos de agrotóxicos depositados sobre as camas biológicas são carregados através de processos como a lixiviação ao longo dos componentes da biomistura, que possui uma atividade microbiológica aumentada, fazendo com que os agrotóxicos sejam decompostos. (THE VOLUNTARY INITIATIVE)

Podem existir dois tipos de camas biológicas, podendo ser isoladas ou não do solo. O sistema não permeável é o que não possui uma barreira protetora que permite a drenagem da água na final. Então caso o solo em questão já tenha uma camada natural de argila ao fundo da cova não há a necessidade de se acrescentar a mesma, porém caso contrário, adiciona-se uma camada de argila. Este modelo é semelhante ao original da Suécia.

Já o sistema permeável possui um revestimento sintético impermeável, como por exemplo, concreto, plástico, lona, etc, que permite que ao final do processo, a água seja drenada para compartimentos especiais. Ainda para auxiliar na etapa de drenagem da água, muitas vezes é colocada uma camada de areia, cascalho entre outros ao fundo, antes da camada de argila. Como pode ser visto na figura 2 a diferença entre esses dois modelos. (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM)

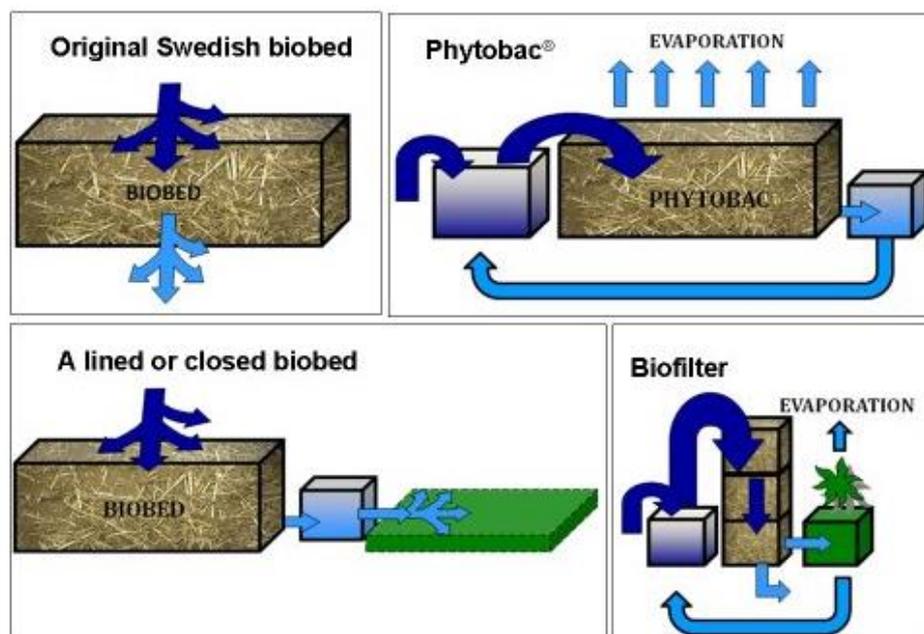
Figura 3 - Modelos de Biobeds, (a) com a adição de uma camada de argila (b) com uma camada natural de argila e (c) com o sistema isolado.



FONTE: CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM

A partir do modelo original de cama biológica, que apresentam baixo custo, simplicidade e eficiência em degradar os agrotóxicos evitando assim posteriores contaminações de solo e água, outros modelos foram sendo adaptados. Porém todas elas mantêm o mesmo conceito, onde a degradação dos agrotóxicos é aumentada devido à matriz biológica ativa que estas possuem que retém os agrotóxicos sobre a matéria orgânica ou partículas do solo. Na figura 3 podem ser vistos os quatro modelos já desenvolvidos. (BRICKSITE)

Figura 4 - Modelos de sistemas de camas biológicas - Original da Suécia, que não possui isolamento. Phytobac, com um sistema de mais de um ciclo na biomistura e no fim sofre evaporação. Sistema fechado onde no fim o resíduo é coletado, e o sistema com biofiltros.



FONTE: BRICKSITE

O aperfeiçoamento dessas camas biológicas é realizado levando em consideração as variações climáticas bem como temperatura do local. A ocorrência de chuvas é um fator a ser analisado, sendo que onde a ocorrência de chuva não é alta, o sistema geralmente adotado é o aberto, que possui uma degradação mais rápida dos agrotóxicos. Quando se tem uma maior probabilidade de o resíduo ser carregado antes de sua degradação, se adota o sistema fechado, onde o resíduo permanece por mais tempo no sistema, possibilitando assim uma degradação mais eficiente.

### 2.2.1 Componentes das camas biológicas

O componente mais importante da cama biológica é a biomistura, pois esta é a responsável pela retenção e a degradação dos agrotóxicos, devido aos microrganismos presentes que possuem a capacidade de degradar e por fim reduzir

a concentração ou até mesmo eliminar os contaminantes. Esta biomistura é composta por palha, turfa e solo na proporção de (2:1:1).

A cobertura vegetal, geralmente grama, é um elemento importante que aumenta a retenção dos resíduos na parte superior com o intuito de evitar a lixiviação, principalmente dos agrotóxicos que apresentam maior mobilidade, mantendo a umidade necessária na biomistura. Contribui também para a evapotranspiração permitindo uma maior degradação em nível de raiz, além de se conseguir detectar algum vazamento no pulverizador pela marca deixada na grama.

Uma camada de cascalho de aproximadamente 10 cm de espessura é colocada ao fundo do leito, acima da camada impermeabilizante, com a finalidade de se evitar a passagem de resquícios da biomistura que possam obstruir o sistema de drenagem e recirculação.

Com utilização opcional, a areia pode ser utilizada com a finalidade de atuar como um filtro mais fino que o cascalho, com uma camada de aproximadamente 5 cm de espessura.

O sistema de impermeabilização consiste de um revestimento de todo o leito com algum material impermeável, como por exemplo, concreto, plástico entre outros. É colocado para evitar que os agrotóxicos entrem em contato com as paredes adjacentes à cama biológica e se dispersem para o solo e lençóis de água.

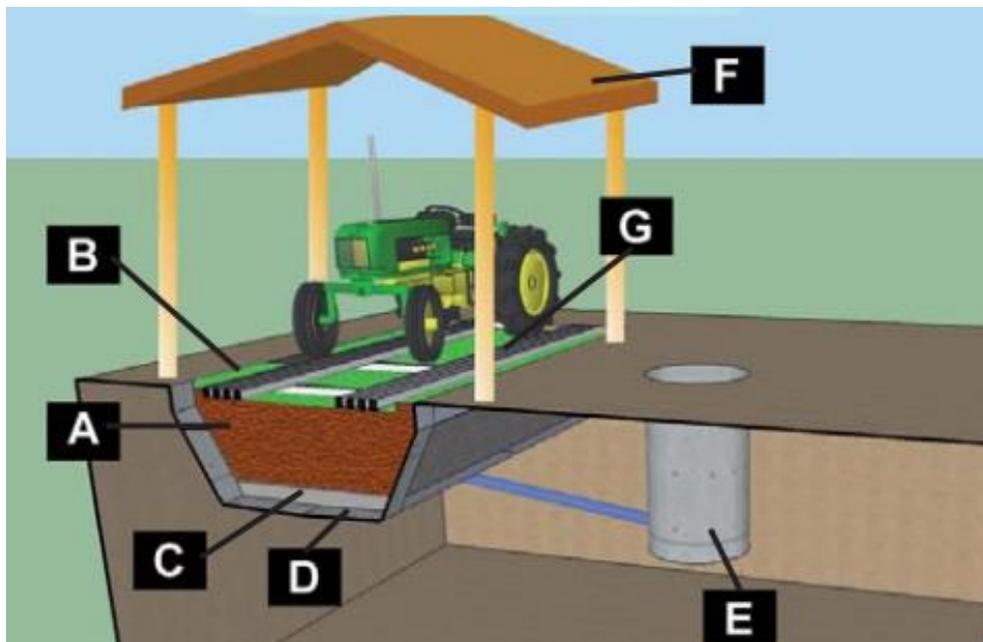
O sistema de suporte é construído sobre a cama biológica, com uma estrutura metálica ou de algum material que suporte o peso do trator mais o pulverizador. Consiste de uma rampa e pilares de sustentação.

O sistema de recirculação é implementado com a função de reter os líquidos provenientes do sistema de camas biológicas, podendo os mesmos retornarem ao início do processo. Consiste de um poço revestido com material impermeável, conectado ao final das camas biológicas através de tubulações e uma bomba para fazer a recirculação dos líquidos.

O teto de proteção é construído sobre a cama biológica para evitar a saturação do leito com água proveniente da chuva, pois caso isto ocorra deve-se esperar a água evaporar ou escoar totalmente pela biomistura antes de utilizar a cama biológica novamente. (JEREZ, M. C. D.)

Todos os componentes acima citados podem ser observados pela figura 4:

Figura 5 - Componentes da cama biológica. (A) Biomistura; (B) Cobertura vegetal; (C) Camada de cascalho; (D) Sistema de impermeabilização; (E) Sistema de recirculação; (F) Teto de proteção; (G) Sistema de suporte para o implemento agrícola



FONTE: JEREZ, M. C .D.

### 2.2.2 Componentes da biomistura

O solo compõe 25% da biomistura e deve ser extraído dos primeiros 20 centímetros de profundidade, excetuando-se os componentes vegetais. O solo contém diversos microrganismos que ajudam no processo de degradação dos agrotóxicos. Dependendo do pH e conteúdo de matéria orgânica, o solo tem a capacidade de reter os agrotóxicos.

O tipo de solo mais recomendado é o que contém grande quantidade de matéria orgânica ou ainda o solo arenoso. O menos recomendado, é o uso de solo argiloso, pois dificulta uma boa homogeneização da biomistura, como também tende a se agregar com a água dificultando a permeabilização dos líquidos através da biomistura.

A turfa é um material esponjoso proveniente de um tipo específico de musgo que tem a capacidade de absorver uma grande quantidade de água, ajudando no controle da umidade e favorecendo a aeração. Esta contém

aproximadamente 60% de carbono, 30% de oxigênio, 6% de hidrogênio e 2% de nitrogênio.

A turfa também contribui para diminuir o pH, favorecendo a atividade de fungos e enzimas que degradam os agrotóxicos. (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, J.)

Outro fator importante é a limitação de nutrientes, principalmente nitrogênio, que ajuda a ativar o sistema de degradação da lignina pelos fungos, por isso, não se recomenda a adição de nutrientes ao biocomposto. (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, J.)

Tendo em vista que a turfa é um recurso natural não renovável, a aquisição deste componente representa um custo importante. Porém, como uma alternativa para contornar este problema, pode-se substituir parcialmente a turfa por carvão vegetal, que também possui a capacidade de adsorver contaminantes orgânicos além de ser um recurso mais acessível e ter menos custo.

A palha é um material orgânico, com alto teor de lignina e celulose. Se obtém principalmente no campo como resíduo da colheita de leguminosas e gramíneas, como palha de arroz, milho entre outros. Possui grande importância, pois favorece o desenvolvimento de microrganismos, como os fungos da podridão branca, que possuem elevada capacidade de degradar os agrotóxicos.

Para que se obtenha uma adequada homogeneização da palha à biomistura, se aconselha que esta palha esteja em partículas menores que 10 cm.

Apesar de ser de fácil obtenção para o setor agrícola, a palha muitas vezes é um componente de difícil acesso para o setor frutícola, por exemplo. Neste caso, existem algumas alternativas, como o uso de serragem, casca de cevada ou casca de aveia. Porém as características da biomistura são alteradas com essa substituição, tanto total como parcial. (JEREZ, M. C. D.)

A função da palha é estimular o crescimento de fungos da podridão branca (figura 5), que tem a capacidade de degradar a lignina, através da formação de enzimas fenoloxidas como as peroxidases e as lacases. ((CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, J.). Devido a sua alta especificidade essas enzimas são as mais adequadas para a degradação de agrotóxicos. (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM)

Figura 6 - Fungo da podridão branca



FONTE: CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, J.,

### **2.2.3 Fatores que afetam a eficiência das camas biológicas**

A decomposição biológica de agrotóxicos tem sido eficiente para a remoção destes do meio ambiente, visto que os microrganismos têm a capacidade de interagir tanto física como quimicamente com substâncias, levando desde a mudanças estruturais até total degradação. Dentre as diversas comunidades microbianas, bactérias, fungos e actinomicetos são os principais biotransformadores, porém são principalmente os fungos que transformam os agrotóxicos em outros xenobióticos, através de alterações estruturais que os transformam em espécies não tóxicas. (DIEZ, M. C.)

A eficiência da cama biológica é medida pela capacidade que possui de reter e degradar agrotóxicos. Deste modo, a composição da biomistura é um fator importante para a sorção dos agrotóxicos e para uma eficaz atividade microbiológica, fato que determina a importância da presença de componentes com alto teor de lignina, como por exemplo, palha, casca de aveia entre outros.

São vários os fatores que contribuem para uma atividade ótima das camas biológicas, como por exemplo, a composição da biomistura, temperatura, disponibilidade de água, homogeneidade dos componentes e a concentração dos agrotóxicos. (CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM.)

## 2.3 MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos busca-se um método que seja eficiente, rápido, confiável, de baixo custo, ambientalmente correto e capaz de analisar diversas classes de agrotóxicos em concentrações menores que o limite máximo de resíduo. (OSHITA, D., JARDIM, I. C. S. F.)

O método multiresíduo, utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos geralmente é utilizado em laboratórios devido a simplicidade de determinação de muitos agrotóxicos de diversas classes e de muitos princípios ativos, requerendo apenas uma simples extração, dessa maneira facilitando a demanda rápida e eficiente do monitoramento.

A etapa mais crítica de um método multiresíduo é o preparo da amostra, devido à grande gama de compostos que podem ser extraídos bem como a ineficiência da extração dos analitos de interesse devido a complexidade de muitas matrizes. Um exemplo disto são os agrotóxicos que possuem estruturas complexas e características próprias. (KUSSUMI, T. A.)

Os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos, geralmente consistem de uma etapa de preparo da amostra, onde se realiza a homogeneização da amostra, seguida da extração dos analitos da matriz, em seguida é realizada a limpeza do extrato a fim de remover possíveis interferentes, quando necessário, pode se realizar a etapa de concentração, utilizada geralmente quando se necessita trocar o solvente para por fim efetuar a determinação qualitativa e quantitativa através de técnicas instrumentais. (KONATU, F. R. B.)

### 2.3.1 Método de extração Luke e Mini-Luke

O método de Luke foi desenvolvido em 1975, com o objetivo de se obter um método que fosse capaz de quantificar quase todos os pesticidas polares e apolares, como também hidrocarbonetos como bifenila e ortofenilfenol. Porém existia a dificuldade em se determinar compostos que possuíam caráter iônico permanente, e conseqüente análise por CG. (PIZZUTTI, I. R.)

Originalmente este método consistia em uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando 200 mL de acetona, seguida de uma partição líquido-líquido, com 100 mL de éter de petróleo e 100 mL de diclorometano.

Várias otimizações deste método foram sendo feitas ao longo dos anos a fim de se aperfeiçoar o método para que se conseguisse principalmente diminuir os volumes de solventes bem como de amostra utilizados, porém mantendo bons valores de recuperações em baixos níveis de concentração.

Outro ponto são os tipos de solventes utilizados, visto que o método de Luke bem como a miniaturização deste método, conhecida por mini-Luke utilizam solventes clorados como diclorometano, o que constitui um risco ambiental sendo um problema no momento do descarte.

Visto isso, foi desenvolvido então a miniaturização no método de mini-Luke, denominado de New Dutch mini-Luke. Este método possui a capacidade de extrair tanto solventes polares como apolares, pois utiliza acetona como solvente de extração e éter de petróleo e diclorometano como solventes de partição. ( LOZANO, U. KIEDROWSKA, B., SCHOLTEN, J., KROON, H., KOK, A., FERNÁNDES-ALBA, A. R.)

Em 2014, uma importante otimização foi realizada, onde neste novo método, 15 g de amostra foram extraídos pela adição de 20 mL de acetona, em seguida foi adicionado 15 g de sulfato de sódio seguido de agitação em ultraturrax. Para a etapa de partição acrescentaram-se 20 mL de éter de petróleo e 10 mL de diclorometano. O extrato resultante é evaporado e posteriormente reconstituído em isoctano e tolueno para posterior análise por GC-MS/MS. (DIAS, J. V.)

Neste trabalho, o método utilizado foi a mais recente otimização do método New Dutch mini-Luke realizada por Dias (2017), pois oferece diversas vantagens como a velocidade de extração, pelo fato de não possuir a etapa de evaporação ou purificação, boa limpeza dos extratos, visto que não se aplica a etapa de purificação, a troca de solvente clorado por outros menos danosos ao meio ambiente, além de ser compatível com os detectores utilizados na cromatografia gasosa, e espectrômetros de massa.

### 2.3.2 Método cromatográfico

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, as técnicas que geralmente são empregadas são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massas. Porém, como não existe nenhuma legislação a respeito de técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas, essas técnicas cromatográficas também podem ser aplicadas a este tipo de matriz, visto a eficiência destas.

Existem variados tipos de espectrômetros de massas que podem ser empregados na cromatografia como, por exemplo, single quadrupolo, triplo quadrupolo (TQ do inglês *Triple quadrupole*), armadilha de íons (ITD, do inglês *IonTrap Detector*), tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e a armadilha de íons orbital (ORBITRAP, do inglês, *Orbital IonTrap*). Estes podem operar em diferentes modos de ionização como a ionização química, a ionização por impacto de elétrons, ionização química a pressão atmosférica e a ionização por eletronebulização. (DIAS, J. V., SANTE)

A espectrometria de massas pode ainda ser combinadas com outras técnicas de separação, porém estas são menos comuns, como a eletroforese capilar, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia de permeação em gel. (CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.).

A combinação da espectrometria de massas com a cromatografia gasosa é muito eficiente para identificação de um analito no extrato final de uma amostra, pois tem a capacidade de fornecer simultaneamente dados de tempo de retenção, taxas de massa/carga e a intensidade destas. (SANTE)

A espectrometria de massas possibilita ainda acoplar dois desses analisadores descritos acima, ou seja, a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas. Nesta técnica, primeiramente um espectrômetro isola o íon de interesse e o outro estabelece uma relação entre o íon isolado e os outros íons gerados. Devido a capacidade de possibilitar o aumento da detectabilidade, reduzir a interferência de outros componentes da matriz além de ainda aumentar a quantidade de informações estruturais obtidas, esta técnica vem sendo muito empregada para a detecção e quantificação de compostos que estejam presentes em baixas concentrações na matriz. (CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.)

### 2.3.2.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica baseada na separação dos analitos de uma amostra, após esta passar pela etapa de extração, onde as diferentes substâncias presentes, são distribuídas entre a fase estacionária, podendo esta ser sólida ou líquida e uma fase móvel, neste caso um gás inerte.

A fase móvel tem apenas a função de arrastar a amostra através da coluna para que os analitos sejam separados. Já a fase estacionária tem a função de separar os analitos por interação diferencial. (COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S.)

Na década de 60, a CG utilizando colunas empacotadas foi adotada devido a capacidade de análise multiresidual de agrotóxicos. No início, eram utilizados os detectores por captura de elétrons (ECD), pois possibilitava uma determinação simultânea de diversos agrotóxicos halogenados. Devido ao seu sucesso, foram desenvolvidos diversos outros detectores seletivos, como por exemplo, o detector de nitrogênio e fósforo (NPD), o detector fotométrico de chama (FPD) os quais são seletivos para compostos que tenham determinados elementos em sua estrutura. Porém, não é possível a obtenção das informações estruturais dos analitos, inviabilizando uma confirmação precisa da estrutura. (HOFF, G. R., ZONEN, P.)

A cromatografia gasosa tem como vantagem, a transferência do analito para o detector já na fase gasosa, evitando dessa maneira, perdas decorrentes da nebulização da amostra, como ocorre na cromatografia líquida, aumentando assim a sensibilidade do método. Porém, para que o composto possa ser analisado por esta técnica, ele necessita ser volátil, ou deve ser passível de derivatização. (CAMPOS, R. C., GRINBERG, P. )

Desta maneira, quando são utilizadas colunas capilares, pode-se conectar a saída da coluna diretamente a fonte do espectrômetro, visto que em condições normais de operação, o bombeamento do espectrômetro de massas é capaz de captar todo o eluente da coluna. Mas quando são utilizadas colunas recheadas, deve-se diminuir a vazão do eluente. O interfaceamento pode ser feito por meio de um separador de jato, constituído por dois capilares alinhados, tendo vácuo estabelecido entre eles por meio de uma bomba. Assim, quando o eluente da coluna atravessa o primeiro capilar, grande parte do gás de arraste é bombeado para fora

dos capilares devido ao baixo peso molecular, enquanto que os analitos, por possuírem maior massa molecular, mantêm-se em um fluxo linear, penetrando no segundo capilar que direciona para a fonte de íons do espectrômetro de massas.

Quanto aos métodos de ionização, os mais empregados na cromatografia gasosa são a ionização por impacto de elétrons e a ionização química.

Na ionização por impacto de elétrons, o analito de interesse, em fase gasosa é bombardeado com um fluxo de elétrons de alta energia, geralmente em torno de 70 eV. As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, como a ionização do analito pela remoção de um elétron, ( $M^+$ ), porém este processo requer pouca energia, geralmente 10 eV, o restante da energia gera a fragmentação do analito. Sendo este um dos maiores problemas deste tipo de ionização, pois a fragmentação rápida pode levar a não observação do íon molecular no espectro.

Para solucionar este problema relacionado ao uso da IE, desenvolveu-se a técnica de ionização química. Nesta técnica, as moléculas do analito em fase gasosa são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, contendo o gás reagente, essa mistura é bombardeada com elétrons. Porém, como o gás está em excesso em relação ao analito, passa então a ocorrer reações entre íons em fase gasosa do gás e as moléculas neutras do analito  $[M+H]^+$ . Por necessitar de pouca energia, quase não é observada fragmentação. (CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.)

## 2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Cada vez mais é exigida a necessidade de se mostrar a qualidade de medições através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade pois dados analíticos não confiáveis podem levar a decisões erradas e conseqüentemente prejuízos financeiros irreparáveis. Para se ter a garantia de que um novo método gere informações confiáveis e interpretáveis sobre determinada amostra, este deve sofrer uma avaliação denominada de validação.

Na literatura, constam diversas definições de o que é validação, como por exemplo:

“Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos;” (ANVISA)

“Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.” (INMETRO)

No Brasil, existem dois órgãos regulamentadores da validação de métodos analíticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO),( RIBEIRO,F.A.L., FERREIRA,M.M.C.)

Segundo a ANVISA, os parâmetros de validação, bem como os respectivos critérios de aceitação, devem ser definidos de acordo com as características do analito e também da natureza do método.

Para que qualquer técnica analítica tenha um bom desempenho, dois parâmetros devem ser atendidos: a qualidade das medidas instrumentais bem como a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Portanto, para assegurar a aplicabilidade e alcance de um método, devem ser estabelecidos limites para estes parâmetros através da estimativa das figuras de mérito que são: a seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da faixa de linearidade, a sensibilidade do método representada pelos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão, exatidão e robustez. (RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA, M. M. C)

#### **2.4.1 Seletividade**

A seletividade de um método instrumental de separação se refere à capacidade de avaliar a substância de interesse de forma inequívoca, na presença de outros componentes que possam interferir na determinação do mesmo em uma amostra complexa. Ou seja, deve-se ter a garantia de que o pico de resposta seja exclusivamente da substância de interesse.

Se a seletividade não for assegurada, ela compromete a linearidade, a exatidão e a precisão. (RIBANI,M.)

### 2.4.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica é utilizada como ferramenta de quantificação correspondendo ao modelo matemático que estabelece uma relação entre resposta instrumental (área/altura do pico cromatográfico) sendo o eixo y, e a concentração do analito sendo o eixo x. Sendo esta relação matemática por vezes expressa como uma equação de reta denominada curva analítica.

Relacionando-se as variáveis x e y tem-se uma equação de regressão linear ( $y = ax + b$ ) onde é possível gerar os coeficientes de regressão a partir da relação das duas variáveis: **a** sendo a inclinação da curva e **b** a interseção da curva analítica com o eixo y, quando  $x=0$ .

Além disso, é possível calcular ainda o coeficiente de correlação r, que permite estimar a qualidade das curvas obtidas, sendo que quanto mais próximo de 1,0 menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. (RIBANI, M.)

A linearidade de um método analítico se refere à habilidade, dentro de uma determinada faixa, de obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra. (INMETRO)

### 2.4.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) de um método analítico se refere a menor concentração do analito que pode ser detectado pelo equipamento, porém não necessariamente quantificada.

O valor de LOD pode variar dependendo o tipo de amostra, por isso deve se ter certeza de que todas as etapas do método analítico sejam incluídas na determinação deste valor.

Na prática o limite de detecção é determinado como sendo a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído. Sendo que o ruído é a amplitude da linha base, incluindo todas as variações do sinal do detector onde a amplitude esteja na ordem de um ou mais ciclos por minuto (LANÇAS, F. M.)

O LOD pode ser calculado de diversas maneiras, como pelo método visual, pelo método da relação sinal/ruído ou ainda pelo método baseado em parâmetros da curva analítica onde o limite de detecção é definido pela equação 1.

$$LOD = 3,0 \times s/S$$

Equação 1

Onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão do branco e  $S$  é a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica. (RIBANI, M.) Sendo que este método é o que fornece os melhores resultados para determinações a nível de traço. (INMETRO)

#### 2.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) corresponde a menor concentração do analito passível de ser quantificado por um determinado método analítico com precisão e exatidão satisfatórias. (INMETRO)

O LOQ pode ser calculado da mesma forma que o limite de detecção, porém a equação utilizada quando se calcula pelo método baseado em parâmetros da curva analítica é determinado pela equação 2

$$LOQ = 10 \times s/S$$

Equação 2

Onde  $s$  corresponde ao desvio padrão da resposta do branco ou ainda quando o branco não gera sinal, pode se utilizar o valor do menor nível da curva analítica, e  $S$  corresponde à inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

#### 2.4.5 Precisão

A precisão é um termo utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, analisados em condições definidas.

As três formas mais comuns de expressar a precisão é por meio da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. (INMETRO)

Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), através da equação 3:

$$RSD(\%) = \left( \frac{s}{xm} \right) \times 100$$

Equação 3

Onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão absoluto,  $x_m$  é o valor médio das determinações. Sendo que para métodos de análise de traços são aceitos valores de RSD% de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra. (RIBANI, M.)

#### *2.4.5.1 Repetibilidade*

A repetibilidade expressa a coerência entre diferentes medições obtidas a partir do mesmo procedimento em um conjunto de condições como os mesmos operadores, mesmo sistema de medição, mesmo local e condição de operação incluindo mesmos objetos ou objetos similares, durante um curto período de tempo. (INMETRO)

O número de repetições a serem realizadas varia segundo as referências dos órgãos responsáveis. O INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. Já a ANVISA sugere que sejam realizadas no mínimo nove determinações no limite especificado do procedimento, ou então seis determinações em uma concentração parecida com o valor esperado. (RIBANI, M.)

#### *2.4.5.2 Precisão intermediária*

A precisão intermediária se refere à precisão avaliada sob o mesmo procedimento, mesmo local e objetos, por um longo período de tempo, porém variando algumas condições definidas, como analistas, equipamento, tempo, representando assim a variabilidade dos resultados dentro de um mesmo laboratório. (INMETRO)

#### *2.4.5.3 Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade define a precisão de um método, através dos resultados obtidos em uma mesma análise por diferentes laboratórios. (RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA, M. M. C.)

Geralmente testes de reprodutibilidade são realizados quando se busca uma padronização metodológica, como por exemplo, métodos citados nas farmacopéias. Ou seja, busca-se certificar se um método pode ser transferido de um laboratório para outro, porém com resultados em concordância com o estabelecido. Tratando-se da precisão interlaboratorial. (LANÇAS, F. M.)

#### 2.4.6 Exatidão

A exatidão mostra a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro relacionando com o erro absoluto de uma medida.

Para a avaliação da exatidão de um método, podem ser utilizados diversos métodos como, por exemplo, materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão entre outros.

A ANVISA recomenda que a exatidão seja expressa como a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, como visto na equação 4.

$$\text{Exatidão} = \left( \frac{C_e}{C_t} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $C_e$  é a concentração média experimental e  $C_t$  é a concentração teórica. (ANVISA)

#### 2.4.7 Robustez

A robustez é definida como a medida da capacidade de um método de não sofrer alterações mediante pequenas variações introduzidas nos parâmetros do método. (LANÇAS, F. M.)

- i) esta pode ser avaliada em um método cromatográfico, por exemplo, através da variação de alguns parâmetros, como concentração do solvente orgânico, programação de temperatura, natureza do gás de arraste no caso da CG, como também durante a extração, como a variação do tempo de agitação, etc. (RIBANI, M.)

### 3 MATERIAIS E MÉTODO

O desenvolvimento deste trabalho consistiu na validação do método multiresidual para determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (GC-MS/MS).

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) em parceria com a Estação de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT) da Embrapa Uva e Vinho (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada na cidade de Vacaria, RS.

A biomistura “branco” (sem agrotóxico) e as amostras contaminadas utilizadas para o desenvolvimento do método foram fornecidas pela Embrapa.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- - Cromatógrafo a gás 450 (Varian, Holanda);
- Amostrador automático modelo 8400 (Varian, Holanda);
- Injetor modelo 1079 PTV (Varian, Holanda), com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm. Modo de injeção split/splitless (1:5);
- Coluna capilar VF-5 MS (95% metilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 30m x 0,25 d.i. x 0,25 µm de espessura de filme (VarianChrompack, Holanda);
- Espectrômetro de massas TQ-MS 320 (Bruker, EUA) com sistema de aquisição de dados Workstation 6.6 (Varian, EUA);
- Homogeneizador Polytron modelo PT/MR 3100 (Kinematica, Suíça);
- Centrífuga modelo HareusVarífuge (Thermo Scientific, Alemanha);
- Compressor de ar ambiente com reserva horizontal para resfriamento do injetor (Chiaperini Industrial, Brasil);
- Balança analítica com precisão de quatro casas decimais PM 600 (Metler, Suíça);

- Balança analítica com precisão de duas casas decimais PM 600 (Metler, Suíça);
- Sistema de purificação de água Mili-Q ELIX (Milipore, Brasil);
- Dispensadores de volume, capacidade de 10, 30 e 50 mL (Brand, Alemanha);
- Micropipetadores automáticos de várias capacidades (Brand, Alemanha);
- Pipetador Hand Step (Brand, Alemanha);
- Concentrador modelo Rapidvap (Labconco Corporation, EUA);
- Frascos de vidro âmbar, com capacidade de 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueável e batoque de teflon e silicone (Bester, Holanda);
- Vidrarias comuns de laboratório (béqueres, balões volumétricos calibrados, entre outros);
- Tubos de polipropileno, com tampa rosqueável, com capacidade de 250 mL.

### 3.2 GASES

- Hélio 99,999% de pureza (Air Gases, Brasil) – gás de arraste;
- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquid, Brasil) – gás de colisão.

### 3.3 REAGENTES E SOLVENTES

- Água purificada em sistema Mili-Q ELIX (Milipore, Brasil);
- Material de referência dos agrotóxicos selecionados para este estudo incluindo os padrões internos marcados com pureza acima de 98,0%, Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha);
- Acetona, tolueno e ácido fosfórico, grau resíduo (Mallinckroft, EUA);
- Isoctano grau resíduo (Lab-ScanAnalyticalsciences, Irlanda);

### 3.4 AGROTÓXICOS ESTUDADOS

Para este estudo, foram selecionados sete agrotóxicos para serem determinados em camas biológicas. As características dos agrotóxicos estudados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Agrotóxicos estudados no método multiresidual, com suas respectivas classificação toxicológica, fórmula molecular, classe e grupo químico.

Agrotóxico	Classificação toxicológica	Fórmula molecular	Classe	Grupo químico
Captana	Classe IV	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	Fungicida	Dicarboximida
Clorotalonil	Classe III	$C_8Cl_4N_2$	Fungicida	Isoftalonitrila
Clorpirifós-etílico	Classe II	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Inseticida, formicida e acaricida	Organofosforado
Fenitrotiona	Classe II	$C_9H_{12}NO_5PS$	Inseticida e formicida	Organofosforado
Fosmete	Classe I	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	Inseticida e acaricida	Organofosforado
Metidationa	Classe II	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	Inseticida e acaricida	Organofosforado
Tebuconazol	Classe IV	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	Fungicida	Triazol

### 3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

A solução estoque de cada agrotóxico, bem como as soluções dos padrões internos marcados, foram preparadas em tolueno e armazenadas em frasco âmbar em congelador à  $-18^{\circ}C$  e antes de serem utilizadas, foram retiradas do congelador a fim de atingirem a temperatura ambiente. A partir do grau de pureza dos padrões de referência dos agrotóxicos foi possível calcular a massa necessária de cada um a ser pesada para se obter no final uma solução com concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Foram preparados 50 mL de uma solução mistura intermediária na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , contendo todos os sete agrotóxicos, com exceção do

produto de degradação tetrahidroftalamida e dos padrões internos, sendo usado como solvente isoctano:tolueno (9:1, v/v).

Esta solução mistura foi utilizada para os estudos de linearidade, efeito matriz, fortificação e recuperação como também no preparo das soluções analíticas utilizadas na confecção das curvas analíticas, em extrato “branco” como também em solvente orgânico, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300 ng mL<sup>-1</sup>.

As soluções analíticas dos padrões internos foram preparadas em tolueno a partir de diluições da solução estoque individual de cada agrotóxico. A solução do padrão interno do procedimento (PCB-153) e do instrumento (HCB-C13) foram preparadas nas concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

O preparo do solvente de extração empregado, (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v), contendo o padrão interno do procedimento (PCB-153, 50 ng mL<sup>-1</sup>), foi feito transferindo-se para um balão volumétrico de 1L, 980 mL de acetona seguido da adição de 10 mL de água e 10 mL de ácido fosfórico e por fim 50 µL da solução estoque do padrão interno do procedimento na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>.

### 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS

As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram estabelecidas a partir do estudo otimizado e validado para determinação multiresidual de agrotóxicos em frutas e vegetais, desenvolvido por Dias et al. (2017).

#### 3.6.1 Condições cromatográficas

- Volume de injeção: 5µL;
- Modo de injeção: *split* (razão 1:5);
- Rampa de temperatura do forno da coluna: 80 °C (1,0 min), 180 °C a 25 °C min<sup>-1</sup>, 280 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> e 300 °C a 30 °C min<sup>-1</sup> (1,0 min);
- Temperatura do injetor: rampa iniciando em 80 °C (0,1 min), aumentando para 300 °C a 200 °C min<sup>-1</sup> (20 min);
- Gás de arraste: hélio;
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>;



Neste estudo, foram avaliados dois diferentes métodos com o intuito de verificar qual seria o mais eficiente. Ou seja, qual método traria os melhores resultados visando também a economia de reagentes e de etapas de procedimento visto que este é um fator que pode vir a gerar perda dos analitos.

Para o método 1, o P.I.P. foi adicionado na concentração de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  diretamente no solvente de extração e o P.I.I. foi adicionado na mistura de solventes utilizado para reconstituir o resíduo de evaporação da amostra, neste caso isoctano:tolueno (9:1, v/v) na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para o método 2, as biomisturas 'branco' foram fortificadas com  $25 \mu\text{L}$  da solução de PCB-153 esta na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e a solução do padrão interno do instrumento (P.I.I.) HCB-C13 na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foram adicionados  $10 \mu\text{L}$  em vial já contendo  $990 \mu\text{L}$  do extrato em isoctano:tolueno (9:1, v/v), antes das análises por GC-MS/MS.

### **3.6.3 Otimização do método de extração multirresidual**

#### *3.6.3.1 Otimização dos parâmetros de extração*

Com o objetivo de se obter um método eficiente para a extração e determinação dos agrotóxicos clorpirifós, fenitrothion, metidationa, fosmete, captana e seu produto de degradação tetrahydroftalimida, clorotalonil e tebuconazol, foram testados dois métodos de extração multirresidual. O primeiro método (método 1) foi baseado no método proposto por Quatrinet al. (2017), sendo este especificamente desenvolvido para a determinação de clorpirifós em camas biológicas. Já o segundo método (método 2) foi baseado na otimização do método que foi otimizado por Dias et al. (2017) que consiste do método mini-Luke para determinação multirresidual de agrotóxicos em frutas e vegetais.

As alíquotas da biomistura "branco" foram fortificadas nas concentrações de  $100$  e  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , em triplicata para cada concentração as quais foram extraídas separadamente com os dois métodos de extração. Inicialmente foram considerados apenas os valores de recuperação e de desvio padrão relativo (RSD %).

### 3.6.3.2 Procedimento de extração do método 1

Inicialmente uma alíquota de  $5 \pm 0,5$  g da biomistura homogeneizada foi pesada em um tubo de centrífuga de PTFE com capacidade para 250 mL. Em seguida a amostra foi fortificada com uma solução contendo a mistura dos agrotóxicos selecionados neste estudo, nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionando-se 100 e 200  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da solução mistura 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Essa amostra foi extraída com 30 mL da mistura acetona:água:ácido fosfórico (98:1:1, v/v/v) contendo o padrão interno do procedimento, PCB-153 (50  $\text{ng mL}^{-1}$ ) através de agitação empregando homogeneizador ultra-turrax por 1 minuto a 15.000 rpm.

A amostra foi centrifugada a 3300 rpm durante 5 minutos e após foi retirada uma alíquota de 2 mL da camada superior (solvente orgânico) a qual foi filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Com o objetivo de determinar o melhor fator de concentração do método, foram utilizados dois volumes diferentes do extrato já filtrado para as etapas de evaporação e reconstituição. Para o primeiro teste foram utilizados volumes do extrato de 125  $\mu\text{L}$  e para o segundo teste volumes de 1000  $\mu\text{L}$ , que foram evaporados em concentrador (50 °C, 450 mBar, 7 minutos) até securo. Posteriormente, foram reconstituídos com 250  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$ , respectivamente, de isoctano:tolueno (9:1, v/v) contendo o padrão interno do instrumento (HCB-C13) a 100  $\text{ng mL}^{-1}$ . E por fim o extrato de ambos os procedimentos foi injetado no sistema GC-MS/MS.

### 3.6.3.3 Procedimento de extração do método 2

Para este procedimento, inicialmente foram pesados  $10 \pm 0,5$  g da biomistura já homogeneizada, em um tubo de centrífuga de PTFE com capacidade de 250 mL. Em seguida, a amostra foi fortificada com uma solução contendo a mistura dos agrotóxicos selecionados neste estudo, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionando-se 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da solução mistura 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Ainda nesta etapa, foi feita a fortificação das amostras de biomistura com 25  $\mu\text{L}$  o padrão interno do procedimento (PBC-153), na concentração de 100  $\text{mg L}^{-1}$ .

Após, foram adicionados 20 mL de acetona e a mistura foi agitada com ultra-turrax por 20 s a 3800 rpm. Em seguida acrescentou-se 20 mL de isoctano e 10 mL de tolueno seguido de homogeneização com o ultra-turrax por 20s a 3800 rpm. A amostra foi centrifugada a 3300 rpm por 5 minutos e em seguida retirou-se uma alíquota de 2 mL da camada superior (solvente orgânico), que foi filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$ . Por fim, 990  $\mu\text{L}$  do extrato filtrado foi transferido para um vial e acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de HCB-C13 na concentração de 10  $\text{mg L}^{-1}$ , perfazendo um volume final de 1 mL. Esse extrato foi injetado diretamente no sistema GC-MS/MS.

### **3.6.4 Validação do método multiresidual**

Como documento de orientação para a validação deste método foi utilizado o guia DG-SANTE N.11813/2017 (SANTE). Embora o documento seja aplicado para a determinação de agrotóxicos em alimentos e em ração animal, foi utilizado para este estudo tendo em vista que não há nenhum documento estabelecido para os critérios de validação de métodos para determinação de agrotóxicos especificamente em camas biológicas.

Este estudo da validação foi realizado em termos de precisão e exatidão (recuperação% e RSD%), precisão intermediária (RSD%), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), linearidade, faixa linear, seletividade e efeito matriz (%).

#### *3.6.4.1 Curva analítica e linearidade*

A avaliação da linearidade das curvas analíticas foi verificada através da resposta do sinal dos analitos presentes nas soluções analíticas em oito concentrações (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300  $\text{ng mL}^{-1}$ ), preparadas tanto em solvente orgânico quanto no extrato “branco” da biomistura. Estas soluções foram injetadas sete vezes cada uma, em condições de repetibilidade, incluindo o branco tanto dos solventes quanto do extrato de biomistura. Cada injeção foi realizada a partir de um vial individual, visto que um dos solventes contidos na solução mistura onde os analitos estão é acetona, que é bastante volátil.

Posterior à etapa descrita anteriormente foram analisadas as áreas dos picos cromatográficos de cada analito e em cada uma das concentrações e replicatas injetadas e então foram calculadas as médias das áreas e do RSD%. Com os valores de concentração de cada agrotóxico estudado, foi possível obter o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), o coeficiente angular (a), o coeficiente linear (b) bem como a equação da reta. Para a obtenção destes dados, colocaram-se os valores das concentrações de cada agrotóxico estudado no eixo das abscissas e as respectivas áreas obtidas no eixo das ordenadas.

A linearidade de cada agrotóxico também foi estudada sendo avaliada através do cálculo dos valores de resíduos, demonstrando o percentual de variação de cada ponto de uma curva analítica com relação ao modelo matemático empregado ( $y = ax + b$ ). Com base no DG-SANTE, para se considerar um método linear, os valores de resíduos devem estar entre  $\pm 20\%$ .

#### *3.6.4.2 Limites de detecção e quantificação*

Os limites de detecção tanto do método quanto do instrumento para cada agrotóxico estudado foram determinados a partir das áreas e do RSD% das sete replicatas de cada agrotóxico, presentes nas soluções analíticas, bem como também com base nas avaliações dos dados da linearidade das curvas analíticas.

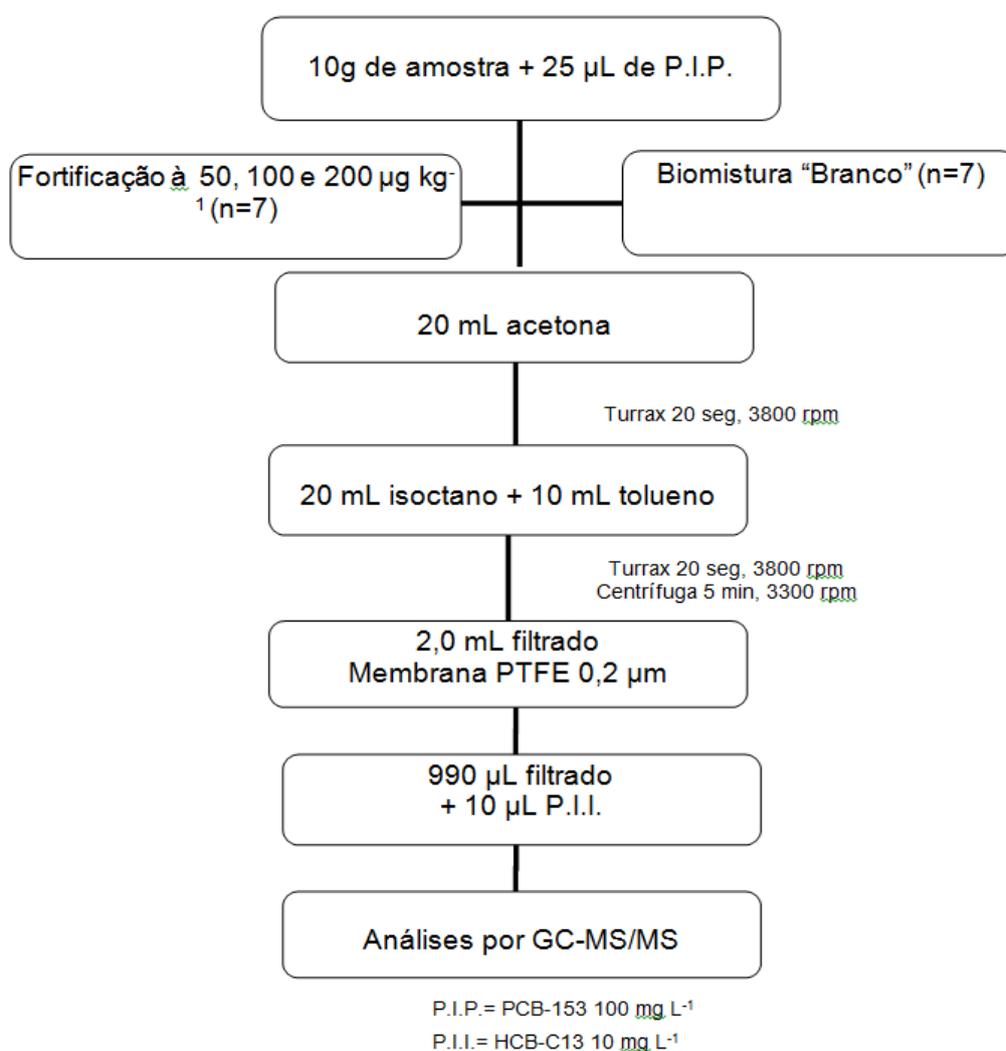
O limite de detecção do instrumento (LOD) foi considerado igual à concentração onde a relação sinal/ruído foi  $\geq 3$ . O limite de quantificação do método (LOQ) foi definido como sendo o menor nível de fortificação que pode ser quantificado com valores de exatidão (70-120%) e precisão ( $RSD \leq 20\%$ ) aceitáveis, com base no documento guia DG-SANTE (SANTE, 2017).

#### *3.6.4.3 Exatidão (estudo de fortificação e recuperação)*

A fim de se verificar a exatidão do método, foram feitos estudos de fortificação e recuperação. Para isso, alíquotas de biomistura "branco" foram fortificadas com a solução analítica contendo os sete agrotóxicos nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionando-se 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da solução 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Para cada concentração foram realizadas sete replicatas

utilizando o método otimizado neste estudo, descrito no item 3.6.3.3 e esquematizado na figura 6.

Figura 6- Esquema do procedimento de extração do método multiresidual 2, utilizado nos ensaios de fortificação e recuperação de agrotóxicos em camas biológicas.



#### 3.6.4.4 Precisão intermediária

Para a determinação da precisão intermediária, as etapas de fortificação e recuperação foram repetidas por um segundo analista, em dias diferentes, para os

três níveis de concentração e com as sete replicatas cada. Cada amostra extraída de cada uma das replicatas foi acondicionada em vial individual.

#### 3.6.4.5 Efeito matriz

O efeito matriz em cromatografia ocorre devido à substâncias presentes na matriz, neste caso o solo, e que podem interagir com os sítios ativos do *liner*, e conseqüentemente produzir supressão ou aumento de sinal se comparado ao sinal do analito apenas em solvente orgânico.

Neste trabalho, este efeito foi calculado baseando-se nas inclinações das curvas analíticas obtidas em extrato da matriz “branco” da biomistura e daquelas preparadas apenas em solvente orgânico, de acordo com a equação 4.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left[ \frac{(\text{inclinação da curva analítica em matriz})}{(\text{inclinação da curva analítica em solvente})} - 1 \right] \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Através desse cálculo, é possível verificar se os componentes presentes na matriz exercem efeito positivo, com o aumento do sinal, ou negativo, com a supressão do sinal.

É considerado que há influência do efeito matriz na análise quando o resultado obtido estiver fora da faixa de  $\pm 20\%$ . Neste caso é recomendado então a construção das curvas analíticas diretamente no extrato da matriz a fim de minimizar o efeito (SANTE).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS

O método utilizado para a determinação multiresidual de agrotóxicos em camas biológicas foi o método New Dutch mini-Luke otimizado, citado no item 3.6.3.3, a partir do método desenvolvido por DIAS (2017).

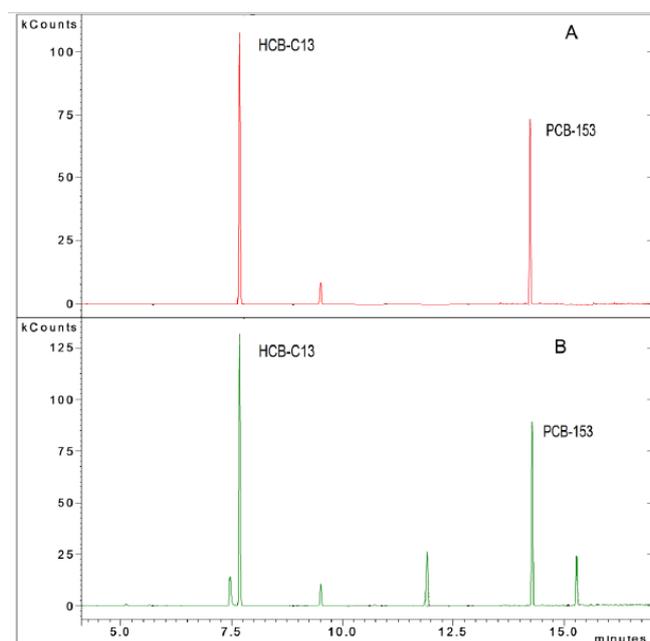
#### 4.1.1 Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura

Antes da realização dos estudos de extração e fortificação das amostras, todos os solventes e reagentes utilizados para o estudo como também o “branco” da biomistura, passaram pelo mesmo procedimento de extração descrito no item 3.6.3.3, a fim de se verificar sua pureza evitando assim possíveis contaminações.

Na figura 7, observam-se os cromatogramas obtidos para (A) reagentes e solventes e para o (B) “branco” da biomistura, através da análise dos extratos destes. Sendo que estes extratos foram obtidos através da extração pelo método multiresidual para análise de agrotóxicos em camas biológicas otimizado, pelo sistema GC-MS/MS, no modo MRM.

Analisando os cromatogramas, pode-se ver a presença de apenas um pico no cromatograma dos reagentes e solventes (A). Os outros dois picos observados são referentes aos padrões internos, sendo o padrão interno do procedimento (PCB-153) e o padrão interno do instrumento (HCB-C13). Já no cromatograma referente ao “branco” da biomistura, é possível observar além dos picos dos padrões internos, alguns picos referentes a componentes da matriz.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para análise de (A) extrato branco dos reagentes e solventes e (B) do “branco” da biomistura.



## 4.1.2 Otimização do método cromatográfico

### 4.1.2.1 Seleção do método de extração

A partir da avaliação dos métodos de extração 1 e 2, descritos nos itens 3.6.3.2 e 3.6.3.3 respectivamente, foi possível selecionar o método que apresentasse recuperações entre 70% e 120% com  $RSD \leq 20\%$ , para todos os agrotóxicos estudados, com exceção da captana, que foi quantificada a partir do seu produto de degradação tetrahidroftalimida.

O método 1 não atingiu os critérios estabelecidos para a validação segundo o documento DG-SANTE (2017). Grande parte dos valores de recuperação do teste 1, onde foram evaporados 125  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e reconstituídos em 250  $\mu\text{L}$  de isoctano:tolueno (9:1, v,v), sendo que os valores de recuperação e desvio padrão ficaram dentro dos valores estabelecidos. Já para o teste 2, onde foram evaporados 1000  $\mu\text{L}$  e reconstituídos em 1000  $\mu\text{L}$  de isoctano:tolueno (9:1, v,v), os valores de recuperação e desvio padrão relativo ficaram praticamente todos fora dos limites estabelecidos para os analitos determinados, como pode ser observado na tabela 4. Uma possível causa para este fato, é que possa ter ocorrido perdas dos analitos durante a etapa de evaporação ou ainda por ser utilizada uma pequena porção de amostra para a extração.

Tabela 4 - Valores médios de RSD% obtidos por GS-MS/MS (modo MRM) para análise de biomistura "branco" fortificadas com os agrotóxicos estudados nas concentrações 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e extraídas empregando-se o método 1 (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v)(n=3).

Agrotóxico	Níveis de fortificação							
	Teste 1 - evaporação de 125 $\mu\text{L}$ /reconstituição em 250 $\mu\text{L}$				Teste 2 – evaporação de 1000 $\mu\text{L}$ /reconstituição em 1000 $\mu\text{L}$			
	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		200 $\mu\text{g kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%
Captana	n.d	-	n.d	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	73	4	62	8	32	28	25	27
Clorotalonil	96	2	135	14	58	17	60	12
Clorpirifós	66	11	62	6	57	6	67	4
Fosmete	106	6	82	6	52	12	104	14
Metidationa	62	4	70	5	73	7	73	4
Tebuconazol	79	4	66	6	71	2	29	10
Fenitrotiona	74	4	62	5	55	4	30	7

<sup>a</sup>Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

O método de extração 2 apresentou os valores de recuperação e RSD% dentro dos limites recomendados pelo DG-SANTE (2017) como pode ser observado na tabela 5. Desta forma, este foi o método selecionado para a validação em camas biológicas. Visto que pela análise dos resultados prévios este método apresentou os melhores resultados de recuperação e precisão, foram realizados novos estudos de fortificação e recuperação em concentrações menores a fim de se determinar quais seriam as menores concentrações na qual se obteria bons resultados, dessa maneira determinando então os limites de detecção e quantificação de cada agrotóxico.

Tabela 5 - Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS, através da análise de biomistura “branco” fortificada com os agrotóxicos avaliados no método multiresidual, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e extraídas empregando o método 2 (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) (n=3)..

Agrotóxico	Fortificação							
	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec.%	RSD%	Rec.%	RSD%	Rec.%	RSD%	Rec.%	RSD%
Captana	26	12	53	10	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	137	1	75	3	99	7	73	10
Clorotalonil	189	0,5	84	1	103	3	87	6
Clorpirifós	108	2	84	9	89	12	89	6
Fosmete	169	14	118	3	106	7	99	2
Metidationa	93	8	112	7	94	15	102	4
Tebuconazol	132	0,7	91	11	104	10	101	5
Fenitrotiona	139	0,5	108	5	93	8	96	3

a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

### 4.1.3 Validação do método multiresidual

#### 4.1.3.1 Curva analítica e linearidade

A avaliação da linearidade das curvas analíticas foi realizada com injeções de soluções analíticas preparadas em solvente (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) e em extrato “branco” de biomistura, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300  $\text{ng mL}^{-1}$  dos analitos estudados. Essas soluções foram analisadas sete vezes (n=7) cada uma e posteriormente foram realizados os cálculos das médias das áreas obtidas.

Na tabela 6 podem ser observados os valores de RSD% entre as áreas, as equações das curvas analíticas, os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e o intervalo linear determinado para cada agrotóxico.

Tabela 6 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico (acetona:isooctano:tolueno, 2:21, v/v/v) e em extrato “branco” de biomistura, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).

Agrotóxico	Curva analítica em solvente			Curva analítica em extrato “branco” de biomistura		
	Inclinação (a)	Intersecção (b)	$r^2$	Inclinação (a)	Intersecção (b)	$r^2$
Captana	-	-	-	-	-	-
Tetrahydroftalamida <sup>a</sup>	1460	23080	0,9892	2149	32112	0,9918
Clorotalonil	2620	64241	0,9819	2825	41726	0,9871
Clorpirifós	5985	50977	0,9986	5359	72947	0,9871
Fenitrotiona	3219	59999	0,9642	4027	46508	0,9977
Fosmete	3314	65086	0,956	4973	35580	0,995
Metidationa	10801	156782	0,9721	13726	81639	0,9993
Tebuconazol	8263	160680	0,978	9649	38408	0,9981

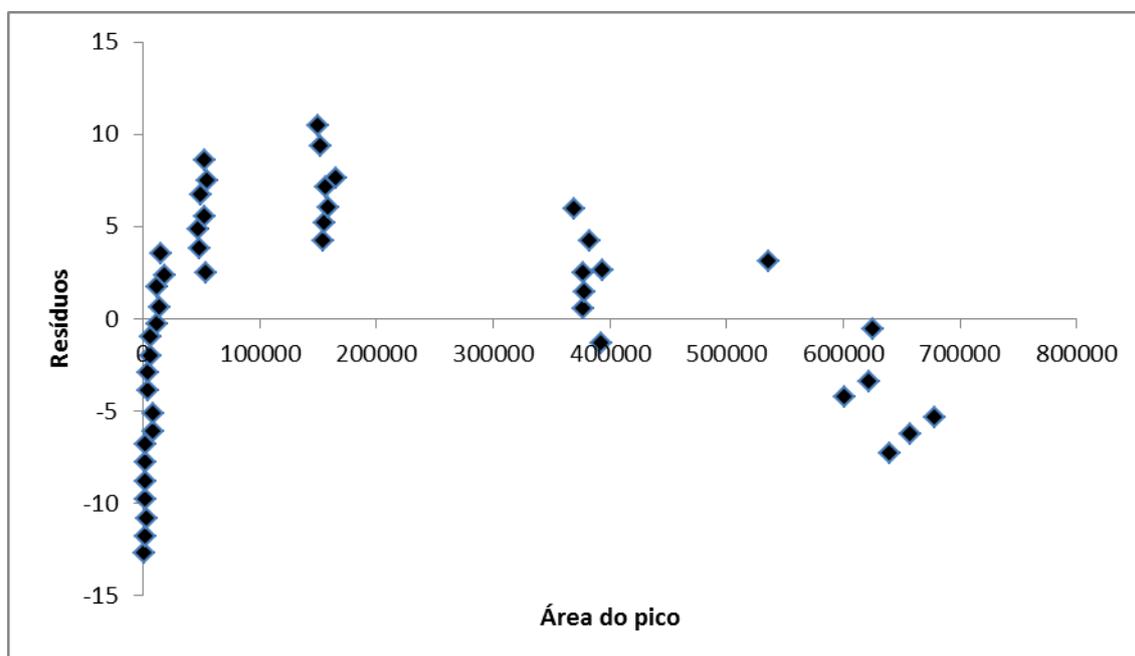
<sup>a</sup> Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de calibração e fortificação;

Quando as curvas analíticas foram preparadas em extrato “branco” da biomistura obteve-se coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para seis agrotóxicos estudados com valores  $>0,99$ , já para o produto de degradação tetrahydroftalimida o  $r^2 > 0,98$ . Quando as soluções analíticas foram preparadas em solvente, os valores de  $r^2$  foram  $\geq 0,956$  para todos os agrotóxicos em estudo. A captana foi avaliada a partir do seu produto de degradação tetrahydroftalimida, portanto, não se tem valores para esta.

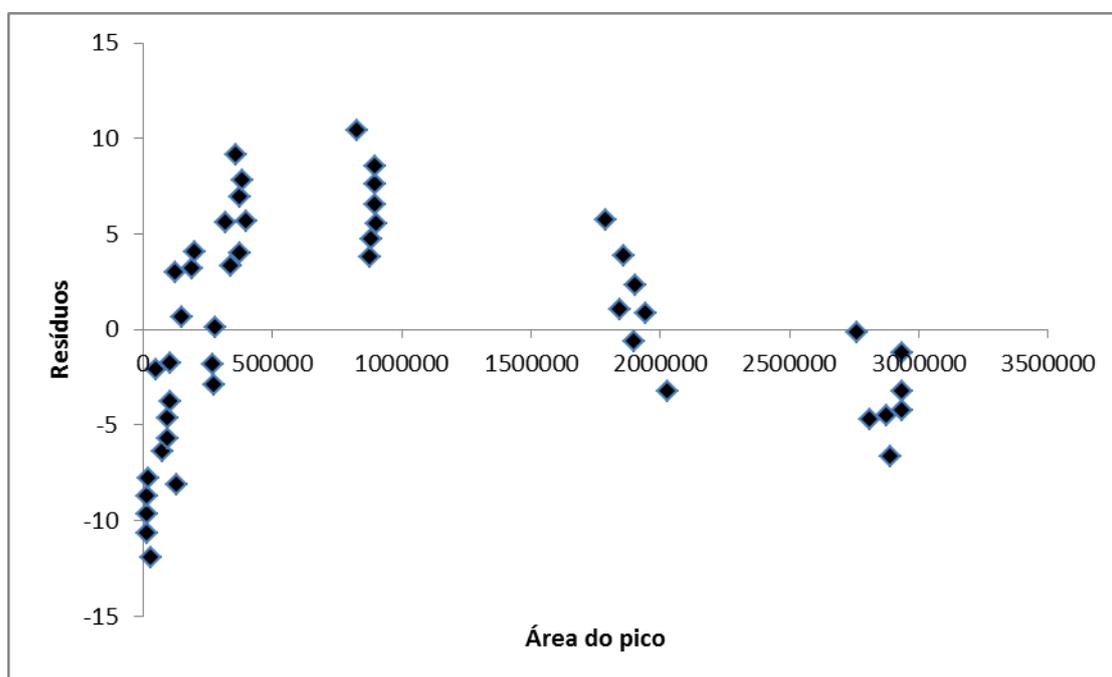
O RSD% calculado dos resíduos das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” da biomistura, foi inferior a 20% para todos os agrotóxicos, como observado na figura 8, sendo que estes resultados estão em concordância com os critérios estabelecidos pelo DG-SANTE para que o método seja estabelecido como linear.

Figura 8 - Resíduos das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS/MS (modo MRM), para os agrotóxicos (A) Tetrahydroftalimida, (B) Tebuconazol, (C) Fosmete, (D) Metidationa, (E) Clorpirifós, (F) Clorotalonil, (G) Fenitrotona.

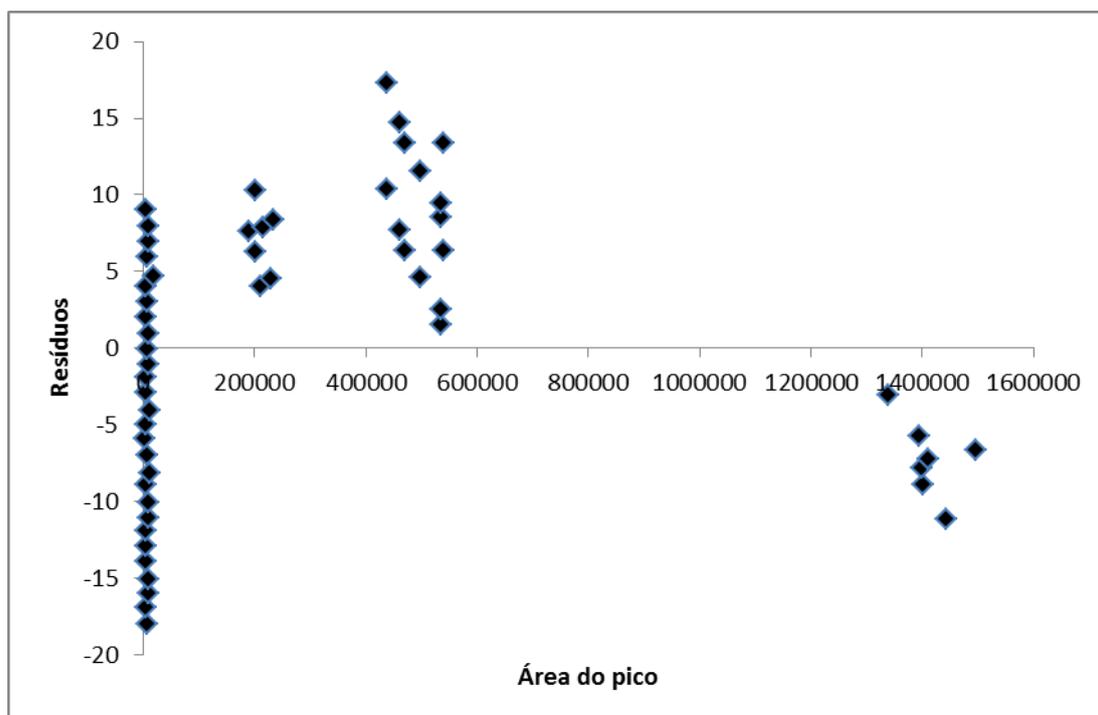
(A) - Tetrahydroftalimida



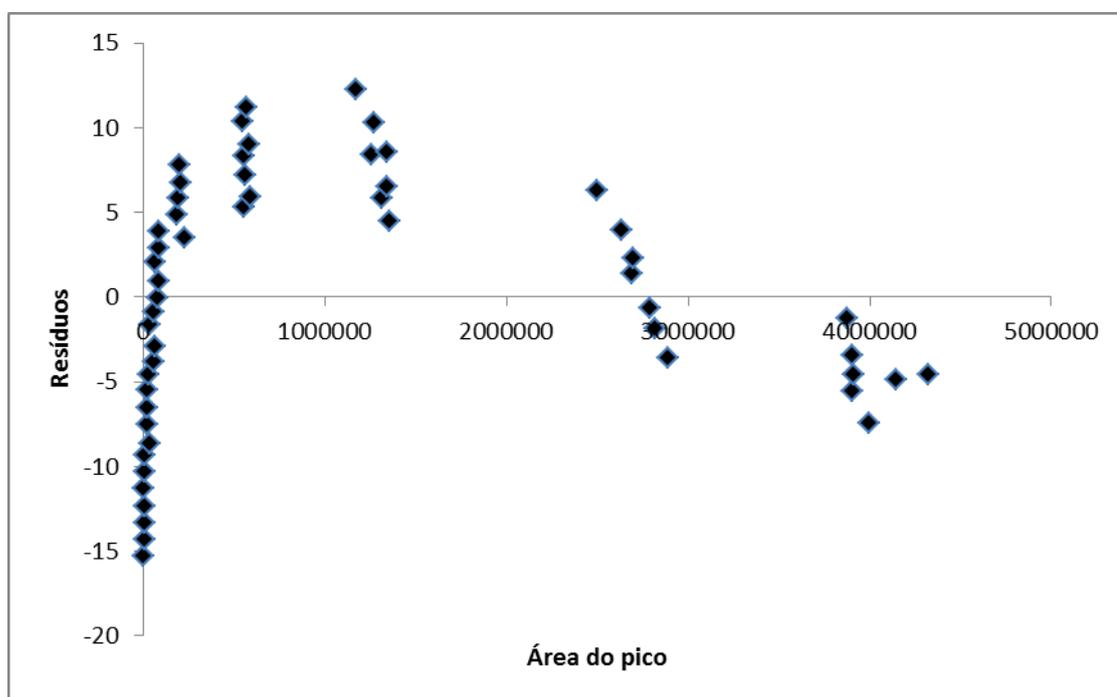
(B) – Tebuconazol



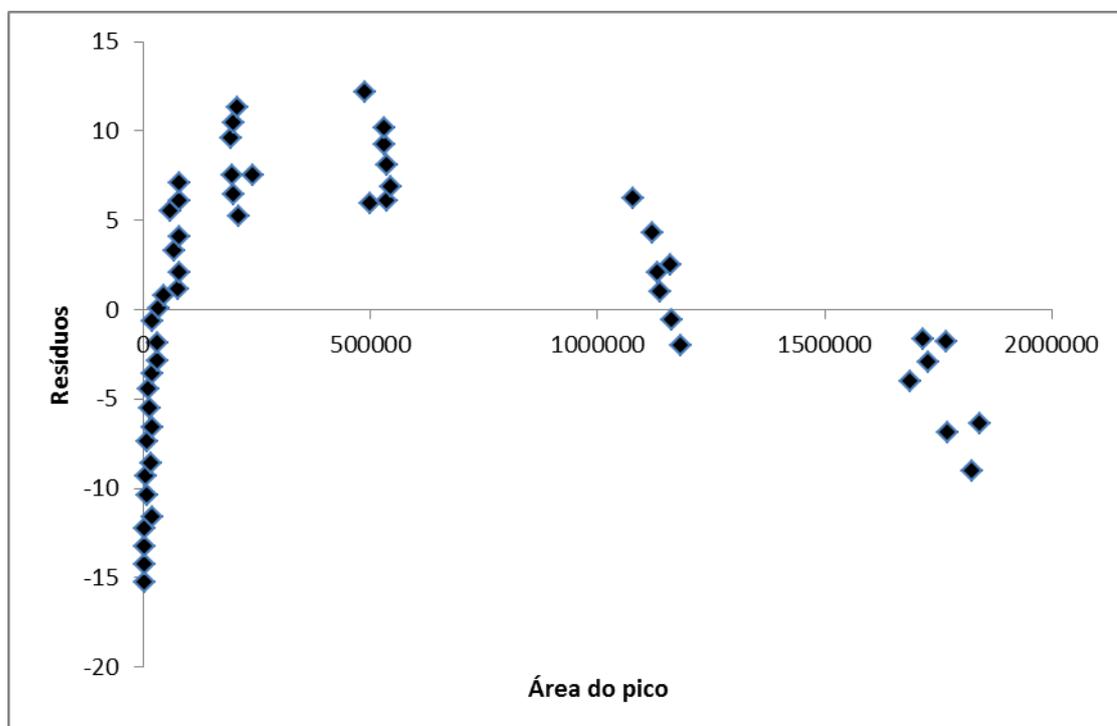
(C) – Fosmete



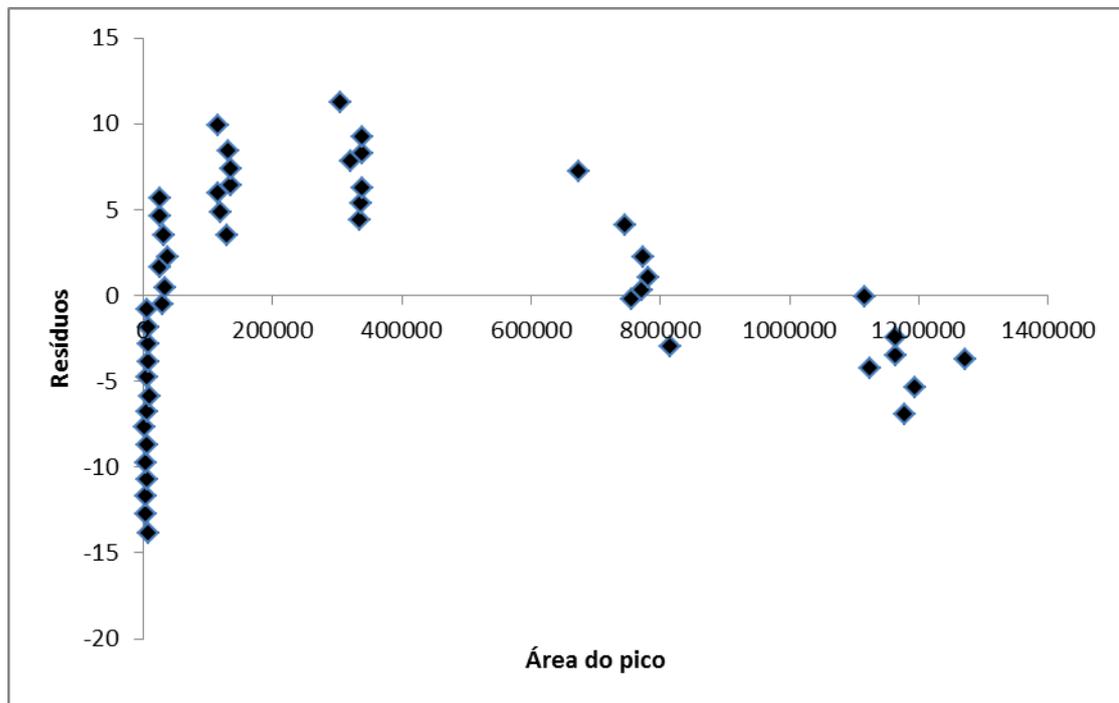
(D) – Metidationa



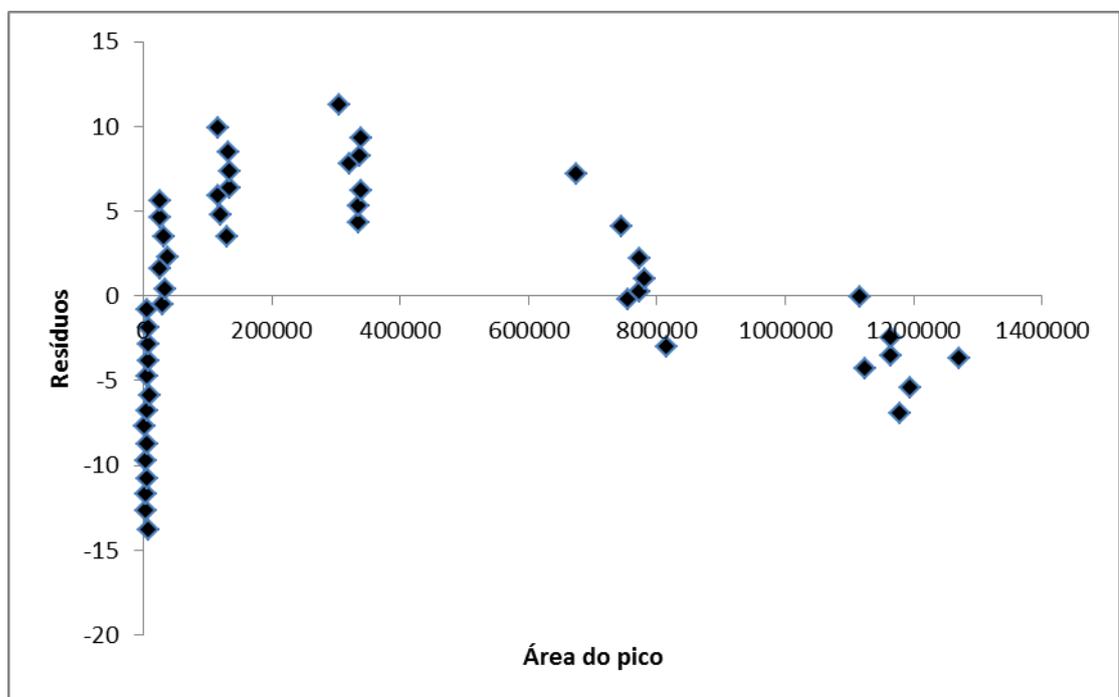
(E) – Clorpirifós



(F) – Clorotalonil



(G) – Fenitrotiona



A resposta do triploquadrupolo foi linear de 1 a 300 ng mL<sup>-1</sup> para clorpirifós, fosmete e metidathiona e de 5 a 300 ng mL<sup>-1</sup> para tetrahidroftalamida, clorotalonil, fenitrotiona e tebuconazol, como pode ser observado na tabela 7.

#### 4.1.3.2 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) do método foi de 10 µg kg<sup>-1</sup> para clorpirifós, fosmete e metidathiona, e de 20 µg kg<sup>-1</sup> para tetrahidroftalamida, clorotalonil e tebuconazol.

Com base no SANTE (2017), o limite de quantificação de um método é definido como o menor nível de fortificação que atende os critérios de exatidão e precisão aceitáveis em uma faixa de 70 a 120% de recuperação e RSD% ≤ 20%. Sendo assim, o limite de quantificação para todos os agrotóxicos em estudo foi de 50 µg kg<sup>-1</sup>. Na tabela 7 é possível ver os valores de LOD e LOQ do método.

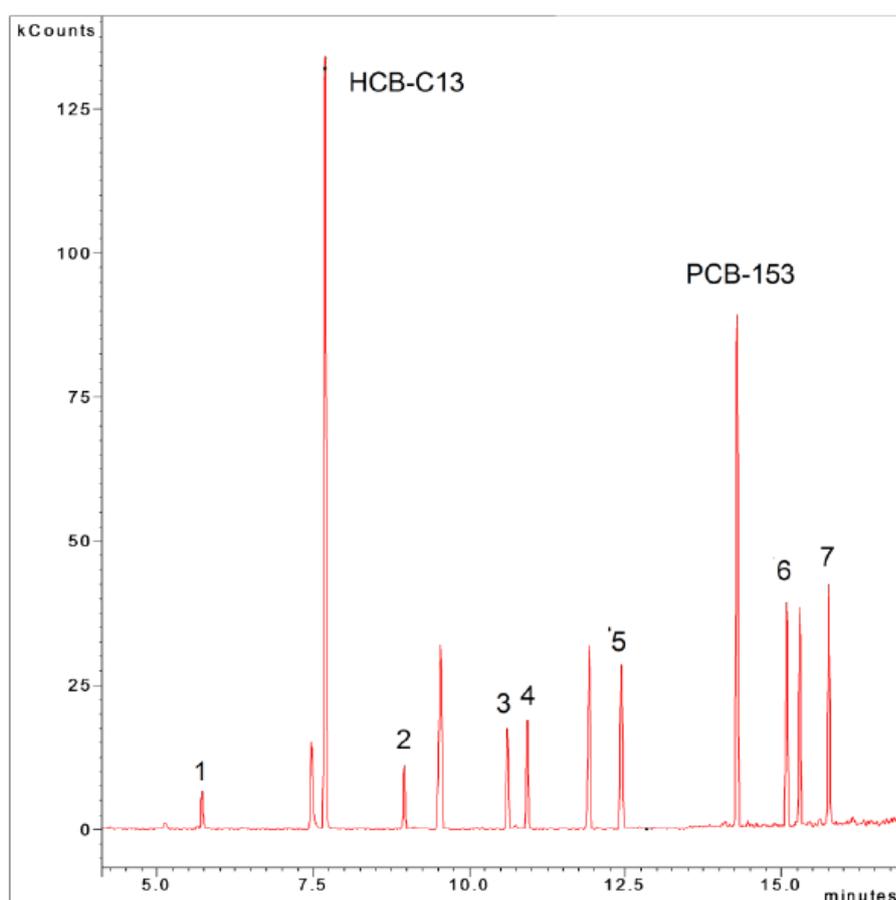
Tabela 7 - Faixa linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método para os agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD (µg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (µg kg <sup>-1</sup> )
Captana	-	-	-
Tetrahidroftalamida <sup>a</sup>	5-300	20	50
Clorotalonil	5-300	20	50
Clorpirifós-etil	1-300	10	50
Fenitrotiona	5-300	20	50
Fosmete	1-300	10	50
Metidathiona	1-300	10	50
Tebuconazol	5-300	20	50

<sup>a</sup>Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação.

Na figura 9 é possível ver o cromatograma obtido da análise de uma solução analítica em extrato “branco” da biomistura, na concentração de 250 µg kg<sup>-1</sup>, valor equivalente ao limite de quantificação, contendo os sete agrotóxicos estudados, sendo a captana determinada a partir do seu produto de degradação, tetrahidroftalamida.

Figura 9 - Cromatograma total obtido a partir de uma solução analítica preparada em extrato “branco” de biomistura, na concentração de  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ , representando os sete agrotóxicos avaliados e o produto de degradação tetrahydrofitalimida, obtido por GC-MS/MS (modo MRM). Os picos estão numerados de acordo com o tempo de retenção de cada agrotóxico: tetrahydrofitalimida (1), clorotalonil (2), fenitrotiona (3), clorpirifós (4), metidationa (5), tebuconazol (6) e fosmete (7).



#### 4.1.3.3 Efeito Matriz

O efeito matriz é considerado uma fonte de erro potencial durante uma análise cromatográfica, visto que os componentes presentes na matriz podem interferir nos resultados, levando a um aumento ou supressão do sinal do analito de interesse. Este efeito é utilizado para explicar as taxas de recuperações dos analitos

que excederam 100% e ainda obtiveram uma baixa precisão dos resultados. (PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., SILVÉRIO, F. O, 2009 )

A avaliação do efeito matriz pode ser feita através da comparação da inclinação de curvas analíticas obtidas em solvente orgânico e em extrato da matriz. (GUEDES, J. A. C, SILVA, R. O., LIMA, C. G., MILHOME, A. L., NASCIMENTO, R. F.). De acordo com o DG-SANTE (2017), valores de efeito matriz em intervalos de -20% a 20% geralmente são considerados insignificantes. Porém, para valores fora desta faixa, se faz necessário o emprego da superposição de matrizes.

Os valores de efeito matriz obtido a partir da equação 4 foram maiores que a faixa considerada insignificante, com exceção apenas do clorpirifós, que obteve efeito matriz de -20%. Sendo assim, as curvas analíticas foram preparadas a partir de soluções analíticas em extrato “branco” da biomistura.

Tabela 8 - Efeito matriz calculado pela diferença da inclinação das curvas analíticas obtidas para soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de biomistura, em oito concentrações, injetadas sete vezes cada (n=7), para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS.

Agrotóxico	Efeito matriz (%)
Captana	n.d.
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	47
Clorotalonil	61
Clorpirifós	-20
Fenitrotona	51
Fosmete	106
Metidationa	38
Tebuconazol	25

<sup>a</sup>Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação

#### 4.1.3.4 Exatidão e precisão

A partir da fortificação de amostras de biomistura nas concentrações de 50, 100 e 200µg kg<sup>-1</sup> e posterior extração seguindo o procedimento descrito no item 3.6.3.3, foi possível obter os resultados de recuperação (%) e os desvios padrão relativos (RSD%). Estes resultados estão descritos na tabela 9, sendo que para

todos os sete agrotóxicos estudados e o produto de degradação são satisfatórios e estão de acordo com o DG-SANTE (2017).

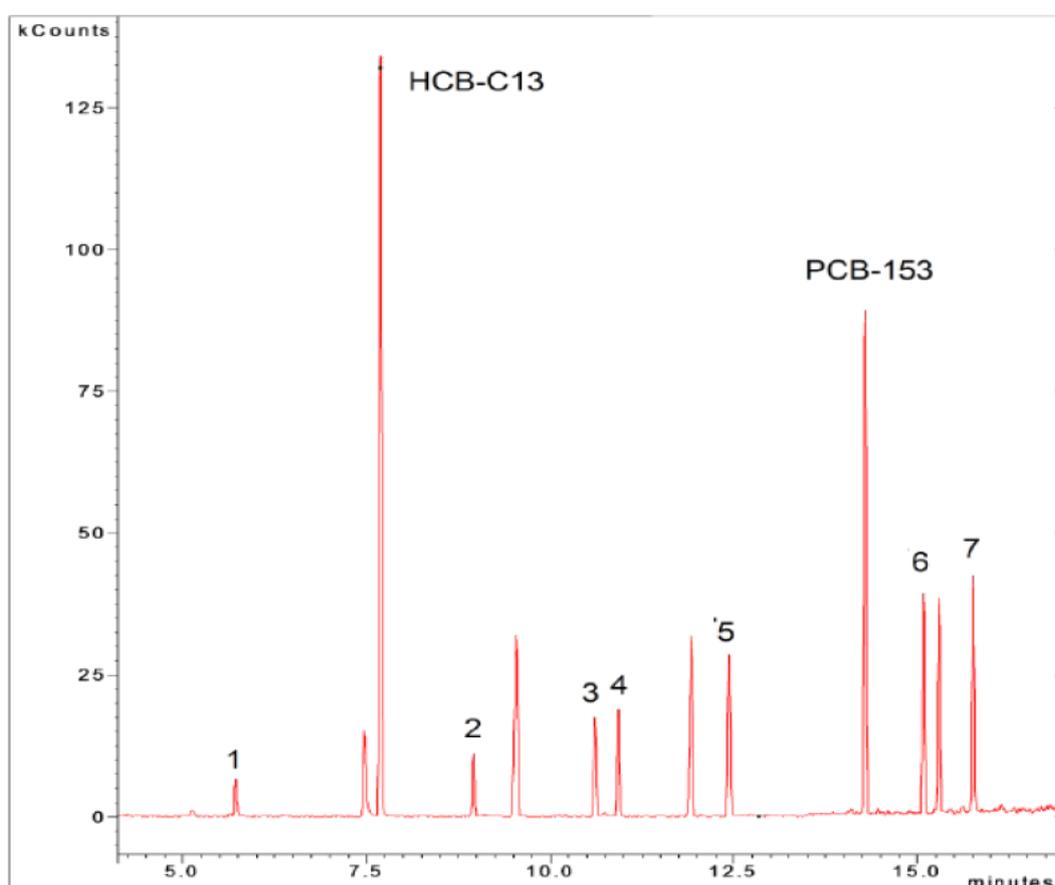
Tabela 9 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a da análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , no estudo da exatidão e precisão do método multirresidual.

Agrotóxico	Conc. de fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )/ Conc. na curva analítica ( $\text{ng mL}^{-1}$ )					
	50/10		100/20		200/40	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Captana	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	81	2	108	10	93	11
Clorotalonil	75	6	95	8	80	3
Clorpirifós	116	10	110	13	103	6
Fenitrotiona	86	6	117	6	104	5
Fosmete	104	9	107	14	107	8
Metidationa	111	4	116	3	105	5
Tebuconazol	107	5	112	6	104	5

<sup>a</sup> Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

A partir dos ensaios de fortificação e recuperação, obtiveram-se os cromatogramas correspondentes. Na figura 10 pode ser visto o cromatograma correspondente ao nível de fortificação de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , que é um nível intermediário. No cromatograma constam os picos referentes aos padrões internos do procedimento (PCB-153) e do instrumento (HCB-C13), como também dos agrotóxicos avaliados. Na figura10, a ordem da numeração está de acordo como tempo de retenção de cada composto: 1-tetrahydroftalimida ( $t_R=5,71$  min), 2-clorotalonil ( $t_R=8,89$  min), 3-fenitrotiona ( $t_R=10,61$  min), 4-clorpirifós ( $t_R=10,89$  min), 5-metidationa ( $t_R=12,39$  min), 6-tebuconazol ( $t_R=15,07$  min), e 7-fosmete ( $t_R=15,76$  min).

Figura 10 – Cromatograma total obtido por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada na concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , apresentando os seis agrotóxicos estudados e o produto de degradação tetrahydroftalimida, numerados de acordo como tempo de retenção: 1-tetrahydroftalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.



#### 4.1.3.5 Precisão Intermediária

Um segundo estudo de validação foi realizado com o intuito de avaliar a precisão intermediária do método. Dessa maneira, foram repetidos os testes de fortificação e recuperação da mesma forma, variando dois parâmetros, o dia da realização do ensaio e o analista. Os valores da média da recuperação encontraram-se dentro dos limites estabelecidos pelo DG-SANTE (2017), ficando na faixa de 78 a

114% com RSD%  $\leq$  17%. Os valores de média de recuperação e RSD% obtidos por este segundo estudo de validação podem ser vistos na tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , no estudo da precisão intermediária do método multirresidual (n=7).

Agrotóxico	Conc. de fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )/ Conc. na curva analítica					
	50/10		100/20		200/40	
	Rec(%)	RSD(%)	Rec(%)	RSD(%)	Rec(%)	RSD(%)
Captana	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	108	3	112	4	112	6
Clorotalonil	97	3	105	4	79	7
Clorpirifós	95	7	114	3	104	15
Fenitrotiona	78	4	106	8	97	8
Fosmete	107	5	106	6	97	12
Metidationa	108	3	112	5	97	17
Tebuconazol	81	4	110	8	85	15

<sup>a</sup> Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

Para o cálculo da precisão intermediária do método, foram calculados os valores de RSD% entre as recuperações médias, entre os valores obtidos nos estudos de fortificação e recuperação pelos dois analistas, como observado na tabela 11.

Tabela 11 - Comparação entre os valores médios de recuperação e RSD (n=7) obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), para a análise de biomistura “branco”fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 µg kg<sup>-1</sup>, realizadas por dois analistas, no intervalo de três dias, no estudoda precisão intermediária.

Agrotóxico	Conc. de fortificação (µg kg <sup>-1</sup> ) / Conc. na curva analítica (ngmL <sup>-1</sup> )								
	50/10			100/20			200/40		
	Rec.%		RSD (%)	Rec.%		RSD (%)	Rec.%		RSD (%)
	Analista1	Analista 2		Analista 1	Analista 2		Analista 1	Analista 2	
Captana	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Tetrahydroftalimida <sup>a</sup>	81	108	20	108	112	2	93	112	13
Clorotalonil	75	97	18	95	105	7	80	79	0,3
Clorpirifós-etil	116	95	14	110	114	2	80	104	19
Fenitrotiona	86	78	7	117	106	8	104	97	5
Fosmete	104	107	2	107	106	1	107	97	7
Metidationa	112	108	2	116	112	3	105	97	6
Tebuconazol	107	81	19	112	110	1	104	85	14

<sup>a</sup> Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

#### 4.1.3.6 Controle de qualidade

Neste procedimento, foram utilizados dois padrões internos isotopicamente marcados, adicionados em diferentes etapas, com o intuito de se verificar o desempenho do método analítico, identificando possíveis erros durante as etapas de extração bem como erros provenientes do próprio equipamento.

A partir da etapa de fortificação, todas as outras foram controladas com a adição de uma solução de PCB-153 como padrão interno do procedimento, sendo que o intervalo aceitável de recuperação para o mesmo compreende a faixa de 80-120%.

Para a avaliação do desempenho do injetor automático do cromatógrafo, foi utilizado um padrão interno do instrumento (P.I.I.), neste caso o HCB-C13, onde se verificaram as áreas referentes a solução do P.I.I., sendo considerados aceitáveis valores de RSD% inferiores a ±30% da área média.

## 5 CONCLUSÃO

Tendo em vista a crescente preocupação com a saúde e o meio ambiente, bem como as previsões de aumento da população mundial, desta forma sendo necessário um grande aumento da produção de alimentos o que acarreta em um maior uso de agrotóxicos. Desta forma, os agrotóxicos são fundamentais para que se possa produzir uma grande quantidade de alimentos sem que haja perdas por ataque de pragas ou doenças, porém os agrotóxicos são também um dos meios de maior contaminação, visto que seus resíduos podem se acumular ao longo da cadeia alimentar. A fim de minimizar a contaminação causada pelos resíduos de agrotóxicos gerados tanto pela lavagem de pulverizadores como por derramamentos acidentais, foi criado o sistema de camas biológicas (*biobeds*).

As camas biológicas cuja função é degradar os agrotóxicos por ele lixiviado, por meio de fungo e bactérias, foi o tema deste estudo, visto o baixo número de trabalhos publicados relacionados a esta área além da necessidade da validação de um método analítico para a avaliação da eficácia desses sistemas.

Desta forma, estudaram-se dois métodos de extração para a determinação multirresíduos de agrotóxicos e de um produto de degradação, em biomistura de camas biológicas.

O método 2 apresentou os melhores resultados nos ensaios preliminares, sendo que foi o que apresentou os melhores valores de recuperações e desvio padrão relativo. Este método eliminou também as etapas de evaporação e purificação dos extratos, além de substituir os solventes clorados antes utilizados, por acetona:isooctano:tolueno, que possibilita a injeção direta no sistema GC-MS/MS após o passo de centrifugação. Além de ainda possuir uma etapa de filtração, posterior a centrifugação a fim de evitar que pequenas partículas possam interferir na análise bem como causar complicações com o equipamento, como obstrução da coluna, visto que o diâmetro desta é muito pequeno.

Este método foi validado para a análise dos seguintes agrotóxicos: captana e seu produto de degradação tetrahydroftalimida, clorotalonil, clorpirifós, fenitrotiona, metidationa, fosmete e tebuconazol em amostras de camas biológicas, por GC-MS/MS.

Foi obtido limites de detecção do método de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o clorpirifós, fosmete e metidationa, já para a tetrahydroftalimida (produto de degradação da captana), clorotalonil e tebuconazol o limite de detecção foide  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O limite de quantificação para todos os agrotóxicos foi de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 6 REFERÊNCIAS

ABRASCO, **Dossiê ABRASCO 2014**. Disponível em: <<http://contraosagrotoxicos.org/dossieagrotoxicos/>> Acessado em 11/09/2018.

AGEITEC, Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_39\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html)> Acessado em 11/09/2018

ALMEIDA,W.,FIÚZA,J.,MAGALHÃES, C.M.,JUNGER,C.M., **Agrotóxicos**. Caderno de saúde pública.vol.1,nº2.

ANVISA, **Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.

ANVISA, **Resolução da diretoria colegiada – RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**.

BRAIBANTE, M. E. F., ZAPPE, J. A., **A química dos agrotóxicos**, Química nova na escola. Vol.34,nº1, fevereiro/2012

BRICKSITE, **What is it all about?**,Disponível em<[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-95162010000100004](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162010000100004)>

CAMPOS, R. C., GRINBERG, P., **Acoplamento cromatografia gasosa – espectrometria de absorção atômica em estudos de especiação:uma revisão**, Química Nova, vol.24, nº 2, pg 220-227, 2001.

CARNIEL, L. S. C., **Avaliação do risco ecológico de mancozebe e clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte**. Dissertação de mestrado, UDESC, 2015.

CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, J., **Biobeds-a Swedish contribution to environmental protection from pesticide pollution**.

CASTILLO, M. P., TORTENSSON, L., STENSTRÖM, **Biodeds for environmental protection from pesticide use – a review**, *Journal of agricultural and food chemistry*, vol.56, pg 6206-6219, 2008

CHIARADIA,M.C.,COLLINS,C.H.,JARDIM,I.C.S.F., **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**, Química Nova, vol. 31, nº3, pg 623-636,2008.

CODEX, Alimentarius.Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>> Acessado em: 15/09/2018

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7ª edição, Editora da UNICAMP, 1977.

DIAS, J. V., **Agrotóxicos em óleos comestíveis:avaliação de procedimento de purificação de extrato empregando diferentes adsorventes e validação por UHPLC-MS/MS**, Tese de doutorado, UFSM,2016

DIEZ, M. C., **Biological aspects involved in the degradation os organic pollutants**, *Journal of soil science and plant nutrition*, vol.10, nº3, julho 2010.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1070557/>> Acessado em 15/09/2018

FLORES, A. V., RIBEIRO, J. N., NEVES, A. A., QUEIROZ, E. L. R., **Organoclorados:um problema de saúde pública**, *Ambiente e Sociedade*, vol. VII, nº.2jul./dez.2004.

FOGG, P., BOXALL, A. B. A., WALKER, A., **Biobeds: the development and evaluation of a biological system for the disposal os pesticide waste ans washings**.Cranfield Centro fosEcoChemistry, september/2001.

GEBLER, L.,**Sistema Biobed Brasil: disposição final de efluentes contaminados com agrotóxicos originados na agricultura**.

HOFF, G. R., ZONEN, P., **Trace analysis of pesticides by gáschromatography**,*Journal of chromatography*, vol.843, pg 301-322,1999

INMETRO, **Orientação sobre validação de métodos de ensaio químicos, DOQ-CGCRE-008**, rev02, junho/2007.

JEREZ, M. C. D., **Manual de construcción y operación de lechos biológicos**, abril 2013.

KONATU, F. R. B., **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de alface, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial**,

KUSSUMI, T. A., **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. Dissertação de mestrado, IPEN,2007.

LANÇAS, F. M.,**Validação de métodos cromatográficos de análise**, Editora RIMA,2004.

LOZANO, U. KIEDROWSKA, B., SCHOLTEN, J., KROON, H., KOK, A., FERNÁNDES-ALBA, A. R., **Miniaturisation and optimization of the Dutch mini-luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables**, *Food Chem.*, v. 192 p. 668-681, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003\\_16\\_01\\_1992.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html)>  
MMA, Ministério do meio ambiente, Disponível em <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/gestao-das-substancias-quimicas/produtos-agrot%C3%B3xicos.html>>

NOBREGA, F. H., **Pesticidas: classificação, propriedades, toxicidade, problemas e soluções.**

OSHITA, D., JARDIM, I. C. S. F., **Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos**, Química Nova, vol.38,no10,São Paulo, dez.2015

PERES, F., MOREIRA, J. C., DUBOIS, G. S., **Agrotóxicos, saúde e ambiente:uma introdução ao tema. É veneno ou é remédio.**

PIZZUTTI, I. R., **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**, Tese de doutorado, UFSM, 2006.

RIBANI, M., **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**, Química nova,vol27, nº5, pg 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA, M. M. C., **Planilha de validação:uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Química Nova, vol.31, nº1, p.164-171, 2008.

SANTE. **Guidance documento n analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**.Documento nº SANTE/11813/2017.

SECRETÁRIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E IRRIGAÇÃO, Disponível em <http://www.agricultura.rs.gov.br/agrotoxicos-2016-12> Acessado em 11 de setembro de 2018.

THE VOLUNTARY INITIATIVE, Biobeds, Disponível em: <<https://voluntaryinitiative.org.uk/water/biobeds/>> Acessado em 20 de setembro de 2018.

VELASCO, L. O. M., CAPANEMA, L. X. L., **O setor dos agroquímicos**, Biblioteca Digital BNDES <[https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%C3%ADmicos\\_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%C3%ADmicos_P.pdf)> Acessado em 20 de setembro de 2018

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., SILVÉRIO, F. O., **Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa**, Química Nova, Vol. 32, No. 4,pg. 987-955, 2009

GUEDES, J. A. C., SILVA, R. O., LIMA, C. G., MILHOME, A. L., NASCIMENTO, R. F., **Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERSmethod and gás chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry**, Food Chemistry, Vol. 199, p. 380-386, 2016