

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

Janice Zulma Francesquett

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
PARAQUATE, DIQUATE, CLORMEQUATE E MEPIQUATE EM
CEVADA E TRIGO UTILIZANDO HILIC-UHPLC-MS/MS

DOUTORADO

Santa Maria, RS
2018

Janice Zulma Francesquett

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
PARAQUATE, DIQUATE, CLORMEQUATE E MEPIQUATE EM
CEVADA E TRIGO UTILIZANDO HILIC-UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS
2018

Francesquett, Janice Zulma
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
PARAQUATE, DIQUATE, CLORMEQUATE E MEPIQUATE EM CEVADA E
TRIGO UTILIZANDO HILIC-UHPLC-MS/MS / Janice Zulma
Francesquett.- 2018.
132 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientador: Osmar Damian Prestes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Desenvolvimento de método analítico 2. Determinação
de resíduos de agrotóxicos I. Zanella, Renato II.
Prestes, Osmar Damian III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

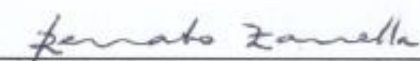
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PARAQUATE,
DIQUATE, CLORMEQUATE E MEPIQUATE EM CEVADA E TRIGO UTILIZANDO
HILIC-UHPLC-MS/MS**

Elaborada por:


Janice Zulma Francesquett

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências

COMISSÃO EXAMINADORA



Renato Zanella, Prof. Dr. (UFSM)
(Orientador)



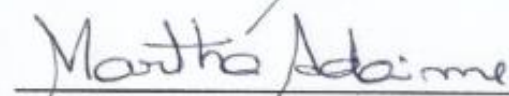
Carla Sirtori, Prof. Dra. (UFRGS)



Sandra Cadore Peixoto, Prof. Dra. (UFN)



Thomas Newton Martin, Prof. Dr. (UFSM)



Martha Bohrer Adaime, Prof. Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS, 20 de julho de 2018

Dedico este trabalho à minha família,
as pessoas mais importantes
de minha vida.

*“Não somos o que sabemos, somos
o que estamos dispostos a aprender.”
Paulo Campos*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, pelo dom da vida. Por me permitir escolher e traçar meu caminho em busca dos meus sonhos.

Gratidão a minha família, minha base, meu forte. Sem vocês nada disso seria possível. Gratidão à minha mãe Zulma, minha principal motivadora para que este sonho se tornasse realidade e meus irmãos Joel, Jacson e Júnior pelo apoio incondicional em todos os momentos. Amo vocês!

Gratidão ao professor Dr. Renato Zanella, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela receptividade desde a primeira vez que conversamos e por ter me dado a oportunidade de colaborar no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas – LARP. Com certeza levo desta oportunidade uma grande bagagem de aprendizados, fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Gratidão pela orientação, colaboração, amizade e companheirismo da colega Dra. Tiele Rizzetti, que desde o início me deu suporte necessário para que esta pesquisa fosse desenvolvida da melhor maneira possível. Palavras seriam poucas para descrever o quanto você foi importante, o quanto me ajudou a enxergar pequenos raios de luz nos diferentes túneis que acabamos entrando ao longo desta pesquisa. Gratidão imensa!

Gratidão ao professor Dr. Osmar D. Prestes pelo apoio e principalmente pela atenção dedicada nos últimos dias.

Gratidão a todos os colegas do LARP, que com pequenas ou grandes ações diárias tornaram os dias mais agradáveis e algumas etapas mais leves. Levo comigo um pouquinho de cada um e algumas grandes amizades. Em especial gostaria de agradecer ao “clube da bóia” pelos momentos de alimentação e descontração; às “gurias do Xevo” (Tiele, Luana, Dani) pela disponibilidade e ajuda de sempre; a Mariela, minha amiga de longa data que foi muito importante no início desta jornada

e ao colega Rômulo por estar sempre pronto para ajudar, independente do horário.

Gratidão a todos os mestres que de uma forma ou outra colaboraram ao longo destes anos, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da UFSM.

Gratidão a minha banca de defesa, Dr. Renato Zanella, Dra. Carla Sirtori, Dra. Sandra Cadore Peixoto, Dr. Thomas Newton Martin e Dra. Martha Bohrer Adaime, pelas contribuições e sugestões a fim de engrandecer esta pesquisa.

Gratidão ao Laboratório de Operações unitárias na Escola de Química e Alimentação da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, pela doação das Quitosanas.

Gratidão ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido e pela bolsa de doutorado.

Gratidão!

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PARAQUATE, DIQUATE, CLORMEQUATE E MEPIQUATE EM CEVADA E TRIGO UTILIZANDO HILIC-UHPLC-MS/MS

Autora: Janice Zulma Francesquett
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 20 de julho de 2018

Os compostos de amônio quaternário (QUATs) constituem uma importante classe de agrotóxicos que incluem o paraquate, diquate, clormequate e mepiquate. Dentre estes, o paraquate é um dos herbicidas mais conhecidos no mundo, tanto pela sua eficiência quanto pela sua toxicidade. Estes fatores aumentam a necessidade de monitoramento dos resíduos destes agrotóxicos que podem permanecer nos alimentos. Nesta pesquisa, desenvolveu-se um método para determinação destes quatro compostos em amostras de cevada e trigo utilizando a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) com análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). As condições do sistema UHPLC-MS/MS foram avaliadas e a seleção da fase móvel foi realizada a partir de um planejamento de composto central. A etapa de extração foi avaliada por meio de ensaios empregando diferentes solventes, modo e tempo de contato do solvente de extração com a amostra; além de comparação entre o uso de amostra seca e *slurry*. Para a limpeza dos extratos avaliou-se três etapas: partição com diclorometano, uso de sorventes e adição de acetonitrila ao extrato. Nesta etapa, a otimização dos sorventes foi realizada a partir de um planejamento experimental. O procedimento proposto consistiu na extração de 10 g de *slurry* com 5 mL de água ultrapura e 5 mL de metanol com 1% (v/v) de ácido fórmico, e limpeza dos extratos por partição do sobrenadante com diclorometano (3:1,5 v/v), extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com quitosana e uso de acetonitrila (1:1, v/v). A validação do método apresentou resultados satisfatórios de seletividade, linearidade, exatidão e precisão. A quantificação dos analitos empregando a curva por diluição da matriz branco fortificada compensou o forte efeito matriz e os valores de recuperação para todos os compostos em ambas as matrizes. O método proposto mostrou ser adequado para a determinação de paraquate, diquate, mepiquate e clormequate em cevada e trigo e foi aplicado com eficiência em 20 amostras de trigo e cevada, demonstrando a aplicabilidade do método em análises laboratoriais de rotina.

Palavras chave: Compostos de amônio quaternário, cereais, HILIC, UHPLC-MS.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF PARAQUAT, DIQUAT, CHLORMEQUAT AND MEPIQUAT IN BARLEY AND WHEAT USING HILIC-UHPLC-MS/MS

Author: Janice Zulma Francesquett
Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, July 20th, 2018

Quaternary ammonium compounds (QUATs) constitute an important class of agrochemicals that include paraquat, diquat, chlormequat and mepiquat. Among these, paraquat is one of the most well-known herbicides in the world, both for its efficiency and its toxicity. These factors increase the need to monitor the residues of these pesticides that can remain in food. In this research, a method was developed for determination of these four compounds in barley and wheat samples using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) with ultra-high-performance liquid chromatographic tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Conditions of the UHPLC-MS/MS system were evaluated and the selection of the mobile phase was performed from a central composite planning. The extraction step was evaluated through tests using different solvents, mode and time of contact of the extraction solvent with the sample and comparing the use of dry and *slurry* samples. For the cleaning of the extracts three steps were evaluated: partition with dichloromethane, use of sorbents and addition of acetonitrile to the extract. In this step, the optimization of the sorbents was carried out from an experimental design. The proposed procedure consisted of the extraction of 10 g of *slurry* with 5 mL of ultrapure water and 5 mL of methanol with 1% (v/v) formic acid, and cleaning the extracts by partitioning the supernatant with dichloromethane (3:1.5 v/v), dispersive solid phase extraction (d-SPE) with chitosan and use of acetonitrile (1:1, v/v). The validation of the method presented satisfactory results of selectivity, linearity, accuracy and precision. Quantification of the analytes employing the curve by dilution of the spiked blank compensated for the strong matrix effect and recovery values for all compounds in both matrices. The proposed method is suitable for the determination of paraquat, diquat, mepiquat and chlormequat in barley and wheat and was applied with efficiency in 20 samples of barley and wheat, demonstrating the applicability of the method in routine laboratory analysis.

Keywords: Quaternary ammonium compounds, barley, wheat, HILIC, UHF MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dinâmica dos agrotóxicos na natureza.....	24
Figura 2 - Fórmula estrutural do dicloreto de paraquate.....	32
Figura 3 - Fórmula estrutural do dibrometo de diquate.....	35
Figura 4 - Fórmula estrutural do cloreto de clormequate.....	37
Figura 5 - Fórmula estrutural do cloreto de mepiquate.....	37
Figura 6 - Fluxograma geral para determinação de paraquate e diquate pelo método QuPPE.....	46
Figura 7 - Relação entre HILIC e as principais modalidades de cromatografia líquida.....	49
Figura 8 - Tipos de interações presentes na cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC).....	52
Figura 9 - Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas.....	63
Figura 10 - Sistema UHPC-MS/MS modelo Xevo TQ (Waters, EUA) utilizado.....	68
Figura 11 - Fluxograma do procedimento preliminar de extração.....	75
Figura 12 – Avaliação da área para os compostos clormequate, mepiquate, diquate e paraquate em relação a alterações das proporções de fase móvel (A/B), modo isocrático, sendo A= solução aquosa de formiato de amônio 150 mmol L ⁻¹ (pH ~ 3,7) e B= acetonitrila a uma vazão de 0,250 mL min ⁻¹	85
Figura 13 - Superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental para os compostos (A) paraquate, (B) diquate, (C) mepiquate e (D) clormequate.....	87
Figura 14 – Média das áreas dos compostos clormequate, mepiquate, diquate e paraquate de soluções (50 µg L ⁻¹) preparadas em diferentes solventes.....	88
Figura 15 - Média das recuperações (%) e respectivos RSD (%) para as extrações utilizando diferentes solventes, com ou sem a etapa de aquecimento.....	90
Figura 16 - Resultados em área para os compostos em estudo (amostra branco fortificada em 250 µg kg ⁻¹) na extração com diferentes solventes utilizando 10 gramas de <i>slurry</i> (1:1,5 m/v) ou 5 gramas de amostra.....	92

Figura 17 - Média das áreas obtidas nos diferentes procedimentos de co amostra fortificada com o solvente de extração.....	93
Figura 18 - Partição dos extratos com diferentes proporções de diclorometano: (A) 6 mL, (B) 3 mL e (C) e 1,5 mL.	94
Figura 19 - Média das áreas obtidas sem a etapa de partição com diclorometano, utilizando 1,5; 3 ou 6 mL de diclorometano.	95
Figura 20 - Média das áreas obtidas para cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate utilizando diferentes sorventes na etapa de limpeza dos extratos.....	96
Figura 21 - Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para otimização da etapa de limpeza dos extratos com PSA e quitosana para (A) paraquate, (B) diquate, (C) mepiquate e (D) cloromequate.	98
Figura 22 - Porcentagem de coextrativos removidos em cada combinação de PSA e quitosana proposta no planejamento experimental.	99
Figura 23 - Extrato de cevada após centrifugação do 10 g de <i>slurry</i> e 10 mL de solvente de extração (a); após centrifugação com diclorometano (b); após centrifugação com 70 mg quitosana (c) e após centrifugação da diluição em acetonitrila 1:1 (v/v) (d).	100
Figura 24 - Método de extração otimizado para determinação de agrotóxicos de amônio quaternário em cevada.	102
Figura 25 - Média das áreas das soluções padrão obtidas para cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate ($50 \mu\text{L}^{-1}$) oriundos de diferentes soluções analíticas de trabalho.....	103
Figura 26 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra branco de cevada fortificada na concentração de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, uma amostra branco de cevada e o branco reagente, respectivamente, para (A) cloromequate, (B) mepiquate, (C) diquate e (D) paraquate.	104
Figura 27 - Curvas analíticas no solvente (CS), na matriz (CM), na matriz branco fortificada (CMF) e por diluição da matriz branco fortificada (CDMF) com respectivos valores de coeficientes de determinação (r^2) para (A) cloromequate, (B) mepiquate, (C) diquate e (D) paraquate.	106
Figura 28 - Extrato de trigo após centrifugação do 10 g de <i>slurry</i> e 10 mL de solvente de extração (a); após centrifugação com diclorometano (b); após centrifugação com 70 mg quitosana (c) e após centrifugação da diluição em acetonitrila 1:1 (v/v) (d).	109
Figura 29 – Cromatogramas obtidos por UHLPC-MS/MS para uma amostra positiva, LOQ e amostra branco para o paraquate em cevada (A) e trigo (B).	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal aproximada de grãos de cereais (%).	22
Tabela 2 - Limites máximos de resíduos para paraquate, diquate, cloromequate e mepiquate em diferentes matrizes de acordo com a ANVISA, Codex Alimentarius e União Europeia.	25
Tabela 3 - Principais características físico-químicas dos compostos paraquate, diquate, mepiquate e cloromequate.....	31
Tabela 4 - Principais características de métodos desenvolvidos (a partir do ano 2000) para análise de QUATs em amostras de alimentos empregando técnicas cromatográficas.	59
Tabela 5 - Características dos padrões sólidos utilizados.	71
Tabela 6 - Condições dos parâmetros avaliados para otimização da fase móvel gerados a partir do planejamento de composto central.	73
Tabela 7 – Ensaio realizado para avaliação da utilização de <i>slurry</i>	76
Tabela 8 – Composição das soluções padrões avaliadas quanto a estabilidade. .	81
Tabela 9 - Configurações utilizadas para quantificação e identificação de cada composto.	86
Tabela 10 - Valores de limites máximos permitidos para os agrotóxicos em estudo para a matriz cevada e valores de LOQ e LOD obtidos pela metodologia proposta.	107
Tabela 11 - Média das recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos considerando as quatro curvas analíticas preparadas para cevada. .	107
Tabela 12 - Recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos nos níveis avaliados para precisão intermediária (matriz cevada).....	108
Tabela 13 - Valores de coeficientes de determinação (r^2) para as CMF e CDMF para trigo considerando os quatro analitos.	110
Tabela 14 - Valores de limites máximos permitidos para os agrotóxicos para a matriz trigo e valores de LOQ e LOD obtidos pela metodologia proposta.	110
Tabela 15 - Recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos considerando a CDMF para a matriz trigo.	110

Tabela 16 - Média dos resultados das análises de amostras reais positiva cevada (C) e trigo (T) em relação ao paraquate para CMF e CDMF e va estatísticos para avaliação da similaridade entre as análises.....111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas técnicas
 ACN - Acetonitrila
 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 ANP - Fase normal aquosa, do inglês *aqueous normal phase*
 APCI - Ionização química à pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*
 API - ionização a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure ionization*
 APPI - fotoionização a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure photoionization*
 C8 - Octilsilano
 C18 - Octadecilsilano
 CFI - Corte de Primeira Instância, do inglês *Court of First Instance*
 CIT - Centro de Informações Toxicológicas
 CQ - Cloromequate
 CMF - Curva na matriz branco fortificada
 CM - Curva na matriz
 CDMF - Curva por diluição da matriz branco fortificada
 CS - Curva no solvente
 DAD - Detector com arranjo de diodos
 DC - Corrente direta, do inglês *direct current*
 DCM - Diclorometano
 DOU - Diário Oficial da União
 DQ - Diquate
 d-SPE - Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*
 EM - Efeito matriz
 EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
 EMR-Lipid - *Enhanced matrix removal of lipids*
 EPI - Equipamento de proteção individual
 ESI - Ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
 EURL-SRM, do inglês *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods*
 eV - Elétron volt
 FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
 FQ - Difenzoquat
 GCB - Carbono grafitizado, do inglês *graphitized carbon black*
 HFBA - Ácido heptafluorobutírico
 HIC - Cromatografia de interação hidrofílica, do inglês *hydrophilic interaction chromatography*
 HILIC - Cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*
 HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
 IDA - Ingestão diária aceitável
 INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO/IEC - *International Organization for Standardization/ International Electrotech Commission*

LC - Cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*

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

LMR - Limite máximo de resíduo

LOD - Limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ - Limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

m/z - Razão massa carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCX - Trocador catiônico de modo misto, do inglês *Mixed-mode Cation eXchange*

MQ - Mepiquate

MS - Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

MS/MS - Espectrometria de massas em série, do inglês *mass spectrometry in tandem*

OMS - Organização Mundial da Saúde

p.a. - Grau para análise

PAN - Pesticide Action Network

PARA - Programa de análise de resíduos de agrotóxicos

p.c. - Peso corpóreo

PCC - Planejamento de composto central

pH - Potencial hidrogeniônico

PI - Padrão interno

PQ - Paraquate

P_{ow} - Coeficiente de partição octanol/água

PÓS - Pós emergência

PP - polipropileno

PPI - Pré plantio incorporado

PRÉ - Pré emergência

PSA - amina primária secundária, do inglês *primary secondary amine*

PTFE - Politetrafluoretileno

Q1 - Primeiro quadrupolo

q2 - Segundo quadrupolo ou cela de colisão

Q3 - Terceiro quadrupolo

QqQ - Triplo quadrupolo

QuPPE - Método rápido para agrotóxicos polares, do inglês *Quick Polar Pesticides Method*

QUATs - Compostos de amônio quaternário

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

r^2 - Coeficiente de determinação

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RF - Radiofrequência

RSD - Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

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

SCX - Trocador catiônico forte, do inglês *strong cation exchange*

SPE - Extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SRM - Monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selected reaction monitoring*

TFA - Ácido trifluoroacético

TOF - Analisador de massas por tempo de voo, do inglês *time of flight*

t_R - Tempo de retenção

UE - União Europeia, do inglês *European Union*

UHPLC - Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês *ultra performance liquid chromatography*

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, do inglês *ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

WCX - Trocador catiônico fraco, do inglês *Weak Cation eXchange*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	20
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 CEREAIS	21
2.2 AGROTÓXICOS	23
2.2.1 Herbicidas	26
2.2.2 Reguladores de crescimento	28
2.2.3 Agrotóxicos de amônio quaternário	29
2.2.3.1 <i>Paraquate</i>	31
2.2.3.2 <i>Diquate</i>	35
2.2.3.3 <i>Cloromequate</i>	36
2.2.3.4 <i>Mepiquate</i>	37
2.3 TÉCNICAS E MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO	38
2.3.1 Extração com solventes	39
2.3.1.1 <i>Extração utilizando aquecimento</i>	40
2.3.1.2 <i>Extração utilizando ultrassom</i>	41
2.3.2 Extração em fase sólida	42
2.3.2.1 <i>Extração em fase sólida dispersiva</i>	43
2.3.3 QuPPE	45
2.3.4 QuEChERS	46
2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	47
2.4.1 Cromatografia de interação hidrofílica	48
2.4.2 Espectrometria de massas	53
2.4.2.1 <i>Fontes de ionização</i>	54
2.4.2.2 <i>Analisadores de massas</i>	54
2.4.2.3 <i>Técnicas de varredura para obtenção do espectro em analisadores sequenciais</i>	56
2.4.3 Determinação de compostos de amônio quaternário em alimentos empregando técnicas cromatográficas	56
2.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	63
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	64
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67

3.1 INSTRUMENTAÇÃO	67
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS.....	69
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	70
3.4 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS	71
3.4.1 Otimização da fase móvel	72
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS DE CEVADA	73
3.5.1 Processamento das amostras	73
3.5.2 Avaliação da resposta cromatográfica dos analitos em diferentes solventes de extração.....	73
3.5.3 Etapa de extração – procedimento preliminar.....	74
3.5.4 Extrações utilizando <i>slurry</i>	75
3.5.4.1 <i>Avaliação do modo de contato (amostra + solvente de extração) e tempos de extração</i>	<i>76</i>
3.5.5 Etapa de limpeza	77
3.5.5.1 <i>Partição com solvente orgânico.....</i>	<i>77</i>
3.5.5.2 <i>Sorventes</i>	<i>78</i>
3.6 AVALIAÇÃO DO PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO INDIVIDUAL E MISTURA.....	80
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	81
3.8 EXTENSÃO DO ESCOPO DO MÉTODO PARA MATRIZ TRIGO	83
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE CEVADA E TRIGO	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	84
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	84
4.1.1 Otimização da fase móvel	86
4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS EM DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO	88
4.3 TESTES DE EXTRAÇÃO DE QUATs EM AMOSTRA DE CEVADA	89
4.3.1 Testes preliminares.....	89
4.3.2 Testes de extração utilizando <i>slurry</i>	91
4.3.2.1 <i>Avaliação do modo de contato (amostra + solvente de extração) e tempos de extração</i>	<i>93</i>
4.4 ETAPA DE LIMPEZA.....	94
4.4.1 Partição com solvente orgânico	94
4.4.2 Sorventes	96
4.4.2.1 <i>Otimização do sorvente</i>	<i>98</i>
4.4.3 Diluição em acetonitrila	100
4.5 MÉTODO OTIMIZADO	101
4.6 AVALIAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE MISTURA	102

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	104
4.7.1 Seletividade	104
4.7.2 Efeito matriz.....	104
4.7.3 Linearidade	105
4.7.4 LOQ e LOD	106
4.7.5 Exatidão e precisão.....	107
4.8 EXTENSÃO DO ESCOPO DO MÉTODO PARA MATRIZ TRIGO	109
4.9 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE QUATs EM AMOSTRAS DE CEVADA E TRIGO	111
5. CONCLUSÕES	114
6. DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	116
7. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	117
8. REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos em larga escala tornou-se uma prática comum para possibilitar o suprimento da atual demanda global por alimentos. Porém, o uso destes produtos químicos pode causar prejuízos severos à saúde humana e ao meio ambiente, principalmente pela alta toxicidade apresentada por alguns deles. Diante deste cenário, torna-se essencial o monitoramento dos resíduos destes agrotóxicos que podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais e nos alimentos que colocamos à mesa.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica bastante utilizada para determinação dos resíduos de agrotóxicos e apresenta resultados satisfatórios na avaliação destes resíduos em amostras complexas com possibilidade de determinar um grande número de analitos em uma única análise.

Durante a produção de cereais, como trigo e cevada, são utilizados agrotóxicos com o intuito de garantir a qualidade e a produtividade. Neste sentido, herbicidas são utilizados na etapa de dessecação pré-colheita (mesmo que em alguns casos não sejam autorizados) e reguladores de crescimento são utilizados para controlar o crescimento e evitar o acamamento em algumas culturas de cereais.

Os compostos de amônio quaternário (QUATs) incluem os herbicidas paraquate e diquate e os reguladores de crescimento cloromequate e mepiquate. O paraquate é conhecido mundialmente pela sua eficiência agrônômica e também pela sua alta toxicidade, motivo do qual é banido em muitos países. Quando estes agrotóxicos são utilizados no final do ciclo de produção dos cereais existe uma maior possibilidade de se encontrar resíduos destes agrotóxicos nos produtos agrícolas tanto na sua forma natural, como nos alimentos processados.

Pela alta polaridade destes compostos, aliada a outras características físico-químicas específicas, estes não são normalmente analisados em métodos multirresíduo de rotina utilizados na maioria dos laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos, pois necessitam de condições diferenciadas de extração e de determinação cromatográfica, aumentando custos e tempo de análise.

Recentemente, avanços relacionados a novas colunas cromatográficas - como a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) - e o surgimento de um método oficial desenvolvido pela União Europeia (QuPPE Method) para análises de

compostos polares movimentaram a pesquisa voltada a análise destes agrotóxicos nas últimas décadas.

Diante desse contexto, é de extrema relevância o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis, capazes de identificar e quantificar estes analitos em matrizes alimentícias sem o comprometimento do sistema cromatográfico, para que os mesmos possam ser utilizados em laboratórios na determinação de agrotóxicos. O estabelecimento de métodos demanda um preparo de amostra adequado, que seja rápido, de custo acessível e eficiente para possibilitar análises confiáveis, mesmo em concentrações muito baixas.

Nesta pesquisa desenvolveu-se um método para determinação de compostos de amônio quaternário em cevada e trigo, partindo inicialmente de uma metodologia adaptada do método oficial QuPPE, otimizando e selecionando melhores condições de extração, limpeza do extrato e determinação dos analitos utilizando HILIC-UHPLC-MS/MS.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

A presente pesquisa tem por objetivo o desenvolvimento e validação de um método para análise de paraquate, diquate, cloromequate e mepiquate em cevada e trigo utilizando a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) em cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS).

1.1.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos desta pesquisa têm-se:

- ✓ Avaliar as melhores condições do sistema cromatográfico para a determinação dos compostos de amônio quaternário;
- ✓ Otimizar a fase móvel a partir do planejamento de composto central avaliando o efeito do pH e da concentração de formiato de amônio na fase móvel aquosa;
- ✓ Avaliar as melhores condições para extração dos analitos da matriz cevada;
- ✓ Avaliar diferentes etapas de limpeza do extrato;
- ✓ Otimizar a etapa de limpeza com sorvente utilizando o planejamento de composto central;
- ✓ Avaliar o comportamento das soluções padrões individuais e de mistura sob diferentes modos de preparo;
- ✓ Validar o método proposto;
- ✓ Avaliar a utilização da curva analítica por diluição da matriz branco fortificada;
- ✓ Avaliar a extensão do escopo e aplicação do método para a matriz trigo;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em amostras de cevada e trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fundamentação teórica desta pesquisa consiste na descrição de algumas características e especificações de matrizes de cereais, seguida de uma análise sobre agrotóxicos e o uso destes, com enfoque em cevada e trigo.

Num segundo momento, descrevem-se os aspectos referentes aos compostos de amônio quaternário (paraquate, diquate, clormequate e mepiquate), sendo estes os agrotóxicos foco deste estudo.

Posteriormente, têm-se uma abordagem sobre o preparo de amostra para a determinação destes compostos, seguida de uma revisão sobre cromatografia líquida com destaque para a cromatografia de interação hidrofílica e espectrometria de massas descrevendo sobre a utilização destas técnicas para a determinação de compostos de amônio quaternário.

Por último, são descritas algumas características para a realização de planejamentos experimentais, além de algumas especificações e requisitos para a validação de métodos cromatográficos.

2.1 CEREAIS

Os cereais constituem um dos grupos de alimentos mais produzidos e consumidos em todo o mundo principalmente pela sua importância nutricional, sendo fonte de energia, contendo alto teor de ácidos graxos essenciais, proteínas, fibras minerais, vitaminas e outros micronutrientes essenciais para a saúde (SERNA-SALDIVAR, 2010; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012). Além disso, também servem de base para duas das mais antigas tecnologias de alimentos, a produção de pães e a fermentação de bebidas alcoólicas (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012).

De acordo com Serna-Saldivar (2010), os cereais compõem-se de carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. Os principais constituintes dos cereais (>80%) são os carboidratos, que incluem o extrato livre de nitrogênio, composto por açúcares solúveis como a glicose, frutose, sacarose e maltose. Além disso, possuem fibras cruas, constituídas de carboidratos associados às paredes das células, os quais são insolúveis e não digeríveis pelo corpo humano. As proteínas estão presentes em uma faixa média de 7 a 17% e sua constituição difere bastante pela espécie e pelas condições ambientais de desenvolvimento. Os minerais e os lipídeos são os

constituintes presente em menores concentrações, os primeiros dividem-se em materiais orgânicos e inorgânicos e são obtidos após a secagem dos grãos e os segundos, são compostos majoritariamente por triglicerídeos (SERNA-SALDIVAR, 2010). A Tabela 1 apresenta a composição centesimal aproximada de diferentes tipos de cereais.

Tabela 1 - Composição centesimal aproximada de grãos de cereais (%).

	Proteínas	Lipídeos	Fibras cruas	Minerais	Extrato livre de nitrogênio
Milho	8,1 - 14,2	3,7 - 9,0	1,6 - 3,5	1,4 - 2,7	70,9 - 84,2
Arroz	7,0 - 10,1	0,3 - 3,3	0,2 - 12,1	0,3 - 6,0	70,2 - 91,9
Trigo	8,0 - 17,0	1,8 - 3,8	2,4 - 3,1	1,7 - 2,1	75,2 - 85,1
Cevada	7,5 - 15,6	1,8 - 2,6	5,3 - 5,9	2,6 - 3,1	72,8 - 82,8

Fonte: Adaptado de SERNA-SALDIVAR (2010).

As culturas de cereais são normalmente divididas em culturas de verão e culturas de inverno; sendo as culturas de verão predominantes: soja, milho, arroz, feijão e sorgo; e de inverno: cevada, trigo, aveia, canola, centeio e triticale (cereal oriundo da hibridização do trigo e do centeio) (CONAB, 2018).

A cevada é utilizada na industrialização de bebidas, farinhas, medicamentos, produtos dietéticos e semelhantes ao café. Além disso, também é empregada na alimentação animal como forragem e na fabricação de rações (EMBRAPA, 2018). De acordo com o levantamento sistemático da produção agrícola fornecido pelo IBGE (2018) o Brasil produziu em torno de 286 mil toneladas de cevada na safra de 2017 e 427 mil toneladas em 2018, apresentando um aumento de cerca de 49% na produção deste cereal no último ano. A semeadura de cevada nacional está concentrado na região Sul do estado (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) (CONAB, 2018; EMBRAPA, 2018; IBGE, 2018) e estima-se um aumento do cultivo deste cereal, principalmente em função do maior fomento por parte das maltarias (CONAB, 2018; EMBRAPA, 2018).

O trigo é um dos principais produtos agrícolas comercializados em escala mundial e destinado ao consumo humano. Está integrado a diversas cadeias produtivas, sobretudo no setor de alimentos onde se insere como principal matéria prima na elaboração de diversos tipos de farinhas, pães e massas. Ainda, é utilizado como ingrediente de rações para animais (FARIAS et al., 2016).

De acordo com Farias e colaboradores (2016) a produção de trigo no Brasil atende aproximadamente metade da necessidade do país. Entretanto, a produção nacional deste cereal teve um aumento de 32,7% comparando as safras de 2017 e 2018, sendo produzido mais de 5 milhões de toneladas no ano de 2018. Só na região Sul a safra de 2018 atinge quase 5 milhões de toneladas (IBGE, 2018), demonstrando uma maior concentração do cultivo deste cereal nesta região, mais especificadamente no Rio Grande do Sul e Paraná (CONAB, 2018).

Durante a produção dos cereais são utilizadas grandes quantidade de agrotóxicos para evitar doenças foliares, pragas, plantas daninhas invasoras, pragas de armazenagem, entre outras, com o intuito de garantir a qualidade e a produtividade (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012). Normalmente, o modo de aplicação de agrotóxicos como inseticidas, fungicidas, herbicidas e reguladores de crescimento ocorre por pulverização sobre os cereais (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012).

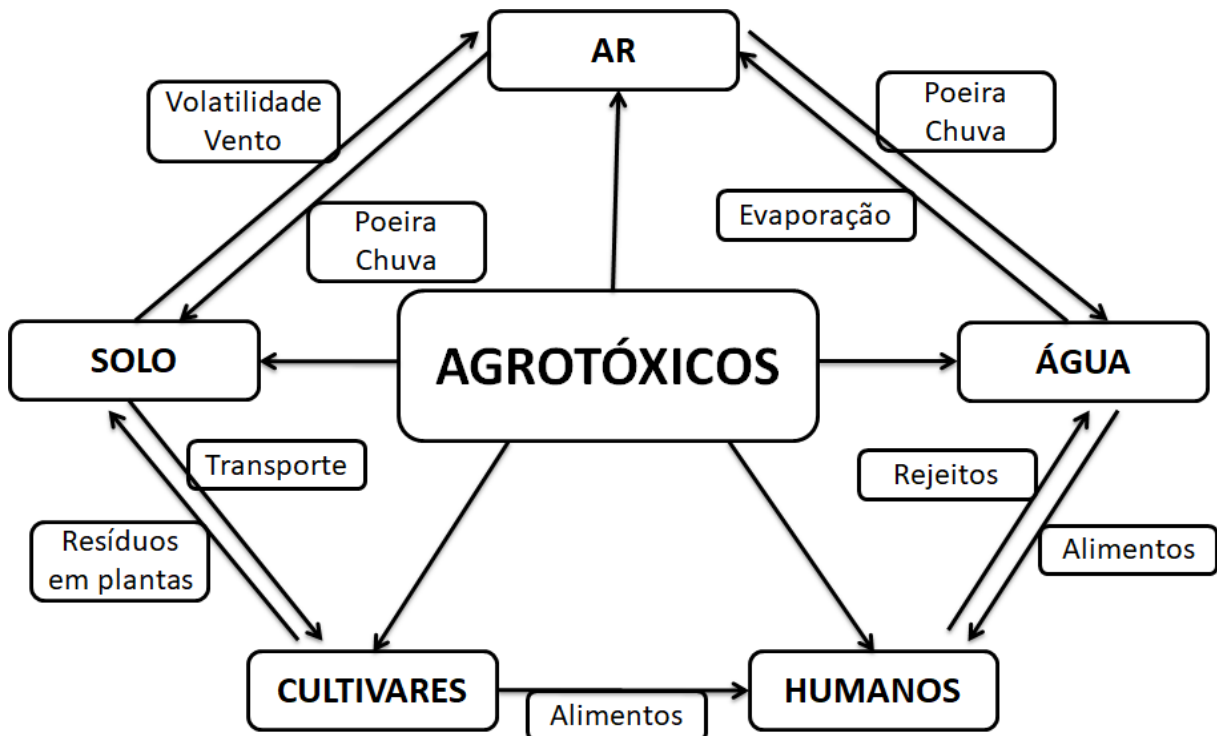
2.2 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos usados em diferentes ecossistemas ou ambientes urbanos, hídricos e industriais visando alterar a composição da flora ou da fauna com o intuito de preservá-las contra a ação de seres vivos considerados nocivos e ainda, os produtos utilizados como modificadores do desenvolvimento de plantas (BRASIL, 2002). Estes compostos podem ser classificados de acordo com o organismo-alvo, sendo que as três principais categorias são os fungicidas, herbicidas e inseticidas, destinados a eliminação de fungos, plantas daninhas e insetos, respectivamente (BAIRD, 2002).

Grande parte do aumento da produção agrícola das últimas décadas está relacionada ao uso de agrotóxicos em larga escala, necessários para suprir a demanda global de alimentos e que tornou muitos países autossuficientes. Por outro lado, estes mesmos compostos podem causar inúmeros prejuízos a saúde humana e ao meio ambiente, como a persistência de alguns compostos e o agravamento de doenças (inclusive carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas) e mortes ocasionadas principalmente pelo uso indevido destes compostos (NOLLET & RATHORE, 2010). Além disso, o uso generalizado de agrotóxicos pode contaminar locais distantes dos locais de aplicação, uma vez que podem ser transportados pela

chuva e pelo vento (FENIK, TANKIEWICZ & BIZIUK, 2011). A Figura 1 apresenta um esquema da dinâmica dos agrotóxicos na natureza.

Figura 1 - Dinâmica dos agrotóxicos na natureza.



Fonte: Adaptado de Fenik, Tankiewicz & Biziuk, 2011.

O Brasil lidera o ranking da quantidade de agrotóxicos consumidos no mundo, apresentando no ano de 2015 um consumo de 887,6 mil toneladas de produto comercial. Destes, em média 44,5% (395,6 mil toneladas) é referente ao princípio ativo. Cabe ressaltar que no país, a agricultura é praticada em sua maioria em ambientes tropicais, mais propícios a ocorrência de pragas, quando comparado a regiões temperadas onde as pragas são reduzidas devido ao inverno rigoroso (MENTEN, 2016).

De acordo com Barbosa (2004), se um composto é utilizado em uma determinada plantação sempre haverá resíduo desse composto no alimento, independente da possibilidade de detectá-lo ou não. Para tanto, considera-se resíduo pequenas quantidades de compostos aplicados ou produtos resultantes de sua degradação. Os resíduos podem ser encontrados nos produtos agrícolas na sua forma natural ou nos alimentos processados, onde pode ocorrer a concentração ou a diminuição dos níveis de resíduos (BARBOSA, 2004). Diante disso, existe uma grande

preocupação relacionada ao monitoramento dos resíduos de agrotóxicos nos diferentes compartimentos ambientais com o intuito de manter a poluição gerada com o uso destes produtos dentro de níveis seguros (NOLLET & RATHORE, 2010) e além disso, garantir a qualidade dos alimentos de origem animal e vegetal para evitar possíveis riscos a saúde humana (JARDIM, ANDRADE & QUEIROZ, 2009; CHOI et al., 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulamentador que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) para agrotóxicos em diversas matrizes (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016). Em relação aos agrotóxicos foco deste estudo (paraquate, diquate, mepiquate e cloromequate) pode-se verificar na Tabela 2 os LMRs permitidos para estes compostos em algumas matrizes de acordo com a ANVISA, Codex Alimentarius e União Europeia.

Tabela 2 - Limites máximos de resíduos para paraquate, diquate, cloromequate e mepiquate em diferentes matrizes de acordo com a ANVISA, Codex Alimentarius e União Europeia.

		Cevada	Milho	Trigo	Soja	Arroz	Algodão/ semente	
LMR's (mg kg⁻¹)	Paraquate	ANVISA	-	0,1	0,01	0,1	0,5	0,2
		CODEX	-	0,03	-	0,5	0,05	2,0
		UE	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,1
	Diquate	ANVISA	-	0,01	-	0,2	0,2	0,01
		CODEX	5,0	-	2,0	0,3	-	-
		UE	0,02	0,02	0,02	0,3	0,02	0,01
	Cloromequate	ANVISA	-	-	-	-	-	0,5
		CODEX	2,0	-	3,0	-	-	0,5
		UE	3,0	0,01	4,0	0,01	0,01	0,7
	Mepiquate	ANVISA	-	-	-	-	-	1,0
		CODEX	-	-	-	-	-	-
		UE	4,0	0,02	3,0	0,05	0,02	0,05

Fontes: ANVISA (Monografias de agrotóxicos), Codex Alimentarius (Pesticide Database Search) e EU (Pesticide database).

A ANVISA também é responsável pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (criado em 2002) com o objetivo de realização de um monitoramento quanto aos tipos e quantidades de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal comercializados no varejo. Os resultados são divulgados

em relatórios anuais que têm constituído um dos principais indicadores da qualidade dos alimentos e dos riscos de exposição da população brasileira (ANVISA, 2015a).

Entre os agrotóxicos deste estudo, têm-se o paraquate e o diquate que pertencem a classe dos herbicidas e o mepiquate e cloromequate que pertencem a classe dos reguladores de crescimento. Diante disso, essas duas classes serão brevemente abordadas ao longo desta fundamentação.

2.2.1 Herbicidas

Como visto anteriormente, a finalidade dos herbicidas é controlar plantas daninhas e neste sentido são normalmente empregados para mata-las sem causar prejuízo a vegetação de interesse, eliminar plantas indesejáveis das margens de estradas e ferrovias, marcar linhas de trilhas ou desfolhar regiões inteiras, substituindo então a ação humana e a capina mecânica (BAIRD, 2002). Além disso, estes compostos são normalmente utilizados na dessecação pré colheita de cereais visando a maturação e/ou uniformização das culturas. Porém, essa prática necessita de estudos referentes ao modo de aplicação, viabilidade econômica e quantificação de resíduos nos grãos colhidos para avaliação da real importância e possibilidade de uso dessa estratégia (VARGAS et al., 2016).

Em virtude da diversidade de modos de ação e composição química dos herbicidas, existem várias maneiras de classificação dos mesmos, sendo que as principais envolvem aspectos relacionados a seletividade, a translocação, a época de aplicação, a estrutura química, ao mecanismo de ação, entre outros (OLIVEIRA Jr, CONSTANTIM & INOUE, 2011; CARVALHO, 2013).

Em relação a seletividade, os herbicidas podem ser seletivos ou não seletivos. No primeiro caso, o composto é capaz de matar ou restringir severamente o crescimento de plantas daninhas em uma cultura sem prejudicar as espécies de interesse. Já os herbicidas não seletivos possuem um amplo espectro de ação, com capacidade de matar ou injuriar severamente a maior parte das plantas. Como exemplos deste, tem-se o glifosato, o paraquate e o diquate. Na classificação quanto a translocação, tem-se os herbicidas de ação de contato, que não se translocam ou o fazem de maneira muito limitada, normalmente com efeito rápido e agudo, como o paraquate; e os herbicidas de ação sistêmica, caracterizados por efeito mais

demorado e crônico (OLIVEIRA Jr, CONSTANTIM & INOUE, 2011; CARVALHO, 2013).

A época de aplicação dos herbicidas é um aspecto importante para garantir a eficiência da absorção pelos diferentes tipos de plantas. De um modo geral, segundo Oliveira Jr, Constantim & Inoue (2011) podem ser realizadas em três principais épocas:

- Pré-plantio e incorporado (PPI): os produtos são aplicados ao solo e posteriormente precisam de incorporação, que pode ser mecânica ou por irrigação.

- Pré-emergência (PRÉ): a aplicação ocorre após a semeadura ou plantio, mas antes da emergência da cultura e das plantas daninhas.

- Pós-emergência (PÓS): neste caso, as plantas daninhas encontram-se emergidas, mas a cultura nem sempre.

A classificação em relação a estrutura química possui maior utilidade quando associada ao mecanismo de ação, uma vez que é insuficiente no propósito de avaliar a atividade dos herbicidas sobre as plantas, principalmente pelo fato de que herbicidas de uma mesma família de compostos podem atuar de maneira diferente no controle de plantas daninhas (OLIVEIRA Jr, CONSTANTIM & INOUE, 2011).

Cereais como trigo, aveia, cevada e triticale são cultivados em diversos estados brasileiros e são várias as espécies daninhas que causam perdas econômicas na produtividade dessas culturas (VARGAS & ROMAN, 2005). Estas podem provocar dificuldades na colheita, elevação da umidade dos grãos e dos custos de secagem, favorecimento da fermentação e aumento da incidência de pragas no armazenamento. Além disso, podem causar a contaminação de grãos com partes de plantas daninhas e/ou sementes destas, provocando depreciação do produto e tornando o valor recebido pelos produtores menor, em função dos descontos gerados pelas impurezas e pela umidade dos grãos (VARGAS & ROMAN, 2005).

O método mais utilizado para controle de plantas daninhas em cereais é o uso de herbicidas, sendo este mais rápido e eficiente quando comparado a medidas mecânicas (EMBRAPA, 2006; BORÉM & SCHEEREN, 2015). Porém, estes produtos devem ser usados com critérios rígidos, levando em consideração o custo, eficiência e segurança ao meio ambiente e ao homem. Estes compostos não devem ser utilizados como única ferramenta de controle, e sim, considerada como parte de um programa integrado de controle de plantas daninhas (EMBRAPA, 2006).

Conforme especificações técnicas para o cultivo de trigo indicadas pela EMBRAPA (2016), entre os herbicidas indicados para o controle de plantas infestantes na dessecação em pré-colheita têm-se o glifosato, o paraquate e associações destes com outros agrotóxicos (BORÉM & SCHEEREN, 2015). Em relação a sementeira, estes devem ser aplicados no mínimo um dia antes e deve-se estar alerta sobre o risco de contaminação direta dos grãos pelo uso destes herbicidas (EMBRAPA, 2016).

Entre os principais herbicidas registrados para o controle de plantas daninhas em cevada têm-se o 2,4-D e o metsulfuron metílico (EMBRAPA, 2013; GALON et al., 2014). Porém, Caierão & Acosta (2007) realizaram diferentes aplicações de paraquate e glifosato para dessecação de cevada e concluíram que os mesmos não prejudicam a germinação das sementes e não aceleram o processo de perda de germinação ao longo do período de armazenagem. Além disso, o diquate é autorizado e comumente utilizado em outros países como dessecante em cevada, porém, com a diminuição do limite máximo permitido deste agrotóxico pela União Europeia, de 10,0 para 0,02 mg kg⁻¹, o uso do mesmo foi restringido (HEALTH AND SAFETY EXECUTIVE, 2018).

2.2.2 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento ou bioreguladores de plantas podem ser usados para alterar as condições de crescimento (RADEMACHER, 2000) e estão envolvidos em muitos aspectos do desenvolvimento das plantas como a floração e o enraizamento, entre outros (ARTECA, 1996).

Estes produtos são usados em plantas ornamentais para controle de tamanho e árvores frutíferas para melhoramento das frutas. No entanto, os principais usos destes compostos são na agricultura, principalmente para facilitar a colheita e aumentar a produtividade de culturas de cereais (LACA-BUENDIA, 1989; ARTECA, 1996). Devido ao aumento da aplicação na agricultura, a ocorrência de reguladores de crescimento no meio ambiente vem recebendo atenção mundial (YU et al., 2010).

Existe uma grande variedade de compostos capazes de afetar o desenvolvimento das plantas (ARTECA, 1996). O grupo mais importante do ponto de vista comercial é caracterizado pelos compostos retardantes de crescimento, que podem ainda ser classificados em dois grupos principais: compostos que liberam etileno e inibidores do ácido giberélico (RADEMACHER, 2000).

Diferentes grupos químicos podem ser utilizados para inibir a biossíntese das giberelinas e cada grupo inibe o metabolismo em diferentes etapas (RADEMACHER, 2000). Os compostos de amônio quaternário como o mepiquate e o clormequate se enquadram no grupo de compostos tipo "*onium*" e atuam principalmente reduzindo os níveis das giberelinas endógenas, por meio da inativação dos genes do metabolismo e da biossíntese (RADEMACHER, 2000; SANTOS et al., 2015).

A utilização de reguladores de crescimento em culturas de cereais ocorre principalmente para controle do crescimento de algumas culturas que são submetidas a altas doses de nitrogênio como fertilizante. Diante disto, estes compostos são utilizados para controle de estatura e proteção contra quebras e acamamento, fatores que prejudicam a qualidade e a produtividade (ZAGONEL et al., 2002; ZAGONEL & FERREIRA, 2013).

As aplicações de reguladores de crescimento em culturas de trigo são restritas às cultivares com tendência ao acamamento, em solos de elevada fertilidade e em trigo irrigado (EMBRAPA, 2016). De acordo com Sørensen e colaboradores (2009), era previsto que em torno de 70% da safra de trigo seria tratada com reguladores de crescimento na União Europeia, e, entre estes, o clormequate é o mais utilizado (FAO, 2008c). Espindula e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos de reguladores de crescimento na alongação do colmo de trigo e observaram que o aumento das doses de clormequate promove a redução do comprimento do colmo e das partes que o formam, e que esta ação é indiferente da época de aplicação conforme descrito anteriormente por Rossarola, Aude & Santos (1993). A utilização deste composto também não afeta a germinação e o vigor das sementes de trigo (SOUZA et al., 2010).

Ainda, tanto o mepiquate quanto o clormequate são utilizados para controlar o crescimento e evitar o acamamento em culturas de cereais como cevada e centeio (ZAGONEL et al., 2002; ZAGONEL & FERREIRA, 2013; CCANCCAPA & PICÓ, 2017).

2.2.3 Agrotóxicos de amônio quaternário

Agrotóxicos de amônio quaternário, denominados QUATs, constituem um grupo importante de agrotóxicos compreendendo os compostos paraquate (PQ), diquate (DQ), difenzoquat (FQ), mepiquate (MQ) e clormequate (CQ) (RAINA-FULTON, 2014; NARDIN et al., 2017).

O paraquate e o diquate são herbicidas de contato não seletivos de amplo espectro usados no controle de plantas daninhas terrestres e aquáticas, possuem forte atividade herbicida, que, aliada ao alto potencial de absorção ao solo justificam o uso destes compostos em larga escala em muitos países (KOLBERG et al., 2012). Também são aplicados como desfolhantes em culturas de algodão e como dessecantes em culturas de abacaxi, batata, cana e girassol (CCANCCAPA & PICÓ, 2017).

O difenzoquat é um herbicida seletivo normalmente utilizado no controle pós-emergente de aveia em culturas de cereais (PICÓ et al., 2000; CASTRO, MOYANO & GALCERAN, 2001, NARDIN et al., 2017). Já o mepiquate o clormequate são utilizados como reguladores do crescimento. O primeiro é utilizado para reduzir o crescimento vegetativo e inibir a germinação em culturas de algodão (MCCARTY & HEDIN, 1994; CASTRO, MOYANO & GALCERAN, 2001) e o segundo, normalmente utilizado em plantas ornamentais (CASTRO, MOYANO & GALCERAN, 2001). Além disso, os dois são utilizados para controlar o crescimento em algumas culturas de cereais conforme descrito anteriormente (ZAGONEL et al., 2002; ZAGONEL & FERREIRA, 2013; CCANCCAPA & PICÓ, 2017).

A Tabela 3 apresenta as principais características físico-químicas dos compostos paraquate, diquate, mepiquate e clormequate, os quais são o foco do presente estudo e que serão discutidos nos próximos itens. Os quatro compostos são normalmente formulados na forma de sais de cloro (paraquate, mepiquate ou clormequate) ou bromo (diquate), porém, para simplificação, serão abordados normalmente na sua forma iônica.

De acordo com os dados descritos na Tabela 3 pode-se observar a alta solubilidade dos compostos em água (de 500 a 886 g L⁻¹) e a baixa solubilidade em solventes orgânicos, bem como, valores do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (log P_{ow}) negativos, enfatizando a alta polaridade dos analitos em estudo, principal característica relacionada a exclusão destes compostos de métodos multirresíduo de análises de agrotóxicos (RAINA-FULTON, 2014).

Tabela 3 - Principais características físico-químicas dos compostos paraquate, diquate, mepiquate e clormequate.

Nome comum (ISO)	Dicloreto de paraquate	Dibrometo de diquate	Cloreto de clormequate	Cloreto de mepiquate
Nome químico (IUPAC)	1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride	9,10-dihydro-8a,10a-diazoniaphenanthrene dibromide	2-chloroethyltrimethylammonium chloride	1,1-dimethylpiperidinium chloride
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	C ₁₂ H ₁₂ Br ₂ N ₂	C ₅ H ₁₃ Cl ₂ N	C ₇ H ₁₆ ClN
Massa molecular (g mol ⁻¹)	257,16	344,05	158,07	149,66
Densidade relativa (gm L ⁻¹)	1,5	1,61	-	1,16
Solubilidade em água a 20 °C (g L ⁻¹)	620	718	886	500
Solubilidade em solventes orgânicos (g L ⁻¹)	Acetona, tolueno, acetato de etila, hexano: 0,1	Metanol: 25 Acetona, tolueno, acetato de etila: 0,1	Metanol: 365 n-heptano:0,01 acetona:0,13 acetato de etila: 0,01	Metanol: 487 tolueno, n-heptano:0,01 acetona:0,02
Coefficiente de partição (log P _{ow}) pH 7; 20 °C	-4,5	- 4.6	-3,47	-3,55

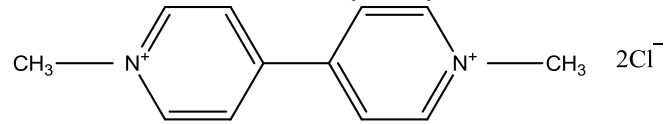
Fonte: PPDB, 2016.

Entre as técnicas empregadas em análises de compostos de amônio quaternário encontram-se a cromatografia líquida (RAINA-FULTON, 2014) ou gasosa (POSECION, OSTREA & BIELAWSKI, 2008; GAO et al., 2014), métodos eletroquímicos (SOUZA & MACHADO, 2005; EL KASMI et al., 2016), colorimetria (CHUNTIB & JAKMUNEE, 2015), imunoenaios (GARCIA-FEBRERO et al., 2014) entre outros.

2.2.3.1 Paraquate

O paraquate é um herbicida não seletivo normalmente formulado na forma de sal diclorídrico e sua fórmula estrutural (Figura 2) é composta de dois anéis piridílios metilados formando uma molécula simétrica (GARCIA-FEBREIRO et al., 2014).

Figura 2 - Fórmula estrutural do dicloreto de paraquate.



Fonte: FAO, 2008a.

As formulações comerciais do paraquate normalmente possuem concentração de paraquate em torno de $200 \pm 10 \text{ g L}^{-1}$ (FAO, 2008a). Como é produzido em muitos países existe uma diversidade de nomes comerciais para este composto e além disso, também pode ser encontrado em associação com outros herbicidas (WATTS, 2011). Para reduzir a chance de intoxicação por paraquate, em sua formulação comercial normalmente são adicionados um agente de odor desagradável, um emético para induzir o vômito e um corante de cor forte para que ele não seja confundido com alguma bebida (WATTS, 2011).

Foi sintetizado pela primeira vez em 1882 e utilizado como indicador em reações de oxi-redução em laboratórios de química desde 1933, tornando-o conhecido pelo nome de metil viológeno (PATEIRO-MOURE, ARIAS-ESTÉVEZ & SIMAL-GÁNDARA, 2013) pela cor azul ou violeta que apresenta na sua forma reduzida (SOUZA & MACHADO, 2003). As propriedades herbicidas deste composto foram descobertas apenas em 1955 (WHO, 1984) e no início da década de 60 o composto passou a ser disponível comercialmente (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT, 2016a)

Este herbicida promove um rápido controle de plantas daninhas de amplo espectro somente pela ação do contato foliar com translocação mínima no xilema (LOCK & WILKS, 2001a; CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT, 2016b). Na superfície de plantas, o paraquate sofre degradação fotoquímica liberando produtos intermediários com menor toxicidade. Em contato com o solo, é rápida e fortemente adsorvido pelos argilominerais presentes inativando-o e tornando a decomposição deste composto por microorganismos mais lenta.

Em água, o herbicida pode desaparecer pelo processo de adsorção sobre plantas e na lama do fundo (WHO, 1984). Mesmo sendo altamente solúvel em água, a não lixiviação deste composto para os lençóis freáticos é justificada pela forte absorção no solo, o que o torna imóvel (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT, 2016c). Em contraste, resíduos deste composto foram relatados em amostras ambientais de águas superficiais ou potáveis, como mostra a pesquisa

desenvolvida por Vidal e colaboradores (2004) que analisaram 40 amostras de água na Andalusia (no sul da Espanha), sendo que destas, 40% apresentaram os compostos paraquate e diquate. Mais recentemente, Veríssimo, Moreira & Meyer (2018) avaliaram pelo período de um ano as concentrações de paraquate em águas superficiais que atravessam uma área rural de produção agrícola intensiva na região montanhosa do Rio de Janeiro e encontraram resíduos em 62,5% das amostras, com agravante em períodos pós precipitações.

Devido a dificuldade de penetração nas plantas, rápida degradação fotoquímica e adsorção no solo, cita-se que não há problemas em relação a resíduos nas lavouras pós-colheita, uma vez que o paraquate praticamente não se desloca até os grãos e tubérculos (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT, 2016c). Por outro lado, Pizzutti e colaboradores (2016) observaram resíduos de paraquate e diquate em amostras de feijão de corda provenientes de diferentes estados brasileiros.

O paraquate é classificado como moderadamente perigoso (classe II) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e perigoso (classe I) pela ANVISA (ANVISA, 2015b) e pelo Pesticide Action Network (PAN), que justifica que além da toxicidade aguda, o composto gera efeitos tóxicos agudos retardados como a fibrose pulmonar e também por não haver antídoto para tal composto (WATTS, 2011). Além disso, o paraquate é considerado o herbicida de maior toxicidade comercializado nos últimos 60 anos (WATTS, 2011).

Amplamente utilizado em quase todo o mundo, o paraquate tem seu uso aprovado em mais de 90 países e é utilizado em mais de 100 tipos de culturas. Porém, é banido em vários países e utilizado com restrições em outros (WATTS, 2011). Na União Europeia (UE), pelo julgamento da Corte de Primeira Instância (CFI) em 2007, a inclusão do paraquate no Anexo I da Diretiva do Conselho 91/414/EEC de 2003 foi anulada, tornando a venda e utilização deste produto não autorizada (THE COURT OF FIRST INSTANCE ANNULS, 2007). Produtos exportados para a UE são aceitos desde que os valores estejam dentro dos LMR estabelecidos para o paraquate, que podem ser de 0,01 ou 0,05 mg kg⁻¹, dependendo do alimento (EUROPEAN COMMISSION, 2018). No Brasil, de acordo com os LMR estabelecidos pela ANVISA, estes limites variam de 0,01 a 0,5 mg kg⁻¹ com intervalos de segurança de um ou sete dias dependendo da cultura (ANVISA, 2018).

Segundo a ANVISA (2018), o paraquate era recomendado em aplicações pós-emergenciais das plantas infestantes em culturas de abacate, abacaxi, algodão, arroz,

aspargo, banana, beterraba, cacau, café, cana-de-açúcar, chá, citros, coco, couve, feijão, maçã, milho, pastagens, pera, pêssego, seringueira, soja, sorgo, trigo e uva; e também como dessecante da cultura de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo (ANVISA, 2018). Porém, o uso do paraquate no Brasil esteve em processo de reavaliação desde 2008 pela ANVISA em relação a reavaliação toxicológica deste ingrediente ativo em virtude do grande número de intoxicações causadas pelo composto.

A RDC Nº 177, de 21 de setembro de 2017 apresenta o resultado deste processo de reavaliação em que a ANVISA decidiu manter o registro de defensivos agrícolas contendo o paraquate por três anos, impondo determinadas condições de produção, comercialização e uso, desde que sejam implementadas medidas adicionais de mitigação de manejo (ANVISA, 2017b). Dentre outras determinações relacionadas aos produtos formulados com paraquate, o mesmo foi proibido em culturas de abacate, abacaxi, aspargo, beterraba, cacau, coco, couve, pastagens, pera, pêssego, seringueira, sorgo e uva; e na utilização como dessecante de culturas. Além disso, os receituários agrônômicos utilizados para a aquisição dos produtos devem obrigatoriamente estar acompanhadas do Termo de Conhecimento de Risco e de Responsabilidade, disponível no anexo da referida resolução e no portal eletrônico da ANVISA (ANVISA, 2017b).

Inúmeras intoxicações ocorrem a cada ano a partir de produtos como paraquate e diquate e os sintomas variam de acordo com a forma de exposição do produto ao corpo (NOLLET & RATHORE, 2010). O primeiro estudo referente a duas mortes por intoxicação por paraquate ocorreu em 1964 e foi relatado por Bullivant em 1966. De acordo com o Centro de Informações Toxicológicas (CIT) de janeiro de 2005 a julho de 2016 foram feitos 276 atendimentos por exposição ao paraquate no Rio Grande do Sul, e dentre estes, registradas 52 mortes (COIRO, 2016).

A principal forma de intoxicação aguda por paraquate é associada aos casos de ingestão intencional ou não, porém, casos de toxicidade, morbidade e mortalidade decorrem também de outras rotas de exposição (SERRA, DOMINGO & PRATA, 2003; ANVISA, 2015b), como inalação e exposição cutânea (WATTS, 2011). Intoxicações humanas têm sido relatadas em diversas investigações forenses, inclusive utilizando técnicas cromatográficas para quantificação do composto em amostras de sangue total (ARIFFIN & ANDERSON, 2006), plasma (BRUNETTO et al., 2003; ZOU et al.,

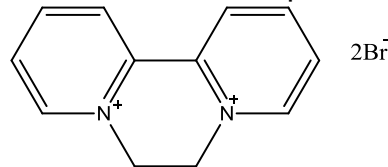
2011), soro (PAIXÃO et al., 2002) e urina (WHITEHEAD Jr. et al., 2010; WUNNAPUK et al., 2011, GAO et al., 2014; RUAN et al., 2014).

Estudos também indicam sua relação com doenças de distúrbios degenerativos como Parkinson, porém este assunto gera discussão e não se tem conclusões específicas sobre a total veracidade desta afirmação (DINIS-OLIVEIRA et al., 2006; BERRY, LA VECCHIA, & NICOTERA, 2010, BALTAZAR et al., 2014). Por outro lado, conforme descrito na RDC N° 177, a ANVISA (2017b) enfatiza a toxicidade aguda do paraquate, sua associação com a doença de Parkinson e seu potencial de mutagenicidade.

2.2.3.2 Diquate

O diquate é um herbicida não seletivo de contato, de rápida ação e dessecante (LOCK & WILKS, 2001b). Este composto apresenta fórmula estrutural formada por dois anéis piridílios pela posição orto e também pelo nitrogênio do anel que mantém a dupla carga positiva na molécula. É normalmente formulado como sal dibromídrico, conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Fórmula estrutural do dibrometo de diquate.



Fonte: FAO, 2008b.

O padrão analítico deste composto usual é mono hidratado, apresentando-se com um pó cristalino na cor amarelo pálido e inodoro. Normalmente é comercializado em solução aquosa escura, na coloração castanho-avermelhada contendo 200 g íon/litro (WHO, 1984).

Assim como o paraquate, é solúvel em água, levemente solúvel em álcool e insolúvel em compostos orgânicos. Em sua formulação aquosa não é inflamável nem explosivo. É estável em soluções ácidas e neutras sendo hidrolisado em soluções alcalinas e sua inativação se dá por argila inerte e surfactantes aniônicos (WHO, 1984).

A degradação do diquate ocorre da mesma maneira que a do paraquate e também apresenta produtos de degradação de baixa toxicidade. Por outro lado, a

degradação fotoquímica (principal via de decomposição) ocorre mais rapidamente em virtude que a absorção máxima deste composto ocorre em um comprimento de onda mais longo, 310 nm em comparação com o paraquate que tem a absorção máxima em 256 nm (WHO, 1984).

O diquate é recomendado em aplicações pós-emergenciais de plantas infestantes nas culturas de algodão, beterraba, café, cebola, citros, feijão, girassol, milho, pêsego e soja; e como dessecante das culturas de arroz, batata, feijão e soja. Possui classe II na classificação toxicológica e a ingestão diária aceitável (IDA) é igual a 0,002 mg kg⁻¹ p.c. (ANVISA, 2018). Os LMRs para o diquate variam de 0,05 a 5 mg kg⁻¹ para a UE (EUROPEAN COMMISSION, 2018) e de 0,01 a 0,5 mg kg⁻¹ segundo a ANVISA (2018) para diferentes culturas com intervalo de segurança variando de 1 a 16 dias.

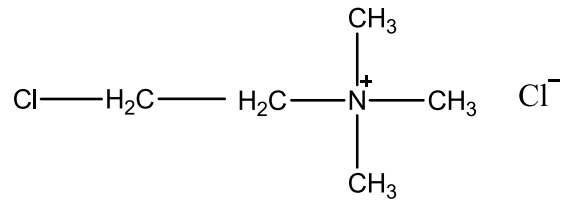
Este herbicida é menos tóxico do que o paraquate e intoxicações por diquate também são menos comuns. Os sintomas são semelhantes, porém, se diferem no fato que o envenenamento com diquate promove diarreia característica e não resulta em doenças pulmonares específicas (típicas do paraquate) (WHO, 1984).

2.2.3.3 Clormequate

O clormequate é um sal de amônio quaternário utilizado como regulador do crescimento em culturas de algodão (ANVISA, 2018) e sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 4. Atua inibindo o alongamento das células, encurtando e fortalecendo os caules, tornando as plantas mais resistentes e além disso, influencia o ciclo de desenvolvimento, aumentando a floração, podendo ainda aumentar a formação de clorofila e desenvolvimento radicular.

Após sua introdução no mercado, no ano de 1965, o clormequate foi o primeiro regulador de crescimento utilizado em larga escala na produção de cereais e assim como o mepiquate são bastante usados em formulações combinadas com outros compostos (HEDDEN & THOMAS, 2016).

Figura 4 - Fórmula estrutural do cloreto de cloromequate.



Fonte: ANVISA, 2018.

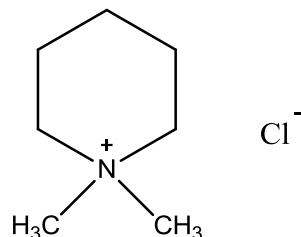
É recomendado pela ANVISA (2018) apenas para uso em culturas de algodão com LMR de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e intervalo de segurança de 80 dias. Porém, é utilizado para aumentar a resistência e a produtividade em culturas de trigo, centeio, aveia e triticle e para promover ramificações laterais e floração em algumas plantas ornamentais como azaléia e begônia, entre outras (FAO, 2008c). Além disso, é autorizado para uso em cereais na maioria dos países da UE e normalmente encontra-se resíduos deste em amostras como arroz, centeio, aveia e trigo (EURL, 2011).

Os valores de LMRs segundo UE variam de $0,01$ a 15 mg kg^{-1} para diferentes alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Quanto a sua toxicologia, o cloromequate é considerado classe III, medianamente tóxico e a ingestão diária aceitável (IDA) é de $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$ (ANVISA, 2018).

2.2.3.4 Mepiquate

O mepiquate (Figura 5) é um composto de amônio quaternário utilizado como regulador do crescimento com aplicação foliar em culturas de algodão e cana-de-açúcar (ANVISA, 2018), em frutos para melhorar a arquitetura e aumentar a retenção, conduzindo a uma melhoria na velocidade de maturidade das plantas e nas taxas de colheita (LI et al., 2012).

Figura 5 - Fórmula estrutural do cloreto de mepiquate.



Fonte: ANVISA, 2018.

Após o grande sucesso do cloromequate, o mepiquate foi desenvolvido e introduzido no mercado no ano de 1979, se apresentando com bom desempenho principalmente na cultura do algodão, mas também em cereais, usado sozinho ou em combinações conforme descrito anteriormente (HEDDEN & THOMAS, 2016). Tanto um como o outro não necessitam de altas temperaturas para desempenhar sua função na agricultura, e com isto, podem ser utilizados em qualquer estação do ano (HEDDEN & THOMAS, 2016).

Segundo a ANVISA (2018) o LMR para culturas de algodão é de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ com intervalo de segurança de 60 dias e $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para cana-de-açúcar com intervalo de segurança de 20 dias. Por outro lado, os valores de LMRs segundo UE variam de 0,02 a $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ para diferentes alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2018).

Devido à rotação habitual de cultivo os resíduos de mepiquate em áreas agrícolas podem afetar negativamente outras culturas e, ainda, seus resíduos em porções comestíveis destas culturas poderiam ameaçar a saúde humana (LI et al., 2012) uma vez que é classificado pela ANVISA como medianamente tóxico (classificação toxicológica III) (ANVISA, 2018).

Resíduos de mepiquate e cloromequate foram encontrados em alimentos preparados para bebês (do inglês, *baby foods*) (ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009; MARCHESE et al., 2009), em cerveja, pão, suco de fruta, café e pera (ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009) e o cloromequate foi ainda encontrado em matrizes como cereais e peras por Hau e colaboradores (2000).

2.3 TÉCNICAS E MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO

Apesar dos grandes avanços tecnológicos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras de interesse ambiental, a etapa de preparo de amostra continua sendo um desafio para os analistas, principalmente, pela diversidade e complexidade das amostras e pelas baixas concentrações dos agrotóxicos nas amostras, tornando necessário na maioria dos casos, o isolamento e/ou a concentração destes compostos (FENIK, TANKIEWICZ & BIZIUK, 2011; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013; NASCIMENTO JÚNIOR & BORGES, 2015).

Métodos de preparo de amostra mais recentes objetivam principalmente a utilização de menores quantidades de solventes, amostras e solventes menos nocivos. Ainda, a miniaturização e automatização dos métodos, a não necessidade de derivatização, preferência por métodos multirresíduo e menor tratamento da amostra. Estas condições estão incluídas nos princípios da química analítica verde, uma área dentro da química verde com a ideia da realização de técnicas ambientalmente "amigáveis" nos laboratórios de química analítica (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI & NAMIEŚNIK, 2013).

Algumas considerações específicas devem ser observadas quando se pretende analisar compostos com as características dos QUATs, os quais são carregados positivamente, altamente solúveis em água, não voláteis e termicamente estáveis em meio ácido. Estas características dificultam a separação e/ou concentração para determinação analítica; principalmente por serem insolúveis em solventes orgânicos (PICÓ et al., 2000; PATEIRO-MOURE, ARIAS-ESTÉVEZ & SIMAL-GÁNDARA, 2013) e permanecerem no extrato aquoso após a remoção de compostos ácidos e alcalinos (PICÓ et al., 2000).

Para tanto, existe uma metodologia oficial desenvolvida pela UE para a determinação dos compostos de amônio quaternário, dentre outros compostos de difícil análise, denominado método QuPPE (*Quick Polar Pesticides*) (ANASTASSIADES et al., 2017) que também será abordada ao longo desta pesquisa.

2.3.1 Extração com solventes

A extração de compostos como paraquate e diquate, que apresentam interações de sorção com as matrizes, era inicialmente realizada por refluxo e/ou aquecimento com a utilização de ácidos fortes como o ácido sulfúrico ou ácido clorídrico (TADEO et al., 2000). Ácidos concentrados normalmente são utilizados para a extração de compostos fortemente adsorvidos nas matrizes (PATEIRO-MOURE et al., 2008).

No método de referência descrito por Anderson & Boseley (1997), a extração destes compostos de cultivares e solo envolvia o refluxo sob aquecimento por 5 h utilizando ácido sulfúrico 0,6 mol L⁻¹ e limpeza com resina de troca catiônica ou extração em fase sólida. Solução ácida também foi utilizada por Peeters e

colaboradores (2001) que realizaram a extração de cloromequate em peras com solução de HCl 40 mmol L⁻¹ seguido de centrifugação e filtração dos extratos.

Os solventes mais utilizados para a extração de compostos de amônio quaternário em alimentos com determinação por cromatografia líquida são soluções compostas de metanol e água (HAU et al., 2000; RIEDIKER et al., 2002), metanol e água acidificado (VAHL, GRAVEN & JUHLER, 1998), e metanol acidificado (KOLBERG, et al., 2012, ANASTASSIADES et al., 2017; PIZZUTTI et al., 2016, NORTES-MÉNDEZ et al., 2016). Entre outros, solventes como metanol (ZHAO et al., 2000), soluções de metanol tamponadas (ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009) e acetonitrila (GAO et al., 2015) também são utilizados.

Extrações utilizando soluções majoritariamente aquosas poderiam ser avaliadas uma vez que os compostos em questão apresentam alta polaridade, porém, em muitas aplicações utiliza-se aquecimento para extração de compostos como paraquate e diquate e, de acordo com Kolberg e colaboradores (2012) o aquecimento provoca na extração com soluções aquosas a formação de suspensões viscosas, dificultando a filtração, fato não observado quando se usa misturas de metanol e água, por exemplo.

Em pesquisa mais recente, Pizzutti e colaboradores (2016) avaliaram solventes de extração contendo metanol e solução aquosa de HCl em diferentes proporções e relatam que o aumento da quantidade de metanol provoca uma diminuição nas recuperações do paraquate e diquate, e, por outro lado, observa-se o aumento na recuperação destes quando há incremento na concentração do ácido.

2.3.1.1 Extração utilizando aquecimento

O uso de temperaturas em torno de 80 °C por 15 min na etapa de extração do paraquate e diquate apresenta melhores porcentagens de recuperação em comparação com extrações realizadas a temperatura ambiente. Acredita-se que estes resultados estão relacionados com a aceleração da cinética da reação, quebra de interações não covalentes com a matriz, além de melhor penetração em matrizes com alto teor de amido (KOLBERG et al., 2012). A água ao penetrar na amostra interage com as moléculas de amido presente nos grânulos (interligadas por ligações de hidrogênio) quebrando estas ligações inter-moleculares. Com o aquecimento, a água penetra mais facilmente nos grânulos de amido fazendo com que estes percam sua

estrutura semicristalina resultando em moléculas de amilose menores, processo chamado de gelatinização do amido, o qual a temperatura depende do tipo de amido (KOLBERG et al., 2012).

A etapa de aquecimento a 80 °C para análise de paraquate e diquate em diferentes alimentos como batata, cevada e lentilha (KOLBERG et al., 2012); feijão de corda (PIZZUTTI et al., 2016) e óleo de oliva (NORTES-MÉNDEZ et al., 2016). Estes autores, obtiveram recuperações entre 58 e 78,6% para os compostos paraquate e diquate em óleo de oliva. Ainda, realizaram o mesmo procedimento para análise destes analitos em olivas, porém sem a etapa de aquecimento e obtiveram baixas recuperações (4 a 7%) na extração mesmo em concentrações de 5 mg L⁻¹ (NORTES-MÉNDEZ et al., 2016). Além disso, a etapa de aquecimento faz parte do método oficial QuPPE da UE para determinação de paraquate e diquate (ANASTASSIADES et al., 2017).

2.3.1.2 Extração utilizando ultrassom

O uso da energia ultrassônica é capaz de realizar transformações químicas e físicas (MARTINES, DAVOLOS & JAFELICCI JUNIOR, 2000) e tem se mostrado eficiente em diversas aplicações da química analítica como na extração de compostos orgânicos e inorgânicos, dispersão e homogeneização, entre outros (NASCENTES et al., 2001).

Vários fatores devem ser levados em consideração quando se usa banhos ultrassônicos, como temperatura, volume da água, número de tubos, tempo de sonicação, entre outros. Uma vez que as condições de máxima cavitação podem ser diferentes para cada banho de ultrassom e que a distribuição da intensidade ultrassônica no interior da cavidade do banho não é homogênea, estes parâmetros devem ser bem estabelecidos para cada experimento separadamente, visando a obtenção de resultados reproduzíveis e precisos (NASCENTES et al., 2001; SANTOS JÚNIOR, KRUG & KORN, 2008).

O ultrassom foi usado no método desenvolvido por Esparza, Moyano e Galceran (2009) para determinação de cloromequate e mepiquate em diferentes amostras de alimentos. Após adição de solvente as amostras foram submetidas a banho ultrassônico por 10 min, posteriormente centrifugadas e submetidas a etapa de limpeza utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase*

extraction) com octadecilsilano (C18). Zou e colaboradores (2015) extraíram paraquate de amostras de vegetais, utilizando água com solvente e banho de ultrassom a 50 °C por 1 h, seguido pela etapa de centrifugação e concentração do analito utilizando cartuchos de SPE com trocador catiônico fraco (WCX, do inglês *Weak Cation eXchange*), com posterior evaporação e reconstituição do extrato. Diferentes testes foram realizados para a otimização da etapa de sonicação e os autores relatam que temperaturas maiores (como 80 °C) induzem a decomposição do paraquate, verificada pela variação significativa nas recuperações das replicatas, e que menores ou maiores tempos de extração (30 min ou 1 h) não apresentam melhores resultados (ZOU et al., 2015).

2.3.2 Extração em fase sólida

Extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é uma das técnicas mais utilizadas no preparo de amostras para extração de analitos semivoláteis ou não voláteis de amostras líquidas, fluidas ou sólidas pré-extraídas por solventes. Comumente a fase sólida está presente dentro de cartucho, disco ou seringa. Esta técnica pode ser usada para extração e/ou concentração de analitos, isolamento do analito, isolamento da matriz, limpeza da amostra ou estocagem (JARDIM, 2015).

Diversos sorventes têm sido estudados na técnica de SPE para determinação de QUATs em diferentes matrizes, sendo que os principais são trocadores iônicos, sílica e fase-reversa (PICÓ et al., 2000).

A SPE também é comumente utilizada na etapa de limpeza (*clean-up*) de extratos nos métodos multirresíduo (CABRERA et al., 2012). Usando sorventes apolares como C8 e C18 é possível realizar a limpeza de interferentes apolares uma vez que os QUATs não possuem interação com estes materiais. Outra maneira de separar estes compostos em fase reversa é pela formação de pareamento iônico com capacidade de retenção neste tipo de coluna, permitindo assim a extração e a concentração dos analitos (PICÓ et al., 2000).

Vahl, Graven & Juhler (1998) analisaram cloromequate em grãos a partir da extração com solvente metanol/água/ácido acético (75:24:1 v/v/v), homogeneização em ultra turrax por 5 min, centrifugação e posterior limpeza do sobrenadante por meio do uso da SPE com cartuchos de C18. Estes cartuchos também foram utilizados por

Ezparza, Moyano & Galceran (2009) para limpeza dos extratos na extração de mepiquate e cloromequate de diferentes matrizes após banho de ultrassom por 10 min com solvente 1:4 (v/v) metanol:solução tampão formiato de amônio 100 mmol L⁻¹ pH 3,5 e centrifugação.

Cartuchos com sorvente de troca catiônica forte (SCX, do inglês *Strong Cation eXchange*) podem ser usados no preparo e concentração de amostras contendo QUATs sem a necessidade de utilização de reagentes de pareamento iônico. Porém o extrato é normalmente analisado por detectores ultravioleta, devido a incompatibilidade dos solventes utilizados com a espectrometria de massas (RAINAFULTON, 2014). Zhao e colaboradores (2000) utilizaram cartuchos SCX para a concentração de extratos obtidos pela extração de cloromequate em peras com 100 mL de metanol sobre agitação por 4 h.

Pesquisas mais recentes descrevem a utilização de cartuchos de SPE de modo misto contendo resinas poliméricas capazes de reter os QUATs como o Oasis MCX (do inglês *Mixed-mode Cation eXchange*) e WCX (do inglês *Weak Cation eXchange*) que envolvem diferentes mecanismos de retenção como troca iônica e fase reversa, possibilitando a limpeza dos extratos e enriquecimento dos analitos (TRAN, SHIA & YOUNG, 2012; SHIA et al., 2013).

2.3.2.1 Extração em fase sólida dispersiva

A extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*) proposta inicialmente por Anastassiades e colaboradores (2003) baseia-se em um método simples para ser realizado na etapa de limpeza dos extratos. Neste, uma porção do extrato é submetida a agitação com uma pequena quantidade de sorvente, seguida de centrifugação para separação do sorvente e então retirada de uma alíquota do extrato final para análise (CABRERA et al., 2012).

Quando comparada com a técnica de SPE para utilização na limpeza de extratos, a d-SPE possui vantagens como:

- Uso de menor quantidade de solventes e sorventes (diminuindo custos de análise);
- Evita o uso de cartuchos (descartando etapas prévias como condicionamento, além de aparato especial e treinamento dos analistas);
- Interação uniforme de todo o sorvente com a matriz;

- Possibilidade de combinação de sorventes de acordo com a necessidade e;
- Possibilidade de remoção de água residual, se necessário.

Diversos materiais são comercializados para utilização como sorventes em d-SPE, entre estes pode-se citar: C18, EMR-Lipid (do inglês *enhanced matrix removal of lipids*), Z-Sep+, terra diatomácea, amina primária e secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) e carbono grafitizado (GCB, do inglês *grafitized carbono black*).

Segundo Zanella e colaboradores (2015a) é possível remover coextrativos apolares em matrizes complexas usando C18 como sorvente, sendo este comumente adicionado na d-SPE para promover a limpeza de extratos obtidos pelo método QuEChERS a partir de amostras com teor de gordura > 2%.

EMR-Lipid e Z-Sep+ (óxido de zircônio e C18 duplamente ligado à sílica) são novos sorventes usados para remover lipídeos (RAJSKI et al., 2013; HAN et al., 2016). O primeiro, é um sorvente de estrutura não divulgada e usado para remover lipídeos de extratos gordurosos sem perda de agrotóxicos comuns, medicamentos veterinários ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAN et al., 2016). O segundo é uma mistura de dois sorventes: C18 e sílica revestida com dióxido de zircônio, sendo a proporção de ZrO₂/C18 de 2/5, com capacidade de remover gordura de extratos com alto teor de lipídeos (RAJSKI et al., 2013).

A terra diatomácea caracteriza-se por seu baixo custo, alta área superficial e baixa massa específica, tendo como principal componente a sílica na forma hidratada (CABRERA et al., 2012), tem uma estrutura inerte, sem grupos reativos que justificam a adsorção de natureza física e pH independente (DOTTO et al., 2011).

O sorvente PSA tem a capacidade de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos (GAO et al., 2015; ZANELLA et al., 2015a). Por outro lado, o uso de GCB como sorvente tem a capacidade de remover coextrativos não polares, bem como pigmentos e esteróis (GAO et al., 2015; ZANELLA et al., 2015a).

Atualmente, sorventes alternativos estão sendo utilizados na d-SPE com o objetivo de se obter melhores resultados na etapa de limpeza, removendo seletivamente coextrativos das amostras e minimizando possíveis perdas de analitos (CABRERA et al., 2012).

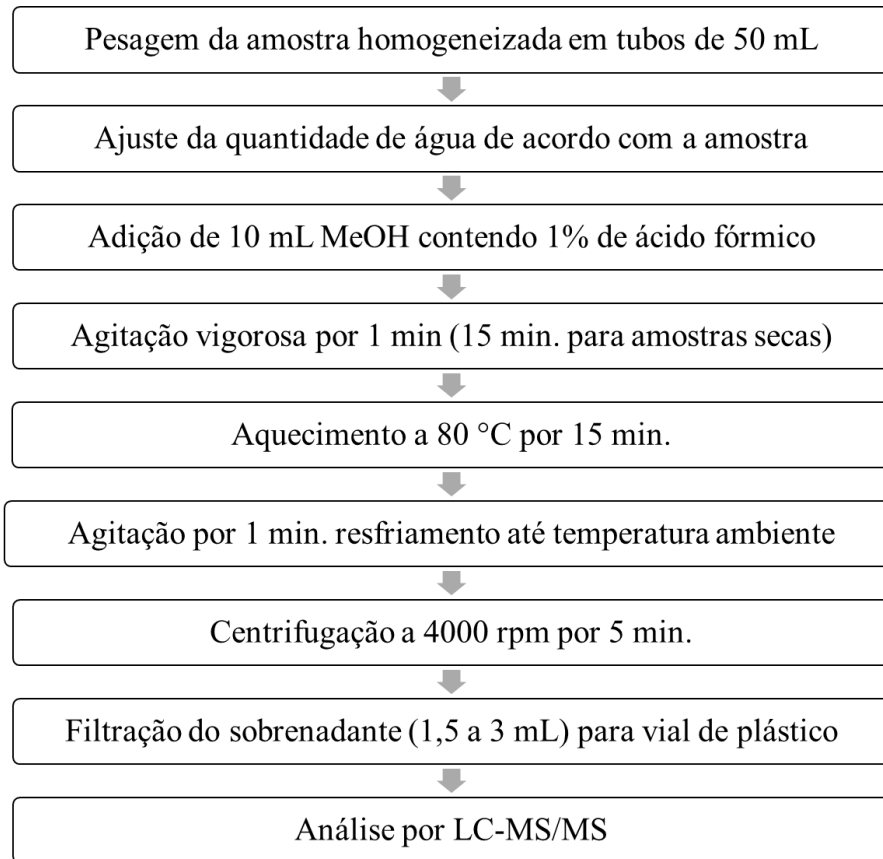
Entre estes, a quitosana, que é um polissacarídeo derivado da quitina (copolímero de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina) (CANELLA & GARCIA, 2001), tem características particulares e atraentes, com

capacidade de associação por interações físicas e químicas de uma ampla variedade de moléculas em função da presença de grupos químicos reativos (hidroxila, acetamida ou funções amino) em cadeias poliméricas, estabilidade química, alta reatividade e excelente seletividade para compostos aromáticos e metais (CRINI, 2005). Trata-se de um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, por meio de um processo de alcalinização a altas temperaturas (CABRERA et al., 2012). A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na terra, só precedida por celulose (ARIAS et al., 2018). Além disso, é um biopolímero renovável, de baixo custo e suscetível a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção (CABRERA et al., 2012).

2.3.3 QuPPE

Atualmente, o método de referência na UE para determinação de compostos altamente polares, como o paraquate e diquate, em alimentos é o método QuPPE (*Quick Polar Pesticides*) (ANASTASSIADES et al., 2017). Este método consiste principalmente no ajuste da concentração de água na amostra a ser analisada, extração com metanol 1% (v/v) ácido fórmico, agitação, aquecimento a 80°C por 15 min, centrifugação e filtração, conforme apresentado no fluxograma da Figura 6. Para a determinação de mepiquate e clormequate o método QuPPE pode ser aplicado, contudo sem a necessidade da etapa de aquecimento. Algumas modificações são necessárias de acordo com a amostra, por exemplo, para a limpeza do extrato é indicada o uso de d-SPE com C18 e posterior centrifugação para a remoção de lipídeos (etapa opcional). Além disso, frascos de plásticos são indicados para todas as etapas para os compostos paraquate e diquate (ANASTASSIADES et al., 2017).

Figura 6 - Fluxograma geral para determinação de paraquate e diquate pelo método QuPPE.



Fonte: Adaptado de ANASTASSIADES et al. (2017).

Cabe ressaltar que o método está em frequente atualização e o mesmo foi revisado (versão 9.3) no ano de 2017. Nesta versão, foi adicionado a informação que o uso de metanol acidificado com 1% (v/v) de ácido fórmico não é ácido suficiente para a extração de paraquate e diquate em algumas matrizes, como lentilha; e, apresentam como alternativa o uso de metanol:solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (1:1, v/v) (ANASTASSIADES et al., 2016).

Este método tem sido amplamente empregado em estudos recentes para a determinação de QUATs em diferentes matrizes (NORTES-MÉNDEZ et al., 2016; KACZYŃSKI, 2017; PIZZUTTI et al., 2017).

2.3.4 QuEChERS

Um método comumente utilizado no preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos é o acrônimo de suas vantagens, QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) desenvolvido

por Anastassiades e colaboradores (2003). Este método consiste na extração com acetonitrila, seguida da etapa de partição promovida pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio ($NaCl$)) e posteriormente pela etapa de limpeza do extrato por d-SPE (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

A utilização de sais na etapa de extração de QUATs não é uma prática muito usual, porém Gao e colaboradores (2015) desenvolveram um método para determinação de cloromequate e mepiquate em amostra de peras e batatas utilizando método QuEChERS modificado e cromatografia líquida utilizando coluna de interação hidrofílica (HILIC) e de troca catiônica forte. Os autores testaram diferentes combinações de sorventes (PSA, GCB e C18) para a realização da etapa de limpeza e consideraram mais favorável a adição de PSA e GCB no método em questão para as matrizes estudadas.

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) é uma técnica bastante difundida em laboratórios modernos e emprega colunas contendo uma fase estacionária especialmente preparada e uma fase móvel líquida. Esta técnica é capaz de realizar separações e análises quantitativas de uma variedade de analitos presentes em diferentes amostras em alguns minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (LANÇAS, 2009; MALDANER & JARDIM, 2009; JARDIM, COLLINS & GUIMARÃES, 2010).

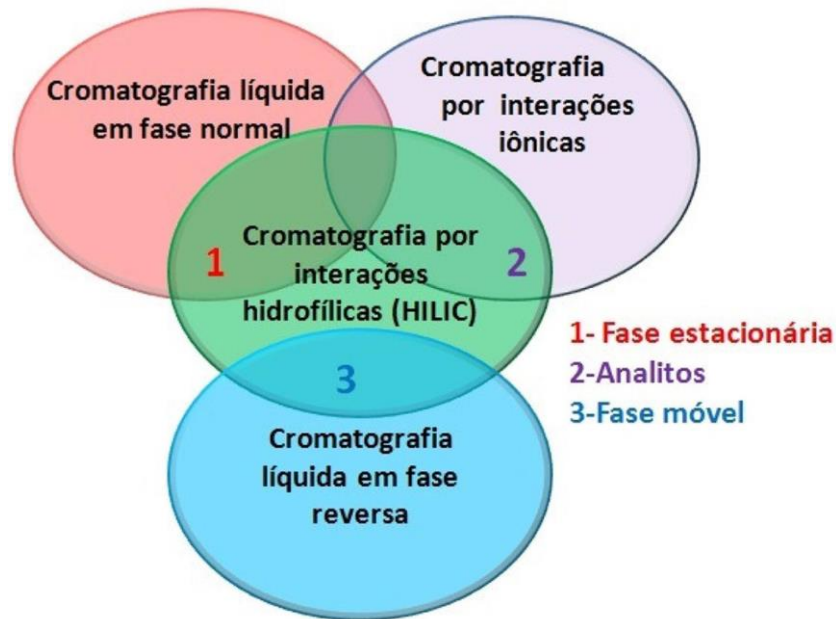
Os principais avanços desta técnica estão relacionados ao desenvolvimento de novas fases estacionárias, mais seletivas, eficientes e estáveis além da redução do tempo de análise, garantindo resultados satisfatórios, o qual pode ser otimizada com a redução do tamanho das partículas da fase estacionária em conjunto com o uso de altas pressões. Neste cenário, tem-se a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) que utiliza fases estacionárias com tamanho de partículas menores que 2 μm em sistemas capazes de trabalhar a pressões muito altas, volumes internos menores, com colunas mais resistentes, injetores de alta precisão para pequenos volumes, células do detector sem dispersão e com altas taxas de aquisição, melhoramento no sistema de dados e rapidez nas análises (MALDANER & JARDIM, 2009; GUILLARME et al., 2010; MALDANER & JARDIM, 2012).

O acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é um avanço significativo neste sentido, permitindo a quantificação de compostos de interesse com a possibilidade de confirmação destes com base na sua massa molar e estrutura molecular (GUILLARME et al., 2010; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

2.4.1 Cromatografia de interação hidrofílica

O termo HILIC (cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*) foi descrito pela primeira vez em pesquisa desenvolvida por Alpert em 1990, como um acrônimo de cromatografia de interação hidrofílica - do inglês, *hydrophilic interaction chromatography* (HIC) - e também é conhecida por fase normal aquosa - ANP, do inglês *aqueous normal phase* (ALPERT, 1990). É considerada uma variação da cromatografia líquida de fase normal, utilizando fases estacionárias polares tradicionais desta fase, como sílica, amino e ciano, porém, com fases móveis semelhantes às utilizadas na fase reversa (contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água). Além disso, a técnica também permite a análise de substâncias carregadas (como na cromatografia de troca iônica), combinando assim, as características dos três principais métodos em cromatografia líquida: fase normal, reversa e por interações iônicas (LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI & NOGA, 2012). A Figura 7 apresenta a relação entre a HILIC e as demais modalidades principais de cromatografia líquida.

Figura 7 - Relação entre HILIC e as principais modalidades de cromatografia líquida.



Fonte: Silva, Botolli & Collins, 2016.

A HILIC é uma técnica usada para a separação de substâncias polares (ALPERT, 2011) apresentando retenção suficiente de compostos fortemente polares, melhorando a eficiência na separação, além de apresentar excelente aptidão para o acoplamento da cromatografia líquida e a espectrometria de massas pelo favorecimento da ionização dos analitos pelo uso de fases móveis com maior concentração de solvente orgânicos (JANDERA, 2011; MALDANER & JARDIM, 2012; RODRIGUEZ-ALLER, 2013; SILVA, BOTOLLI & COLLINS, 2016). Outras vantagens desta técnica em comparação com cromatografia em fase normal ou reversa incluem:

- Diminuição da pressão do sistema, uma vez que aumentando a concentração de solvente orgânico na fase móvel, a viscosidade diminui;
- Maior retenção de analitos polares sem a utilização de reagentes de pareamento iônico;
- Maior preservação da fase estacionária pelo uso de menores quantidades de água na fase móvel e;
- Compatibilidade com técnicas de extração que utilizam altas concentrações de solvente orgânico, facilitando o preparo da amostra (SILVA, BOTOLLI & COLLINS, 2016).

Os materiais de suporte e superfícies químicas das colunas HILIC têm sido ampliados continuamente para se adequar aos diferentes problemas de separação específicos (JANDERA, 2011). Existem diversas fases estacionárias, sendo que as

mais utilizadas são baseadas em sílica, incluindo sílica híbrida, partículas superficialmente porosas e sílica monolítica ou suportes de sílica modificada (fases quimicamente ligadas) (BERNAL et al., 2011; GUO & GAIKI, 2011; SILVA, BOTOLLI & COLLINS, 2016).

As fases estacionárias em HILIC podem ser baseadas em sílica não derivatizada; quimicamente ligadas, carregadas ou zwitteriônicas (LANÇAS, 2010; CHIRITA et al., 2011; GUO & GAIKI, 2011; JANDERA, 2011). Fases estacionárias baseadas em sílica não derivatizada (sílica pura) são as mais utilizadas em HILIC e oferecem vantagens quando comparada as fases quimicamente ligadas, principalmente em sistemas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), sendo que neste caso não existe a possibilidade da ruptura da ligação e eliminação do ligante com criação de sinais alterados no espectro de massas. Além disso, a adição de uma fração significativa de água provoca desativação da superfície o suficiente para a obtenção de resultados reprodutíveis na maioria dos casos (LANÇAS, 2010).

A fase móvel normalmente utilizada nesta técnica inclui solventes orgânicos polares (solúveis em água) e uma pequena quantidade de água. Na maioria das vezes as separações são realizadas em modo gradiente com uma elevada porcentagem de solvente orgânico inicial e aumentando a proporção de solvente aquoso com o tempo (HEMSTRÖM & IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010). Os solventes orgânicos geralmente usados em HILIC podem ser classificados de acordo com o aumento da força de eluição do seguinte modo: acetona < isopropanol ~ propanol < acetonitrila < etanol < dioxano < dimetilformamida ~ metanol < água (BUSZEWSKI & NOGA, 2012). As altas taxas de solventes orgânicos utilizados também favorecem a ionização quando se utiliza espectrômetros de massa acoplados ao cromatógrafo (GOSETTI et al., 2010).

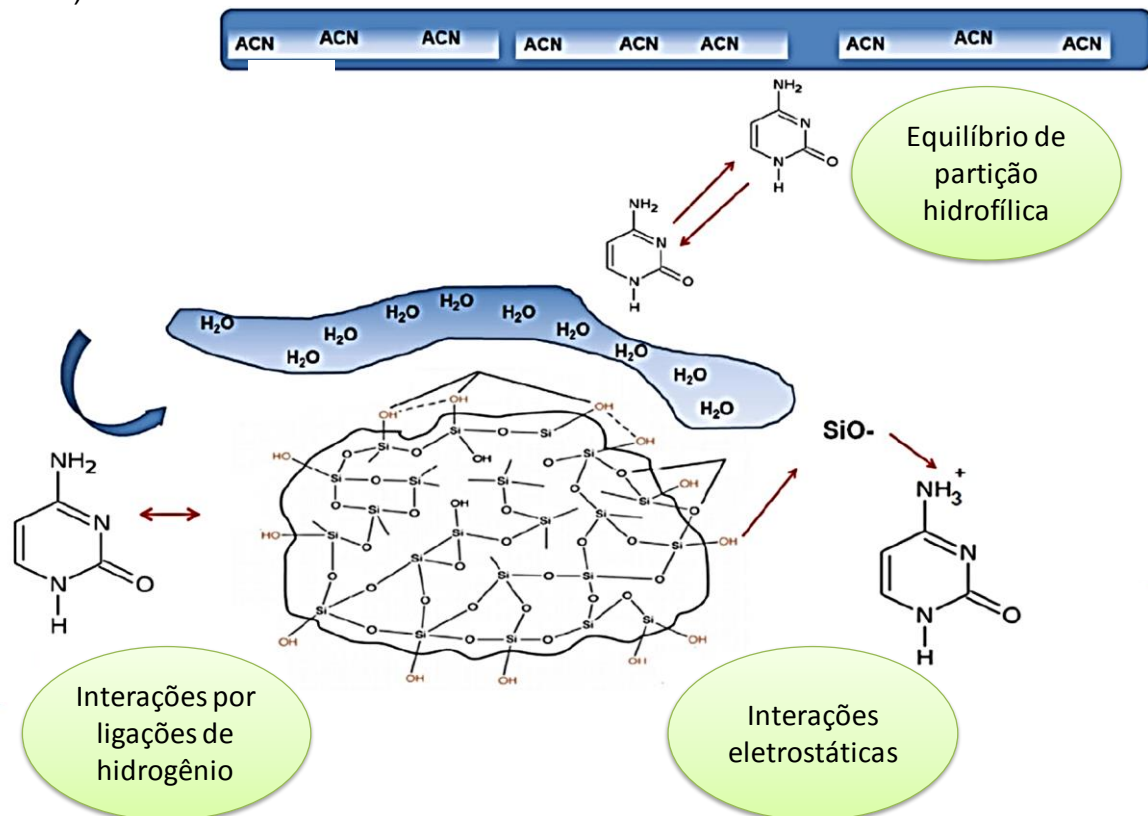
A importância do pH da fase móvel utilizada em cromatografia HILIC é evidenciada principalmente quando os compostos em foco são ionizáveis (HEMSTRÖM & IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010). Alguns aditivos podem ser usados para controlar o pH da fase móvel e a força iônica do meio (BUSZEWSKI & NOGA, 2012). No caso de compostos ionizáveis, é comum (quando são utilizadas colunas HILIC baseadas em sílica) o emprego de ácidos como o fórmico e acético, porém estes podem causar problemas de supressão da ionização pelo aumento do pH dos ácidos em soluções contendo elevados teores de solvente orgânico. Como alternativa,

aditivos como formiato e acetato de amônio podem ser utilizados, pois resolvem este problema e ainda são voláteis o suficiente favorecendo o acoplamento LC/MS (LANÇAS, 2010). A HILIC apresenta tipicamente a mesma ordem de eluição da cromatografia líquida de fase normal (ALPERT, 1990; BUSZEWSKI & NOGA, 2012), porém, o mecanismo de separação é bem mais complicado e dependente de vários fatores, destacando as propriedades físico-químicas da fase estacionária e da fase móvel hidroorgânica e a estrutura das amostras analisadas. A definição da maneira precisa de como a separação ocorre nesta coluna ainda é uma tarefa difícil e complicada, portanto, é um fenômeno ainda a espera de elucidação teórica (BUSZEWSKI & NOGA, 2012).

Alpert (1990) sugere que a retenção principal é causada pela partição do analito injetado entre a fase móvel (mais hidrofóbica) e a camada enriquecida com água, parcialmente imobilizada na fase estacionária. Vários estudos sobre a explicação da separação em HILIC foram desenvolvidos com o passar dos anos, mas a explanação de Alpert ainda pode ser considerada na teoria, uma vez que é baseada somente em evidências (HEMSTRÖM & IRGUM, 2006). Porém, acredita-se que a real interação é muito mais complexa que uma simples partição e que a separação pode ser influenciada por vários fatores em conjunto, incluindo doações de hidrogênio entre espécies polares neutras, interações eletrostáticas (ALPERT, 1990; HEMSTRÖM & IRGUM, 2006; BUSZEWSKI & NOGA, 2012), interações do tipo forças de van der Waals entre a porção hidrofóbica da fase estacionária e grupos não polares dos analitos e adsorção dos analitos na superfície do adsorvente (SILVA, BOTTOLI & COLLINS, 2016).

Parte dessas interações estão apresentadas na Figura 8, sendo estas: partição hidrofílica dos solutos da amostra entre a fase móvel (orgânica) e a camada aquosa sobre a superfície da fase estacionária; interação entre os átomos polares presentes nos solutos e a superfície polar da fase estacionária (interações por ligações de hidrogênio) e interações eletrostáticas. Na ilustração o soluto está representado pela molécula da citosina; a fase estacionária é a sílica pura e a fase móvel ACN/H₂O (SILVA, BOTTOLI & COLLINS, 2016).

Figura 8 - Tipos de interações presentes na cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC).



Fonte: Adaptado de SILVA, BOTTOLI & COLLINS, 2016.

Bernal e colaboradores (2011) destacam a utilização da cromatografia líquida com interação hidrofílica para análise de alimentos e apresentam dados que praticamente 80% das matrizes analisadas em publicações entre 2001 e 2011 estão relacionadas a bebidas e alimentos de origem vegetal e animal, enquanto uma pequena parte está relacionada com a análise de alimentos para bebês e outros. Em relação aos analitos, os autores observaram a prevalência de compostos nutricionais (como proteínas, carboidratos, lipídeos ou outras vitaminas solúveis), agrotóxicos, medicamentos veterinários e toxinas, entre outros. A principal técnica de detecção observada nas publicações foi a espectrometria de massas, seguida da detecção por arranjo de diodos (BERNAL et al., 2011).

Análises de contaminantes polares (medicamentos de uso humano ou veterinário, drogas de abuso e agrotóxicos) em amostras ambientais e de alimentos utilizando HILIC foram avaliadas por Nuijs, Tarcomnicu & Covaci (2011). Os autores relatam que ao se tratar de analitos polares, hidrofílicos e iônicos, a utilização de métodos baseados em HILIC se mostra uma opção mais fácil, rápida e com melhores

resultados em comparação com outras técnicas que necessitam de derivatização, uso de reagentes de pareamento iônico ou adição de pós coluna com solventes orgânicos para otimizar a ionização e possibilitar a análise. Além disso, pelas altas taxas de solventes orgânicos polares utilizados como eluente, há uma maior eficiência na ionização e conseqüentemente, uma sensibilidade mais elevada. Destacam ainda, que as técnicas HILIC tem um futuro promissor na substituição de análises de rotinas antigas para amostras ambientais e alimentícias (NUIJS, TARCOMNICU & COVACI, 2011).

2.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica que possibilita a determinação de massas moleculares de determinados compostos, identificando assim a identidade da espécie com base na fragmentação e ionização das moléculas de interesse (WATSON & SPARKMAN, 2011). Um espectrômetro de massas deve funcionar primeiramente pela produção de íons dos componentes da amostra, após, estes íons devem ser separados de acordo com sua razão massa-carga (m/z) nos analisadores de massa (nesta etapa é possível fragmentar novamente íons selecionados para análise dos fragmentos destes íons em um segundo analisador), posteriormente mede-se a abundância dos íons formados e estes íons são convertidos em sinais elétricos em um detector e processados para serem transmitidos a um computador para análise do espectro de massas (HOFFMAN & STROOBANT, 2007).

É importante que os analitos estejam majoritariamente separados de misturas complexas para facilitar a interpretação dos espectros obtidos pela fragmentação. Neste sentido, a combinação da cromatografia com a detecção por espectrometria de massas torna-se vantajosa pela alta seletividade e eficiência de separação obtida pela cromatografia aliada a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade proporcionado pela espectrometria (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009).

2.4.2.1 Fontes de ionização

Para o acoplamento da espectrometria de massas com a cromatografia líquida faz-se necessário a utilização de fontes de ionização específicas. Técnicas oriundas da ionização a pressão atmosférica (API, do inglês *atmospheric pressure ionization*) como a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e a fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*) permitem este acoplamento e possibilitam a análise efetiva de diferentes compostos orgânicos em diversas áreas de aplicação como ambiental, forense, farmacêutica, entre outras (WATSON & SPARKMAN, 2011).

Dentre essas técnicas, pode-se destacar a ionização por eletronebulização como a mais importante e preferível para análises de compostos polares ou iônicos, termolábeis ou com massa molecular elevada (LANÇAS, 2009). Neste tipo de ionização, o eluente utilizado como fase móvel passa através de um capilar, a pressão atmosférica, mantido sobre alta voltagem. Na saída deste capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. Esta dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco, geralmente N₂, na região do “*spray*”. Conforme a dessolvatação ocorre, o tamanho das gotas vai sendo reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Explosões sucessivas passam a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

2.4.2.2 Analisadores de massas

Após a fragmentação e formação dos íons, os mesmos devem ser separados de acordo com as razões massa-carga (m/z) em analisadores de massas e esta

separação pode ocorrer baseada em diferentes princípios de acordo com o tipo de analisador utilizado (HOFFMAN & STROOBANT, 2007).

O quadrupolo é o analisador de massas mais comumente disponível nos laboratórios principalmente por ser mais compacto, apresentar menor custo e ser mais robusto que a maioria dos outros tipos de analisadores, além de apresentar altas velocidades de varredura e boa linearidade (WATSON & SPARKMAN, 2011). O equipamento consiste em quatro barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos com os pares opostos das barras conectados eletronicamente, sendo um par ligado ao lado positivo e outro par ligado ao terminal negativo onde se aplicam uma corrente contínua do tipo corrente direta (DC, do inglês *direct current*) e um potencial de radio frequência (RF) alternante. Em um valor específico de voltagem, íons de uma determinada razão massa carga (m/z) atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável e os demais íons atingem as barras e são convertidos em moléculas neutras (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Nos últimos anos, a utilização da ionização por eletronebulização ou ionização química a pressão atmosférica na cromatografia líquida em combinação com analisadores de massa do tipo quadrupolo, armadilha de íons ou tempo de voo tem sido amplamente aceita para determinação de diferentes agrotóxicos (NOLLET & RATHORE, 2010). Além disso, esse acoplamento tem sido preferido para a identificação e quantificação de compostos polares e termicamente instáveis como carbamatos, triazinas, compostos de amônio quaternários e agrotóxicos organofosforados, entre outros, principalmente pela maior sensibilidade em relação aos detectores clássicos utilizados em cromatografia líquida (NOLLET & RATHORE, 2010).

Os analisadores quadrupolares podem ainda estar configurados de forma sequencial (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*). Os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) são constituídos por três quadrupolos em série sendo que o segundo quadrupolo (q2) não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) geralmente por dissociação induzida por colisão, sendo também empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3) (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008). Esta configuração permite melhorar a detectabilidade e aumentar a relação sinal/ruído pela seleção dos íons

característicos, tornando a técnica mais seletiva e sensível ao analito (GOSETTI et al., 2010; WATSON & SPARKMAN, 2011).

2.4.2.3 Técnicas de varredura para obtenção do espectro em analisadores sequenciais

Com a utilização de analisadores sequenciais pode-se optar por diferentes técnicas de varreduras, de acordo com o que se pretende analisar. No triplo quadrupolo o segundo quadrupolo corresponde a cela de colisão induzida onde a dissociação ocorre quando há presença de um gás inerte na célula (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Considerando a utilização de um espectrômetro do tipo triplo quadrupolo, na varredura de íons produzidos, o íon de interesse é isolado no primeiro estágio, fragmentado na cela de colisão e realizada a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado. Na varredura do íon precursor primeiramente são transmitidos íons dentro de um intervalo de m/z de interesse, os quais são fragmentados na cela de colisão e posteriormente é transmitido apenas o íon produto da fragmentação, de uma única m/z (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008). Já, no monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo e do fragmento selecionado no último quadrupolo (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

2.4.3 Determinação de compostos de amônio quaternário em alimentos empregando técnicas cromatográficas

Entre os analitos mais difíceis para análise em cromatografia, encontram-se os compostos altamente hidrofílicos e com carga, por permitirem a interação coulômbica em cromatografia líquida e por apresentarem baixa volatilidade ou instabilidade térmica para a análise por cromatografia gasosa. A derivatização química é utilizada muitas vezes para tornar estes compostos mais hidrofóbicos permitindo a separação por cromatografia gasosa (HEMSTRÖM & IRGUM, 2006).

Na determinação de compostos carregados quimicamente por cromatografia líquida, as colunas de fase normal ou reversa normalmente não conseguem realizar uma separação eficiente. Como opção, a cromatografia de troca iônica poderia ser utilizada (funcionando melhor para compostos ionizáveis) (LANÇAS, 2010), ou ainda, o pareamento iônico, onde um composto iônico de carga oposta ao analito é adicionado visando promover o equilíbrio e o emparelhamento dos elétrons. Dessa forma, possibilita a determinação por colunas de fase reversa, porém, estes reagentes podem causar a supressão de sinal em espectrometria de massas diminuindo a sensibilidade (HEMSTRÖM & IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010).

As primeiras pesquisas desenvolvidas para determinação de QUATs por cromatografia líquida normalmente foram realizados com a utilização de reagentes de pareamento iônico como ácido trifluoroacético (TFA) (TAGUCHI et al., 1998) e ácido heptafluorobutírico (HFBA) (CASTRO, MOYANO & GALCERAN, 2000; CASTRO, MOYANO & GALCERAN, 2001; VIDAL et al., 2004; ARAMENDÍA et al., 2006; ARRIFIN & ANDERSON, 2006; WANG et al., 2008). No entanto, a utilização destes reagentes pode causar incrustações e tornar necessária a limpeza frequente do espectrômetro de massas (YU et al., 2010).

Pelas características físico-químicas dos QUATs, estes compostos normalmente são excluídos dos métodos multiresíduo, justamente pela necessidade de colunas ou fases móveis específicas, adição de reagentes, entre outros (RAINA-FULTON, 2014). Neste sentido, estes analitos normalmente requerem um método específico dedicado (EURL-SRM, do inglês *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods*).

Diante disso, esse tipo de determinação tende a ser demorada e extremamente desafiadora e além disso, as aplicações frequentemente têm sido desenvolvidas para apenas um ou dois QUATs, o que amplia ainda mais o tempo de avaliação (NARDIN et al., 2017).

Neste cenário, a HILIC vem ganhando destaque como uma alternativa que apresenta resultados satisfatórios, sem a necessidade de adição de reagentes complementares para este tipo de determinação (ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009). Algumas pesquisas mais recentes também apresentam métodos para determinação de QUATs em conjunto com outros compostos altamente polares como por exemplo: glifosato, ácido aminometilfosfônico (AMPA), glufosinato,

hidrazida maleica, ciromazina, entre outros (DANEZIS et al, 2016; KACZYŃSKI, 2017).

A Tabela 4 apresenta um resumo das principais características de aplicações visando a determinação de QUATs em diferentes amostras de alimentos por cromatografia líquida a partir do ano 2000.

Tabela 4 - Principais características de métodos desenvolvidos (a partir do ano 2000) para análise de QUATs em amostras de alimentos empregando técnicas cromatográficas.

(continua)

Analitos	Matrizes	Preparo da amostra	Técnica de análise	Coluna	Fase móvel	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
CQ	Pera e concentrado de pera	Extração com MeOH, agitação por 4 h, limpeza com SCX, evaporação, reconstituição	LC-MS	WCX	25 mM acetato de amônia em água-metanol (3:2)	10	81 a 93	ZHAO et al., 2000
CQ	Cereais, pera e concentrados de pera	Cereais - agitação magnética; peras- suspensão com metanol-água 1:1 (v/v) + SPE SCX	LC-MS	SCX	Metanol: água 1:1 (v/v) 50 mmol acetato de amônia pH 6,8	1,5 e 4	83 a 103	HAU et al., 2000
CQ	Peras	Extração com 40 mM HCl, centrifugação, filtração	LC-MS	Catiônica	20 mM H ₂ SO ₄ em 4% ACN	1700	92 a 95	PEETERS et al., 2001
CQ e MQ	Pera, tomate, farinha de trigo	Extração com MeOH-água 1:1 (v/v), agitação magnética, centrifugação, filtração, SPE on-line	LC-MS/MS	SCX	Metanol:água (1:1, v/v, sem ajuste de pH)	<1 a 5	90 a 96	RIEDIKER et al., 2002
PQ, DQ e CQ	Óleo de oliva	Extração com n-hexano e solução aquosa 10 mM HFBA, agitação, centrifugação, 4 °C por 2 h.	HPLC-DAD e MS/MS	C8	A: Solução aquosa HFBA 5 mM pH 2 B: ACN/MeOH 75/25 (v/v)	0,3 e 4	>92	ARAMENDIA et al., 2006
PQ e DQ	Óleo de oliva	Extração com fluido supercrítico, limpeza <i>on line</i>	HPLC-DAD	C18	Mistura de 0.5% (m/v) brometo de potássio, 5% (v/v) metanol e 0,1% (v/v) trietilamina, pH 3 com ácido fosfórico	0,006	95 a 108	ZOUGAGH et al., 2008
CQ e MQ	Frutas, suco de frutas, vegetais, cogumelos, pão, baby food, cerveja, pó de café	Extração com 1:4 (v/v) metanol:solução tampão formiato de amônia 100 mM pH 3,5, ultrassom, centrifugação, SPE C18, diluição.	LC-MS/MS	HILIC Sílica	A: solução tampão 50 mM ácido fórmico-formiato de amônio pH 3,75 B: ACN		>78	ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009

(continuação)

Analitos	Matrizes	Preparo da amostra	Técnica de análise	Coluna	Fase móvel	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
CQ e MQ	Farinha de trigo e farinhas utilizadas em baby food	Extração líquida pressurizada (etanol a 120 °C e 100 atm)	LC-MS/MS	SCX	Água/metanol (50:50 v/v) contendo 50 mmol de formiato de amônia	<MRL UE	83 a 99	MARCHESE et al., 2009
PQ e DQ	Batata, cevada e lentilha	Extração com MeOH (50%) + HCl 0,1 M em água (50%), agitação, aquecimento a 80 °C por 15 min	LC-MS/MS	Obelisc R	A: 20 mM formiato de amônio em água pH 3 com ácido fórmico B: ACN	6 a 10	92 a 119	KOLBERG et al., 2012
PQ	Vegetais	Amostra em pó (nitrogênio líquido). Extração com água, sonicação, centrifugação, limpeza SPE WCX, evaporação e reconstituição.	LC-MS/MS	HILIC zwitterionica	A: 10 mM acetato amônio 0,1% ácido fórmico B: ACN	3 a 6	43,6 a 73,5	ZOU et al., 2015
PQ, DQ, FQ, MQ, CQ (M.R.)	Alimentos	Ajuste da quantidade de água de acordo com a matriz, extração com metanol acidificado 1% ácido fórmico, agitação, (aquecimento a 80 °C por 15 min para paraquate e diquate), centrifugação e filtração.	LC-MS/MS	Obelisc R	A: 20 mmol formiato de amônia em água (pH 3 com ácido fórmico) B: ACN	5 a 20		ANASTASSIADES et al., 2017
MQ	Pera e batata	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	HILIC	A: 20 mM acetato de amônia contendo 0,1% de ácido fórmico B: MeOH	0,07 e 0,7	83 a 119	GAO et al., 2015
PQ e DQ	Feijão-de-corda	Extração com MeOH/HCl 0,5 mol/L 6:4 (v/v), agitação, aquecimento a 80 °C por 15 min, agitação, resfriamento, centrifugação	UPLC-MS/MS	Obelisc R	A: Solução aquosa 20 mM formiato de amônia, acidificado pH 3 com ácido fórmico B: ACN	10 e 20	68 a 103	PIZZUTTI et al., 2016

(continuação)

Analitos	Matrizes	Preparo da amostra	Técnica de análise	Coluna	Fase móvel	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
PQ, DQ, MQ	Óleo de oliva e oliva	Extração com MeOH com 1% HCOOH, agitação, aquecimento 80 °C por 15 min (não realizada para olivas), agitação, centrifugação, diluição, centrifugação e filtração.	HILIC-MS/MS e HILIC-TOFMS	HILIC Plus Sílica	A: 100 mM formiato de amônio pH 2,85 com ácido fórmico B: ACN com 0,1% HCOOH(v/v)	2 a 100	4 a 78	NORTES-MÉNDEZ et al., 2016
PQ, DQ, CQ, MQ entre outros	Maçã, damasco, alface, cebola, <i>baby foods</i> , trigo, legumes, leite e carne	Extração com metanol 1% ácido fórmico, agitação por 2 min, centrifugação, congelamento do extrato e filtração.	LC-MS/MS	ZIC-pHILIC	A: solução aquosa de formiato de amônio 50 mM B: água:acetoneitrila 10:90 (v/v).	1 a 10	55 a 158	DANEZIS et al, 2016
PQ, DQ, CQ, MQ entre outros	Cebola, trigo, batata e pera	Extração com água:metanol 1% ácido fórmico (1:1 v/v), agitação por 2 min, aquecimento de 15 min a 80 °C, agitação por 2 min, centrifugação, limpeza de 5 mL de sobrenadante com diferentes sorventes, agitação, centrifugação e filtração.	LC-MS/MS	Obelisc N	A: Solução aquosa de formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ com 1% de ácido fórmico B: Acetonitrila	>10	46 a 88	KACZYŃSKI, 2017
PQ, DQ, CQ, MQ, FQ	Água mineral, suco de laranja, cerveja, chá, grão de café verde, pó de café tostado, arroz, açúcar, semente de cacau, farinha de milho branca	Para alimentos: extração com água/metanol/ácido fórmico (69,6:30:0,4 v/v), agitação por 15 min, centrifugação, filtração.	UHPLC-MS/MS	Colunas de troca catiônica	A: água com 2% de ácido fórmico B: Acetonitrila C: Água	0,5 e 1	64 a 118	NARDIN et al., 2017

(conclusão)

Analitos	Matrizes	Preparo da amostra	Técnica de análise	Coluna	Fase móvel	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
PQ, DQ	Batata	Extração com 15 mL MeOH:HCl 0,1 N (1:1 v/v), agitação 10 min, aquecimento 15 min a 80°C, agitação 2 min, resfriamento, centrifugação, SPE com Oasis HLB.	LC-MS/MS	Acclaim Trinity Q1	Acetonitrila:água 7:3 (v/v) contendo 50 mM acetato de amônio (pH 4,7)	0,9 e 1,2	81 a 103	CHAMKASEM, MORRIS & HARMON, 2017.
PQ, DQ, CQ, MQ,	Limão, tomate, semente de chia, trigo, sultana	Extração com água/metanol/ácido clorídrico 1M (50:25:25, v/v/v), agitação por 5 min, centrifugação, centrifugação adicional. Sobrenadante passado em seringa com filtro.	UHPLC-MS/MS	Obelisc R	A: solução aquosa de formiato de amônio 20 mM, pH 3 com ácido fórmico B: Acetonitrila	10	77 a 120	BAUER et al., 2018.
CQ, MQ e outros	Maçã, cenoura, ervilha	10 g. de amostra + 0,5 g. de ácido ascórbico. Extração com metanol 1% ácido fórmico (v/v), agitação por 10 min, centrifugação, diluição.	LC-MS/MS	Acclaim Trinity Q1	A:água B: acetonitrila + formiato de amônio 5 mM e acetonitrila + formiato de amônio 50 mM	1 a 4	82 a 136	CHAMKASEM, 2018.

M.R. - método de referência

Fonte: Autora.

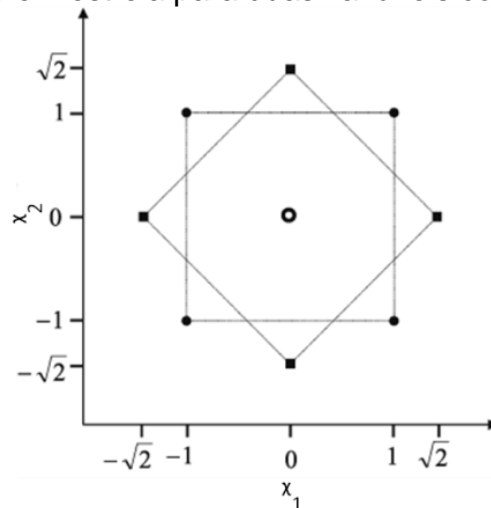
2.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Visando a otimização de procedimentos químicos em geral, costuma-se utilizar planejamentos experimentais a partir de princípios estatísticos tendo por objetivo avaliar os melhores resultados considerando várias variáveis. Com isto, é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil com um número mínimo de experimentos de ordem aleatória, para evitar a ocorrência de distorção nos resultados (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada para avaliar os efeitos (ou influências) quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores) prevendo a interação entre as mesmas (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Um planejamento fatorial 2^2 pode ser representado geometricamente por um quadrado, tendo em cada vértice a combinação dos níveis de dois fatores. Sendo realizado um giro de 45° sobre estes, são gerados os pontos axiais e a geração de mais 4 experimentos, distantes $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central conforme pode ser visualizado na Figura 9. Este então é denominado planejamento de composto central (PCC) ou planejamento estrela (CALADO & MONTGOMERY, 2003; OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 9 - Planejamento em estrela para duas variáveis codificadas.



Fonte: Adaptado de Barros Neto, Scarminio & Bruns, 2010.

Com a utilização do planejamento estrela, observa-se a existência de termos quadráticos no modelo de regressão, possibilitando a análise por meio de superfícies de resposta (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A validação de métodos analíticos é o processo de avaliação de todo e qualquer método analítico desenvolvido para garantir eficiência, qualidade e confiabilidade dos resultados. Para tal, existem guias que sugerem diretrizes a serem seguidas para a validação destes métodos (ZANELLA et al., 2015b). Como documentos normativos brasileiros, podemos citar o desenvolvido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) através do documento "Orientação sobre validação de métodos analíticos" (DOQ-CGCRE-08) de 2017 e o desenvolvido pela ANVISA, o RDC Nº 166 de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (ANVISA, 2017a).

Outro documento importante em nível internacional para controle de qualidade analítica e procedimentos de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos é denominado "*Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed*" (SANTE/11813/2017), elaborado pela UE. Este descreve as exigências para a validação de métodos analíticos e tem como objetivos a uniformização dos sistemas de controle de qualidade, a garantia da qualidade e a comparabilidade de resultados analíticos, a garantia de exatidão aceitável e de que resultados falsos negativos ou positivos sejam evitados e ainda, serve de apoio ao sistema ISO/IEC 17025:2005 para acreditação de laboratórios.

Na validação de métodos analíticos são avaliados parâmetros que são usados como indicadores para verificação do bom desempenho das técnicas, e entre estes, pode-se destacar:

- Seletividade: a seletividade é habilidade de discriminação entre o analito e outros compostos e existe em todas as etapas do método (SANTE, 2017). Para avaliação da seletividade pode-se comparar injeções de uma amostra branco com e sem a presença dos analitos e também um branco reagente (sem os possíveis interferentes da matriz) (ARAUJO, 2009).

- Efeito matriz: o efeito matriz está relacionado com a influência de um ou mais compostos co-extraídos da amostra sobre a medida de concentração do analito e pode ser observado pelo aumento ou diminuição da resposta do detector comparada com uma solução do analito preparada em solvente (SANTE, 2017). O efeito matriz é avaliado pela comparação da inclinação de uma curva analítica preparada em solvente (CS - curva no solvente) e outra no extrato da matriz (CM - curva na matriz), de acordo com a equação (1). Para que o efeito matriz seja considerado desprezível, o valor de EM deve ser $\leq 20\%$ (SANTE, 2017).

$$EM(\%) = \left(\frac{a_e}{a_s} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: a_e = inclinação da curva preparada no extrato da matriz branco

a_s = inclinação da curva analítica preparada no solvente.

- Linearidade e curva analítica: é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados analíticos são diretamente proporcionais a concentração de um analito dentro de uma faixa especificada. Para tal, verifica-se se há relação linear aparente do gráfico e determina-se o coeficiente de correlação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular e a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (ANVISA, 2017a);
- Limites de detecção e quantificação: limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (SANTE, 2017).
- Exatidão: a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É avaliada a partir das recuperações de 6 réplicas de no mínimo 4 níveis de fortificação de acordo com a equação (2). As recuperações devem estar entre 70 e 120% (ANVISA, 2017a).

$$Exatidão(\%) = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

- Precisão: a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2017a). A repetitividade pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), calculado de acordo com a equação (3) a partir de 6 réplicas de 4 níveis de fortificação. Os valores de RSD devem ser $\leq 20\%$ (ANVISA, 2017a; SANTE, 2017).

$$RSD(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (3)$$

Em que: DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada.

A precisão intermediária pode ser avaliada pela repetição dos ensaios de precisão e exatidão em dois níveis de fortificação por outro analista em dois dias diferentes (ANVISA, 2017a). Os resultados devem estar de acordo com os estipulados em cada procedimento descrito anteriormente (recuperações entre 70 e 120% e RSD $\leq 20\%$).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia descrita envolve inicialmente o preparo de soluções e a seleção das condições cromatográficas para a determinação de paraquate, diquate, mepiquate e clormequate, além do emprego de um planejamento experimental como ferramenta para a otimização das condições da fase móvel utilizada. Após, apresenta-se a otimização da etapa de preparo de amostra e limpeza dos extratos para a matriz cevada seguida da validação do método otimizado. Por fim, têm-se a proposta de extensão do escopo do método para a matriz trigo.

O método analítico para a determinação dos resíduos de QUATs em cevada e trigo foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), na Universidade Federal de Santa Maria. O LARP é acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO, sob o CRL nº 0627 para a Norma Brasileira ABNT NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa estão listados abaixo:

- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab, Brasil);
- Mesa agitadora pendular TE – 240/1 (Tecnal, Brasil);
- Moinho A11 Basic (IKA, Alemanha);
- Ultra-turrax T25 digital (IKA, Alemanha);
- Bomba de vácuo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- pHmetro modelo pH 500 series Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, EUA);
- Ultrassom Unique, modelo USC-1400 (Brasil);
- Banho termostático 398 (De Leo, Brasil);
- Purificador de água Milli-Q Direct 3UV – resistividade 18,2 MΩ cm (França);
- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Evaporador TurboVap® LV (Biotage, Alemanha);

- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha; Eppendorf, Canadá);
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), equipado com:
 - Cromatógrafo a líquido Waters (EUA);
 - Amostrador automático *sample manager* (Acquity);
 - Fonte de ionização por eletronebulização (EUA);
 - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ (EUA);
 - Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) Waters (Irlanda);
 - Sistema gerador de nitrogênio, PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia).

O sistema UHPLC-MS/MS utilizado nesta pesquisa pode ser visualizado na Figura 10.

Figura 10 - Sistema UHPC-MS/MS modelo Xevo TQ (Waters, EUA) utilizado.



3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa seguem descritos:

- Padrões sólidos dos agrotóxicos em estudo (Dr. Ehrenstorfer, Darmstadt; Alemanha);
- Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.
- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker - EUA)
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 M Ω cm);
- Ácido clorídrico (J. T. Baker - EUA)
- Metanol grau HPLC (J. T. Baker - EUA);
- Acetona grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich, EUA);
- Diclorometano (Honeywell, EUA);
- Octadecilsilano (C18) com tamanho de partículas de 40 μ m – Bondesil (Agilent Technologies, EUA);
- Amina primária e secundária (PSA) com tamanho de partícula de 40 μ m – Bondesil (Agilent Technologies, EUA);
- Supel QuE Z-Sep+® (Sigma Aldrich, EUA);
- Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid®) (Agilent Technologies, USA);
- Terra diatomácea (Sigma Aldrich, USA);
- Carbono grafitizado (*graphitized carbon black* - GCB) Supelclean ENVI-Carb 120/400 mesh (Supelco, USA);
- Quitosana com grau de desacetilação de 83% (MM: 200 KDa) e 86% (MM:160 KDa) (Laboratório de Operações unitárias na Escola de Química e Alimentação - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil).
- Fibrothin® 500 – Quitosana com grau de desacetilação > 90% (Catarinense Pharma, Brasil);

- Cartucho SPE Oasis[®] HLB 60 mg/3 mL (30 µm) (Waters, USA);
- Cartucho SPE Strata[®] C18 500 mg/3 mL (Phenomenex, USA);
- Cartucho SPE Bond Elut[®] NH₂ 500 mg/3 mL (Agilent Technologies, USA).

Os materiais utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa seguem descritos:

- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Filtros de seringa nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Agilent Technologies, EUA);
- Filtros de seringa PTFE hidrofílico de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Analítica, Brasil);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Inserts de polipropileno, capacidade de 0,2 mL (Supelco, EUA);
- Tubos Eppendorf, capacidade de 2 mL (Eppendorf, Brasil);
- Vidrarias comuns de laboratório.

Cabe ressaltar que todos os ensaios foram realizados utilizando frascos de polipropileno em todas as etapas a fim de evitar a interação dos analitos paraquate e diquate com a sílica do vidro (HAO et al., 2013; PIZZUTTI et al., 2016; ANASTASSIADES et al., 2017).

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Preparou-se soluções estoque individuais na concentração de 1000 mg L⁻¹ a partir dos padrões sólidos de paraquate, diquate, clormequate e mepiquate, os quais apresentam as características descritas na Tabela 5. A partir das soluções individuais, preparou-se uma solução de mistura dos analitos na concentração 10 mg L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas em metanol e também em água ultrapura para avaliar o comportamento dos padrões e intensidades do sinal analítico nesses solventes.

Além destas, uma solução do composto trifenilfosfato foi utilizada para avaliação de possíveis variações do sinal analítico no instrumento, não sendo utilizada a sua resposta para os cálculos de recuperação. A solução de trifenilfosfato foi preparada em acetonitrila e uma alíquota foi adicionada ao final da etapa de preparo de amostra, diretamente no extrato final e antes da injeção cromatográfica, obtendo-se uma concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento.

Tabela 5 - Características dos padrões sólidos utilizados.

Composto	Nº CAS	Fórmula molecular	Peso molecular	Pureza (%)	Pressão de vapor (mPa a 20 °C)	Solubilidade em água (g/L a 20 °C)
Dicloreto de paraquat monohidratado	75365-73-0	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	275,16	99	$< 1\text{E}^{-7}$	N/A
Dibrometo de diquate monohidratado	6385-62-2	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	362,1	98,3	$< 0,013$	700
Cloreto de clormequate	999-81-5	$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}$	158,07	99	0,01	> 1000
Cloreto de mepiquate	24307-26-4	$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClN}$	149,66	99	$< 0,01$	> 500

3.4 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

Inicialmente foram definidas as condições cromatográficas para determinação dos compostos QUATs no sistema UHPLC-MS/MS utilizando a coluna do tipo HILIC.

As infusões no espectrômetro de massas dos compostos em estudo foram solução de 50 mmol L^{-1} de formiato de amônio em água:acetonitrila (1:1, v/v). Assim, escolheram-se as transições SRM de maior intensidade para cada analito. Os parâmetros estabelecidos para o espectrômetro de massas foram os seguintes:

- Ionização: eletrospray (ESI) modo positivo;
- Modo: monitoramento de reações selecionadas (SRM);
- Temperatura da fonte: $150 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Temperatura de dessolvatação: $350 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Vazão do gás de dessolvatação: 800 L h^{-1} ;
- Vazão do gás no cone: 30 L h^{-1} ;
- Vazão do gás de colisão: $0,15 \text{ mL min}^{-1}$;

- *Software* para processamento dos dados: MassLynx™ v4.1.

A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida a 30 °C e o volume de injeção no sistema UHPLC-MS/MS foi de 10 µL.

Para a verificação da intensidade dos sinais e dos tempos de retenção dos analitos, injetou-se uma solução de mistura dos compostos na concentração de 50 µg L⁻¹ preparada em água ultrapura. Empregou-se a fase móvel constituída por (A) solução tampão aquosa de formiato de amônio 150 mmol L⁻¹, pH ~ 3,7 e (B) acetonitrila. O modo de eluição isocrático foi avaliado nas variações de 40, 50 e 60% de A; com vazão de 0,250 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 4 min. Além destas, o modo de eluição gradiente também foi testado, conforme: iniciou com 25% de A, passando para 50% de A aos 4,00 min e retornando a proporção inicial aos 4,01 min mantendo a vazão de 0,250 mL/min e tempo de corrida de 7 min.

3.4.1 Otimização da fase móvel

Visando a otimização da fase móvel utilizada o sistema UHPLC-MS/MS, realizou-se um planejamento de composto central utilizando o *software* Statistica versão 8. O planejamento foi realizado com as variáveis pH e concentração de formiato de amônio na fase móvel aquosa com duplicata do ponto central. Como pode ser visto na Tabela 6, 10 combinações de preparo de fase móvel aquosa foram geradas. Para cada ensaio, foi analisado, em duplicata, uma solução de mistura contendo todos os analitos na concentração de 70 µg L⁻¹. Esta solução foi preparada pela diluição 1:1 (v/v) em água ultrapura a partir de uma solução 140 µg L⁻¹ em metanol. Empregou-se o modo de eluição isocrática na proporção de 40:60 A/B (v/v), sendo a fase móvel B, acetonitrila.

As respostas analíticas empregadas no processamento dos dados foram as áreas obtidas para cada analito no uso de diferentes fases móveis aquosas (testes 1 a 9 da Tabela 6) que variaram em relação ao pH e a concentração de formiato de amônio. Assim, a seleção se deu pelo resultado que apresentou maiores áreas para os quatro compostos.

Tabela 6 - Condições dos parâmetros avaliados para otimização da fase móvel gerados a partir do planejamento de composto central.

Fatores	-2	-1	0	+1	+2
Valores de pH	2,8	3,0	3,5	4,0	4,2
Concentração de formiato de amônio (mmol L ⁻¹)	17,2	40,0	95,0	150,0	172,8
Fase móvel aquosa	Valores de pH	Concentração de formiato de amônio (mmol L ⁻¹)			
1	3,0	40,0			
2	3,0	150,0			
3	4,0	40,0			
4	4,0	150,0			
5	2,8	95,0			
6	4,2	95,0			
7	3,5	17,2			
8	3,5	172,8			
9	3,5	95,0			
10	3,5	95,0			

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS DE CEVADA

3.5.1 Processamento das amostras

Os grãos de cevada foram processados finamente em moinho, homogeneizados e armazenados em frascos de polipropileno sob refrigeração (temperatura abaixo de -10^o C). Para a utilização nos testes, os mesmos foram retirados do freezer e se aguardou o equilíbrio com a temperatura ambiente para dar início aos procedimentos.

3.5.2 Avaliação da resposta cromatográfica dos analitos em diferentes solventes de extração

Inicialmente, observou-se o comportamento de soluções padrão dos analitos previamente preparados em diferentes solventes. Para isso, analisou-se (em duplicata) uma solução contendo a mistura dos analitos na concentração de 50 µg L⁻¹ nos solventes: acetonitrila, acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido fórmico, metanol, metanol acidificado com 1% (v/v) de ácido fórmico, água, água acidificada com 1% (v/v) de ácido fórmico e mistura de metanol/ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (1:1 v/v).

3.5.3 Etapa de extração – procedimento preliminar

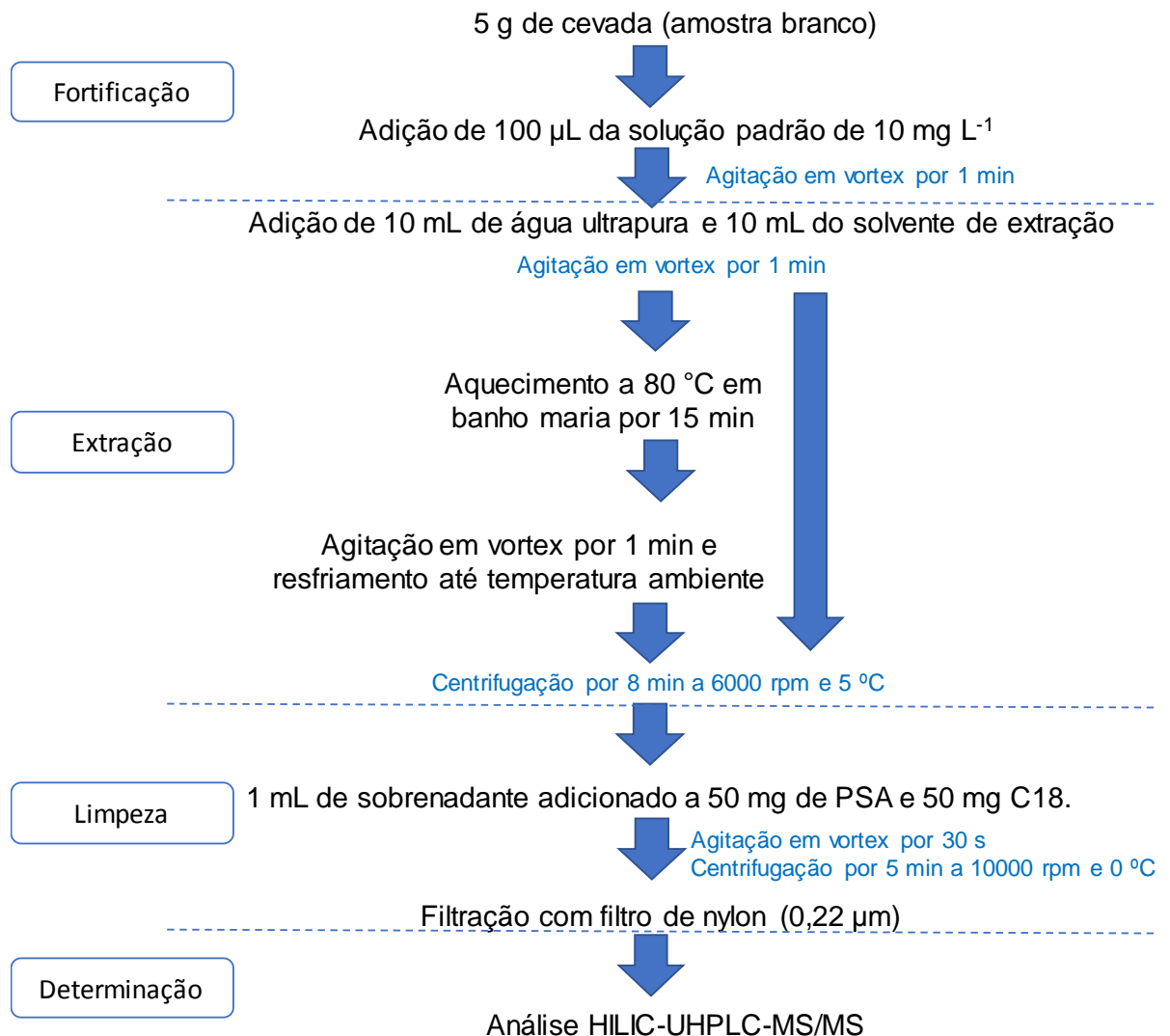
Os solventes descritos no item 3.5.2 também foram avaliados na etapa de extração dos analitos. O método empregado (Figura 11) foi adaptado da metodologia proposta por ANASTASSIADES e colaboradores (2017) no método oficial QuPPE. Para tanto, utilizou-se 5 gramas de amostra de cevada (previamente moída) as quais foram fortificadas a um nível de $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ (utilizando $100 \mu\text{L}$ da solução padrão contendo a mistura dos quatro compostos na concentração de 10 mg L^{-1}) e homogeneizadas por 1 min em vortex. Após, adicionou-se 10 mL de água ultrapura e 10 mL do solvente de extração e agitou-se por mais 1 min em vortex.

Avaliou-se a etapa de aquecimento a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min em banho maria. Após, realizou-se a agitação em vortex por 1 min e então os tubos foram deixados em repouso para que atingissem a temperatura ambiente (ANASTASSIADES et al., 2017). Todos os solventes foram testados com ou sem a etapa de aquecimento.

Após, os tubos foram levados a centrifugação por 8 min a 6000 rpm (4.856 g) e $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, 1 mL do extrato sobrenadante foi adicionado a um frasco de Eppendorf contendo 50 mg de C18 e 50 mg de PSA, o qual foi agitado por 30 s em vortex e centrifugado a 10000 rpm (10.192 g) por 5 min a $0 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante desta etapa de limpeza foi filtrado com filtro de nylon ($0,22 \mu\text{m}$) e injetado no cromatógrafo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Um fluxograma simplificado destes procedimentos pode ser visualizado na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma do procedimento preliminar de extração.



3.5.4 Extrações utilizando *slurry*

Novos testes de extração foram realizados utilizando a amostra após a preparação de um *slurry*, ou seja, uma mistura da amostra seca com uma quantidade de água. Para tanto testou-se três proporções relacionadas a quantidade de cevada finamente moída e de água ultrapura adicionada, sendo elas: 1:1 (50 g e 50 mL), 1:1,5 (50 g e 75 mL) e 1:2 (50 g e 100 mL). As misturas foram homogeneizadas em ultraturrax por 3 min e a consistência foi avaliada visualmente, selecionando assim, a proporção matriz/água mais adequada para a sequência de experimentos.

Os próximos ensaios (T1 a T5) foram realizados sem a etapa de aquecimento e com o *slurry* na proporção de amostra:água, 1:1,5 (m/v) conforme apresentado na

Tabela 7. Além disso, dois ensaios realizados anteriormente foram usados para comparação, e aqui denominados T6 e T7.

Após cada etapa de limpeza, os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 0 °C. Nos testes T1, T6 e T7 os extratos oriundos da limpeza 1 foram filtrados e injetados no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS. Nos testes T2 a T5, os extratos foram filtrados e injetados após a realização da etapa adicional de limpeza.

Tabela 7 – Ensaios realizados para avaliação da utilização de *slurry*.

	Amostra	Solvente de extração	Limpeza 1	Limpeza 2
T1	10 g <i>slurry</i>	10 mL de água e 10 mL de ACN 1% (v/v) ácido fórmico	50 mg PSA e 50 mg C18	-
T2	10 g <i>slurry</i>	10 mL de água	50 mg PSA e 50 mg C18	0,5 mL sobrenadante e 0,5 mL ACN 1% (v/v) ácido fórmico
T3	10 g <i>slurry</i>	10 mL de água	50 mg PSA e 50 mg C18	0,5 mL sobrenadante e 0,5 mL ACN
T4	10 g <i>slurry</i>	10 mL de MeOH 1% (v/v) ácido fórmico	50 mg PSA e 50 mg C18	0,5 mL sobrenadante e 0,5 mL ACN
T5	10 g <i>slurry</i>	5 mL de água e 5 mL de MeOH 1% (v/v) ácido fórmico	50 mg PSA e 50 mg C18	0,5 mL sobrenadante e 0,5 mL ACN
T6	5 g amostra seca	10 mL de água e 10 mL de ACN 1% (v/v) ácido fórmico	50 mg PSA e 50 mg C18	-
T7	5 g amostra seca	10 mL de água e 10 mL de MeOH 1% (v/v) ácido fórmico	50 mg PSA e 50 mg C18	-

Os testes T1 ao T5 foram realizados em triplicata e suas áreas, obtidas a partir de uma fortificação em 250 µg kg⁻¹ (realizada conforme descrito no item anterior) comparadas com os ensaios T6 e T7.

3.5.4.1 Avaliação do modo de contato (amostra + solvente de extração) e tempos de extração

Diferentes processos de modo e tempo de permanência do solvente de extração com a amostra foram avaliados:

- Agitação em vortex por 1 min;

- Agitação em vortex por 1 min precedida de 15 min de permanência em banho ultrassônico;
- Agitação em mesa agitadora por 15 min.

Os resultados foram avaliados em relação à média das áreas obtidas no sistema UHPLC-MS/MS a partir da amostra branco fortificada na concentração de 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dos compostos paraquate, diquate, mepiquate e clormequate. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.5 Etapa de limpeza

Uma etapa adicional de limpeza (*clean-up*) dos extratos oriundos de matrizes complexas é comumente requerida para separar os analitos dos coextrativos da matriz, reduzindo o efeito matriz e causando menos danos ao sistema cromatográfico (PINHO et al., 2009). Neste sentido algumas etapas foram adicionadas e/ou otimizadas visando obter um extrato final com a menor fração possível de interferentes.

3.5.5.1 Partição com solvente orgânico

A primeira etapa de limpeza consistiu na avaliação visual da remoção de interferentes no extrato. Esta foi realizada com a adição de diferentes quantidades de diclorometano (1,5 mL, 3 mL e 6 mL) a 3 mL de extrato. A mistura extrato + diclorometano foi agitada por 1 min em vortex e centrifugada a 6000 rpm (4.677 g) por 8 min a 5° C. Após, a fração aquosa foi submetida à limpeza por d-SPE com 50 mg de C18 e 50 mg de PSA, agitação e centrifugação a 10000 rpm (10.192 g) por 5 min a 0 °C e posterior filtração com filtro de nylon (0,22 μm).

Além do aspecto visual, as áreas obtidas foram comparadas através da fortificação na amostra branco na concentração de 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ visando a confirmação de que esta etapa não afetaria negativamente os resultados de extração obtidos. Para comparação injetou-se também uma fortificação na mesma concentração que não foi submetida a adição de diclorometano. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.5.2 Sorventes

Nesta etapa, diferentes sorventes foram utilizados para avaliação da melhor limpeza do extrato sem a perda dos analitos. Para tanto, as quantidades e os sorventes testados foram:

- 50 mg de PSA e 50 mg de C18;
- 50 mg de C18;
- 50 mg de PSA;
- 50 mg de quitosana com grau de desacetilação de 86% (denominada quitosana A);
- 50 mg de quitosana com grau de desacetilação de 83% (denominada quitosana B);
- 50 mg de quitosana comercial, com grau de desacetilação >90% (denominada quitosana C);
- 50 mg de Oasis HLB dispersivo;
- 50 mg de GCB;
- 50 mg de terra diatomácea;
- 50 mg de ZSep+;
- 200 mg de EMR;
- Cartucho Oasis HLB 60 mg;
- Cartucho C18 500 mg;
- Cartucho Bond Elut NH₂ 500 mg.

A etapa de d-SPE foi realizada com adição de 1 mL de sobrenadante (obtido na etapa de extração) às quantidades acima descritas. Após, realizou-se a agitação em vortex por 30 s e centrifugação a 10.000 rpm (10.192 g) por 5 min a 0 °C. Por outro lado, durante a etapa de limpeza empregando SPE, 1 mL de sobrenadante (obtido na etapa de extração) foi percolado no Oasis HLB e 3 mL nos cartuchos C18 e NH₂, sem a etapa de condicionamento anterior.

Os resultados foram avaliados em relação às áreas cromatográficas obtidas para cada composto, a partir de uma amostra branco fortificada em 250 µg kg⁻¹ e submetida a cada uma das etapas de limpeza descritas. As análises foram realizadas em duplicata.

A partir dos resultados dos testes iniciais de limpeza com sorventes, um planejamento de compostos central foi realizado utilizando o *software* Statistica 8.0 a fim de otimizar esta etapa de limpeza. As variáveis escolhidas foram a presença e a quantidade de quitosana e PSA e a partir deste planejamento nove combinações de experimentos foram geradas e realizadas em duplicata. Os níveis utilizados no PCC foram $-\alpha$ (0 mg), -1 (10 mg), 0 (40 mg), $+1$ (70 mg) e $+\alpha$ (82 mg) e os resultados foram avaliados em função das áreas cromatográficas obtidas para os compostos em estudo a partir de uma fortificação na concentração de $250 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Para efeito de comparação, todos os ensaios realizados no PCC e mais um teste sem esta etapa foram submetidos a testes gravimétricos para verificação da quantidade de coextrativos resultante. Neste teste, tubos de vidro foram deixados em estufa por 2 h a uma temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e após resfriamento em dessecador, foram pesados até peso constante. Após, 5 mL de cada extrato foram evaporados até a secura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob fluxo de nitrogênio (15 psi). Posteriormente, os tubos foram deixados em estufa novamente a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1h 30 min). Decorrido este tempo, os tubos foram mantidos em dessecador a temperatura ambiente, quando novamente foram realizadas as pesagens até massa constante (RIZZETTI, 2017).

Diante das massas de coextrativos obtidas, calculou-se a percentagem de remoção de interferentes a partir da diferença em massa de coextrativos antes e depois dos processos de limpeza (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013), de acordo com a equação (4).

$$\% \text{Coextrativos} = (\text{Ca} - \text{Cd}) / \text{Ca} \times 100 \quad (4)$$

Em que: Ca = massa de coextrativos antes da etapa de limpeza

Cd = massa de coextrativos depois da etapa de limpeza

Após esta etapa, avaliou-se a influência da utilização de dois tipos de filtros (nylon e politetrafluoretileno hidrofílico), para a filtração dos extratos, antes da injeção no sistema HPLC-MS/MS. Os filtros apresentavam 13 mm de diâmetro e $0,22 \mu\text{m}$ de tamanho do poro.

3.6 AVALIAÇÃO DO PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO INDIVIDUAL E MISTURA

As soluções estoque e de mistura contendo todos os compostos deste estudo foram avaliadas quanto a estabilidade em relação ao ano de preparação, tipo de solvente, tipo de frasco de armazenamento e condições de armazenamento conforme segue:

2015: preparo de soluções padrões individuais (1000 mg L^{-1}) dos quatro agrotóxicos em estudo utilizando água ultrapura. Estas soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar em temperatura de 4 a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (geladeira).

2016: preparo de soluções padrões individuais (1000 mg L^{-1}) dos quatro agrotóxicos em estudo utilizando água ultrapura. Estas soluções foram acondicionadas em frascos de polipropileno em temperatura de 4 a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (geladeira). A partir destas soluções preparou-se uma solução contendo a mistura dos quatro compostos na concentração de 10 mg L^{-1} em água ultrapura (MIX 1), a qual foi armazenada nas mesmas condições.

2017: preparo de soluções padrões individuais (1000 mg L^{-1}) dos quatro agrotóxicos em estudo utilizando metanol. Estas soluções foram acondicionadas em frascos de polipropileno em temperatura inferior a $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (freezer). A partir destas soluções preparou-se soluções contendo a mistura dos quatro compostos na concentração de 10 mg L^{-1} em metanol (MIX 2) e em água ultrapura (MIX 3), as quais foram armazenadas em freezer e geladeira, respectivamente.

2018: Preparo de novas soluções analíticas contendo a mistura dos analitos na concentração de 10 mg L^{-1} a partir das soluções padrões individuais preparadas em água ultrapura e acondicionadas em frascos de polipropileno (MIX 4), em metanol acondicionadas em frascos de polipropileno (MIX 5) e em água ultrapura acondicionadas em frascos de vidro âmbar (MIX 6). As soluções preparadas em água foram armazenadas a temperatura entre 4 a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as soluções preparadas em metanol, a temperatura inferior a $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A Tabela 8 apresenta resumidamente cada uma destas soluções padrões avaliadas.

Tabela 8 – Composição das soluções padrões avaliadas quanto a estabilidade.

	Solução padrão individual				Solução - mistura			
	Ano	Frasco	Solvente	Armazenamento	Ano	Frasco	Solvente	Armazenamento
MIX 1	2016	PP	Água UP	Geladeira	2016	PP	Água UP	Geladeira
MIX 2	2017	PP	MeOH	Freezer	2017	PP	MeOH	Freezer
MIX 3	2017	PP	MeOH	Freezer	2017	PP	Água UP	Geladeira
MIX 4	2016	PP	Água UP	Geladeira	2018	PP	Água UP	Geladeira
MIX 5	2017	PP	MeOH	Freezer	2018	PP	MeOH	Freezer
MIX 6	2015	Vidro	Água UP	Geladeira	2018	Vidro	Água UP	Geladeira

PP: prolipileno; Água UP: água ultrapura; MeOH:metanol

A partir de todas as soluções contendo a mistura dos analitos (MIX 1 a 6) preparou-se uma solução na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e analisou-se em triplicata no sistema UHPLC-MS/MS. O solvente empregado foi uma mistura de água/metanol 1% v/v ácido fórmico/ acetonitrila (25:25:50, v/v/v). Todas essas soluções foram preparadas e injetadas no mesmo dia.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método proposto nesta pesquisa foi avaliada pela determinação dos parâmetros de seletividade, efeito matriz, curva analítica e faixa linear, limites de quantificação e detecção, exatidão através de ensaio de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária (reprodutibilidade).

A amostra branco utilizada em todos os ensaios consiste em uma amostra comercial que foi previamente analisada e não apresentou resíduos de nenhum dos quatro analitos (paraquate, diquate, clormequate e mepiquate).

Para a avaliação da seletividade, comparou-se os cromatogramas obtidos a partir da injeção da amostra branco fortificada na concentração de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ com os analitos, cromatograma da amostra branco na ausência dos analitos e cromatograma obtido a partir da injeção de um branco reagente (com todos solventes e reagentes, sem a amostra). Para tanto, considerou-se o método seletivo se os cromatogramas da amostra branco e branco reagente não apresentassem sinal cromatográfico no mesmo tempo de retenção dos analitos (ARAÚJO, 2009; SANTE, 2017).

A avaliação do efeito matriz foi realizada pela comparação entre a inclinação da curva analítica preparada no solvente de extração e a inclinação obtida na curva analítica preparada na amostra branco, conforme a equação (1) descrita no item 2.6.

A linearidade foi avaliada nas curvas analíticas preparadas em nove níveis de concentração sendo estes 20, 40, 80, 100, 200, 400, 500, 800 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que correspondem a 4, 8, 16, 20, 40, 80, 100, 160 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento. Foram avaliadas:

- Curva analítica preparada no solvente de extração (curva no solvente – CS);
- Curva analítica preparada no extrato da amostra branco de cevada (curva na matriz - CM);
- Curva analítica preparada na matriz branco fortificada (CMF) obtida através da extração de diferentes níveis de concentração e;
- Curva analítica preparada por diluição na matriz branco fortificada (CDMF) preparada a partir da diluição do extrato da amostra branco fortificada na maior concentração, conforme descrito por Martins e colaboradores (2016).

As curvas de calibração foram injetadas em triplicata e a média das áreas foi utilizada para a obtenção da regressão linear e dos coeficientes de determinação (r^2) para cada caso, utilizando o Microsoft Office® Excel 2016.

Os limites de quantificação (LOQ) foram avaliados através da avaliação de 6 réplicas no menor nível de fortificação que apresentou precisão e exatidão adequadas (recuperações entre 70 a 120% e desvio padrão relativo $\leq 20\%$) (SANTE, 2017). O limite de detecção (LOD) foi considerado o valor do LOQ dividido por 3,33.

A exatidão e precisão (em termos de repetibilidade) do método proposto foram avaliadas através da % das recuperações e desvio padrão relativo (% RSD). Avaliou-se 9 níveis de fortificação (20, 40, 80, 100, 200, 400, 500, 800 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para cada nível de fortificação foram extraídas 6 réplicas e o cálculo da recuperação foi realizado de acordo com a equação (2) e do RSD conforme a equação (3), ambas descritas no item 2.6.

Para a verificação da precisão intermediária, foram preparados ensaios de fortificação nos níveis de 20, 40, 80, 100, 200, 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e curvas CMF e CDMF. Para isto, utilizou-se um branco diferente de cevada e os ensaios foram realizados em dia diferente da realização dos ensaios de repetibilidade.

3.8 EXTENSÃO DO ESCOPO DO MÉTODO PARA MATRIZ TRIGO

Após a validação do método proposto para a matriz cevada, avaliou-se a possibilidade da aplicação deste método para a matriz trigo. De acordo com a SANTE (2017) isso é possível se as matrizes pertencerem a uma mesma categoria. Neste caso, cevada e trigo são classificados como alimentos com alto teor de amido e/ou proteínas e baixo teor de água e gordura (SANTE, 2017).

Para tanto, avaliou-se os parâmetros seletividade, linearidade a partir de uma curva na matriz trigo fortificada (CMF) e por diluição da matriz branco fortificada (CDFM), precisão, exatidão, LOQ e LOD para paraquate, diquate, mepiquate e clormequate em três níveis de fortificação (20, 40 e 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$) com 6 réplicas em cada nível.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE CEVADA E TRIGO

O método proposto foi utilizado para a análise de 10 amostras de cevada e 10 amostras de trigo. As amostras de cevada foram obtidas em lojas de produtos naturais de Santa Maria-RS e as amostras de trigo foram oriundas de manejo experimental. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A comparação das concentrações das amostras positivas avaliadas na curva analítica preparada na matriz branco fortificada (CMF) e da curva diluída na matriz branco fortificada (CDFM) foi realizada estatisticamente através do Teste *t de Student* e da análise de variância (teste F) utilizando o Microsoft Office® Excel 2016.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

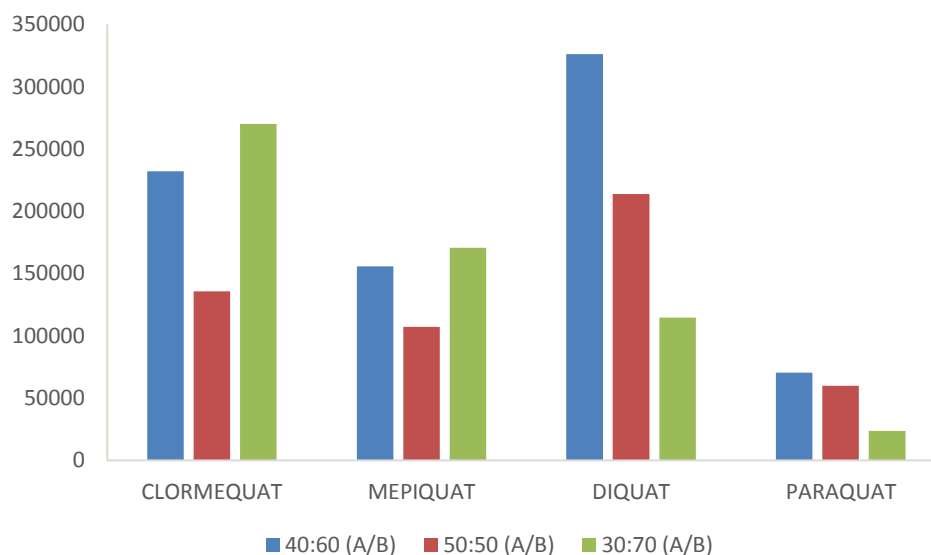
Para a separação dos compostos escolheu-se a coluna HILIC, uma vez que é normalmente empregada para reter compostos altamente polares sem a necessidade de adição de reagentes de pareamento iônico (JANDERA, 2011; SILVA, BOTOLLI & COLLINS, 2016). Contudo, para garantir a reprodutibilidade da resposta cromatográfica foi necessário um condicionamento da coluna com fase móvel (equilíbrio) por um período de no mínimo 3 h antes do início das injeções. Além disso, entre cada injeção tomou-se o cuidado para reestabelecer este equilíbrio, deixando-se passar 30 volumes de coluna, ou seja, 6 mL de fase móvel. De acordo com dados informados pela literatura (RESTEK, 2017) essa etapa é de extrema importância para que se reestabeleça a camada de água na superfície da partícula, responsável pela adsorção dos analitos envolvida no mecanismo de separação.

A avaliação dos modos de eluição (isocrático ou gradiente) foi realizada empregando a fase móvel A= solução aquosa de formiato de amônio 150 mmol L⁻¹ e (pH ~ 3,7) e B= acetonitrila a uma vazão de 0,250 mL min⁻¹ em um tempo de análise de 4 min.

Como pode ser visto na Figura 12, após alterações nas proporções dos constituintes A e B da fase móvel (modo isocrático), os analitos diquate e paraquate apresentaram áreas de pico maiores quando utilizada a proporção de 40:60 (A/B, v/v). Por outro lado, para os compostos clormequate e mepiquate observaram-se áreas maiores com a proporção 30:70 (A/B, v/v). Porém, nesta proporção, a área do diquate diminuiu consideravelmente em relação as demais e o paraquate não apareceu no tempo de corrida de 4 min.

Quando a separação cromatográfica foi realizada empregando a proporção 50:50 (A/B, v/v), esta resultou em picos menores para todos os compostos, quando comparada a proporção 40:60 (A/B, v/v). Além disso, a proporção 40:60 (A/B, v/v) apresentou melhores formatos de picos, principalmente para paraquate e diquate.

Figura 12 – Avaliação da área para os compostos cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate em relação a alterações das proporções de fase móvel (A/B), modo isocrático, sendo A= solução aquosa de formiato de amônio 150 mmol L⁻¹ (pH ~ 3,7) e B= acetonitrila a uma vazão de 0,250 mL min⁻¹.



A separação cromatográfica realizada no modo gradiente, quando comparada com o modo isocrático, apresentou picos cromatográficos com formato irregular, pouco eficientes e com baixa resolução. Por isso, não foi escolhida nesta pesquisa.

Assim, a proporção selecionada para a sequência de análises foi de 40% de fase móvel A e 60% de fase móvel B (v/v) pois apresentou resultados satisfatórios para os quatro analitos tanto em área quanto em resolução dos picos. Além disso, a utilização de taxas maiores de solventes orgânicos favorece a ionização dos analitos no espectrômetro de massas (GOSETTI et al., 2010; NUIJS, TARCOMNICU & COVACI, 2011).

As informações sobre tempo de retenção e dos parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS (energia de colisão, voltagem do cone e transições monitoradas no modo SRM) para cada composto estão descritas na Tabela 9. As transições SRM avaliadas para cada composto proporcionaram a escolha de duas transições, das quais a transição mais intensa foi utilizada para quantificação e a segunda mais intensa para a identificação.

Tabela 9 - Configurações utilizadas para quantificação e identificação de cada composto.

Composto	t _R (min)	Transição quantificação (m/z)	Transição Identificação (m/z)	Voltagem do cone (V)
Clormequate	1,39	122 > 58 (23)	122 > 63 (21)	30
Mepiquate	1,57	114 > 98 (26)	114 > 58 (27)	30
Diquate	2,45	183 > 157 (25)	183 > 130 (30)	50
Paraquate	2,56	185 > 170 (22)	171 > 155 (31)	38/45
Trifenilfosfato (PI)	1,03	327 > 215 (28)	327 > 152 (37)	40

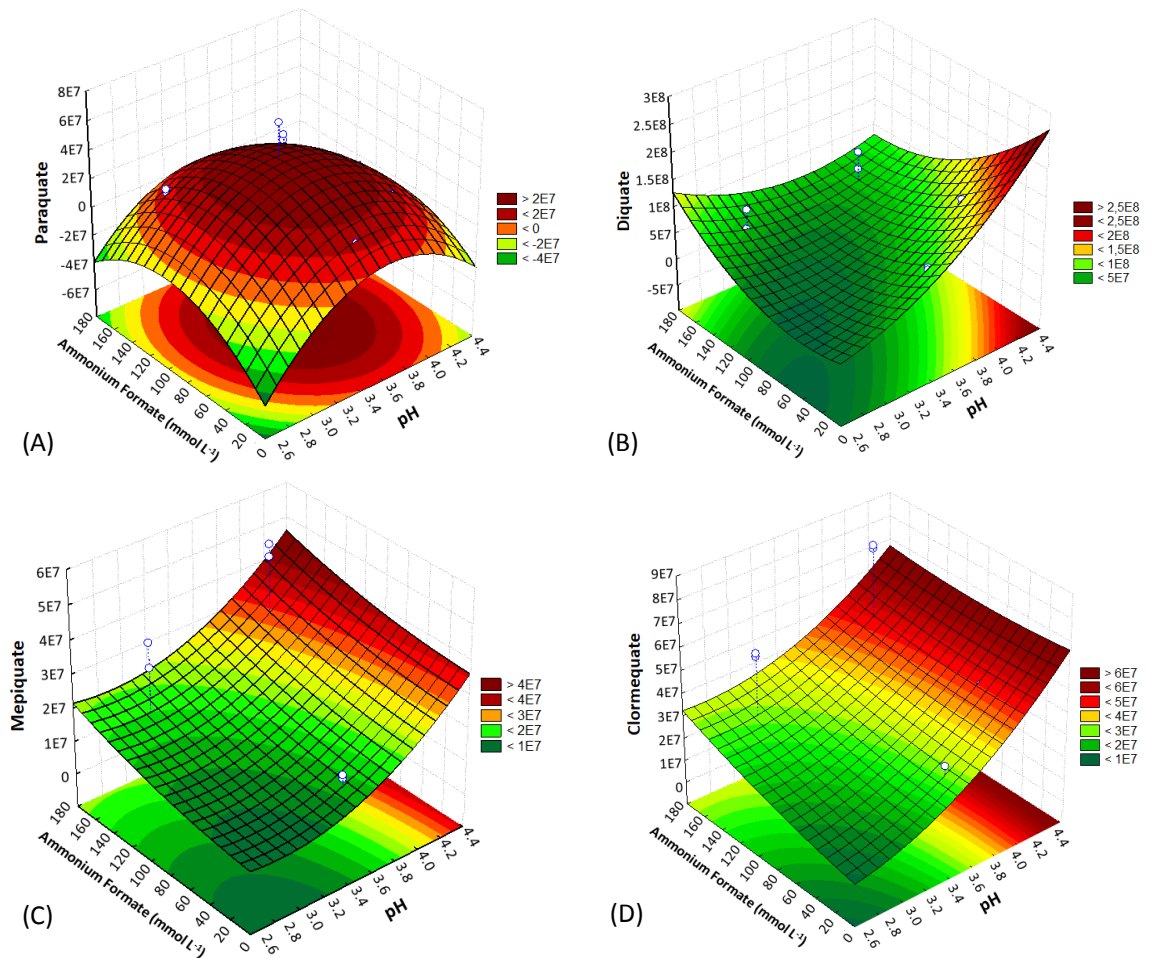
Energia de colisão (eV) é apresentada entre parênteses. PI = Padrão Interno

Como pode ser observado na Tabela 8, para o paraquate o íon mais abundante refere-se ao m/z 185, que de acordo com a literatura corresponde à molécula desprotonada $[M^{2+}-H]^+$. A m/z 170 corresponde a perda de uma molécula de CH₃ (ARAMENDIA et al., 2006; KOLBERG et al., 2012). Os íons mais abundantes para o diquate são os que apresentam m/z 183, que corresponde a perda de um próton $[M^{2+}-H]^+$ e o íon m/z 157 que corresponde ao íon com a perda de HCN (KOLBERG et al., 2012). Para o clormequate, o íon mais abundante apresentou m/z 122, correspondente ao íon molecular $[M^+]$, seguido dos íons de m/z 58 e 63, que correspondem a $[M-(CH_2)_2Cl-H]^+$ e $[M-N(CH_3)_3]^+$, respectivamente (ARAMENDIA et al., 2006; ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009; GAO et al., 2015). Os principais íons para o mepiquate são o de m/z 114, correspondente ao íon molecular $[M^+]$, m/z 58 que corresponde ao $[M-CH(CH_2)_2CH_3]^+$ e m/z 98 que corresponde ao $[M-CH_3-H]^+$ (ESPARZA, MOYANO & GALCERAN, 2009; GAO et al., 2015).

4.1.1 Otimização da fase móvel

As superfícies de resposta (Figura 13) geradas a partir do planejamento do composto central tornaram possível uma melhor compreensão sobre a combinação e a influência dos fatores avaliados na resposta cromatográfica dos analitos. Durante a etapa de otimização manteve-se constante as proporções de fase móvel (modo isocrático) na proporção de 40:60 (A/B, v/v).

Figura 13 - Superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental para os compostos (A) paraquate, (B) diquate, (C) mepiquate e (D) clormequate.



Com base nas superfícies de resposta, o componente aquoso da fase móvel para determinação de paraquate deve ter pH na faixa entre 3,3 e 3,8. Além disso, deve apresentar concentração de formiato de amônio entre 60 e 120 mmol L⁻¹. Para o diquate, melhores condições foram obtidas com valores de pHs acima de 4 e baixas concentrações de formiato de amônio (< 40 mmol L⁻¹). Os compostos mepiquate e clormequate apresentaram condições semelhantes, com melhores resultados relacionados a maiores valores de pH e concentração de formiato de amônio independente. Visando contemplar todos os compostos em conjunto, as condições selecionadas para a fase móvel aquosa foram a concentração de 60 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e o pH de 3,7.

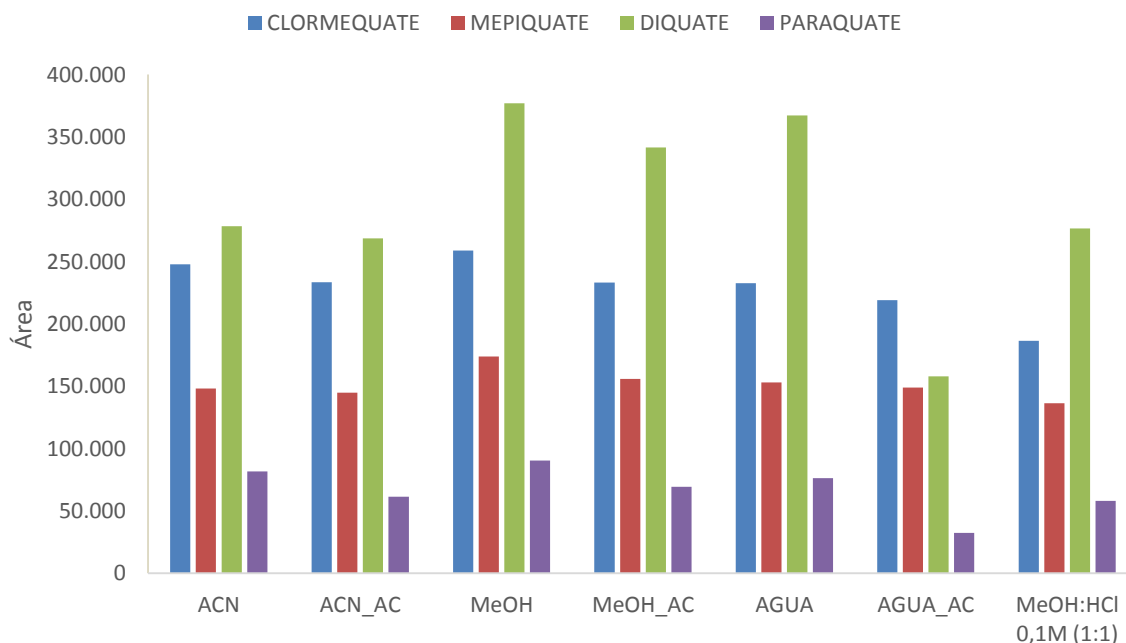
Esparza, Moyano e Galceran (2009) enfatizam a importância do pH da fase móvel para determinação dos compostos clormequate e mepiquate utilizando coluna HILIC e relatam que em pH acima de 4,25 observa-se redução na resolução entre os compostos. Isso ocorre, provavelmente pela interação destes analitos carregados

positivamente com os grupos silanóis desprotonados. Porém, em pH menor que 3,75 apresentam picos cromatográficos mais largos devido a interação com grupos silanóis protonados. Os autores também discutem sobre as diferenças de separação observadas quando soluções tampão compostas de ácido acético/acetato de amônio e ácido fórmico/formiato de amônio são utilizadas. A força iônica do tampão acético/acetato de amônio é mais baixa a um pH 3,75; portanto, o segundo tampão tem preferência para este tipo de análise (ESPARZA, MOYANO E GALCERAN, 2009). Lanças (2010) também indica que a utilização destes aditivos favorece o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, facilitando a análise.

4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS EM DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO

Na Figura 14 observa-se a resposta cromatográfica (área média, $n = 2$) dos analitos a partir da análise de soluções analíticas preparadas em diferentes solventes na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 14 – Média das áreas dos compostos cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate de soluções ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas em diferentes solventes.



Pode-se observar que para o composto clormequate, a diferença em área não foi significativa comparando os diferentes solventes. Porém, utilizando metanol e ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ obteve-se uma resposta em área menor quando comparada aos demais. Para o mepiquate, obteve-se comportamento semelhante em área, não apresentando diferença entre os solventes. No entanto, em relação ao formato dos picos cromatográficos, os solventes acetonitrila e acetonitrila acidificada apresentaram os melhores resultados.

Para o diquate, áreas maiores foram observadas na utilização de metanol, metanol acidificado e água. Este composto apresentou formato de pico cromatográfico similar para a maioria dos solventes avaliados. Por outro lado, uma baixa resolução cromatográfica foi observada com a utilização de água acidificada e metanol:ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (1:1, v/v). O paraquate apresentou resultados similares ao diquate, com exceção da solução preparada em acetonitrila que se destacou em área, ficando estas próximas apenas quando comparadas com metanol.

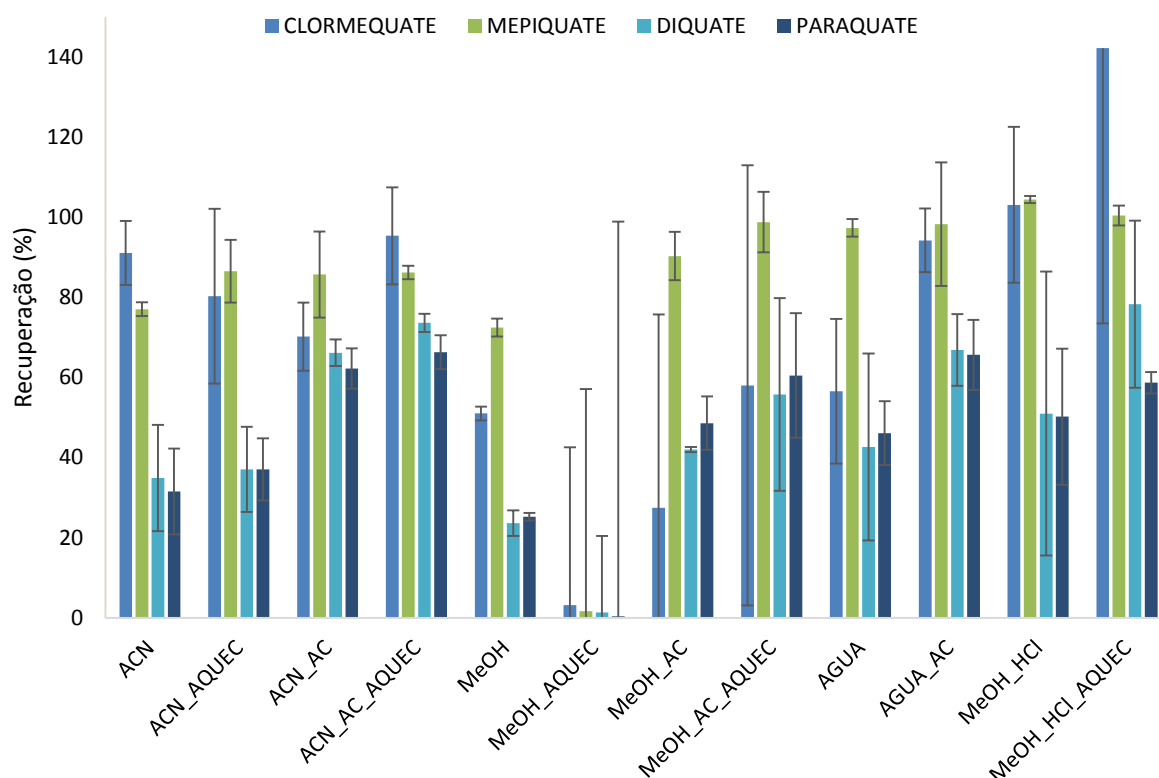
4.3 TESTES DE EXTRAÇÃO DE QUATs EM AMOSTRA DE CEVADA

4.3.1 Testes preliminares

Durante a realização dos testes para avaliação das condições de extração, não foi possível dar continuidade aos procedimentos que utilizam água e água acidificada associados com a etapa de aquecimento. Observou-se a formação de uma suspensão, o que está de acordo com as observações realizadas por Kolberg e colaboradores (2012) que cita que o aquecimento de soluções aquosas provoca a formação de suspensões viscosas.

Para as demais extrações, podem-se observar os resultados de recuperação (%) e RSD (%) obtidos pela média das extrações ($n = 2$) na Figura 15.

Figura 15 - Média das recuperações (%) e respectivos RSD (%) para as extrações utilizando diferentes solventes, com ou sem a etapa de aquecimento.



Os resultados demonstraram que a utilização de metanol como solvente de extração não foi efetiva, pois observaram-se baixos valores de recuperação. Além disso, com a presença da etapa de aquecimento, os resultados apresentaram-se extremamente discrepantes. Portanto, para a etapa de extração, a utilização deste solvente não é viável.

A etapa de aquecimento (80 °C, 15 min) não apresentou uma melhora significativa nos resultados para a maioria dos solventes avaliados. Estes resultados concordam com os relatos de Bauer e colaboradores (2018). Além disso, Danezis e colaboradores (2016) e Nardin e colaboradores (2017) também propuseram metodologias para extração destes analitos sem etapa de aquecimento, obtendo boas recuperações (70-120%, $\leq 20\%$ RSD) para os compostos paraquate e diquate.

A presença de meio ácido (ácido fórmico, 1% v/v) nos solventes de extração água, metanol e acetonitrila, refletiu em uma melhora na resposta cromatográfica para os compostos paraquate e diquate. A acetonitrila acidificada e água acidificada destacaram-se tanto em área quanto em formato de picos cromatográficos. O solvente metanol acidificado também apresentou resultados semelhantes para os dois

compostos. A partir destes resultados confirmou-se a necessidade da acidificação do solvente de extração para melhorar os % de recuperação destes analitos. Resultados semelhantes foram obtidos por Kaczyński (2017) para análise de paraquate, diquate, mepiquate e clormequate em cebola, trigo, batata e pera.

Segundo Pateiro-Moure e colaboradores (2008), a utilização de um solvente de extração mais polar (metanol) na presença de ácido volátil como o fórmico, pode ser uma boa alternativa para a extração de QUATs. Estes autores relatam que a utilização de ácidos concentrados é justificada quando o analito é "ligado" a matriz e os herbicidas de interesse são fortemente adsorvidos, como o paraquate em superfícies minerais.

A mistura metanol/ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (1:1 v/v) apresentou valores significativos de áreas, porém, o formato dos picos cromatográficos não era simétrico e por esse motivo não foi considerado como alternativa para a sequência desta pesquisa.

Neste sentido, acetonitrila, água e metanol foram considerados solventes potenciais com a necessidade de acidificação e sem a etapa de aquecimento.

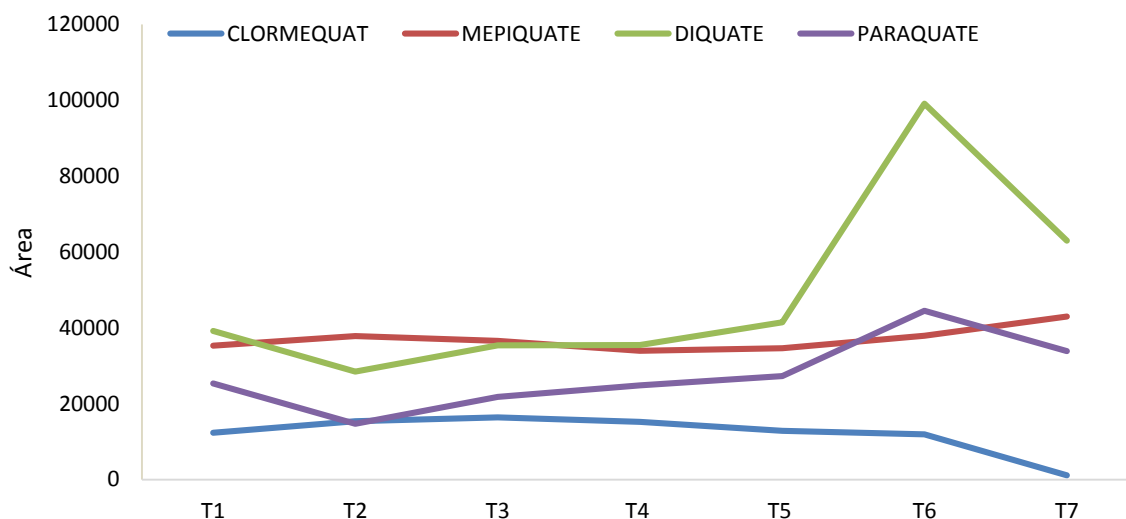
4.3.2 Testes de extração utilizando *slurry*

Os testes de extração realizados até o item anterior (4.3.1) avaliaram a etapa de fortificação na amostra seca, ou seja, em 5 gramas de cevada, conforme descrito no método oficial QuPPE (ANASTASSIADES et al., 2017). Afim de melhorar a eficiência do método de extração avaliou-se a utilização de um *slurry* (mistura da amostra com água). A adição de água na etapa anterior à extração em amostras de cereais é justificada pelo baixo teor de umidade (<80%). Assim, a adição de água tem como objetivo melhorar a capacidade de extração dos compostos, hidratando as partículas e facilitando o acesso do solvente de extração aos agrotóxicos a serem analisados (DORS et al., 2011), além de melhorar a homogeneidade da amostra (ZANELLA et al., 2015a).

Após a avaliação do aspecto visual, constatou-se que a proporção 1:1,5 (m/v) de matriz/água foi a mais apropriada. A proporção 1:1 (m/v) apresentou-se muito densa e a proporção 1:2 (m/v) muito diluída. Resultados semelhantes foram obtidos por Pizzutti e colaboradores (2016) na avaliação de *slurry* para a matriz feijão de corda.

Diante destes resultados, a comparação das extrações foi realizada utilizando 5 gramas de amostra seca e 10 gramas de *slurry* (1:1,5, m/v). Os resultados em área, para cada composto, podem ser observados na Figura 16.

Figura 16 - Resultados em área para os compostos em estudo (amostra branco fortificada em $250 \mu\text{g kg}^{-1}$) na extração com diferentes solventes utilizando 10 gramas de *slurry* (1:1,5 m/v) ou 5 gramas de amostra.



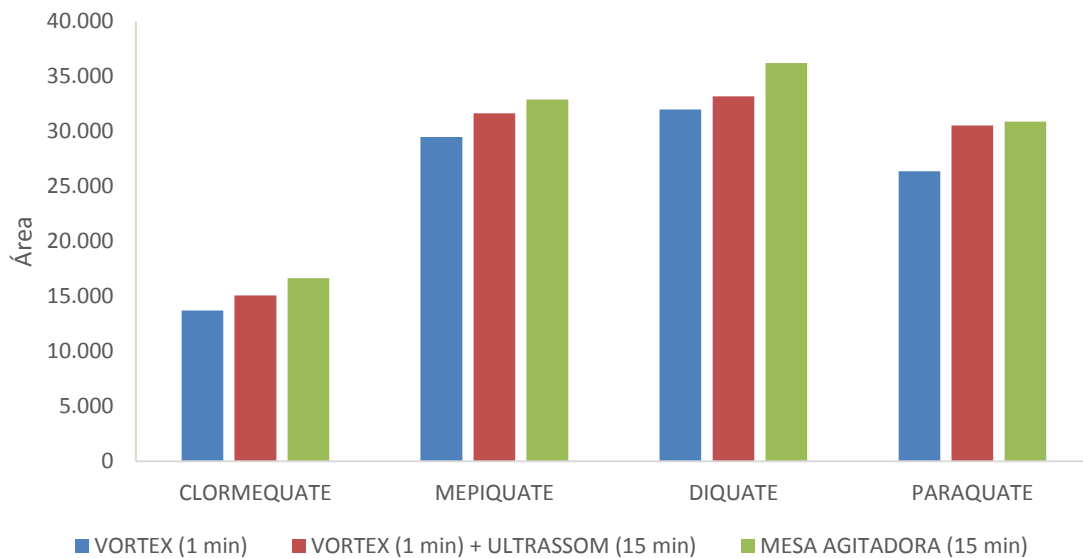
Os resultados demonstram que usando *slurry* (testes T1 a T5) os resultados são mais reprodutíveis que os testes T6 e T7. Nos testes T1 a T5 é possível avaliar a influência das etapas de extração e limpeza empregando acetonitrila. As áreas dos picos cromatográficos foram semelhantes para todos os testes realizados, exceto para T2 que apresentou áreas menores para os compostos diquate e paraquate. Este resultado demonstra que o uso de solventes acidificados é indicado apenas na etapa de extração. Quando avaliado o formato dos picos cromatográficos, os testes T4 e T5 apresentaram os melhores resultados, indicando que a acetonitrila empregada na etapa de limpeza proporciona estes resultados.

Neste sentido, a mistura de solventes de extração composta de 5 mL de água e 5 mL de metanol acidificado com 1% (v/v) de ácido fórmico foi escolhida. A discussão sobre a adição de acetonitrila na etapa de limpeza está apresentada no item 4.4.3.

4.3.2.1 Avaliação do modo de contato (amostra + solvente de extração) e tempos de extração

A Figura 17 apresenta os resultados das áreas obtidas na etapa de extração submetida a diferentes modos de contato entre o solvente de extração e a amostra branco fortificada ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Figura 17 - Média das áreas obtidas nos diferentes procedimentos de contato da amostra fortificada com o solvente de extração.



Como demonstrado na Figura 17 existe uma pequena diferença em área quando se utiliza um maior tempo na extração (vortex + ultrassom ou mesa agitadora). As diferenças em áreas considerando 1 minuto de agitação em vortex e 15 minutos em mesa agitadora foram de 10, 11, 14 e 17% para o mepiquate, diquate, paraquate e clormequate, respectivamente. Porém, como as diferenças foram menores que 20% optou-se por continuar os testes com o uso de agitação em vortex (1 min), sendo um procedimento mais rápido e simples. Danezis e colaboradores (2016) realizaram a extração dos mesmos compostos avaliados neste estudo, para diferentes amostras, utilizando metanol acidificado (1% v/v ácido fórmico) e agitação manual por 2 min com resultados de recuperações satisfatórias (entre 70 e 120%).

A eficiência de extração referente ao tempo e modo de extração selecionado no método proposto é confirmada quando avaliada em termos de recuperação dos analitos, os quais serão discutidos mais adiante nesta pesquisa.

4.4 ETAPA DE LIMPEZA

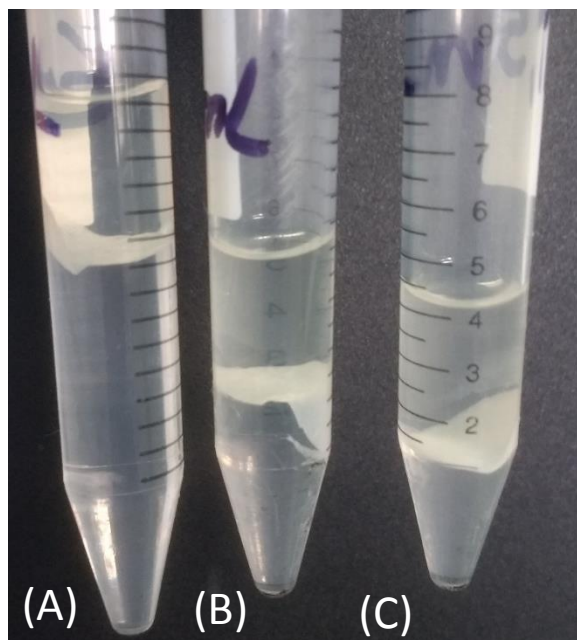
A etapa de limpeza é de extrema importância e representa a alternativa mais recomendada para reduzir o efeito matriz e causar menos danos ao sistema cromatográfico. Estas vantagens se sobressaem sobre a necessidade de aumento do número de etapas do processo analítico (PINHO et al., 2009). Neste sentido, seguem os resultados obtidos nas diferentes etapas de limpeza propostas.

4.4.1 Partição com solvente orgânico

O diclorometano foi utilizado nesta etapa em função de sua baixa polaridade, com possibilidade de partição com a fase aquosa e consequente eliminação de compostos orgânicos de baixa polaridade por meio do descarte da fase orgânica (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; BARTH et al., 2015).

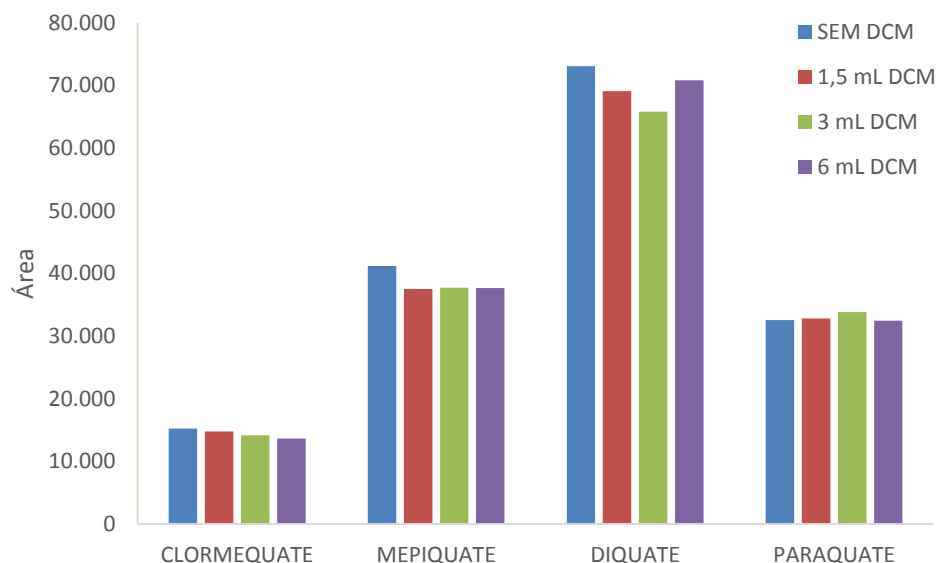
A partir do aspecto visual de cada teste empregando diferentes volumes de diclorometano (1,5; 3 e 6 mL) pode-se concluir que a quantidade de diclorometano não afeta significativamente a quantidade de coextrativos de baixa polaridade removidos. A Figura 18 mostra que basicamente a mesma quantidade de coextrativos foi removida nos três testes, portanto, a utilização de 1,5 mL de diclorometano foi considerada suficiente para remoção dos interferentes.

Figura 18 - Partição dos extratos com diferentes proporções de diclorometano: (A) 6 mL, (B) 3 mL e (C) e 1,5 mL.



Na Figura 19, pode-se observar a comparação da média das áreas ($n = 2$) obtidas através da fortificação na amostra branco na concentração de $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ de uma extração sem a etapa de partição com diclorometano e com a etapa de partição utilizando diferentes quantidades de diclorometano (1,5; 3 e 6 mL).

Figura 19 - Média das áreas obtidas sem a etapa de partição com diclorometano, utilizando 1,5; 3 ou 6 mL de diclorometano.



A partir destes resultados conclui-se que houve pequena diferença entre as áreas dos compostos no teste que não foi submetido a etapa de partição com diclorometano e nos testes que foram submetidos a esta etapa com diferentes quantidades do solvente orgânico. O composto que apresentou maior diferença entre as áreas foi o diquate, com um aumento de 10% considerando o ensaio utilizando 3 mL de diclorometano e sem a utilização do solvente. No entanto, esta diferença não foi considerada significativa em função da importância desta etapa na limpeza dos extratos, avaliada visualmente.

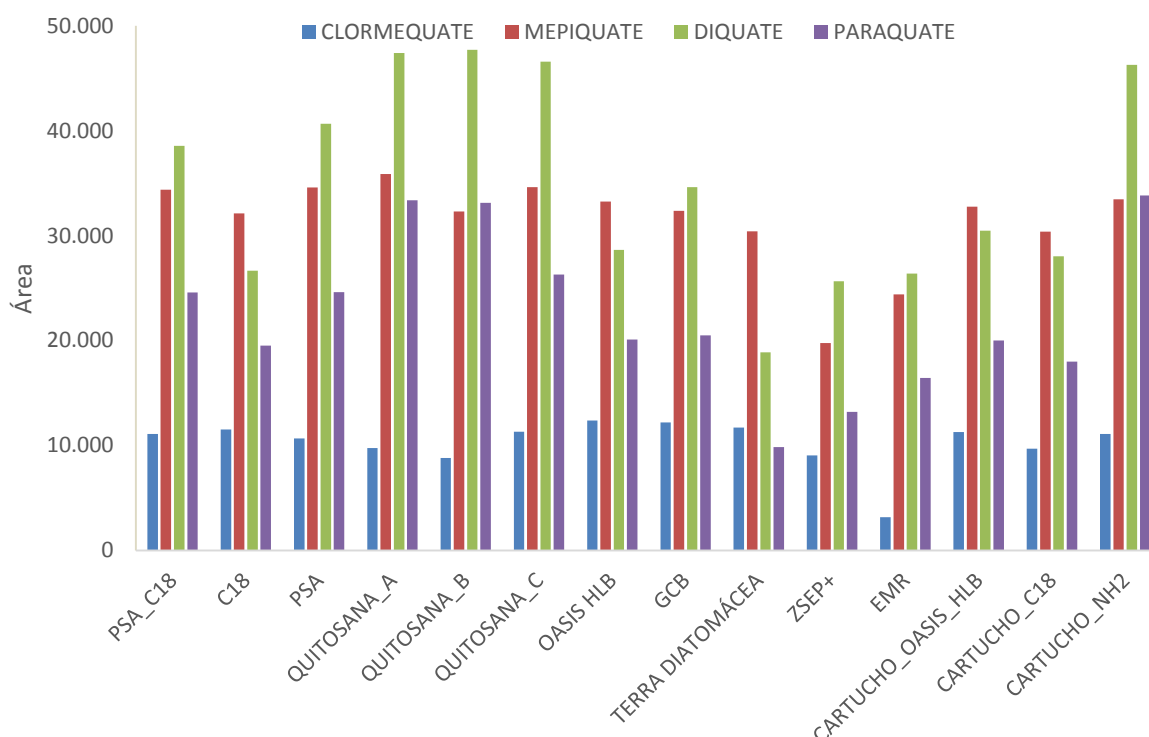
Este solvente também foi utilizado na etapa de limpeza para remoção de interferentes apolares durante a determinação de agrotóxicos em outras matrizes (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

Diante do exposto, a etapa de partição com diclorometano foi adicionada ao método proposto, utilizando 1,5 mL de diclorometano e 3 mL de extrato da amostra.

4.4.2 Sorventes

Na etapa de limpeza com o uso de sorventes, os resultados das médias das áreas ($n = 2$) obtidas através da fortificação em $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cada um dos compostos, na utilização dos sorventes testados podem ser verificados na Figura 20.

Figura 20 - Média das áreas obtidas para cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate utilizando diferentes sorventes na etapa de limpeza dos extratos.



Como pode ser visto na Figura 20, utilizando d-SPE, os sorventes terra diatomácea, Z-Sep+ e EMR apresentaram áreas menores para a maioria dos compostos. Os materiais Oasis HLB, GCB e C18 apresentaram resultados semelhantes. O sorvente oasis HLB é eficaz para separação de compostos polares e não polares (WANG, 2012), e neste caso, existe a possibilidade de retenção parcial dos compostos diquate e paraquate.

Resultados semelhantes também foram obtidos na utilização de PSA ou da mistura de PSA e C18, ou seja, a combinação destes sorventes não apresentou um incremento nos resultados.

Comparando os resultados obtidos através do uso de C18 e Oasis HLB (nos modos d-SPE ou SPE), pode-se observar que os resultados para o Oasis HLB foram muito semelhantes. Por outro lado, para C18, o uso de SPE apresentou resultados

ligeiramente inferiores. Isso pode ser justificado pela interação mais uniforme de todo o sorvente com a matriz através do uso do modo dispersivo (CABRERA et al., 2012).

As melhores áreas de pico para os compostos diquate e paraquate foram observadas ao usar diferentes tipos de quitosana em d-SPE e Bond Elut NH₂ em SPE, seguido pelo uso de PSA em d-SPE. Bons resultados também foram encontrados para o cloromequate e o mepiquate no uso desses mesmos sorventes.

Uma vez que a cevada consiste em 77% de açúcares solúveis, como glicose, frutose, sacarose e maltose (SERNA-SALDIVAR, 2010), o uso do PSA é interessante. Esse sorvente remove açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos (GAO et al., 2015) e seria uma boa alternativa para a limpeza de extratos de cevada. O cartucho Bond Elut NH₂ tem basicamente as mesmas características do PSA em termos de seletividade; no entanto, o PSA tem uma capacidade de retenção muito maior devido à presença da amina secundária (Sigma-Aldrich, 2015).

Melhores resultados foram obtidos com o cartucho Bond Elut NH₂ quando comparado com o PSA. Isto pode ser justificado pela grande diferença de massa desse sorvente entre o d-SPE e o cartucho, uma vez que foram utilizados apenas 50 mg de PSA em d-SPE e um cartucho contendo 500 mg de amina, isto é, uma quantidade 10x maior. Além disso, o cartucho Bond Elut NH₂ quando comparado a etapa de d-SPE tem como desvantagens interação menos uniforme de todo o sorvente com a matriz e principalmente o alto custo, entre outros (CABRERA et al., 2012).

A quitosana também possui caráter básico, atribuído principalmente à presença do grupamento amina nas unidades repetidas deste polímero (CANELLA & GARCIA, 2001) que permite interações por pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas por protonação deste grupamento em meio ácido (ARIAS et al., 2018). As propriedades de adsorção da quitosana dependem da origem do polissacarídeo, da massa molecular, da porcentagem de desacetilação e da quantidade de grupamentos amino, entre outros (CRINI, 2005).

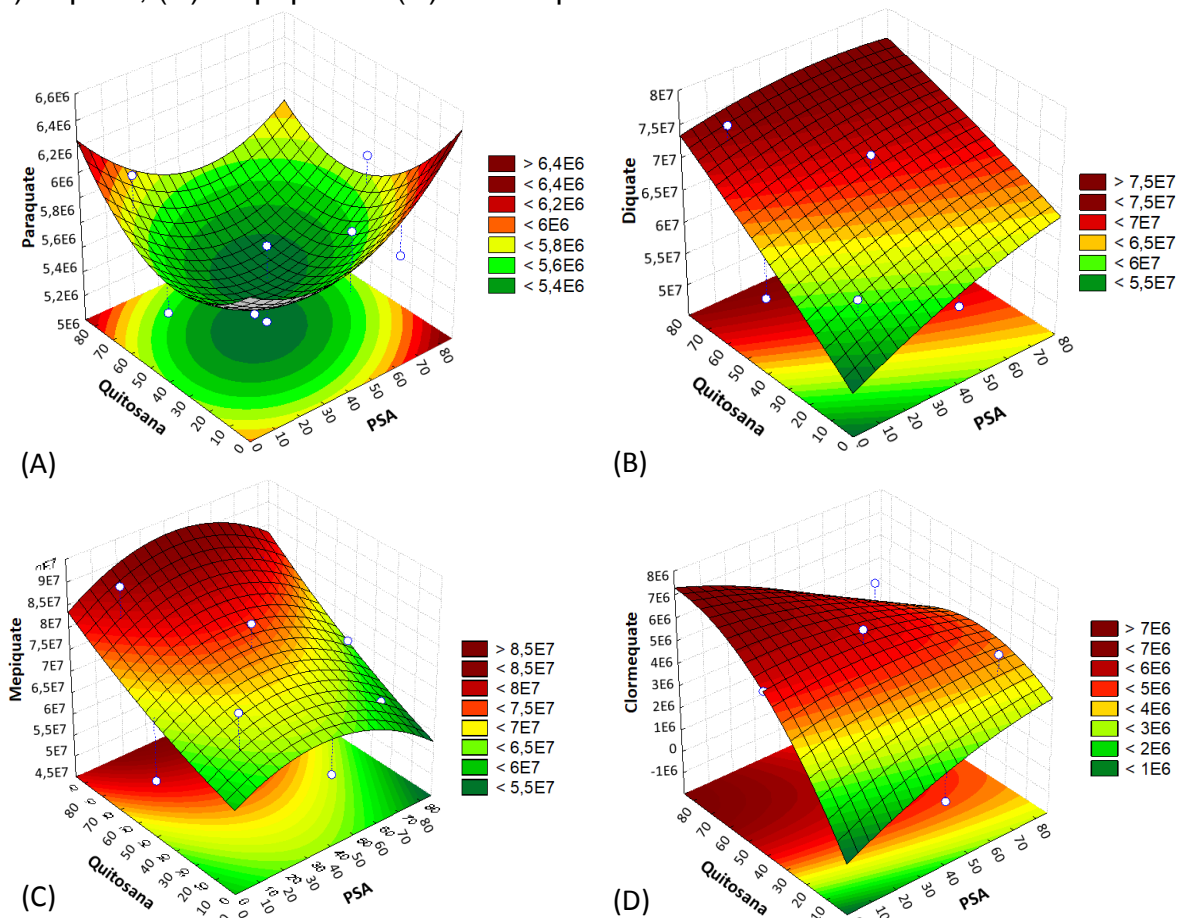
Entre as principais diferenças das três amostras de quitosana testadas está o grau de desacetilação, apresentados como 86, 83 e > 90% para a quitosana A, B e C, respectivamente. Nesta pesquisa, não foi possível estabelecer uma relação entre o grau de desacetilação e as áreas obtidas para os analitos em estudo. Assim, PSA e quitosana A, com 86% de desacetilação, foram selecionados para a etapa de limpeza otimizada.

4.4.2.1 Otimização do sorvente

De acordo com as superfícies de resposta obtidas experimentalmente a partir do planejamento experimental proposto foi possível verificar a influência dos sorventes PSA e quitosana na etapa de limpeza em relação às áreas cromatográficas.

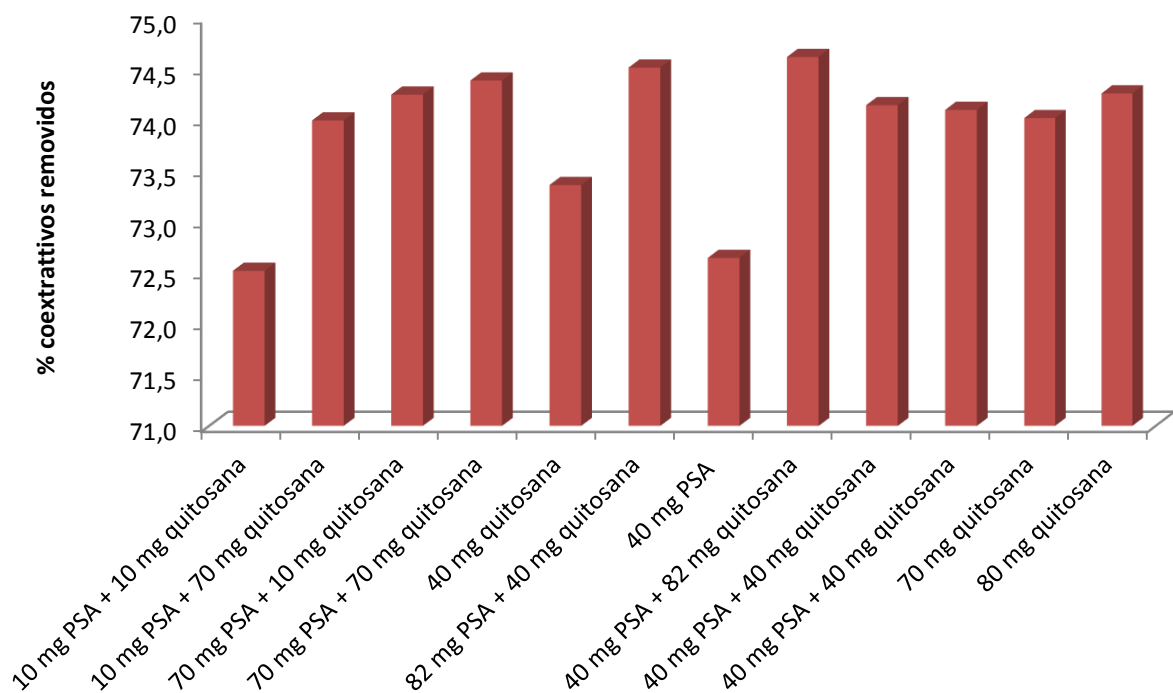
Como pode ser visto na Figura 21, resultados satisfatórios (maiores áreas) foram obtidos utilizando misturas de quitosana e PSA para diquate, mepiquate e clormequate ou utilizando apenas quitosana como sorvente para todos os analitos. Para clormequate, melhores resultados foram obtidos utilizando em torno de 30 mg de quitosana, para diquate 50 mg e para mepiquate 70 mg. Por outro lado, para o paraquate, melhores resultados foram obtidos utilizando 70 mg de quitosana ou 70 mg de PSA.

Figura 21 - Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para otimização da etapa de limpeza dos extratos com PSA e quitosana para (A) paraquate, (B) diquate, (C) mepiquate e (D) clormequate.



Considerando os resultados obtidos nos testes gravimétricos (Figura 22) pode-se observar que utilizando 70 mg de quitosana foram removidos 74% dos coextrativos presentes no extrato. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou combinações de quantidades de PSA e quitosana. Entretanto, pelos bons resultados obtidos pelo planejamento de composto central aliados ao menor custo da quitosana em comparação ao PSA, escolheu-se o emprego de 70 mg de quitosana. Além disso, este sorvente também é interessante, pois é produzido a partir de polímeros naturais, abundantes e biodegradáveis; possui baixo custo e características biossorbentes que tornam o método mais barato e mais ecológico quando comparado a outros sorventes como PSA (ARIAS et al., 2014, ARIAS et al., 2018).

Figura 22 - Porcentagem de coextrativos removidos em cada combinação de PSA e quitosana proposta no planejamento experimental.



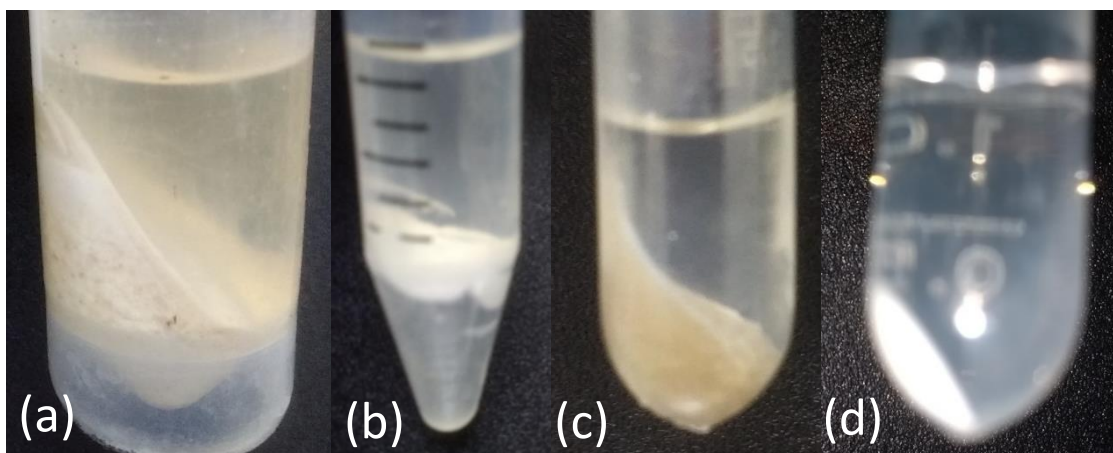
Outras pesquisas também relatam o uso de quitosana para d-SPE. Arias e colaboradores (2014) e Cabrera e colaboradores (2016) utilizaram quitosana na etapa de d-SPE para limpeza de extratos de solo e arroz obtidos pelo método QuEChERS. Kaczyński (2017) utilizou quitosana na etapa de limpeza após extração pelo método QuPPE modificado para a determinação de 11 herbicidas altamente polares em diferentes matrizes (trigo, batata, pera e cebola) apresentando recuperações de 73 a 95%.

4.4.3 Diluição em acetonitrila

Nos testes iniciais foi possível observar que quando se emprega acetonitrila como solvente de extração não foram obtidos resultados satisfatórios, quando comparados aos demais solventes. Contudo, quando utilizada na etapa de limpeza bons resultados são obtidos tanto em áreas quanto para o formato dos picos cromatográficos. Isto ocorre, pois o uso de acetonitrila favorece a precipitação de coextrativos, como por exemplo, proteínas (MARTINS et al., 2015) e consequentemente uma diluição do extrato reduzindo o efeito matriz (FERRER et al., 2011). Outro benefício da diluição em acetonitrila é que o extrato final se assemelha à proporção da fase móvel utilizada no sistema UHPLC-MS/MS, que corresponde a 40% da fase aquosa e 60% da fase orgânica, característica importante na utilização da cromatografia de interação hidrofílica (RESTEK, 2017).

Na Figura 23 pode ser visualizada a remoção de coextrativos remanescentes em cada etapa de limpeza, demonstrando de forma visual a importância de cada uma das etapas escolhidas.

Figura 23 - Extrato de cevada após centrifugação do 10 g de *slurry* e 10 mL de solvente de extração (a); após centrifugação com diclorometano (b); após centrifugação com 70 mg quitosana (c) e após centrifugação da diluição em acetonitrila 1:1 (v/v) (d).



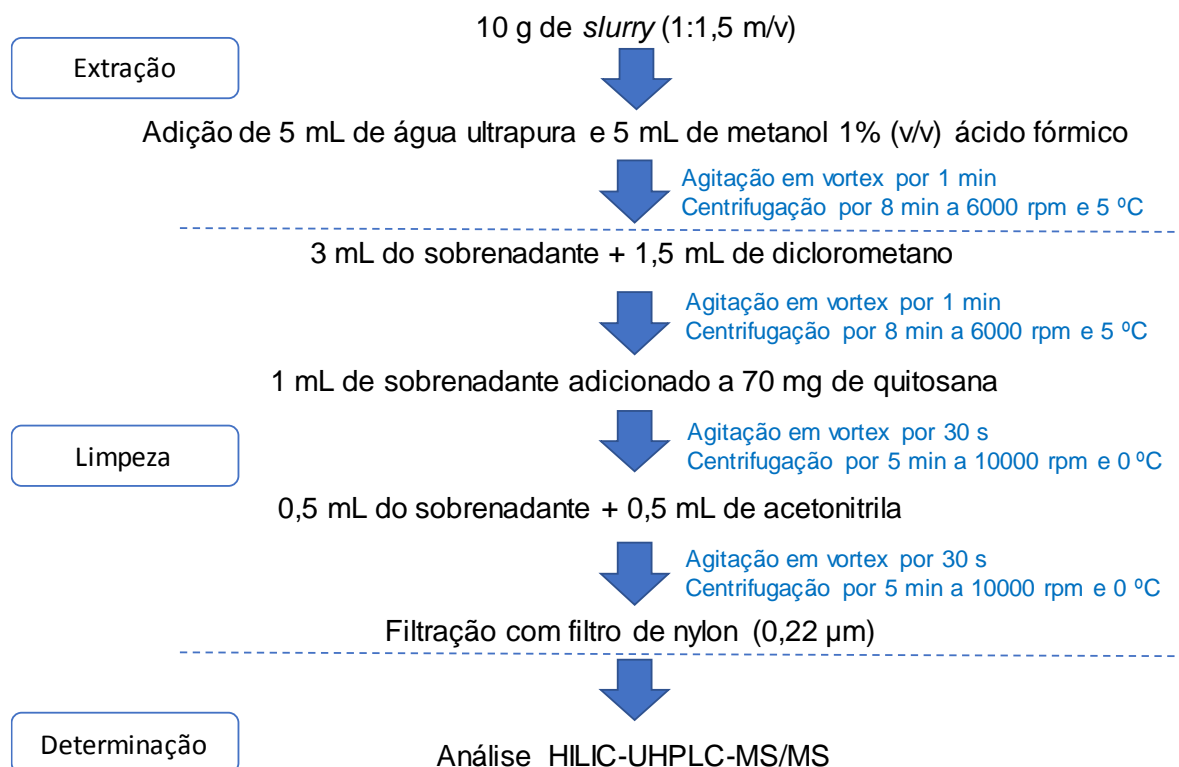
Em relação aos dois filtros testados, observou-se uma diminuição nas áreas cromatográficas dos analitos quando se utilizou os filtros de PTFE hidrofílico e, portanto, filtros de nylon foram utilizados em todas as etapas. Pizzutti e colaboradores (2016) avaliaram o efeito das recuperações de diquate e paraquate em relação ao uso ou não de uma etapa de filtração anterior a análise no sistema UHPLC-MS/MS. Como

resultados, não encontraram diferenças significativas para o diquate. Por outro lado, para o paraquate encontraram resultados inconsistentes. No entanto, os autores não citam qual o material do filtro utilizado, apenas a porosidade de 0,45 μm (PIZZUTTI et al., 2016).

4.5 MÉTODO OTIMIZADO

O método final proposto nesta pesquisa para a determinação de paraquate, diquate, mepiquate e clormequate em amostras de cevada apresenta-se resumidamente no fluxograma da Figura 24. Neste, 10 gramas de *slurry* e 10 mL do solvente de extração (água/metanol 1% (v/v) ácido fórmico (1:1, v/v) foram agitados durante 1 min em vortex e depois centrifugados durante 8 minutos a 6000 rpm e 5 °C. Após, 3 mL do sobrenadante foram misturados com 1,5 mL de diclorometano, agitados durante 1 min e centrifugados a 6000 rpm por 8 min a 5 °C. Em seguida, 1 mL deste sobrenadante foi adicionado ao tubo de Eppendorf contendo 70 mg de quitosana, agitado por 30 s e centrifugado a 10000 rpm durante 5 min. a 0 °C. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do sobrenadante a 0,5 mL de acetonitrila, agitou-se durante 30 s, centrifugou-se a 10000 rpm durante 5 min a 0 °C, realizou-se a filtração com filtro de nylon (0,22 μm) e posterior análise cromatográfica.

Figura 24 - Método de extração otimizado para determinação de agrotóxicos de amônio quaternário em cevada.



4.6 AVALIAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE MISTURA

Na avaliação das soluções padrão contendo a mistura dos analitos preparadas em diferentes solventes, datas e frascos, obteve-se os resultados apresentados na Figura 25.

A partir da avaliação das soluções padrão pode-se observar que para mepiquate e paraquate houve pequena diferença em área (<20%) para as diferentes condições de preparo empregadas.

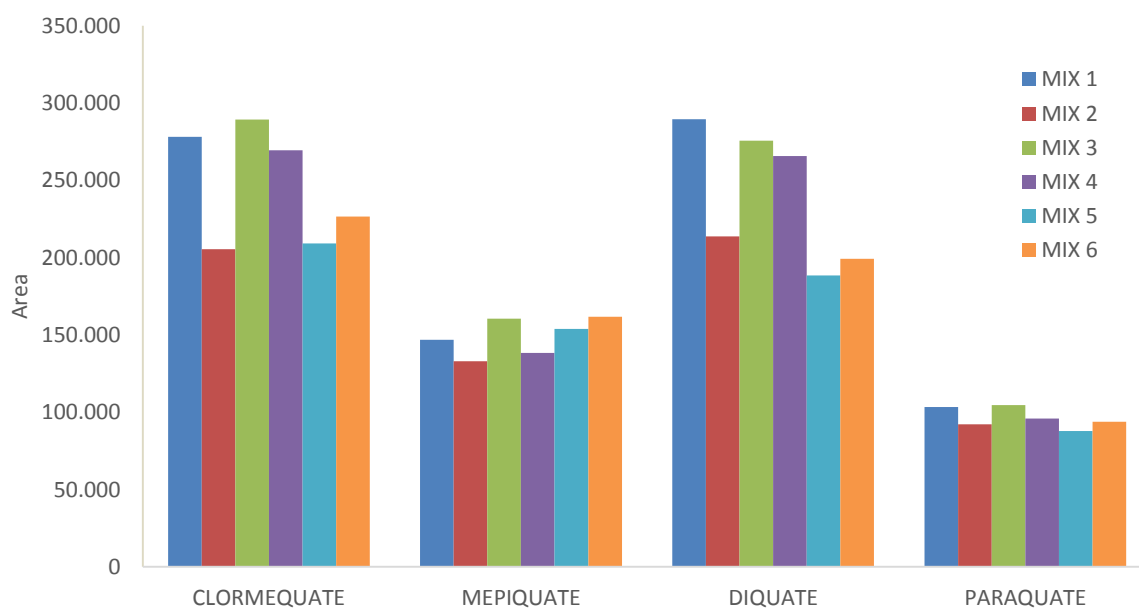
No entanto, quando foram avaliados os compostos clormequate e diquate observou-se maiores áreas (com diferenças em torno de 30%) para as soluções preparadas em água e mantidas em frascos de polipropileno (MIX 1, 3 e 4). Em relação ao MIX 6, preparado em água e armazenado em frasco de vidro âmbar, observou-se resultado semelhante com o apresentado para metanol, ou seja, área um pouco menor para estes dois compostos.

Com base nestes resultados, conclui-se que a durabilidade das soluções de trabalho, se armazenadas sob refrigeração, independente se preparadas em metanol

ou água ultrapura como solvente, pode ser superior a um ano pois, as áreas obtidas através de soluções preparadas no mesmo solvente (MIX 1,3,4 em água ultrapura e MIX 2 e 5 em metanol) em diferentes datas foram semelhantes.

Além disso, observou-se pequena interação do diquate e nenhuma interação do composto paraquate com a superfície do vidro após armazenamento por três anos, adversamente ao que descreve a literatura (ANASTASSIADES et al., 2017), que cita que estes compostos possuem elevada capacidade de formação de complexos de coordenação com íons metálicos (HAO et al., 2013). Porém, novos estudos devem ser realizados de forma mais minuciosa para confirmação deste fato.

Figura 25 - Média das áreas das soluções padrão obtidas para cloromequate, mepiquate, diquate e paraquate ($50 \mu\text{L}^{-1}$) oriundos de diferentes soluções analíticas de trabalho.



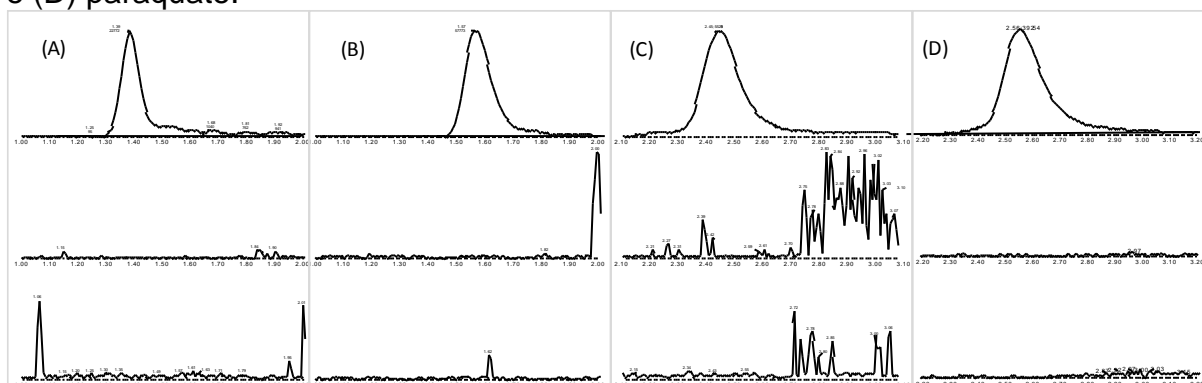
Diante do exposto, adotou-se o uso de água como solvente no preparo das soluções de trabalho, a partir de soluções padrão também preparadas em água. Optou-se também por continuar o uso de frascos de polipropileno para garantir que isso não afetaria os resultados em nenhuma etapa da análise.

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.7.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada através da comparação dos cromatogramas de uma amostra branco de cevada, um branco reagente e uma amostra branco fortificada em $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Conforme pode ser visualizado na Figura 26, não existem interferentes no mesmo tempo de retenção e não há presença de sinal cromatográfico nas transições monitoradas para os analitos paraquate, diquate, clormequate e mepiquate. Portanto, pode-se dizer que o método é seletivo para os analitos em estudo.

Figura 26 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra branco de cevada fortificada na concentração de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, uma amostra branco de cevada e o branco reagente, respectivamente, para (A) clormequate, (B) mepiquate, (C) diquate e (D) paraquate.



4.7.2 Efeito matriz

Os efeitos de matriz são uma grande preocupação na análise de compostos a níveis de traços em alimentos pois podem comprometer gravemente os resultados e a reprodutibilidade do método (FERRER et al., 2011). Neste caso, o efeito matriz obtido foi de -92, -70, -84 e -58% para clormequate, mepiquate, diquate e paraquate, respectivamente; observando-se efeito matriz negativo forte (menor que -50%) para todos os compostos (FERRER et al., 2011).

Estas condições de efeito matriz negativo confirmam as considerações descritas na literatura, em que analitos mais polares são mais suscetíveis a sofrer supressão de íons. Isto pode ser ocasionado pela presença de compostos voláteis na

matriz com capacidade de alteração na eficiência de formação de gotículas do analito e/ou a quantidade de íons do analito na forma gasosa que chegam até o detector (GOSETTI et al., 2010). Outros estudos têm demonstrado altas interferências negativas da matriz na análise destes compostos em diferentes amostras (PIZZUTTI et al., 2016; BAUER et al., 2018).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para compensar o efeito de matriz quando não se pode eliminá-la; dentre estas se têm a extração de curvas de calibração, adição de padrão utilizando isótopos estáveis, padrões internos, etc (FERRER et al., 2011). Uma alternativa recentemente apresentada visando minimizar estes efeitos e ainda compensar os baixos valores de recuperação em amostras complexas é a utilização de curva de calibração por diluição da matriz branco fortificada (MARTINS et al., 2016).

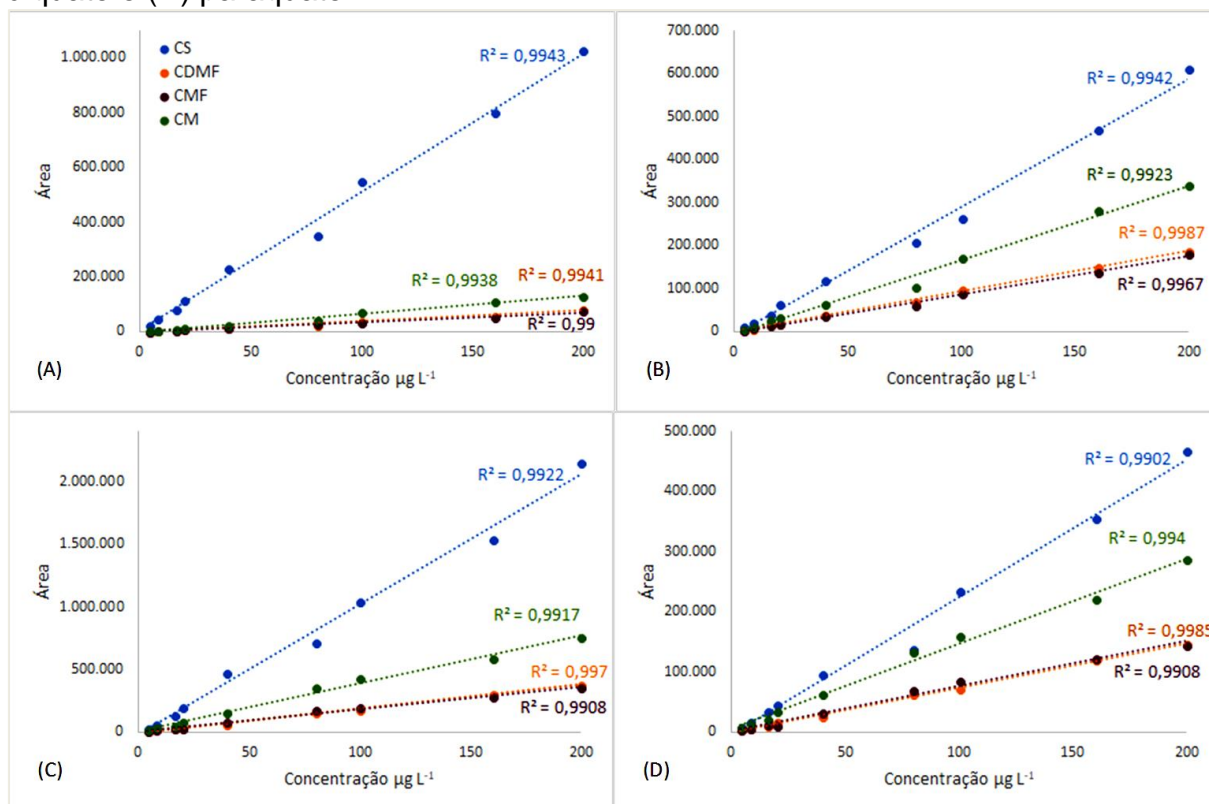
4.7.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada para a curva no solvente, na matriz, na matriz branco fortificada e por diluição da matriz branco fortificada. As curvas para cada composto e os valores de coeficientes de determinação encontrados em cada caso podem ser observados na Figura 27.

Pela análise das curvas analíticas, observa-se boa linearidade das curvas preparadas de diferentes modos, uma vez que apresentam valores de coeficientes de determinação acima de 0,99 para todos os compostos.

Além disso, é possível observar o forte efeito de matriz negativo, discutido anteriormente, pela diminuição significativa das áreas quando comparadas a curva preparada no solvente (CS) e; a similaridade das curvas na matriz branco fortificada (CMF) e por diluição da matriz branco fortificada (CDMF) que praticamente se sobrepõem nos gráficos para os quatro analitos em estudo.

Figura 27 - Curvas analíticas no solvente (CS), na matriz (CM), na matriz branco fortificada (CMF) e por diluição da matriz branco fortificada (CDMF) com respectivos valores de coeficientes de determinação (r^2) para (A) cloromequate, (B) mepiquate, (C) diquate e (D) paraquate.



4.7.4 LOQ e LOD

O limite de quantificação foi considerado como sendo o menor nível de fortificação em que a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis. O limite de detecção foi calculado dividindo-se o valor do LOQ por 3,33. O LOQ e LOD para os compostos diquate e paraquate foram $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $6 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para o composto cloromequate, o valor do LOQ foi de $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD, $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para o mepiquate os valores foram de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ para LOQ e LOD, respectivamente.

Esses valores mostram-se adequados uma vez que compreendem os limites máximos de resíduos aceitáveis pela União Europeia para a matriz cevada, conforme pode ser visualizado na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de limites máximos permitidos para os agrotóxicos em estudo para a matriz cevada e valores de LOQ e LOD obtidos pela metodologia proposta.

	Paraquate	Diquate	Mepiquate	Clormequate
LMR (mg kg ⁻¹)	0,02*	0,02*	4,0*	3,0*
LOQ (mg kg ⁻¹)	0,02	0,02	0,04	0,08
LOD (mg kg ⁻¹)	0,006	0,006	0,012	0,024

*Fonte: EU Pesticide Database.

4.7.5 Exatidão e precisão

Os parâmetros de exatidão e precisão foram avaliados através da análise de diferentes níveis de fortificação em seis repetições, por meio do cálculo de recuperação e desvio padrão relativo. Estes valores foram calculados para as três curvas de trabalho desenvolvidas: na matriz (CM), na matriz branco fortificada (CMF) e por diluição da matriz branco fortificada (CDMF) e os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 - Média das recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos considerando as quatro curvas analíticas preparadas para cevada.

Conc. (µg kg ⁻¹)	Recuperação (RSD) (%)								
	20	40	80	100	200	400	500	800	1000
CDMF									
Clormequate	n.a.	n.a.	100 (10)	103 (3)	95 (8)	98 (8)	95 (8)	99 (8)	97 (8)
Mepiquate	n.a.	101 (3)	97 (4)	97 (6)	98 (1)	96 (4)	97 (3)	96 (3)	95 (4)
Diquate	101 (4)	104 (3)	106 (4)	107 (1)	106 (4)	102 (10)	102 (3)	102 (2)	98 (5)
Paraquate	93 (6)	96 (4)	99 (3)	101 (3)	98 (7)	98 (7)	98 (6)	99 (2)	95 (8)
CMF									
Clormequate	n.a.	n.a.	102 (10)	105 (3)	99 (8)	98 (7)	99 (9)	104 (8)	101 (8)
Mepiquate	n.a.	100 (3)	100 (4)	101 (7)	103 (1)	101 (5)	102 (3)	102 (3)	100 (4)
Diquate	98 (4)	101 (3)	104 (3)	106 (2)	104 (4)	102 (3)	101 (3)	97 (6)	95 (6)
Paraquate	104 (4)	102 (4)	103 (2)	104 (3)	100 (7)	101 (6)	100 (5)	101 (2)	96 (8)
CM									
Clormequate	n.a.	n.a.	59 (10)	61 (2)	58 (8)	59 (8)	58 (9)	60 (8)	58 (8)
Mepiquate	n.a.	57 (3)	56 (4)	56 (6)	56 (1)	55 (4)	56 (3)	55 (3)	55 (4)
Diquate	50 (4)	51 (2)	52 (4)	53 (2)	52 (4)	52 (3)	51 (3)	51 (2)	49 (6)
Paraquate	50 (6)	51 (4)	53 (3)	54 (3)	52 (7)	53 (5)	52 (5)	53 (2)	50 (8)

n.a.= não avaliado, abaixo do LOQ do método.

Pode-se observar que foram obtidas boas recuperações e valores de RSD aceitáveis para os analitos quando as concentrações foram calculadas a partir da CDMF, assim como na CMF (recuperações entre 93 e 107% e RSD entre 1 e 10%).

Porém, quando se utiliza a curva na matriz, os percentuais de recuperação variam entre 49 e 61%. Contudo, os valores de RSD permaneceram abaixo de 20%, demonstrando a estabilidade do sinal analítico.

Na presente pesquisa, propõe-se a possibilidade de extração dos analitos considerando a curva na matriz branco fortificada (CMF) ou por diluição da matriz branco fortificada (CDFM). A primeira é bastante utilizada em métodos analíticos por compensar o efeito matriz e melhorar os valores de recuperação (SANTE, 2017). Porém, a segunda opção também proporciona esses efeitos e ainda diminui a quantidade de amostra utilizada, os custos com reagentes e o tempo de preparo, pois apenas uma amostra fortificada é extraída no maior nível de concentração e posteriormente diluída no extrato da matriz branco (MARTINS et al., 2016).

A precisão intermediária foi avaliada através de ensaios realizados em diferentes dias e utilizando outra amostra branco de cevada. Foram realizados os níveis de fortificação de 20, 40, 80, 100, 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os resultados de RSD demonstraram a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, as recuperações foram avaliadas assegurando também a exatidão do método. Os resultados de recuperação e RSD podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 12 - Recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos nos níveis avaliados para precisão intermediária (matriz cevada).

Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (RSD) (%)					
	20	40	80	100	200	400
CDFM						
Clormequate	n.a.	n.a.	110 (10)	111 (17)	114 (9)	110 (10)
Mepiquate	n.a.	100 (9)	101 (4)	101 (8)	106 (6)	106 (3)
Diquate	111 (11)	115 (9)	111 (4)	109 (11)	108 (7)	105 (11)
Paraquate	103 (11)	113 (6)	110 (9)	102 (15)	109 (4)	109 (7)
CMF						
Clormequate	n.a.	n.a.	99 (10)	100 (17)	104 (9)	101 (10)
Mepiquate	n.a.	95 (9)	99 (4)	99 (9)	104 (6)	105 (3)
Diquate	100 (12)	109 (9)	108 (4)	106 (11)	106 (7)	103 (11)
Paraquate	104 (10)	110 (5)	107 (10)	98 (15)	104 (4)	104 (7)

n.a.= não avaliado, abaixo do LOQ do método.

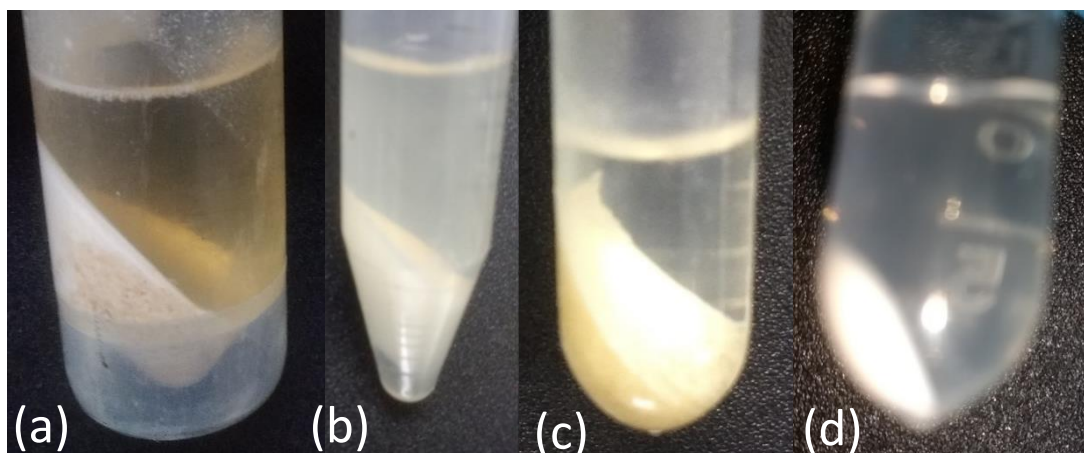
Pode-se observar que bons resultados para precisão intermediária, uma vez que as recuperações ficaram entre 92 e 115% e os valores de RSD entre 3 e 17% para todos os analitos. Diante disso, pode-se afirmar que o método proposto possui resultados satisfatórios de exatidão e precisão, em termos de repetibilidade e precisão

intermediária. Ainda, cabe ressaltar que considerando os valores de recuperações obtidos, pode-se confirmar que 1 min de agitação em vortex, selecionado na etapa de preparo da amostra, é suficiente para que ocorra a transferência dos analitos da matriz cevada para o solvente de extração.

4.8 EXTENSÃO DO ESCOPO DO MÉTODO PARA MATRIZ TRIGO

Em relação ao preparo de amostra utilizando o método proposto na Figura 24 para a cevada foi possível observar bons resultados visuais para trigo conforme mostra a Figura 28, onde se observa um extrato límpido no final das etapas de extração e limpeza.

Figura 28 - Extrato de trigo após centrifugação do 10 g de *slurry* e 10 mL de solvente de extração (a); após centrifugação com diclorometano (b); após centrifugação com 70 mg quitosana (c) e após centrifugação da diluição em acetonitrila 1:1 (v/v) (d).



Além disso, destaca-se a importância da etapa de partição com diclorometano, pela maior remoção de coextrativos uma vez que o trigo pode conter uma quantidade maior de gordura em sua composição (1,8 - 3,8%) quando comparado à cevada (1,8 - 2,6%) (SERNA-SALDIVAR, 2010) além de outros possíveis coextrativos polares.

A seletividade foi confirmada pela comparação dos cromatogramas, os quais não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos e a linearidade foi avaliada para as curvas de calibração na matriz branco fortificada e por diluição da matriz branco fortificada. Os valores de coeficientes de determinação encontrados podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de coeficientes de determinação (r^2) para as CMF e CDMF para trigo considerando os quatro analitos.

	CMF	CDMF
Cloromequate	0,9948	0,9974
Mepiquate	0,9983	0,9901
Diquate	0,9943	0,9949
Paraquate	0,9966	0,9981

A partir do exposto, observa-se boa linearidade das curvas uma vez que apresentam valores de coeficientes de determinação acima de 0,99 para todos os compostos.

Os valores de LOQ e LOD para o trigo foram os mesmos encontrados para a cevada, uma vez que para o LOQ as recuperações e RSD encontradas estão dentro da faixa aceitável. Além disso, esses valores mostram-se adequados uma vez que compreendem os limites máximos de resíduos aceitáveis pela União Europeia para a matriz trigo, conforme pode ser visualizado na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de limites máximos permitidos para os agrotóxicos para a matriz trigo e valores de LOQ e LOD obtidos pela metodologia proposta.

	Paraquate	Diquate	Mepiquate	Cloromequate
LMR (mg kg ⁻¹)	0,02*	0,02*	3,0*	4,0*
LOQ (mg kg ⁻¹)	0,02	0,02	0,04	0,08
LOD (mg kg ⁻¹)	0,006	0,006	0,012	0,024

*Fonte: EU Pesticide Database.

Os valores de recuperação e dos desvios padrões relativos obtidos para os três níveis testados considerando a curva por diluição na matriz branco fortificada (CDMF) podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 - Recuperações e desvios padrões relativos encontrados para os analitos considerando a CDMF para a matriz trigo.

Conc. (µg kg ⁻¹)	Recuperação (RSD) (%)		
	20	40	80
Cloromequate	n.a	n.a.	115 (13)
Mepiquate	n.a.	97 (5)	103 (3)
Diquate	70 (14)	75 (9)	71 (3)
Paraquate	83 (18)	71 (10)	73 (3)

n.a.= não avaliado, abaixo do LOQ do método.

Observa-se boa exatidão e precisão uma vez que os valores de recuperação estão entre 70 e 115% e os valores de RSD abaixo de 18 para os menores níveis de fortificação considerados. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o método proposto para a matriz cevada se mostra eficiente também para a matriz trigo.

4.9 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE QUATs EM AMOSTRAS DE CEVADA E TRIGO

Dentre as 20 amostras analisadas, 10 de cevada e 10 de trigo, em nenhuma delas foi detectada a presença dos analitos diquate, clormequate e mepiquate. Entretanto, quatro amostras de cevada e oito de trigo apresentaram concentrações acima do limite máximo de resíduo (LMR) para paraquate, conforme pode ser visualizado na Tabela 16.

Tabela 16 - Média dos resultados das análises de amostras reais positivas de cevada (C) e trigo (T) em relação ao paraquate para CMF e CDMF e valores estatísticos para avaliação da similaridade entre as análises.

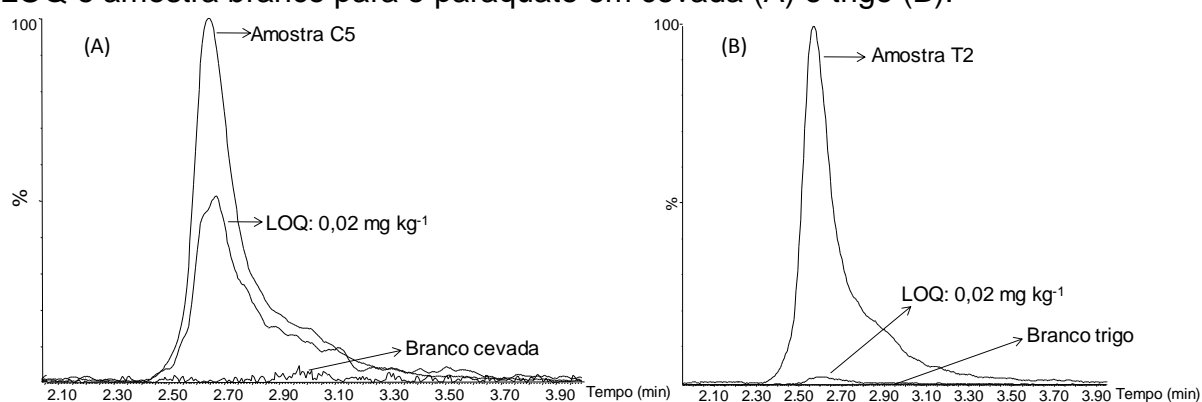
Amostras	Médias das concentrações (mg kg ⁻¹)		Comparação entre variâncias (teste F)	Comparação entre as médias (teste t)
	CMF	CDMF	F calculado (F crítico = 199,47)	t calculado (t crítico = 3,32)
C4	0,053	0,055	39,06	1,98
C5	0,295	0,329	27,23	2,03
C6	0,572	0,637	1,74	2,43
C7	0,257	0,285	1,24	2,45
T1	0,960	0,898	7,08	0,66
T2	0,849	0,725	2,17	3,21
T3	0,849	0,719	1,37	2,76
T4	0,645	0,563	2,69	1,95
T6	0,813	0,696	1,92	2,53
T7	0,794	0,668	1,25	3,12
T8	0,897	0,813	11,42	2,44
T9	0,805	0,679	2,42	2,44

O teste *t* é um teste paramétrico baseado na distribuição normal e pode ser usado quando se tem duas condições experimentais para uma mesma análise, avaliando se existe ou não diferença significativa entre as médias (FIELD, 2009). Como todos os valores de *t* calculados foram menores que o valor de *t* crítico (3,32) para *n*-1 pode-se concluir que não existe diferença significativa entre os valores

encontrados para as amostras positivas para paraquate, utilizando CMF ou CDMF. Além disso, foi feita a avaliação da análise de variância pelo teste F e os resultados demonstram que não há variância significativa entre as médias. Diante disso, novamente confirma-se que qualquer uma das curvas analíticas poderia ser utilizada.

A Figura 29 apresenta os cromatogramas de amostras branco fortificadas na concentração de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, do branco e de amostras (uma de cevada e uma de trigo) para comparação dos picos referentes ao composto paraquate.

Figura 29 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra positiva, LOQ e amostra branco para o paraquate em cevada (A) e trigo (B).



Conforme já mencionado, o paraquate é proibido em diversos países e no Brasil o resultado da reavaliação toxicológica pela ANVISA na RDC Nº 177, de 21 de setembro de 2017 proíbe a produção, importação, comercialização e a utilização de produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo paraquate a contar três anos a partir desta publicação. Além de outros aspectos, a resolução proíbe também o uso do paraquate como dessecante a partir de sua publicação, ou seja, setembro de 2017 (ANVISA, 2017b).

Em virtude das altas concentrações de paraquate encontradas nas amostras torna-se oportuna uma maior discussão sobre esta resolução, a qual define que as receitas agrônomicas que indicam o uso deste ingrediente ativo devem anexar um termo de conhecimento de risco e responsabilidade contendo as seguintes informações:

- Um pequeno gole de paraquate pode matar
- O paraquate pode ser absorvido pela pele
- O paraquate pode causar doença de Parkinson
- O paraquate pode causar mutações genéticas.

Este termo também deve especificar a data de proibição (22 de setembro de 2020) e as seguintes recomendações:

- Evite ao máximo o contato com o produto
- Utilize todos os equipamentos de proteção individual (EPI) recomendados para o manuseio e aplicação do produto
- Utilize o produto apenas nas culturas e formas de aplicação autorizadas (ANVISA, 2017b).

Diante do exposto, mais uma vez ficam claros os problemas relacionados ao uso deste ingrediente ativo, extremamente tóxico, e que neste caso, além de estar sendo utilizado em culturas as quais foi proibido, ainda foram encontradas quantidades deste resíduo até 45 vezes acima da permitida pela legislação.

5. CONCLUSÕES

O método proposto nesta pesquisa se mostrou eficiente para análise de paraquate, diquate, clormequate e mepiquate em cevada e trigo, apresentando-se como um método simples e sem a necessidade de aquecimento e de aparatos mais sofisticados para o preparo da amostra. Além disso, a aplicação do planejamento experimental para a seleção da fase móvel ideal para esta análise foi de extrema relevância, uma vez que possibilitou observar a influência e interação entre os fatores selecionados.

A avaliação das condições de extração permitiu uma diminuição no tempo de extração dos analitos, uma vez que foi possível a realização desta etapa sem a necessidade de aquecimento e posterior resfriamento a temperatura ambiente. Além disso, foi possível selecionar o melhor solvente de extração e o modo de contato eficiente deste com a amostra.

As etapas de limpeza propostas se mostraram satisfatórias para as matrizes em estudo, não comprometendo a vida útil do sistema cromatográfico. Além disso, com a escolha e otimização do sorvente utilizado, obteve-se um resultado bastante interessante uma vez que a quitosana é uma opção alternativa, renovável e de baixo custo quando comparada a maioria dos sorventes testados.

Com a avaliação das soluções padrões foi possível observar que estas são estáveis por um tempo superior a um ano, independente se preparadas em metanol ou água ultrapura e não se observou a interação do composto paraquat com a superfície do vidro em tempo de até 3 anos.

A observação dos fortes efeitos de matriz negativos na análise dos compostos de amônio quaternário torna necessário o uso de curva analítica na matriz branco fortificada, ou, conforme proposto nesta pesquisa, de uma curva analítica por diluição da matriz branco fortificada, que além de compensar o efeito matriz e melhorar os valores de recuperação, ainda diminui a quantidade de amostra utilizada, os custos com reagentes e o tempo de preparo, se tornando assim, uma ótima opção para este tipo de análise.

Os resultados encontrados na etapa de validação do método proposto demonstram que o mesmo é exato, preciso, estável e reprodutivo, possibilitando o uso do mesmo em análises de rotina do laboratório para amostras de cevada. Além disso, o método também se mostrou eficiente para amostras de trigo e provavelmente

poderá ser empregado com sucesso na análise de outros cereais após uma avaliação prévia.

Ademais, conclui-se que os objetivos traçados para esta pesquisa foram atingidos e com base nos resultados obtidos para as amostras de cevada e trigo fica evidente a importância e a necessidade de monitoramento desses agrotóxicos em cereais.

6. DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento desta pesquisa, tanto líquidos como sólidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos. Já, os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos e separados nas seguintes classes: halogenados, não-halogenados, além dos resíduos de álcool e acetona utilizados na limpeza do material de laboratório. Todos os resíduos foram devidamente identificados e encaminhados para descarte e remediação.

7. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

As sugestões propostas para trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa são as seguintes:

- Realizar um monitoramento mais abrangente incluindo amostras de trigo e cevada disponíveis para comercialização em todo o estado do Rio Grande do Sul;
- Avaliar a aplicação do método proposto para outros tipos de amostras como arroz, milho, soja e aveia;
- Avaliar a aplicação do método para outros alimentos de origem vegetal;
- Avaliar a aplicação do método proposto para análise destes agrotóxicos em solo, porém utilizando um solvente de extração mais efetivo e aumentando o tempo de extração, além de tornar o procedimento de agitação mais vigoroso. Obs.: o método proposto foi testado para solo e os analitos paraquate e diquate não foram extraídos. Ainda, cabe ressaltar que para esta matriz, a etapa de partição com diclorometano é desnecessária pois não removeu praticamente nenhum coextrativo, porém, a diluição com acetonitrila se apresentou eficiente na remoção de coextrativos do solo, podendo ser uma etapa a ser considerada.

8. REFERÊNCIAS

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 499, p. 177-196, 1990.

ALPERT, A. J. HILIC at 21: Reflections and perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5879, 2011.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; KOLBERG, D. I.; EICHHORN, E.; BENKENSTEIN, A.; LUKACEVIC, S.; MACK, D.; WILDGRUBE, C.; SIGALOV, I.; DÖRK, D.; BARTH, A. **Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method)** - Version 9.3 (August 2017) EURL-SRM.

ANDERSON, L & BOSELEY, A.D. The determination of residues of paraquat and diquat in crops and soil - a high performance liquid chromatographic method. **ZENECA Agrochemicals**, 1997.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em 18 jul. 2015a.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Parecer técnico de reavaliação Nº 01, de 2015/GGTOX/Anvisa**, 2015b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/59b95b804a3555b2bafbfe4eff144ba1/CP+942015++NT.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 20 jan. 2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**, 2017a. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução - RDC Nº 177, de 21 de setembro de 2017**, 2017b. Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Paraquate em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Monografias de agrotóxicos**, 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em 20 jun. 2018.

ARAMENDÍA, M. A.; BORAU, V.; LAFONT, F.; MARINAS, A.; MARINAS, J. M.; MORENO, J. M.; PORRAS, J. M.; URBANO, F. J. Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (MRM). **Food Chemistry**, v. 97, p. 181–188, 2006.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224–2234, 2009.

ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66–75, 2014.

ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; BATISTA-ANDRADE, J. A.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240, n. 1, p. 1243-1253, 2018.

ARIFFIN, M. M.; ANDERSON, R. A. LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. **Journal of Chromatography B**, v. 842, p. 91–97, 2006.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York, NY: Chapman & Hall, 1996, 332p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622p.

BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; BASTOS, M. L.; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases — A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 85–103, 2014.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004, 215 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 414 p.

BARTH, T.; CALIXTO, L. A.; JABOR, V. A. P.; BORGES, K. B. Extração líquido-líquido. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 30-39.

BAUER, A.; LUETJOHANN, J.; ROHN, S.; KUBALLA, J.; JANTZEN, E. Development of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of the Quaternary Ammonium Herbicides Paraquat, Diquat, Chlormequat, and Mepiquat in Plant-Derived Commodities. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2237-2243, 2018.

BERNAL, J.; ARES, A. M.; PÓL, J.; WIEDMER, S. K. Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7438–7452, 2011.

BERRYL, C.; LA VECCHIA, C & NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 1115–1125, 2010.

BORÉM, A. & SCHEEREN, P. L. **Trigo: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015, 260 p.

BRASIL, **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

BRUNETTO, M. R.; MORALES, A. R.; GALLIGNANI, M.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Determination of paraquat in human blood plasma using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with direct sample injection. **Talanta**, v. 59, p. 913-921, 2003.

BULLIVANT, C. M. Accidental Poisoning by Paraquat: Report of Two Cases in Man. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1272-1273, 1966.

BUSZEWSKI, B & NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 231–247, 2012.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dispersive Solid Phase Extraction in the determination of residues and contaminants in food. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CABRERA, L. C.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 1945–1954, 2016.

CAIERÃO, E.; ACOSTA, A. S. Uso industrial de grãos de cevada de lavouras dessecadas em pré-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.9, p.1277-1282, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003, 260 p.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel –influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. Lages, SC: Editado pelo autor, 2013. 61 p.

CASTRO, R.; MOYANO, E. & GALCERAN, M. T. On-line ion-pair solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 441–449, 2000.

CASTRO, R.; MOYANO, E. & GALCERAN, M. T. Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 914, p. 111–121, 2001.

CCANCCAPA, A.; PICÓ, Y. **Pesticides (New Generation) and Related Compounds, Analysis of**. Encyclopedia of Analytical Chemistry in 2017 by John Wiley & Sons, Ltd., 2017.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT. **Uso do paraquat**. 2016a. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/uso>> Acesso em: 13 jan. 2016.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT. **A ciência do paraquat**. 2016b. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/banco-de-conhecimentos/qu%C3%ADmica-e-bioqu%C3%ADmica/-a-ci%C3%Aancia-do-paraquat>> Acesso em: 13 jan. 2016.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PARAQUAT. **Dados e fatos sobre o paraquat**. 2016c. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/banco-de-conhecimentos/dados-e-fatos-sobre-paraquat>> Acesso em: 14 jan. 2016.

CHAMKASEM, N.; MORRIS, C.; HARMON, T. Determination of paraquat and diquat in potato by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometer. **Journal of Regulatory Science**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2017.

CHAMKASEM, N. Rapid determination of polar pesticides and plant growth regulators in fruits and vegetables by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal Of Environmental Science And Health**, Part B, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.

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**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIRITA, R. I.; WEST, C.; ZUBRZYCKI, S.; FINARU, A.; ELFAKIR, C. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p. 5939– 5963, 2011.

CHOI, S.; KIM, S.; SHIN, J. Y.; KIM, M.; KIM, J.-H. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v.173, p. 1236–1242, 2015.

CHUNTIB, P. & JAKMUNEE, J. Simple flow injection colorimetric system for determination of paraquat in natural water. **Talanta**, v. 144, p. 432–438, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Database Search**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/search/en/>> Acesso em 03 jul. 2016.

COIRO, F. Polêmica do uso do herbicida paraquat longe do fim. **Zero Hora Campo e Lavoura**, 19 jul. 2016. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/campo-e-lavoura/noticia/2016/07/polemica-do-uso-do-herbicida-paraquat-longo-do-fim-6706989.html>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos**, v. 5, safra 2017-2018, n. 9, 2018.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 38–70, 2005.

DANEZIS, G. P.; ANAGNOSTOPOULOS, C. J., LIAPIS, K.; KOUPPARIS, M. A. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography e MS/MS in various food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 942, p. 121-138, 2016.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; REMIÃO, F.; CARMO, H; DUARTE, J. A.; NAVARRO, A. S.; BASTOS, M. L.; CARVALHO, F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 1110–1122, 2006.

DORS, G. C.; PRIMEL E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALE-FURLONGA, E. Distribution of Pesticide Residues in Rice Grain and in its Coproducts. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1921-1930, 2011.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. O.; PINTO, L. A. A. Removal of acid blue 9, food yellow 3 and FD&C yellow n° 5 dyes from aqueous solutions using activated carbon, activated earth, diatomaceous earth, chitin and chitosan: equilibrium studies and thermodynamic. **Quimica Nova**, v. 34, n.7, p. 1193-1199, 2011.

EL KASMI, S.; LAHRICH, S.; FARAHI, A.; ZRIOUIL, M.; AHMAMOU, M.; BAKASSE, M.; EL MHAMMEDI, M. A. Electrochemical determination of paraquat in potato, lemon, orange and natural water samples using sensitive-rich clay carbon electrode. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 58, p. 165–172, 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA Trigo - Método de controle**, 2006. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do63_3.htm> Acesso em 21 jun. 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Indicações técnicas para a produção de cevada cervejeira nas safras 2013 e 2014**. Editado por Euclides Minella. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. 105 p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informações Técnicas para Trigo e Triticale - Safra 2016**. Editado por Gilberto Rocca da Cunha, Eduardo Caierão e André Cunha Rosa. Passo Fundo: Biotrigo Genética, 2016. 230 p.

EMBRAPA. **Cultivo de cevada**, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo/cultivos/cevada>>. Acesso em 10 mar. 2018.

ESPARZA, X.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 4402–4406, 2009.

ESPINDULA, M. C.; ROCHA, V. S.; SOUZA, L. T.; SOUZA, M. A.; GROSS, J. A. S. Efeitos de reguladores de crescimento na elongação do colmo de trigo do colmo de trigo. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticide database**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?eventhomepage&language=EN>>. Acesso em: 04 mai. 2018.

EURL - EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. **Cereals and feeding stuff – production, consumption and pesticides** (Version 5). Por Susan Strange Herrmann, Karen Hjorth, Hanne Bjerre Christensen e Mette Erecius Poulsen. National Food Institute, The Danish Technical University, 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. **Paraquat dichloride**, 2008a.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. **Diquat dibromide**, 2008b.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. **Chlormequat chloride**, 2008c.

FARIAS, A. R.; MINGOTI, R.; HOLLER, W. A.; SPADOTTO, C. A.; FILHO, E. L.; MORI, C.; CUNHA, G. R.; DOSSA, A. A.; FERNANDES, J. M. C.; SILVA, M. S. **Potencial de produção de trigo no Brasil a partir de diferentes cenários de expansão da área de cultivo**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Trigo, 2016.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, 2011.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634–7639, 2011.

FIELD, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS**. 2ª ed., Bookman Editora, 2009, 688 p.

GALON, L.; FORTE, C. T.; KUJAWISKI, R.; RADUNZ, A. L.; DAVID, F. A.; PERIN, G. F.; CASTOLDI, C. T.; RADUNZ, L. L. Eficácia e fitotoxicidade de herbicidas aplicados para o manejo de plantas daninhas em cevada. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.13, n.2, p.105-116, 2014.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. & NAMIES'NIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GAO, L.; LIU, J.; WANG, C.; LIU, G.; NIU, X.; SHU, C.; ZHU, J. Fast determination of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 136–140, 2014.

GAO, J.; WANG, J.; ZUO, M.; MA, L.; CUI, Y.; YANG, T.; DING, M. A highly sensitive method for simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides chlormequat and mepiquat in pears and potatoes by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 5895-5903, 2015.

GARCIA-FEBRERO, R.; SALVADOR, J.-P.; SANCHEZ-BAEZA, F.; MARCO, M.-P. Rapid method based on immunoassay for determination of paraquat residues in wheat, barley and potato. **Food Control**, v. 41, p. 193-201, 2014.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 32-51, 2012.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929–3937, 2010.

GUILLARME, D.; SCHAPPLER, J.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 15-27, 2010.

GUO, Y.; GAIKI, S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5920– 5938, 2011.

HAN, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17–29, 2016.

HAO, C.; ZHAO, X.; MORSE, D.; YANG, P.; TAGUCHI, V.; MORRA, F. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 169– 176, 2013.

HAU, J.; RIEDIKER, S.; VARGA, N.; STADLER, R. H. Determination of the plant growth regulator chlormequat in food by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 77–86, 2000.

HEALTH AND SAFETY EXECUTIVE. **Withdrawal of use of diquat on cereal crops.** Disponível em: <<http://www.hse.gov.uk/pesticides/news/diquat-withdraw-cereal.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2018.

HEDDEN, P & THOMAS, C. G (Ed.). **The gibberellins.** Series: Annual Plant Reviews, v. 49. 2016.

HEMSTRÖM, P.; IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1784-1821, 2006.

HOFFMAN, E. & STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: principles and applications.** 3^a ed., England: Wiley, 2007. 489 p.

IBGE, **Levantamento sistemático da produção agrícola-maio, 2018.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em 25 jun. 2018.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZACAO E QUALIDADE INDUSTRIAL). **Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-08).** Rev. 06, 2017.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, p. 1–25, 2011.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia.** São Paulo: Editora da Unicamp, 2010. cap. IX, p. 273-398.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1^a ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 61-79.

KACZYŃSKI, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 524–531, 2017.

KOLBERG, D. I. S.; MACK, D.; ANASTASSIADES, M.; HETMANSKI, M. T.; FUSSELL, R. J.; MEIJER, T.; MOL, H. G. J. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2465–2474, 2012.

LACA-BUENDIA, J. P. Efeito de doses de reguladores de crescimento no algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, p. 109-113, 1989.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, 49-57, 2010.

LI, W.-X.; CHEN, M.; CHEN, W.-T.; QIAO, C.-K.; Li, M.-H.; HAN, L.-J. Determination of mepiquat chloride in cotton crops and soil and its dissipation rates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 85, p. 137–143, 2012.

LOCK, E. A.; WILKS, M. F. Paraquat. In: KRIEGER, R. I. (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology**, v. 2, 2ª ed., Hardcover, 2001a, p. 1559-1603.

LOCK, E. A.; WILKS, M. F. Diquat. In: KRIEGER, R. I. (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology**, v. 2, 2ª ed., Hardcover, 2001b, p. 1605-1621.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MARCHESE, S.; PERRET, D.; BAFILE, E.; GENTILI, A.; CARETTI, F.; BERARDINO, M. Pressurized Liquid Extraction Coupled with LC–ESI–MS–MS for the Determination of Herbicides Chlormequat and Mepiquat in Flours. **Chromatographia**, v. 70, n. 5/6, p. 761-767, 2009.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R. & JAFELICCI JUNIOR, M. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MARTINS, I. Precipitação de proteínas e hidrólise de conjugados. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 15-18.

MARTINS, M. L.; RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; SAIBT, N.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84–91, 2016.

MCCARTY, J.C. & HEDIN, P.A. Effects of 1,1-dimethylpiperidinium chloride on the yields, agronomic traits, and allelochemicals of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), a nine years study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2302-2304, 1994.

MENTEN, J. O. **Consumo de produtos fitossanitários no Brasil**. SINDIVEG, 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/consumo-de-produtos-fitossanitarios-no-brasil/>> Acesso em 01 set. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos/gtpr>> Acesso em: 18 mai. 2016.

NARDIN, T.; BARNABA, C.; ABBALLE, F.; TRENTI, G.; MALACARNE, M.; LARCHER, R. Fast analysis of quaternary ammonium pesticides in food and beverages using cation-exchange chromatography coupled with isotope-dilution high-resolution mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 40, p. 3928-3937, 2017.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUSA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of Ultrasonic Baths for Analytical Applications: A New Approach for Optimisation Conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 57-63, 2001.

NASCIMENTO JUNIOR, C. S. & BORGES, K. B. Princípios básicos de preparo de amostras. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 9-18.

NOLLET, L. M. L.; RATHORE, H. S. (Ed.) **Handbook of Pesticides. Methods of Pesticide Residues Analysis**. CRC Press, Boca Raton, 2010.

NORTES-MÉNDEZ, R.; ROBLES-MOLINA, J.; LÓPEZ-BLANCO, R.; VASS, A.; MOLINA-DÍAZ, A.; GARCIA-REYES, J F. Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 158, p. 222–228, 2016.

NUIJS, A. L. N. V.; TARCOMNICU, I.; COVACI, A. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5964-5974, 2011.

OLIVEIRA Jr, R. S.; CONSTANTIM, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. 348 p.

OLIVEIRA, M. A. L.; PORTO, B. L. S.; VAZ, F. S. A.; SATO, R. T. Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015, p. 19-27.

PAIXÃO, P.; COSTA, P.; BUGALHO, T.; FIDALGO, C.; PEREIRA, L. M. Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 775, p. 109–113, 2002.

PATEIRO-MOURE, M.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of quaternary ammonium herbicides in soils. Comparison of digestion, shaking and microwave-assisted extractions. **Journal of Chromatography A**, v. 1196–1197, p. 110–116, 2008.

PATEIRO-MOURE, M.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; J. SIMAL-GÁNDARA. Critical Review on the Environmental Fate of Quaternary Ammonium Herbicides in Soils Devoted to Vineyards. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 4984–4998, 2013.

PEETERS, M.-C.; DEFLOOR, I.; COOSEMANS, J.; DELCOUR, J. A.; OOMS, L.; DELIEVER, R. DE VOS, D. Simple ion chromatographic method for the determination of chlormequat residues in pears. **Journal of Chromatography A**, v. 920, p. 255–259, 2001.

PICÓ, Y.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MÃNES, J. Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 251–271, 2000.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PIZZUTTI, I. R.; VELA, G. M. E.; KOK, A.; SCHOLTEN, J. M.; DIAS, J. V.; CARDOSO, C. D.; CONCENÇO, G.; VIVIAN, R. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, v. 209, p. 248–255, 2016.

POSECION, N. C.; OSTREA, E. M. & BIELAWSKI, D. M. Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 862, p. 93–99, 2008.

PPDB: **Pesticide Properties DataBase**, 2016. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>>. Acesso em: 05 ago. 2016.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n.6, 2009.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of plant biology**, v. 51, p. 501–31, 2000.

RAINA-FULTON, R. A review of methods for the analysis of orphan and difficult pesticides: glyphosate, glufosinate, quaternary ammonium and phenoxy acid herbicides, and dithiocarbamate and phthalimide fungicides. **Journal of AOAC International**, v.97, n. 4, p. 965-77, 2014.

RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FÉRNANDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109–120, 2013.

RESTEK. **How to Avoid Common Problems with HILIC Methods**, 2017. Disponível em: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/General-Interest/general_GNAR2716-UNV>. Acesso em: 28 mar. 2018.

RIEDIKER, S.; OBRIST, H.; VARGA, N.; STADLER, R. H. Determination of CHLORMEQUAT and mepiquat in pear, tomato, and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography–electrospray

ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 15–23, 2002.

RIZZETI, T. M. **Desenvolvimento de método simples e rápido para determinação multiclasse de resíduos de medicamentos veterinários em rim, fígado e músculo bovino por UHPLC-MS/MS**. 2017, 156 p. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 2– 18, 2013.

ROSSAROLA, E.; AUDE, M. I. S. & SANTOS, O. S. Doses and application time of chlormequat chloride in wheat. **Ciência Rural**, v. 23, n. 1, p. 15-19, 1993.

RUAN, X.-L.; QIU, J.-J.; WU, C.; HUANG, T.; MENG, R.-B.; LAI, Y.-Q. Magnetic single-walled carbon nanotubes–dispersive solid-phase extraction method combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of paraquat in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 85–90, 2014.

SANTE (EUROPEAN COMMISSION) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Documento N° SANTE/11813/2017**.

SANTOS, J. L. D.; MATSUMOTO, S. N.; BRITO, C. L. L.; SANTOS, J. L.; OLIVEIRA, L. S. Respostas fisiológicas de cafeeiro em crescimento vegetativo inicial a cloreto de mepiquat e disponibilidade hídrica. **Coffee Science**, v. 10, n. 4, p. 482 - 490, 2015.

SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. & KORN, M. Extrações assistidas por ultra-som. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª ed. Piracicaba, 2008, 340 p.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

SERNA-SALDIVAR, S. O. **Cereal grains: properties, processing and nutritional attributes**. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2010, 747 p.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por paraquat. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 25-32, 2003.

SHIA, J. C.; YABU, M.; TRAN, K. V.; YOUNG, M. S. Improved Resolution for Paraquat and Diquat: Drinking Water Analysis Using the CORTECS UPLC HILIC Column. Waters Corporation, 2013. Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004732en.pdf>> Acesso em: 20 nov. 2015.

SIGMA-ALDRICH. **Solid Phase Extraction Products**, 2015. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf. Acesso em: 30 mai. 2018.

SILVA, C. G. A.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. 210-220, 2016.

SØRENSEN, M. T.; POULSEN, M. E.; LEFFERS, H.; VAJTA, G.; HALEKOH, U. No effect of the plant growth regulator, chlormequat, on boar fertility. **Animal**, v. 3:5, p. 697–702, 2009.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 644-647, 2003.

SOUZA, D. & MACHADO, S. A. S. Electrochemical detection of the herbicide paraquat in natural water and citric fruit juices using microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p. 85–91, 2005.

SOUZA, L. T.; ESPINDULA, M. C.; ROCHA, V. S.; SANTOS, D. C. F.; SOUZA, M. A. Growth retardants in wheat and its effect in physiological quality of seeds. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1431-1434, 2010.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175–191, 2000.

TAGUCHI, V. Y.; JENKINS, S. W. D.; CROZIER, P. W.; WANG, D. T. Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography- (Electrospray Ionization) Mass Spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, p. 830–839, 1998.

THE COURT OF FIRST INSTANCE ANNULS, 2007. The Directive Authorising Paraquat As An Active Plant Protection Substance, Court of First Instance of the European Communities. Disponível em: <http://curia.europa.eu/en/actu/communiqués/cp07/aff/cp070045en.pdf> Acesso em: 29 jan. 2016.

TRAN, K. V.; SHIA, J. C.; YOUNG, M. S. Fast and Sensitive UPLC/MS(MS) Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water. Waters Corporation, 2012. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004220en.pdf> Acesso em: 20 nov. 2015.

VAHL, M.; GRAVEN, A. & JUHLER. Analysis of Chlormequat residues in grain using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 361, p. 817–820, 1998.

VERÍSSIMO, G.; MOREIRA, J. C.; MEYER, A. Paraquat Contamination in Surface Waters of a Rural Stream in the Mountain Region in the State of Rio De Janeiro

Southeastern Brazil. **Journal of Environmental and Toxicological Studies**, v. 2, p. 1-6, 2018.

VARGAS, L. & ROMAN, E. S. Seletividade e eficiência de herbicidas em cereais de inverno. **Revista Brasileira de Herbicidas**, n. 3, p. 1-10, 2005.

VARGAS, L.; GUARIENTI, E. M.; PIRES, J. L. F.; TIBOLA, C. S. Eficiência de herbicidas para dessecação pré-colheita do trigo e efeitos sobre rendimento de grãos, germinação e qualidade tecnológica. Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2016, Londrina, PR.

VIDAL, J. L. M.; VEGA, A. B.; LÓPEZ, F. J. S.; FRENICH, A. G. Application of internal quality control to the analysis of quaternary ammonium compounds in surface and groundwater from Andalusia (Spain) by liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, p. 179–184, 2004.

WANG, K.-C.; CHEN, S.-M.; HSU, J.-F.; CHENG, S.-G.; LEE, C.-K. Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 876, p. 211–218, 2008.

WANG, Y.; LIU, X.; XIAO, C.; WANG, Z.; WANG, J.; XIAO, H.; CUI, L.; XIANG, Q.; YUE, T. HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. **Food Control**, v. 28, p. 131-134, 2012.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentations, Applications and Strategies for Data Interpretation**. 4^a ed., England: Wiley, 2011, 819 p.

WATTS, M., 2011. **Paraquat. Penang, Malaysia: Pesticide Action Network Asia and the Pacific**. Disponível em: <<http://wssroc.agron.ntu.edu.tw/note/Paraquat.pdf>> Acesso em 03 fev. 2016.

WHITEHEAD Jr, R. D.; MONTESANO, M. A.; JAYATILAKA, N. K.; BUCKLEY, B.; WINNIK, B.; NEEDHAM, L. L.; BARR, D. B. Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2548–2553, 2010.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 1984. **Environmental Health Criteria 39: Paraquat and diquat**. Geneva, World Health Organization. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm#SubSectionNumber:1.1.1>>. Acesso em: 13 jan 2016.

WUNNAPUK, K.; MEDLEY, G. A.; LIU, X.; GRICE, J. E.; JAYASINGHE, S.; GAWARAMMANA, I.; BUCKLEY, N. A.; ROBERTS, M. S. Simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods for quantification of paraquat in plasma and urine: Application to experimental and clinical toxicological studies. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3047– 3052, 2011.

YU, Z.; JIN, F.; HU, J.; ZHANG, X.; SUN, J.; YANG, M. An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 90–95, 2010.

ZAGONEL, J.; VENANCIO, W. S.; KUNZ, R. P.; TANAMATI, H. Doses de nitrogênio e densidades de plantas com e sem um regulador de crescimento afetando o trigo, cultivar OR-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 25-29, 2002.

ZAGONEL, J. & FERREIRA, C. Doses e épocas de aplicação de regulador de crescimento em híbridos de milho. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 395-402, 2013.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015a, p. 230-244.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B. Quantitative Analysis and Method Validation. In: TUZIMSKI, T. & SHERMA, J. (Ed.). **High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis**. CRC Press Taylor & Francis Group 2015b, p. 303-324.

ZHAO, Y.; LAZOU, K.; SCHELFAUT, M.; DE REU, L.; SANDRA, P. Determination of Chlormequat Residues in Pears and Pear Concentrates by Benchtop LC-ESI-MS. **Chromatographia**, v. 51, n. 9/10, 2000.

ZOU, Y.; SHI, Y.; BAI, Y.; TANG, J.; CHEN, Y.; WANG, L. An improved approach for extraction and high-performance liquid chromatography analysis of paraquat in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1809–1812, 2011.

ZOU, T.; HE, P.; CAO, J.; LI, Z. Determination of Paraquat in Vegetables Using HPLC–MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, p. 204–209, 2015.

ZOUGAGH, M.; BOUABDALLAH, M.; SALGHIC, R.; HORMATALLAH, A.; RIOS, A. Supercritical fluid extraction as an on-line clean-up technique for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatography for confirmation of paraquat and diquat in olive oil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, p. 56–61, 2008.