

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

**MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS E
DERIVADOS POR GC-PFPD, GC-ITD-MS E LC-MS/MS**

TESE DE DOUTORADO

Rosselei Caiél da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2011

MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS E DERIVADOS POR GC-PFPD, GC-ITD-MS E LC-MS/MS

Rosselei Caiél da Silva

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 **Doutor em Química**

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS E DERIVADOS POR
GC-PFPD, GC-ITD-MS E LC-MS/MS**

Elaborada por
Rosselei Caiél da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr^a Carmem Dickow Cardoso (Orientadora)
Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a Ionara Regina Pizzutti (Co-orientadora)
Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a Rosana de Cássia de Souza Schneider
Universidade de Santa Cruz do Sul

Dra. Rochele Cassanta Rossi
Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Dr^a Maria Verónica Césio
Universidad de la República/Uruguai

Santa Maria, 29 de Agosto de 2011.

Dedico este trabalho a Deus, que sempre esteve presente iluminando meu caminho e dando-me a sabedoria necessária para realizar os meus sonhos, e aos meus queridos e amados pais, Alcir e Zeli, que me ensinaram desde a infância princípios e os reais valores da vida. Que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e realizá-los.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e inigualável amor. Obrigada por mais esta etapa vencida e por todas as pessoas maravilhosas que tu colocaste em meu caminho.

A toda a minha família, especialmente meus pais, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por, principalmente, confiarem que este dia chegaria! Obrigada pelo amor, amizade e torcida, apesar de nem sempre concordarem com as minhas escolhas!

Ao meu querido e amado Rodrigo, que me incentivou a finalizar este trabalho, mesmo em meio a tantas dificuldades, e hoje desfruta comigo a alegria desta conquista. Obrigada, amor!

As minhas eternas amigas de longa jornada, Ana Paula e Gleice, obrigada por todo o carinho e por compreenderem a minha ausência em momentos especiais da vida de vocês!

As minhas queridas amigas Graciele, que me ajudou no desenvolvimento do método multirresidual e fez com que parte desta conquista acontecesse, Catiucia, que me ajudou no desenvolvimento do método individual, e a Cristine pela ajuda no desenvolvimento da etapa de purificação. Foi um enorme prazer trabalhar com vocês, e que a nossa sintonia e amizade sempre continue assim! Obrigada por tudo!

A Prof^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso pela difícil tarefa que ficou em suas mãos: de me “orientar” neste trabalho. Agradeço do fundo do coração poder ter concluído mais esta etapa da minha vida!

A Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti pela “co-orientação”. A formação que tenho hoje agradeço a você que me acolheu no início da iniciação científica, vivenciei os momentos do mestrado e agora é prova viva, que devemos sempre fazer as escolhas que consideramos certas, mesmo que para isto tenhamos que pagar um alto preço! Agradeço a amizade, as oportunidades e todos os momentos que já passamos juntas ao longo destes 11 anos!

A Prof^a Dr^a Rochele Cassanta Rossi pela participação na banca examinadora, mas principalmente pela amizade cultivada desde a época da faculdade. Obrigada, você também faz parte desta conquista!

As Prof^a Dr^a Rosana de Cassia Schneider e Dr^a Maria Verónica Césio pela participação no exame de qualificação e na banca examinadora.

A Prof^a Dr^a Carla Beatriz Grespan Bottoli e ao Dr Rafael Vivian pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao Dr. André de Kok pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no VWA e aos amigos que conquistei durante a minha estada em Amsterdã. Obrigada por todos os ensinamentos. *Thank you for everything!*

A todos os colegas e amigos do CEPARC, Ângela, Bárbara, Darliana, Gabriel, Jaqueline, Jonatan, Laís e Lilian, que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Agradeço pelo companheirismo e ótimos momentos desfrutados juntos ao longo dos anos!

Aos funcionários da UFSM, especialmente ao Ademir e a Valéria pela simpatia e atenção de sempre.

“... Nossa vida é tão entrelaçada com a de outros, que ninguém é capaz de conseguir o sucesso por si mesmo. Praticamente tudo o que sabemos, aprendemos de outros. Quase tudo o que fazemos está construído sobre o fundamento colocado por outros.”

(Alf Lohne)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS E DERIVADOS POR GC-PFPD, GC-ITD-MS E LC-MS/MS

AUTORA: ROSSELEI CAIÉL DA SILVA

ORIENTADORA: CARMEM DICKOW CARDOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2011.

Devido a complexidade de matrizes de grãos como soja, milho e arroz, e das baixas concentrações dos pesticidas presentes, há uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação desses resíduos.

A maior vantagem de um método multirresidual é a possibilidade de se determinar um grande número de pesticidas na mesma análise cromatográfica. Entretanto, alguns compostos, devido suas características específicas, não podem ser determinados em conjunto com outros analitos. Assim, é importante que também se desenvolva e valide métodos individuais de análise, como o método para determinação de ditiocarbamatos (DTC).

Os DTC apresentam baixa toxicidade aguda, combinado com forte ação fúngica, baixo custo e baixa persistência ambiental, por isto, estes continuam sendo largamente utilizados na agricultura. Na primeira parte deste estudo, foi desenvolvido um método individual de análise para determinar DTC em soja, arroz e milho, empregando GC-PFPD e GC-ITD-MS. Para o estudo de validação do método, os seguintes parâmetros foram avaliados: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão, através do estudo de fortificação e recuperação, nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1 e 0,5 mg CS₂ kg⁻¹.

Para a determinação de ditiocarbamatos, adicionou-se um volume de água à amostra (arroz, milho e soja). Fortificou-se com solução de tiram, adicionou-se 25 mL de isoctano e 150 mL de solução de SnCl₂ em HCl. Os frascos foram fechados e levados ao banho de agitação, a 80 °C, por 1 hora. Após o resfriamento, 2 mL da fase orgânica foram transferidos para outro frasco contendo 50 mg de sílica gel, para a etapa de purificação.

As curvas analíticas foram lineares na faixa de 0,02 a 1,0 mg CS₂ L⁻¹, com coeficiente de determinação (r^2) maior do que 0,99, para todas as culturas, nos dois sistemas de detecção. O LOD e LOQ do método apresentaram os mesmos valores para soja e milho, sendo, respectivamente, 20 e 50 µg CS₂ kg⁻¹. Já o LOQ para arroz foi de 62 µg CS₂ kg⁻¹, devido a menor quantidade de amostra utilizada. Observa-se, desta forma, que os valores de LOQ encontrados são inferiores aos limites máximos de resíduos permitidos (LMR) pela legislação nacional, que são de 0,3 mg CS₂ kg⁻¹ para soja e milho, e de 3 mg CS₂ kg⁻¹ para o arroz, indicando que os métodos podem ser utilizados para este tipo de determinação.

A precisão mostrou-se muita boa, com valores de RSD entre 1,8 e 8,7%, e recuperações de 63 a 103%. Assim, os resultados obtidos pela validação do método permitem concluir que ambos os sistemas cromatográficos são adequados para determinar DTC em grãos.

A segunda etapa do estudo foi validar o método multirresidual para determinação de 75 pesticidas em milho (grão) e cereais matinais, empregando LC-MS/MS, no modo ESI positivo. O procedimento de extração foi baseado no método QuEChERS, com algumas modificações. Grãos de milho e cereais matinais foram moídos e homogeneizados, e um volume de água de, respectivamente, 7,5 e 8 mL foi adicionado. Após, executou-se a fortificação com uma solução contendo os 75 pesticidas do estudo, nos níveis de concentração de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Um volume de 10 mL de solução de ácido acético 1% em acetonitrila contendo o padrão interno quinalfós foi adicionado, e os tubos agitados por 1 minuto. Os tubos foram abertos e MgSO_4 anidro adicionado seguido de agitação e centrifugação a 4000 rpm, por 4 minutos. Um volume de 0,5 mL da fase superior foi transferido para vial contendo 0,5 mL do padrão interno propoxur em metanol.

Os resultados obtidos para esta validação foram satisfatórios. Recuperações entre 70 e 120%, com RSD <20% foram obtidos para a maioria dos pesticidas estudados, nas duas matrizes, conforme recomendando pela SANCO (2009). Conforme esperado em LC-MS/MS, o efeito matriz não influenciou os resultados.

Palavras-chave: Pesticidas. Ditiocarbamatos. Grãos. Cromatografia gasosa. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Post Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SINGLE AND MULTI-RESIDUE METHODS FOR PESTICIDE ANALYSIS IN GRAINS AND DERIVATES BY GC-PFPD, GC-ITD-MS AND LC-MS/MS

AUTHOR: ROSSELEI CAIÉL DA SILVA
ADVISOR: CARMEM DICKOW CARDOSO
Santa Maria, August, 2011

Due to the complexity of grains like soybean, corn and rice, and the very low pesticide concentration expected for these samples, it is really necessary to develop efficient and reliable analytical methods to identify and quantify their residues.

The possibility to perform the determination of a large number of pesticides in just a single chromatographic analysis is the major advantage of the multi-residue methods. However, there are important compounds that are not possible to be analyzed together, like the dithiocarbamates (DTC). For that, is so important to develop and validate single methods.

Due to low acute toxicity, combined with strong action, low-cost production and low environmental persistence, the dithiocarbamates are still using worldwide. The first part of this study reports a sensitive analytical single method suitable for the quantitative analysis of DTCs in soybeans, rice and corn, using GC-PFPD and GC-ITD-MS. For the method validation studies, the following parameters were assessed: detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy, via recovery experiments at 0.05, 0.1 and 0.5 mg CS₂ kg⁻¹ spiking levels. For soybeans is necessary a clean-up step due the high fat content in that crop, because of it, same sorbents (Aluminum oxide, Florisil[®], Silica, PSA, C₁₈ and C₁₈OH) were tested and the best results were obtained applying silica gel. For the extraction procedure, an amount of sample was weighed and water added. The spike solution (thiram) was added to the sample, 25 mL of isoctane and 150 mL of tin (II) chloride solution in hydrochloric acid were added. The bottles were closed immediately and heated for 1 h in a water bath at 80 °C, under shaking. After cooling, 2 mL aliquot of the upper organic layer of each bottle was pipetted into a tube containing 50 mg of silica gel, for the clean-up step. The analytical curves were linear from 0.02 to 1.0 mg CS₂ L⁻¹ with determination coefficients (r^2) higher than 0.99 for both detection systems and to all crops. Method LOD and LOQ values were 20 and 50 µg CS₂ kg⁻¹, respectively, for soybeans and corn. For rice LOQ was just 40 µg CS₂ kg⁻¹. Very good precision was obtained with RSD between 1.8 and 7.9% and recoveries from 67 to 103%, for all matrices. The results obtained in the validation step allow us to conclude that both chromatographic detection systems are appropriate to determine residues of DTCs in grains.

The second step was to develop and validate a method for the analysis of 75 pesticides in corn grain and breakfast cereals using LC-MS/MS, ESI positive mode. The extraction procedure was the modified QuEChERS method, however, excluding

the dispersive SPE clean-up step. To that end, milled and homogenized corn grain and breakfast cereals with water were spiked with 75 pesticides, at 3 spiking levels (10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=6$), plus the procedure internal standard (quinalfos). A volume of 10 mL of acetonitrile with 1% acetic acid was added and the tubes were vigorously shaken for 1 minute. The tubes were uncapped, anhydrous magnesium sulfate were added, the shaking procedure was repeated and the extract was centrifuged at 4000 rpm, for 4 min. The upper layer of the extracts was transferred to chromatographic vial, containing 0.5 mL of the instrumental internal standard (propoxur) in methanol.

The linear range was evaluated and validated between 0.1 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the analytical curves (7 concentrations, $n=6$). Also LOD, LOQ, matrix effect, as well as precision (as RSD%) and accuracy (as recovery), for 75 pesticides, were studied. The LOD were calculated based on practically realized repeatability RSD. To determine the precision, accuracy and LOQ, blank samples were spiked at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The results showed recoveries between 70 and 120% and RSDs <20% for the majority of the pesticides studied, even at the lowest level. As expected, the matrix effect did not have influence on the results, and the values of LOD and r^2 were considered as satisfactory for the purpose of this study.

Keywords: Pesticides. Dithiocarbamates. Grain. Gas chromatography. Tandem liquid chromatography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal dos grãos de arroz, milho e soja (adaptado de KOBLITZ, 2011).....	30
Tabela 2 - Destino dos produtos fabricados a partir do milho (grão) (adaptado de GARCIA et al, 2006).....	40
Tabela 3 - Classificação dos pesticidas sintéticos quanto à estrutura química (adaptado de BELDOMÉNICO et al, 2005).....	47
Tabela 4 - Pesticidas estudados com a respectiva classe, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.....	82
Tabela 5 - Concentração das soluções de CS ₂ da curva analítica e volumes medidos das soluções de trabalho, para preparar 10 mL de cada solução em isoctano.....	84
Tabela 6 - Pesticidas analisados por LC-MS/MS, valores dos t _R , voltagem do cone, íons precursores, íons produtos e energia de colisão, para as duas transições.....	96
Tabela 7 - Percentuais de recuperação e RSD (%) obtidos das análises dos extratos de soja por GC-PFPD, após fortificação a 0,1 mg CS ₂ kg ⁻¹	112
Tabela 8 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos na faixa de 0,02 a 2,0 mg L ⁻¹ para CS ₂	114
Tabela 9 - Valores de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos para o CS ₂ , nos dois sistemas cromatográficos, para as matrizes soja, arroz e milho.....	115
Tabela 10 - Limites máximos de resíduos estabelecidos pela ANVISA para ditiocarbamatos em soja, arroz e milho. (ANVISA, 2011).....	116
Tabela 11 - Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD _{ri}) e de precisão intermediária do instrumento (RSD _{pii}), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração.....	118
Tabela 12 - Valores médios de recuperação e RSD%, em 3 níveis de fortificação, para soja, arroz polido e milho, analisados por GC-PFPD e GC-ITD-MS.....	119

Tabela 13 - Coeficiente de determinação e intervalo linear, para cada pesticida, obtidos pela análise cromatográfica de soluções analíticas preparadas em solvente e nos extratos das matrizes.....	122
Tabela 14 - Efeito matriz (%) e LOQm, obtidos para cada pesticida, nas matrizes estudadas.....	127
Tabela 15 - Percentuais de recuperação e RSDr% para os 75 pesticidas estudados em grãos de milho, calculados com curva analítica em extrato da matriz.....	136
Tabela 16 - Percentuais de recuperação e RSDr% para os 75 pesticidas estudados em cereais matinais, calculados com curva analítica em extrato da matriz.....	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama geral dos objetivos do presente trabalho.....	28
Figura 2 - Representação do processamento da soja para produção de produtos alimentícios e não alimentícios derivados do grão (adaptado de KOBLITZ, 2011).....	32
Figura 3 - Esquema da industrialização de produtos obtidos do processamento industrial do arroz (adaptado de KOBLITZ, 2011)....	36
Figura 4 - Esquema da industrialização de diversos produtos a base de milho através da moagem a seco (adaptado de PINAZZA, 2007b).....	41
Figura 5 - Classificação toxicológica presente nos rótulos dos frascos de pesticidas. (adaptado de FAO, 1995).....	52
Figura 6 - Hidrólise ácida de tiram formando amina e CS ₂	56
Figura 7 - Esquema da sequência do método QuEChERS.....	59
Figura 8 - Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons dentro de um sistema a baixa pressão (vácuo). Ionização por impacto de elétrons (adaptado de LANÇAS, 2009).....	64
Figura 9 - Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons fora de um sistema a baixa pressão (vácuo). Ionização a pressão atmosférica (adaptado de LANÇAS, 2009).....	65
Figura 10 - Principais características dos modos de ionização a pressão atmosférica, empregadas em LC-MS (adaptado de LANÇAS, 2009).....	66
Figura 11 - Interface do tipo ESI, operando no modo positivo, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas (adaptado de LANÇAS, 2009).....	67
Figura 12 - Esquema de funcionamento do ITD, em (a) os íons estão aprisionados e em (b) os íons com as razões m/z selecionadas são ejetados e analisados. (MARCH, 1997).....	70
Figura 13 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de ditiocarbamatos em frutas e hortaliças.....	88

Figura 14 - Representação esquemática do método individual de análise de resíduos de ditiocarbamatos em grãos de soja, arroz e milho seguido de análise por cromatografia gasosa.....	93
Figura 15 - Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em grãos de milho e cereais matinais, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de análise por LC-MS/MS.	102
Figura 16 - Representação esquemática do método QuEChERS, utilizado para extração de pesticidas em frutas e hortaliças.....	103
Figura 17 - Cromatograma obtido por GC-PFPD na análise do branco dos solventes e reagentes, durante o desenvolvimento do método individual de análise ditiocarbamatos.....	105
Figura 18 - Cromatograma obtido por GC-PFPD na análise da amostra branco de soja, durante o desenvolvimento do método individual de análise ditiocarbamatos.....	106
Figura 19 - Espectro de massas obtido por GC-ITD-MS para solução analítica de CS ₂ 4 mg L ⁻¹ , no t _R do CS ₂	106
Figura 20 - Espectro de massas obtido por GC-ITD-MS na análise da amostra branco de arroz polido.....	107
Figura 21 - Cromatograma obtido da análise cromatográfica de óleo de soja em isoctano por HPLC-DAD.....	108
Figura 22 - Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE empregando 100 mg de (a) sílica gel, (b) florisil [®] , (c) alumina, (d) C ₁₈ , (e) C ₁₈ OH e (f) PSA.....	108
Figura 23 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD após a purificação dos extratos por dSPE com 50 mg de sílica gel.....	109
Figura 24 - Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE com (a) 50 mg, (b) 70 mg, (c) 100 mg e (d) 200 mg de alumina.....	110
Figura 25 - Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE com 50 mg de (a) sílica gel, (b) alumina e (c) florisil [®]	111

Figura 26 - Curvas analíticas com soluções de CS ₂ em solvente e em extrato de soja, arroz e milho, na faixa de concentração de 0,02 a 2,0 mg CS ₂ L ⁻¹ , analisadas por GC-PFPD.....	114
Figura 27 - Curvas analíticas com soluções de CS ₂ em solvente e em extrato de soja, arroz e milho, na faixa de concentração de 0,02 a 2,0 mg CS ₂ L ⁻¹ , analisadas por GC-ITD-MS.....	115
Figura 28 - Cromatograma obtido por GC-PFPD nas análises das soluções analíticas de CS ₂ , correspondente ao LOD (0,02 mg CS ₂ L ⁻¹).....	116
Figura 29 - Cromatograma obtido por GC-PFPD nas análises das soluções analíticas de CS ₂ , correspondente ao LOQ (0,05 mg CS ₂ L ⁻¹).....	117
Figura 30 - Comparação entre os percentuais do efeito matriz obtidos para os 75 pesticidas, nas matrizes de grãos de milho e cereais matinais.....	119
Figura 31 - Comparação das curvas analíticas obtidas com soluções de zoxamida preparadas em solvente e no extrato de grãos de milho na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 µg L ⁻¹ e analisadas por LC-ESI-MS/MS.....	131
Figura 32 - Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para as transições de quantificação (a) e de confirmação (b) do pesticida tebuconazol, na concentração de 0,5 µg L ⁻¹ em (1) solvente e (2) extrato de grão de milho.....	132
Figura 33 - Comparação das curvas analíticas obtidas com soluções de diclorvós preparadas em solvente e no extrato de cereais matinais, na faixa de concentração de 0,5 a 10,0 µg L ⁻¹ e analisadas por LC-ESI-MS/MS.....	133
Figura 34 - Percentual de recuperação e de RSD dos pesticidas (a) bitertanol, (b) clorpirifós-metílico e (c) cresoxim-metílico que não tiveram o LOQm determinado.....	134
Figura 35 - Cromatograma obtido para clorpirifós-metílico, (a) transição de quantificação e (b) de confirmação, por LC-ESI-MS/MS, para cereais matinais fortificado a 50 µg L ⁻¹	135
Figura 36 - Percentual de pesticidas em cada faixa de recuperação, para grãos de milho fortificado a 10, 20 e 50 µg L ⁻¹ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).....	138

Figura 37 - Percentual de pesticidas em cada faixa de RSD%, para grãos de milho fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).....	139
Figura 38 - Percentual de pesticidas em cada faixa de recuperação, para cereais matinais fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).....	142
Figura 39 - Percentual de pesticidas em cada faixa de RSD%, para cereais matinais fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).....	143
Figura 40 - Cromatograma obtido para as transições de (a) quantificação e de (b) confirmação para os isômeros do ciproconazol por LC-ESI-MS/MS para cereais matinais fortificado a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	144
Figura 41 - Cromatograma obtido para as transições de (a) quantificação e de (b) confirmação para os isômeros do ciproconazol por LC-ESI-MS/MS para cereais matinais fortificado a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	144

LISTA DE REDUÇÕES

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização química sob pressão atmosférica do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- API – Ionização sob pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
- APPI – Fotoionização sob pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- BPA – Boas Práticas Agrícolas
- CI – Ionização química, do inglês *Chemical Ionization*
- CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento
- d.i. – Diâmetro interno
- DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diodo Array Detection*
- dSPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- DDE – Diclorodifeniltricloroetano
- DDT – Diclorodifeniletileno
- DRf – Dose de Referência
- EM – Multiplicação de Elétrons, do inglês *Electron Multiplier*
- EI – Ionização por impacto de elétrons, do inglês *Electron Impact Ionization*
- ELSD – Detector de dispersão de luz por evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- ESI – Ionização por eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*
- ETU - Etilenotioureia
- EU – União Européia, do inglês *European Union*
- EUA – Estados Unidos da América
- FAO – Organização do Alimento e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

GPC – Cromatografia por permeação em gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ITD – Detector por aprisionamento de íons, do inglês *Ion Trap Detector*

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade, do inglês *Low Density Lipoprotein*

LMR – Limite máximo de resíduo

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantitation*

m/z – Razão massa/carga, do inglês *Mass to Charge Ratio*

MSPE – Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de massas *tandem*, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*

PFPD – Detector fotométrico de chama pulsada, do inglês *Pulsed Flame Photometric Detector*

PI – Padrão interno

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

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

r^2 – Coeficiente de determinação

Rf – rádio frequência

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SIM – Monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

TOF – Tempo de vôo, do inglês *Time of Flight*

t_R – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

VWA – *The Food and Consumer Product safety Authority*

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Ensaio de recuperação do método individual.....	158
APÊNDICE 2 – Ensaio de recuperação do método multirresidual.	159

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Objetivos	27
1.1.1 Objetivos Específicos	28
2 REVISÃO	29
2.1 Grãos.....	29
2.1.1 Soja	30
2.1.1.1 Origem e importância econômica.....	30
2.1.1.2 Formas de utilização	31
2.1.1.3 Composição e importância nutricional.....	33
2.1.2 Arroz.....	34
2.1.2.1 Origem e importância econômica.....	34
2.1.2.2 Processamento industrial	35
2.1.2.3 Composição e importância nutricional.....	36
2.1.3 Milho.....	37
2.1.3.1 Origem e importância econômica.....	37
2.1.3.2 Produção e processos industriais.....	38
2.1.3.2.1 Cereais matinais.....	42
2.1.3.3 Composição e importância nutricional.....	42
2.2 Pesticidas	43
2.2.1 Histórico	43
2.2.2 Utilização e comércio	45
2.2.3 Classificação	46
2.2.3.1 Organofosforados.....	48
2.2.3.2 Triazóis.....	49
2.2.3.3 Ditiocarbamatos	49
2.2.4 Toxicidade	50
2.2.5 Limites Máximos de Resíduos (LMR).....	53
2.3 Métodos para determinação de pesticidas.....	54
2.3.1 Métodos individuais.....	55
2.3.2 Métodos multirresiduais.....	57
2.3.3 Métodos de purificação	60
2.4 Técnicas analíticas.....	61
2.4.1 Cromatografia Gasosa	61
2.4.2 Cromatografia Líquida.....	62
2.4.3 Espectrometria de Massa.....	63
2.4.3.1 Modos de Ionização	64
2.4.3.1.1 Ionização por Impacto de Elétrons	64
2.4.3.1.2 Ionização por Eletrospray (ESI).....	65
2.4.3.2 Analisadores de massas	67
2.4.3.2.1 Quadrupolo.....	68
2.4.3.2.2 Aprisionadores de íons.....	70

2.4.3.3 Detector	71
2.4.3.3.1 Detector baseado na multiplicação de elétrons	71
2.4.3.3.2 Detector baseado em fotomultiplicador dinolítico	71
2.5 Validação de métodos analíticos	72
2.5.1 Seletividade	73
2.5.2 Linearidade e curva analítica	73
2.5.3 Limite de Detecção e de Quantificação	74
2.5.4 Exatidão	75
2.5.5 Precisão	76
3 MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1 Equipamentos e materiais	77
3.2 Gases	79
3.3 Solventes e reagentes	80
3.4 Pesticidas selecionados	80
3.5 Preparo das soluções analíticas	81
3.5.1 Soluções utilizadas no método individual	81
3.5.2 Soluções utilizadas no método multirresidual	84
3.6 Avaliação e armazenamento das amostras branco	85
3.7 Desenvolvimento e validação do método individual	85
3.7.1 Avaliação da separação e condições cromatográficas	85
3.7.1.1 Sistema GC-PFPD (modo enxofre)	86
3.7.1.2 Sistema GC-MS	86
3.7.2 Análise dos solventes e reagentes	87
3.7.3 Desenvolvimento e validação dos métodos (GC-PFPD e GC-ITD-MS)	87
3.7.3.1 Purificação da amostra (testes 1, 2 e 3)	88
3.7.3.2 Otimização do procedimento de extração (testes 4, 5 e 6)	90
3.7.3.3 Curva analítica, linearidade e efeito matriz	90
3.7.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação	91
3.7.3.5 Repetitividade e precisão intermediária	91
3.7.3.6 Procedimento de fortificação e extração das amostras	92
3.8 Desenvolvimento e validação de método multirresidual	94
3.8.1 Condições cromatográficas	94
3.8.2 Seleção do padrão interno	98
3.8.3 Análise dos solventes e reagentes	98
3.8.4 Validação dos métodos multirresiduais	98
3.8.4.1 Curva analítica, linearidade e efeito matriz	98
3.8.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação	99
3.8.4.3 Procedimento de fortificação e recuperação (Exatidão)	100
3.9 Análise de amostras reais	103
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	104
4.1 Método individual	104
4.1.1 Avaliação da separação cromatográfica	104
4.1.2 Análise dos solventes e reagentes	104
4.1.3 Avaliação das amostras para uso como amostra branco	105

4.1.4 Desenvolvimento e validação dos métodos (GC-PFPD e GC-ITD-MS)	107
4.1.4.1 Purificação da amostra (testes 1, 2 e 3)	107
4.1.4.2 Otimização do procedimento de extração (testes 4, 5 e 6)	111
4.1.4.3 Curva analítica, linearidade e efeito matriz.....	113
4.1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação	115
4.1.4.5 Repetitividade e precisão intermediária.....	117
4.1.4.6 Recuperação	118
4.1.5 Análise das amostras reais	119
4.2 Método multirresidual	120
4.2.1 Análise dos solventes e reagentes.....	120
4.2.2 Otimização e validação dos métodos cromatográficos	120
4.2.2.1 Curva analítica, linearidade e efeito matriz.....	120
4.2.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação	133
4.2.2.3 Fortificação e recuperação (Exatidão).....	135
4.3 Análise de amostras reais	145
5 CONCLUSÕES	146
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	149
REFERÊNCIAS.....	150

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, grandes esforços no setor da agricultura têm sido feitos para aumentar a produção de alimentos e suprir os mercados tanto interno quanto externo. Desta forma, pode-se dizer que o emprego de pesticidas está intimamente relacionado à necessidade de suprimento de alimentos em função do crescimento populacional.

Com a disponibilidade de várias ferramentas que tem levado ao incremento da produção de alimentos, a segurança alimentar tem sido um tema cada vez mais importante em metas governamentais, não apenas no sentido de garantir que a população tenha acesso a alimentos, mas que estes estejam dentro dos padrões de qualidade nutricional, e dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) químicos ou de microrganismos, que não causem danos à população. Dentre os produtos químicos que podem gerar resíduos nos alimentos se encontram os pesticidas, que fazem parte de um grande grupo de compostos orgânicos, que apresentam propriedades físico-químicas extremamente diversificadas.

Os pesticidas são amplamente utilizados no mundo todo para o controle ou prevenção de doenças decorrentes de pragas e/ou ervas daninhas, porém mesmo quando aplicados de acordo com as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e em concentrações que respeitam os LMR estabelecidos pelas legislações nacional e internacionais vigentes, podem deixar resíduos os quais podem levar a população consumidora a intoxicação crônica ao longo dos anos, comprometendo a segurança alimentar.

Devido a toxicidade e aos riscos associados à saúde humana e animal pelos pesticidas, o processo de exportação de muitos produtos vegetais produzidos no Brasil, principalmente as frutas e os cereais, tem sido dificultado devido a muitos destes produtos apresentarem resíduos de determinados pesticidas acima dos LMR aceitos pela comunidade internacional.

O agronegócio ocupa no Brasil uma posição de destaque na economia, movimentando, anualmente, bilhões de dólares. No cenário mundial, o Brasil é um dos principais países produtores e exportadores de grãos, sendo a soja, o milho e o arroz os principais grãos produzidos no país. No ano de 2009, os principais destinos

das exportações brasileiras foram a China com 17% de participação, seguido dos Países Baixos (7,6%) e dos EUA (7%). A soja e seus derivados como farelo, óleo bruto e refinado, corresponderam a mais de 32% do total exportado. (KOBLOITZ, 2011).

Para grãos e outros produtos destinados à exportação, os resíduos devem estar de acordo com os LMR dos países de destino, os quais são, muitas vezes, inferiores aos estabelecidos para o mercado nacional. Portanto, há uma pressão crescente, por parte dos governos e dos setores privados, para o aperfeiçoamento do desempenho analítico para as determinações de resíduos de pesticidas (pois as concentrações dos analitos são geralmente muito baixas e as amostras muito complexas), exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo das análises.

Assim, a determinação de resíduos de pesticidas, nas mais diversas matrizes, torna-se de fundamental importância, pois indica se o teor de resíduos está dentro dos LMR estabelecidos pelas legislações vigentes.

Apesar do grande número de pesticidas empregados na agricultura, os ditiocarbamatos continuam sendo empregados como fungicidas, pois além da baixa toxicidade, combinado com seu baixo custo e curta persistência ambiental, agem de maneira efetiva contra um largo espectro de doenças causadas por fungos, em grande parte das culturas agrícolas, abrangendo desde frutas e hortaliças até cereais de grande importância econômica.

Os métodos utilizados para a determinação de ditiocarbamatos são bastante diferentes da maioria dos métodos de análises de resíduos de pesticidas. A elevada instabilidade na presença de umidade e oxigênio torna estes compostos difíceis de serem analisados. A maioria dos métodos analíticos está baseada na quantificação do dissulfeto de carbono (CS_2), após digestão ácida das amostras.

Vários métodos analíticos para determinação multirresidual têm sido desenvolvidos eficientemente e aplicados na rotina de muitos laboratórios. Em 2003, Anastassiades introduziu um método simples, rápido, fácil, barato e seguro, denominado de método QuEChERS, para extração de pesticidas de alimentos. Desde então, vários pesquisadores tem modificado o método original a fim de melhorar a eficiência na extração.

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo principal o desenvolvimento e a validação de dois métodos cromatográficos para determinação de resíduos de pesticidas.

Um método individual para a determinação dos fungicidas ditiocarbamatos, que devido a propriedades físico-químicas diferenciadas, não podem ser analisados em conjunto com os demais pesticidas, nas matrizes de soja, arroz e milho, utilizando as técnicas de separação, quantificação e confirmação por Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama Pulsada (GC-PFPD, do inglês *Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection*) e por Espectrometria de Massas por Aprisionamento de Íons (GC-ITD-MS, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry Ion Trap Detection*).

O outro, um método multirresidual para determinação de 75 pesticidas, entre estes fungicidas, inseticidas e herbicidas em grãos de milho e cereais matinais, empregando Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em *tandem* (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry in Tandem*) com ionização por Eletrospray (ESI, do Inglês *Eletrospray Ionisation*).

Os grãos de arroz, milho e soja foram escolhidos para este estudo por se tratar dos grãos mais produzidos no estado do Rio Grande do Sul, além da soja apresentar grande importância econômica tanto no cenário nacional quanto internacional. Os grãos de milho, devido ao seu emprego em larga escala, quer seja na alimentação humana quanto, principalmente, na alimentação animal também foi escolhido. E os cereais matinais, devido ao fato de muitas pessoas os ingerirem, uma vez que a tendência atual é a de associar uma vida mais saudável e ao mesmo tempo prática. Cabe ressaltar que os cereais matinais são produzidos a base de flocos de milho.

A Figura 1, demonstra de forma mais clara os objetivos deste estudo.

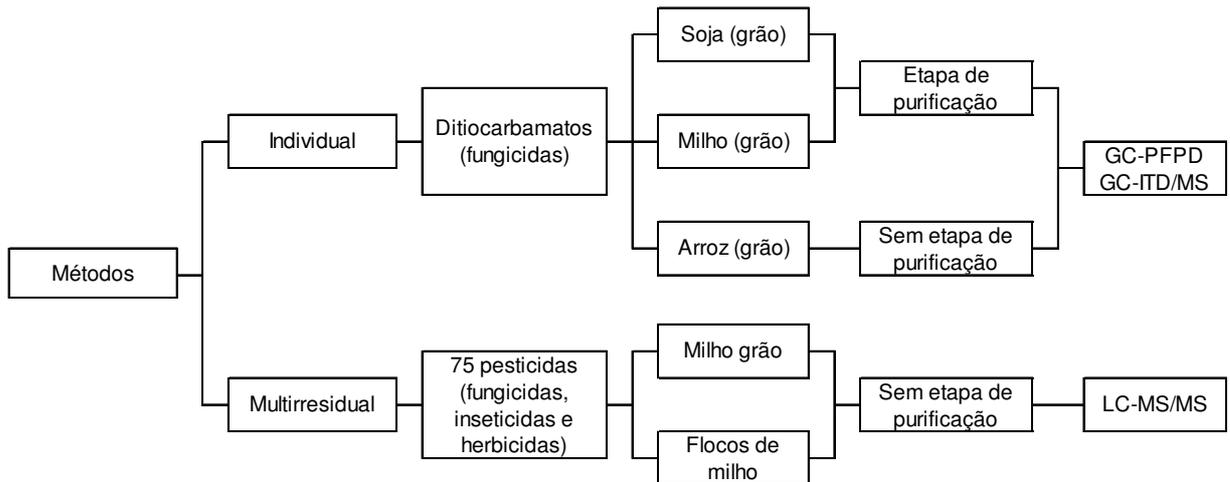


Figura 1 – Diagrama geral dos objetivos do presente trabalho.

1.1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar e validar o método cromatográfico para determinação de ditiocarbamatos nos grãos de soja, arroz e milho;
- ✓ Desenvolver um procedimento de purificação do extrato de soja na determinação de ditiocarbamatos;
- ✓ Otimizar e validar o método cromatográfico para determinação multirresidual de 75 pesticidas, entre estes, fungicidas, inseticidas e herbicidas, permitidos ou não, para grãos de milho e cereais matinais;
- ✓ Aplicar o método individual validado em amostras comerciais de arroz.

2 REVISÃO

2.1 Grãos

A definição de grãos na literatura técnica de alimentos é muitas vezes vaga e geralmente confusa. A palavra pode ser utilizada de um modo bem amplo para designar todos os alimentos comercializados como grãos secos. (KOBBLITZ, 2011).

Os grãos são divididos em cereais, leguminosas e oleaginosas, sendo que os cereais e as leguminosas estão na base da pirâmide alimentar da população. (KOBBLITZ, 2011).

Os cereais pertencem à família das gramíneas *Poaceae* e o grão não se trata de uma semente, mas sim, de um fruto seco, chamado cariopse, composto das seguintes partes básicas: embrião, endosperma, tegumento e pericarpo. (KOBBLITZ, 2011).

O trigo, o arroz, o centeio, a aveia, o sorgo e o milho são cereais importantes tanto para a alimentação humana quanto a animal. (KOBBLITZ, 2011). Constituem a principal fonte de nutrientes como carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais na dieta alimentar da população mundial. Os carboidratos são indispensáveis para manter a integridade funcional do tecido nervoso e, em condições normais, são a única fonte de energia para o cérebro. (IRGA, 2011a).

As leguminosas pertencem à família *Leguminosae*, e suas sementes maduras apresentam duas partes, o tegumento e o embrião. Seus representantes mais importantes são a soja, o feijão e o amendoim. (KOBBLITZ, 2011).

No Brasil, os principais grãos produzidos são, em primeiro lugar, a soja, seguida do milho e do arroz, que representam 90,5% da produção de grãos. (AGROSOFT BRASIL, 2011). Na Tabela 1, tem-se a composição centesimal destes grãos.

Tabela 1 – Composição centesimal dos grãos de arroz, milho e soja (adaptado de KOBLITZ, 2011).

Composição (%)	Arroz	Milho	Soja
Carboidratos	65	72	29
Proteínas	8	10	40
Lipídeos	2	4	20
Fibras	9	2	5
Outros	16	12	6

2.1.1 Soja

2.1.1.1 Origem e importância econômica

A soja (*Glycine Max L. Merrill*) figura entre os alimentos mais importantes para a humanidade. Acredita-se que sua domesticação tenha ocorrido na China, no século XI a. C., a partir de espécies selvagens. (KOBLITZ, 2011).

A importância da soja na dieta alimentar da antiga civilização chinesa era tal que, juntamente com o trigo, o arroz, o centeio e o milho, era considerada um grão sagrado, com direito a cerimônias ritualísticas na época da semeadura e da colheita. (EMBRAPA, 2011).

No final da década de 1960, dois fatores internos fizeram o Brasil começar a enxergar a soja como um produto comercial, fato que mais tarde influenciaria no cenário mundial da produção do grão. Na época, o trigo era a principal cultura do sul do Brasil e a soja surgia como uma opção de verão, em sucessão ao trigo. O Brasil também iniciava um esforço para produção de suínos e aves, gerando demanda por farelo de soja. Em 1966, a produção comercial de soja já era uma necessidade estratégica, sendo produzidas cerca de 500 mil toneladas no país. (EMBRAPA, 2011).

A soja é um dos principais produtos agrícolas do mundo, sendo cultivada uma área de 102 milhões de hectares e quase 260 milhões de toneladas, na safra 2009/2010. Na América no sul a produção foi de 134,2 milhões de toneladas em uma área total de 46,6 milhões de hectares. (EMBRAPA, 2011).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA, maior produtor e exportador. (PINAZZA, 2007a). No Brasil, a produção na safra 2009/2010 foi de 68,7 milhões de toneladas, em área plantada de 23,6 milhões de hectares. Já na safra 2010/2011, a cultura ocupou uma área de 24,1 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 75 milhões de toneladas, ou seja, um aumento de produtividade de 9,2%. (AGROSOFT BRASIL, 2011; EMBRAPA, 2011).

O maior produtor brasileiro de soja é o estado do Mato Grosso do Sul, seguido do Rio Grande do Sul. A soja é a cultura que detém a maior área de plantio no RS, participando da economia de pequenos, médios e grandes propriedades rurais do estado. (EMBRAPA, 2011).

A cadeia produtiva da soja é de suma importância para a economia brasileira, que se destaca como a principal cultura explorada no mercado interno, respondendo por cerca de 45% da produção brasileira de grãos. (PINAZZA, 2007a). Desta produção, 42,2% é destinada a exportação; 56% ao beneficiamento (separação do óleo e farelo) e apenas uma pequena parcela é empregada no consumo direto, como feijão de soja, e à obtenção de produtos tradicionais ou de nova geração (Figura 2). (KOBELITZ, 2011).

2.1.1.2 Formas de utilização

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. (EMBRAPA, 2011).

A proteína de soja é a base de ingredientes de padaria, massas, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês e alimentos dietéticos. A soja também é muito empregada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel emulsão de água para tintas. (EMBRAPA, 2011).

No entanto, sua principal utilização é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto, utilizado tanto na indústria, quanto na alimentação, sendo o mais conhecido dentre os óleos vegetais. O óleo corresponde, em média, a 20% da matéria seca dos grãos de soja, enquanto que a maioria das leguminosas (exceto o

amendoim, que contém entre 40 e 50%) contém de 2 a 14% de óleo. (KOBBLITZ, 2011).

A lecitina é produzida durante a extração do óleo, e é muito empregada na fabricação de salsichas, maioneses e achocolatados, entre outros produtos, devido a sua ação emulsificante, ou seja, faz a ligação entre a fase aquosa e oleosa dos produtos. Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível, e desta forma biodiesel de soja já vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa. (EMBRAPA, 2011).

A Figura 2 ilustra os diferentes modos possíveis de utilização da soja.

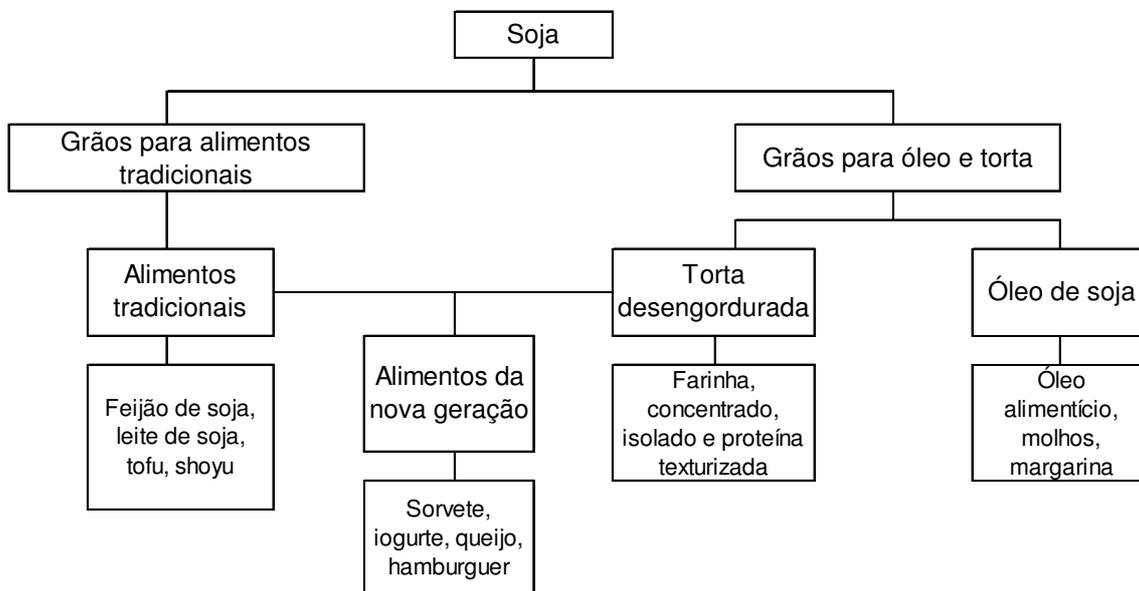


Figura 2 – Representação do processamento da soja para produção de produtos alimentícios e não alimentícios derivados do grão (adaptado de KOBBLITZ, 2011).

Cabe ressaltar que existe uma diferença bem nítida entre os modos de utilização da soja no oriente e no ocidente. Em países como China, Japão e Coreia, a soja é tradicionalmente aplicada na obtenção de uma grande variedade de alimentos processados para consumo humano, enquanto nas Américas, as sementes são, de modo geral, utilizadas na obtenção do óleo e da torta. Embora a quase totalidade do óleo seja destinado à alimentação humana, a maior parte da torta é consumida como ração animal. (KOBBLITZ, 2011)

2.1.1.3 Composição e importância nutricional

A soja é rica em nutrientes, e, em média, possui até 40% de proteínas (de alta qualidade e equivalentes as proteínas do leite e de carne), 29% de carboidratos, sendo a maior parte correspondente a fibra e apenas 1 a 2% de amido, 20% de lipídeos, além de minerais, o que faz deste grão o produto com maior valor econômico entre os grãos. (KOBELITZ, 2011).

A soja é considerada um alimento funcional porque além de funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde, reduzindo os riscos de algumas doenças crônicas e degenerativas. (PIZZUTTI, 2006).

O consumo de soja e/ou proteína de soja produz benefícios que vão desde a redução dos riscos de doenças cardíacas, combate ao colesterol, prevenção ao câncer, osteoporose até a amenização dos sintomas da menopausa. (PIZZUTTI, 2006).

Estes efeitos terapêuticos foram identificados através da observação de que em países do oriente, onde a população consome grandes quantidades de soja e derivados, as incidências de alguns tipos de câncer como o de mama, colo de útero e próstata, bem como das doenças cardiovasculares é muito menor do que em países do ocidente, e constataram que a diferença estava na dieta alimentar dos orientais, que é rica em soja e seus subprodutos. (PIZZUTTI, 2006).

No entanto, cabe ressaltar que a biodisponibilidade dos principais minerais da soja assim como de outros grãos é afetada por sua presença na forma de fitatos. Na soja, esse composto contém 51,4 a 57,1% de todo o fósforo do grão. (KOBELITZ, 2011).

2.1.2 Arroz

2.1.2.1 Origem e importância econômica

Segundo alguns historiadores, o Brasil foi o primeiro país a cultivar o arroz (*Oryza sativa*) no continente americano, e a partir da primeira metade do século XIX foi iniciado o cultivo do arroz no RS. (EMBRAPA, 2005).

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção, sendo o 2º cereal mais produzido no mundo perdendo apenas para o trigo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Atualmente, o arroz é cultivado em todos os continentes e constitui alimento básico para 2,4 bilhões de pessoas. (KOBELITZ, 2011).

A produção mundial de arroz é maior nos países asiáticos, sendo os principais produtores a China (com 29,8% do total produzido), Índia (20,8%), Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas e Japão. Estes países respondem por mais de 70% da produção mundial deste cereal. (KOBELITZ, 2011).

O Brasil é responsável por 2,1% da produção mundial, que corresponde a 50% da produção da América Latina e destaca-se como sendo o único país não asiático entre os 10 maiores produtores desse grão. (KOBELITZ, 2011).

A produção mundial de arroz não vem acompanhando o crescimento do consumo. Nos últimos seis anos, a produção mundial aumentou cerca de 1,1% ao ano, enquanto a população cresceu 1,3% e o consumo 1,2%, havendo grande preocupação com relação a estabilização da produção mundial. (KOBELITZ, 2011). Por outro lado, o consumo brasileiro de arroz vem aumentando em um ritmo inferior ao do crescimento da produção. Assim, o aumento da população brasileira vem sendo compensado por uma redução no consumo *per capita* do cereal, consequência de uma série de modificações nos padrões e hábitos de consumo que vem sendo observados na população. (WANDER, 2006).

A região Sul é responsável por mais de 72% da produção nacional de arroz e o RS representa 64%, sendo o maior produtor nacional. Sua participação na produção nacional vem aumentando; na safra 2010/2011 a produção foi recorde, alcançando mais de 13,7 milhões de toneladas, significando um acréscimo de 17,8%

em relação a safra 2009/2010. No RS, a produção teve um aumento de 20,6% na comparação com a safra anterior. (BBMNET, 2011; IRGA, 2011b). Este aumento se deve ao excelente desempenho da lavoura irrigada do RS, por conta do clima favorável, o emprego de variedades de alta produtividade e a aplicação de tecnologia de alto nível. (BBMNET, 2011).

2.1.2.2 Processamento industrial

O arroz é utilizado predominantemente na forma de grão, para a alimentação humana, ao contrário do que ocorre com o trigo e o milho, que são transformados em outros produtos antes do consumo ou destinados à alimentação animal. (KOBBLITZ, 2011).

De acordo com o grau de beneficiamento, o arroz pode ser dividido em:

- a) Arroz com casca, aquele que não sofreu nenhuma operação de transformação ou beneficiamento;
- b) Arroz integral, aquele obtido após a retirada da casca;
- c) Arroz polido, também chamado de arroz branco e obtido pela retirada da casca e polimento. Corresponde a mais de 80% do arroz consumido no Brasil;
- d) Arroz parboilizado derivado do arroz integral ou polido, obtido por processamento hidrotérmico. (KOBBLITZ, 2011).

A casca representa o maior volume entre os subprodutos obtidos durante o beneficiamento do arroz, chegando, em média, a 22%. Sua utilização é bastante variada, sendo a principal delas a produção de energia, com emprego na alimentação de fornalhas de secadores e das autoclaves da própria indústria arroseira. (KURZ, 2007).

O farelo representa cerca de 8% do beneficiamento do arroz, possui um teor de proteínas entre 11,3 e 14,9%, o que explica o seu alto valor nutritivo. O óleo extraído a partir do farelo passa por uma série de processos até chegar à condição de óleo refinado, o qual se destina à alimentação. (KURZ, 2007).

Na Figura 3, tem-se esquematicamente representada a obtenção dos diferentes produtos do arroz, após beneficiamento e processamento industrial do mesmo.

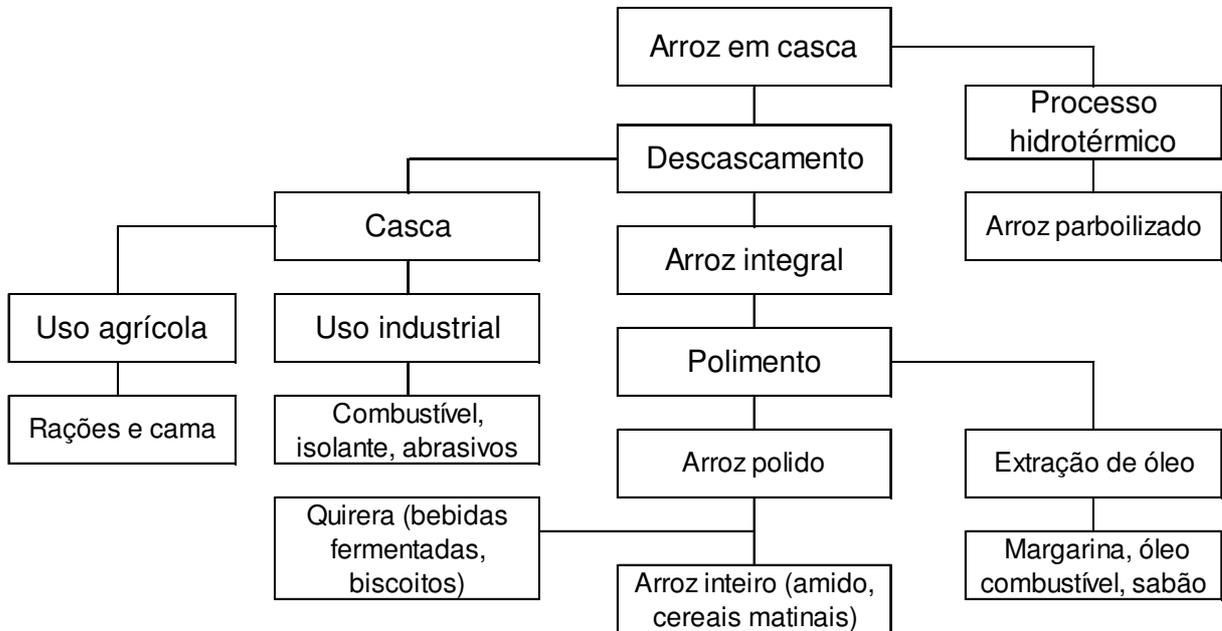


Figura 3 – Esquema da industrialização de produtos obtidos do processamento industrial do arroz (adaptado de KOBLITZ, 2011).

2.1.2.3 Composição e importância nutricional

No Brasil, o consumo *per capita* de arroz é de 108 g ao dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídeos da dieta. (KOBLITZ, 2011).

Os carboidratos são os principais componentes do arroz. Além do amido, que corresponde a 90% da matéria seca do arroz polido, também estão presentes açúcares livres e fibra. Quanto à fração proteica, embora considerada baixa, apresenta a melhor composição de aminoácidos para o metabolismo humano, dentre todos os cereais. (KOBLITZ, 2011).

Assim como os demais cereais, o arroz apresenta concentrações apreciáveis de vitaminas do complexo B e de vitamina E. No entanto, essas substâncias, juntamente com os minerais, concentram-se nas camadas mais externas dos grãos,

sendo retiradas durante o processo de beneficiamento, causando uma grande redução no seu valor nutricional. (KOBBLITZ, 2011).

2.1.3 Milho

2.1.3.1 Origem e importância econômica

O milho (*Zea mays L.*) é uma planta nativa das Américas e constitui o mais importante cereal desse continente. Segundo estudos arqueológicos, o milho se originou no México e a partir deste país, se disseminou ao sul e ao norte, sendo encontrado da Argentina ao Canadá. (KOBBLITZ, 2011). Logo após a descoberta da América, o milho foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins como planta exótica e ornamental. Uma vez reconhecido seu valor nutricional, passou a ser cultivado como planta econômica e difundiu-se para a Ásia e África. (ALESSI et al, 2003).

Atualmente, o milho é praticamente cultivado no mundo todo, exceto em regiões que apresentam limitações climáticas, (ALESSI et al, 2003), sendo um dos cereais mais cultivados pelo homem, devido a sua ampla adaptação a diversos ambientes, altos rendimentos na lavoura e composição dos grãos favorável a inúmeras utilizações. (MUNDSTOCK, 2006).

Trata-se de uma cultura importante na economia brasileira, sendo este grão plantado em grandes áreas de norte a sul. (GARCIA et al, 2006). No entanto, 70% da produção nacional concentra-se nos estados das regiões sul e sudeste, sendo o Paraná o principal produtor brasileiro. O RS ocupa a 4ª posição, atrás de Minas Gerais e São Paulo, e responde ainda por aproximadamente 16% do consumo nacional do milho. (PINAZZA, 2007b).

A importância do milho não está apenas na produção de uma cultura, mas em todo o relacionamento que esta tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais. (MAGALHÃES et al, 2002).

Devido à versatilidade da sua utilização, a cadeia produtiva do milho é um dos segmentos mais importantes do agronegócio brasileiro. (MAGALHÃES et al, 2002). Considerando apenas a produção primária, o milho responde por cerca de 37% da produção nacional de grãos. Ao mesmo tempo, é insumo básico para a avicultura e a suinocultura, dois setores extremamente competitivos em nível internacional e grandes geradores de receitas. (PINAZZA, 2007b).

Apesar da sua importância, a cadeia produtiva do grão ainda é muito desorganizada. Um dos resultados desse processo tem sido a queda da área plantada com milho (1ª safra), a qual vem sendo substituída pelo cultivo da soja, o que não é positivo para o setor, uma vez que o crescimento da área plantada e da produtividade do grão é crucial para a competitividade do segmento de carnes, que tem no milho a principal matéria-prima para a produção de ração. (PINAZZA, 2007b).

Da produção mundial de milho, em torno de apenas 10% são comercializados internacionalmente, o que prova que o milho é uma cultura de consumo doméstico. (KOBBLITZ, 2011). No entanto, para atender a crescente demanda por ração animal, desde 2007 a produção brasileira de milho tem sido acima dos 50 milhões de toneladas, chegando, na safra 2009/2010, a 56 milhões de toneladas. (AVISITE, 2011; CONAB, 2010).

A projeção da produção brasileira de milho na safra 2014/2015, é de 70 milhões de toneladas, o que tornaria o Brasil um exportador deste grão. (PINAZZA, 2007b). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, logo depois dos EUA, responsável por mais de 50% da quantidade comercializada internacionalmente, e da China. (KOBBLITZ, 2011). Os principais consumidores são o Japão, a Coreia do Sul, o México e o Egito. (GARCIA et al, 2006; PAES, 2006; PINAZZA, 2007b).

2.1.3.2 Produção e processos industriais

A importância desse cereal não se restringe ao fato do milho ser produzido em grande volume e sobre imensa área cultivada, mas, também, pelo fato de possuir uma gama de aplicações tanto na alimentação humana quanto animal (MUNDSTOCK, 2006).

O milho é o cereal que mais constitui matéria-prima básica para uma série enorme de produtos industrializados, criando e movimentando grandes complexos industriais, onde milhares de empregos são criados. É utilizado, não somente na alimentação humana e animal, mas também na indústria farmacêutica, bélica e aérea. (ALESSI et al, 2003).

Embora seja versátil em sua utilização, a produção de milho tem acompanhado basicamente o crescimento da criação de suínos e aves, tanto em nível mundial quanto nacional (CRUZ et al, 2006), uma vez que o emprego do milho em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 60 a 80% da produção brasileira e 70% da produção mundial. (ALESSI et al, 2003; CRUZ et al, 2006; GARCIA et al, 2006; PAES 2006).

O milho destinado a industrialização nos EUA atinge volumes extraordinários, em contraste com o Brasil. Cerca de 80 milhões de toneladas são industrializadas anualmente nos EUA, e destas, 20 milhões para a obtenção de frutose. No Brasil, apenas uma pequena parcela da produção é processada pelas indústrias para consumo humano. Um total de 40% permanece nas propriedades rurais e dos 60% comercializado, a maior parte (70 a 80%) é transformada em rações para animais e muito pouco é destinado a produção de alimentos para consumo humano. (ALESSI et al, 2003; GARCIA, et al, 2006).

Na Tabela 2, estão listados alguns produtos produzidos a partir do milho e os seus destinos.

O milho não está integrado ao hábito alimentar de toda a população brasileira e apenas 15% da produção nacional se destina ao consumo humano, não sendo explorado o grande potencial que apresenta para a obtenção de uma gama enorme de produtos através de uma industrialização ampla e sofisticada, tal qual em países desenvolvidos.

Mesmo para o consumo humano, o milho necessita de alguma transformação. À exceção do consumo, quando os grãos estão em estado leitoso (verde), os grãos secos não podem ser consumidos diretamente pelos seres humanos. (GARCIA et al, 2006). Assim, o milho é muito utilizado para preparo de diversos produtos e entre os de maior consumo no Brasil estão a farinha, a canjica e o fubá. A diferenciação entre os produtos, além da qualidade do milho usado, está apenas no tamanho da partícula. O amido de milho é ainda empregado como excipiente na maioria dos comprimidos produzidos por indústrias farmacêuticas. (ALESSI et al, 2003).

Tabela 2 – Destino dos produtos fabricados a partir do milho (grão) (adaptado de GARCIA et al, 2006).

Matéria-prima	Destino	Forma/Produto final
Milho	Uso animal direto ou ração	Grãos inteiros ou desintegrados e rações para aves, suínos e bovinos
	Uso humano direto	Espiga assada ou cozida, pamonha, curau, pipoca, pães, bolos, broas, cuscuz, polenta
	Indústria de alimentos	Amidos, fubás, farinhas comuns, farinhas pré-cozidas, flocadas, canjicas, óleo, pipoca, glicose, canjicas, sêmolos, semolina, farelo de germe, goma de mascar, balas, embutidos cárneos, compotas, biscoitos, sorvetes
	Aditivos alimentares	Aromas, essências, pós para pudins, produtos achocolatados, fermento em pó,
	Outros	Adesivos (rotulagem de latas e garrafas), beneficiamento de minérios, lixa, abrasivo, engomagens de tecidos

O milho pode ser industrializado através dos processos de moagem úmida e seca, sendo esse último o mais utilizado no Brasil. Desse processo resultam subprodutos como a farinha de milho, canjica, fubá mimoso e quirera empregados para uso na alimentação humana, os farelos para rações e o óleo, entre outros, conforme pode ser visualizado na Figura 4. O processamento industrial do milho rende, em média, 5% do seu peso na forma de óleo. Através do processo de moagem úmida, o principal subproduto obtido é o amido. (GARCIA et al, 2006).

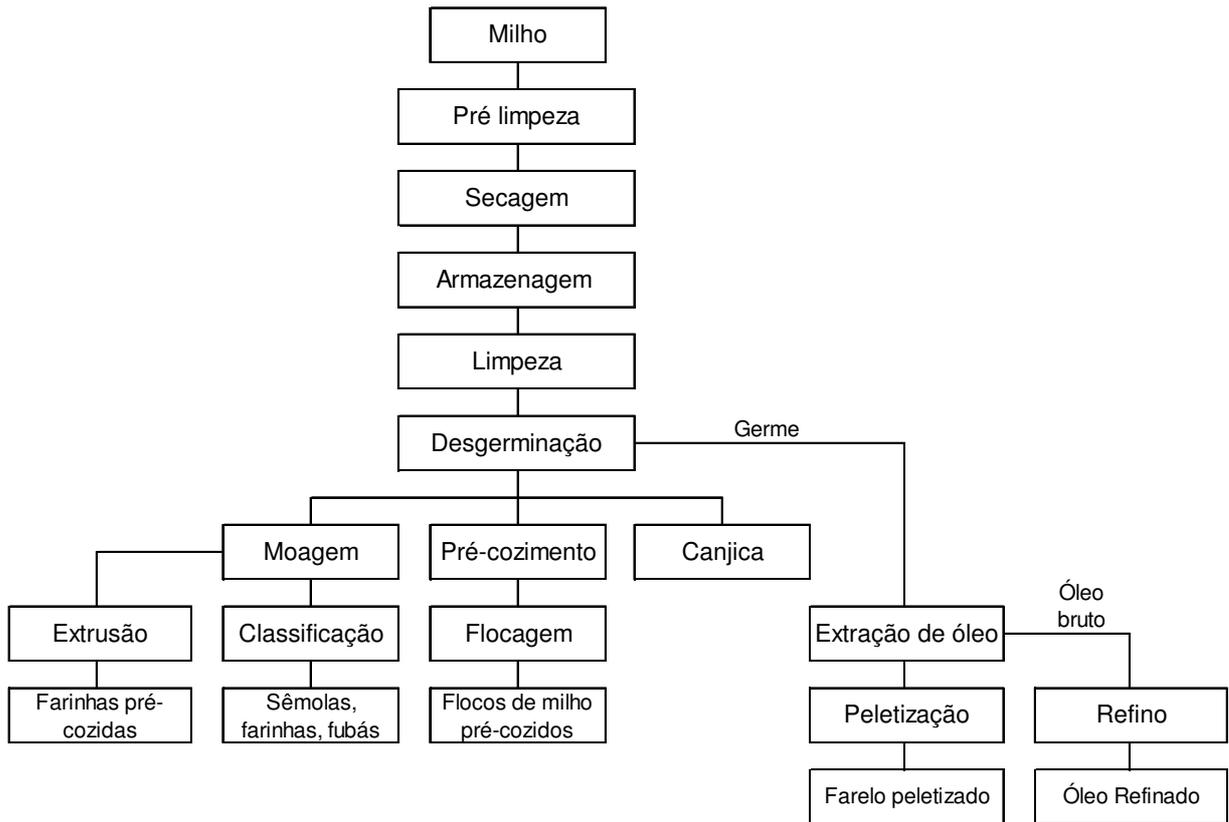


Figura 4 – Esquema da industrialização de diversos produtos a base de milho através da moagem a seco (adaptado de PINAZZA, 2007b).

O processo industrial da moagem a seco é relativamente simples, não exigindo grandes investimentos em termos tecnológicos. A indústria da moagem a seco divide-se em três segmentos:

- Indústria moageira que fabrica diversos produtos como canjica, fubá de milho, farinha, floculados e óleos, entre outros;
- Indústria de salgadinhos: indústria bastante concentrada, sendo a Elma Chips a líder neste segmento;
- Indústria de cereais matinais: indústria bastante concentrada, que apresenta um padrão de concorrência baseado em diferenciação de produto. As líderes neste segmento são Kellogg's[®], Nestlé[®] e Nutrifoods[®]. (PINAZZA, 2007b).

2.1.3.2.1 Cereais matinais

O consumo de cereais matinais tem aumentado muito nos últimos anos devido à necessidade de se obter produtos de preparo rápido, tendo em vista a falta de tempo da vida moderna, mas, principalmente, pela informação divulgada dos benefícios nutricionais que oferecem à saúde. (EQUILÍBRIO NUTRICIONAL, 2011; TAKEUCHI, 2005).

Os cereais matinais são produtos extrusados com alto teor de proteína, carboidratos (especialmente o amido) e fibras, podendo ser enriquecido com vitaminas e sais minerais aumentando seu valor nutritivo. (EQUILÍBRIO NUTRICIONAL, 2011; TAKEUCHI, 2005).

No processo de extrusão, os ingredientes (principalmente os flocos de milho) são misturados com compostos de aroma e sabor, e aditivos tais como malte, sal e açúcar, que sob a influência de calor, umidade, pressão e cisalhamento são transformados em uma massa viscoelástica, a fim de ampliar as possibilidades de elaboração de alimentos básicos ou alternativos, em alimentos de distinta forma, textura, cor e aroma, que agradem a todo o público consumidor. (BORBA et al, 2005; EQUILÍBRIO NUTRICIONAL, 2011; TAKEUCHI, 2005).

2.1.3.3 Composição e importância nutricional

Na região nordeste do Brasil, o milho é ainda a principal fonte de energia para muitas pessoas que vivem no semiárido e, em algumas situações, constitui o único alimento diário destas. (CRUZ et al, 2006)

O milho, na forma pura, ou como ingrediente de outros produtos, é uma importante fonte energética para o ser humano, rico em carboidratos, essencialmente o amido (em torno de 60%), de onde se deriva sua classificação como alimento energético. Contêm ainda proteínas, vitaminas e sais minerais, óleo e grandes quantidades de açúcares, gorduras, celulose e calorias. (KUSSUMI, 2007; MUNDSTOCK, 2006).

A proteína presente nesse cereal, a zeína, embora em quantidade significativa, possui qualidade inferior a de outras fontes vegetais e animais. Entretanto, o óleo de milho possui uma composição de ácidos graxos que o define como de grande importância para a dieta humana, principalmente para a prevenção de doenças cardiovasculares e o combate ao colesterol sérico elevado. (PAES, 2006).

2.2 Pesticidas

O termo pesticida pode ser definido como toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal, ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfoliantes, dessecantes ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte. (BELDOMÉNICO et al, 2005; PIZZUTTI, 2006).

2.2.1 Histórico

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pestes, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. A utilização de pesticidas no controle de pragas data do período clássico da Grécia e Roma, sendo o mais antigo registro atribuído aos sumérios que, em 2500 a. C., utilizavam enxofre para combater insetos. (BARBOSA, 2004).

O próximo registro histórico data do século XVII, quando se empregou pela primeira vez a nicotina das folhas de tabaco para controlar os insetos das árvores.

Em 1860, os sais de cobre e de arsênio foram empregados no controle de besouros em batatas, no Colorado, EUA. (KAUSHIK; KAUSHIK, 2007).

Já em 1867, o acetoarsenito de cobre, conhecido pelo nome de Verde Paris, foi preparado comercialmente e indicado no controle de uma grande variedade de pragas. Depois surgiu o arseniato de chumbo utilizado como inseticida a partir de 1894, o dinitro-o-cresol em 1925, e o sulfato de tálio em 1930. (LARINI, 1999).

No século XX, muitos pesticidas serviram de arma química nas guerras da Coreia e do Vietnã, como, por exemplo, o Agente Laranja (mistura de 2,4 D e 2,4,5 T), desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis. (LARINI, 1999).

Desde a década de 1940, os países industrializados começaram a empregar pesticidas sintéticos com o objetivo de aumentar a produção agrícola. O primeiro pesticida sintético a ser utilizado de forma massiva foi o inseticida organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT), em 1942, para fins de saúde pública, atuando no combate de vetores da malária. Após, foi empregado com grande êxito para combater as pragas na agricultura. (BELDOMÉNICO et al, 2005).

Na década de 1970, ocorreu a utilização de pesticidas na agricultura nacional em larga escala. Neste mesmo período, o DDT foi banido em vários países, quando estudos revelaram que os resíduos desses compostos eram de alto impacto ambiental e persistiam ao longo de toda a cadeia alimentar, contaminando inclusive o leite materno. (BELDOMÉNICO et al, 2005).

No Brasil, somente em 1992, após intensas pressões sociais, foram banidas as formulações à base de cloro (como BHC, Aldrin, Lindano), assim como o Amitraz, entre outros compostos. A lei nº 7802, aprovada em 1989, que regula os pesticidas, proíbe o registro de produtos que possam provocar câncer, defeitos na criança em gestação (teratogênese) e nas células (mutagênese). Mas produtos que já haviam sido proibidos continuam sendo comercializados ilegalmente.

Já alguns ditiocarbamatos como, por exemplo, o mancozebe, e o herbicida paraquat embora proibidos em vários países, são muito empregados no Brasil.

Em 2011, a Universidade Federal do Mato Grosso publicou os resultados obtidos do monitoramento de leite materno. Foram coletadas amostras de leite de 62 mulheres, 3 delas da zona rural da cidade de Lucas do Rio Verde, MT, entre fevereiro e junho de 2010. Em todas as amostras, foi encontrado, pelo menos, um tipo de pesticida, como o diclorodifeniletileno (DDE), proibido desde 1998. Em 76% das amostras foi detectado o Endossulfam, que deixará de ser empregado a partir

de julho de 2013. No entanto, o mais surpreendente é que em algumas amostras, havia até seis tipos de pesticidas. (ECODEBATE, 2011; GLOBO, 2011).

2.2.2 Utilização e comércio

Os pesticidas são utilizados em grande escala por vários setores produtivos: na agropecuária, no tratamento de madeiras, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, como domissanitários no combate às endemias e epidemias, entre outras utilizações que excedem em muito aquilo que comumente se conhece. (SILVA et al, 2006).

A agricultura é de longe o setor que mais utiliza pesticidas. De fato, a capacidade atual dos países desenvolvidos de produzir e colher grandes quantidades de alimentos em áreas relativamente pequenas, com participação reduzida de trabalho humano, tem sido possível graças ao emprego de pesticidas. (BAIRD, 2002).

Apesar dos riscos, os gastos mundiais com pesticidas crescem continuamente e passaram de US\$ 20 bilhões em 1983 para US\$ 34,1 bilhões ao longo dos anos 1990. (SILVA et al, 2006). No Brasil, este mercado triplicou nos últimos anos. Em 2006, o comércio totalizou 3,9 bilhões de dólares, de acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG). O Brasil, desde 2008, é o maior utilizador de pesticidas do mundo, gastando, no ano de 2008, cerca de 7,1 bilhões de dólares nessas negociações, frente a 6,6 bilhões do segundo colocado, os EUA. (IBAMA, 2010; SINDAG, 2009).

O aumento pode ter a ver também com o crescente emprego de tecnologias no campo, pois quanto mais avançado é o sistema produtivo, maior é o consumo de pesticidas. No entanto, cabe lembrar que é necessário fazer um balanço entre os riscos e os benefícios da sua utilização. Atualmente, há 450 ingredientes ativos empregados na produção de pesticidas, registrados no Brasil, pela ANVISA. (SINDAG, 2009).

A indústria que fabrica pesticidas registrou em 2010 o melhor ano de vendas da história do setor. Conforme levantamento do SINDAG, o segmento faturou 7,24 bilhões de dólares, resultado 9% acima do registrado em 2009, superando o

desempenho de 2008, melhor resultado registrado pela indústria até então, quando o setor comercializou 7,1 bilhões de dólares. Com exceção do segmento de acaricidas, que encolheu 18%, todos os demais setores apresentaram crescimento em suas vendas. Mais uma vez, os fungicidas se destacaram com aumento de 21% em comparação a 2009, totalizando 2,17 bilhões de dólares. Com esse resultado, os fungicidas se igualaram em importância aos inseticidas, que registraram o mesmo volume de vendas, com crescimento de 9% sobre o ano anterior. Apesar de ter encolhido 22% em 2009 e crescido de forma modesta em 2010 (1%), o segmento de herbicidas ainda se mantém como o maior segmento. Em 2010, as vendas da categoria subiram para US\$ 2,53 bilhões, mas ainda não retomaram o patamar de 2008, quando a receita obtida com os herbicidas foi de 3,2 bilhões de dólares. (SINDAG, 2011).

Em âmbito nacional, os estados que mais empregaram pesticidas em 2009, pela quantidade de ingrediente ativo vendidos neste ano, foram, em primeiro lugar, o estado do Mato Grosso do Sul, seguido de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Minas Gerais, Bahia, Santa Catarina e Maranhão. (IBAMA, 2010).

2.2.3 Classificação

Os pesticidas podem ser classificados quanto: ao tipo de organismo que se deseja controlar; ao grupo químico ou a toxicidade aguda. (BELDOMÉNICO et al, 2005; KUSSUMI, 2007).

Entre os grupos químicos mais utilizados encontram-se os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, ditiocarbamatos e benzimidazóis. (KUSSUMI, 2007). Na Tabela 3, pode ser observada a classificação dos pesticidas sintéticos quanto ao grupo químico.

Tabela 3 – Classificação dos pesticidas sintéticos quanto à estrutura química (adaptado de BELDOMÉNICO et al, 2005).

	Grupo químico	Subgrupo químico e exemplos
Inseticidas	Organoclorado	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)
		Hexaclorocicloexano (isômeros HCH)
		Ciclodieno (clordano, heptacloro, aldrim e dieldrim)
	Organofosforado	Ácido fosfórico (monocrotofós e clorfenvinfós)
		Ácido tiofosfórico (parationa e clorpirifós)
Carbamatos	Ácido carbâmico (aldicarbe, carbofurano e carbaril)	
Piretróides	Ésteres do ácido crisantêmico sintético (aletrina, permetrina e deltametrina)	
Herbicidas	Ácidos carboxílicos	2,4 D e picloram
	Carbamatos aromáticos	Clorprofam
	Uréias	Monorum, diurom e linurom
	Triazinas substituídas	Atrazina e simazina
	Bipiridilo	Paraquate e diquate
	Fosfonatos	Glifosato
Fungicidas	Fenol	pentaclorofenol
	Sulfonamida	p-aminobenzeno
	Triazol	Diniconazol e hexaconazol
	Benzimidazol	Benomil e tiabendazol
	Ditiocarbamatos	Etileno-bisditiocarbamto: mancozebe e tiram

Neste trabalho, além do desenvolvimento e validação do método individual para determinação de ditiocarbamato, estudou-se também um método mutirresidual para 75 pesticidas, onde 40% destes são inseticidas organofosforados e fungicidas triazóis. A seguir será abordado brevemente alguns aspetos destas 3 classes.

2.2.3.1 Organofosforados

Em 2009, foram comercializados 90,5 toneladas de inseticidas no Brasil, compreendendo 380 marcas comerciais. Os principais princípios ativos mais vendidos foram: imidacloprido, clorpirifós, bifentrina, tiametozam, carbosulfam, cialotina, diflubenzurona, cipermetrina, carbofurano e metamidofós.

O metamidofós, pertencente à classe dos organofosforados, está registrado no Brasil, para sete culturas. É uma substância altamente transportável, persistente e tóxica para os organismos do solo, pássaros e abelhas, e classificado pela ANVISA como extremamente tóxico. No entanto, deverá sair do mercado brasileiro até 2013, pois após uma reavaliação toxicológica, foi comprovado o seu risco a saúde humana, por causar transtornos aos sistemas neurológico, imunológico, endócrino e reprodutor, bem como ao desenvolvimento do feto. (IBAMA, 2010; IDEC, 2011).

Os compostos da família dos organofosforados são todos derivados do ácido fosfórico, com a possibilidade de distintas formas de substituição, gerando uma grande variedade de compostos. (BELDOMÉNICO et al, 2005).

O mecanismo de ação destes compostos se dá pela inibição de várias enzimas, mas principalmente, da acetilcolinesterase (AChE), impossibilitando-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. A AChE está presente no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e também nos eritrócitos. Inativa a acetilcolina, responsável pela transmissão do impulso nervoso no SNC. (BELDOMÉNICO et al, 2005; SAÚDE, 2011).

Os principais sinais e sintomas da intoxicação aguda por inseticidas vão desde falta de apetite, náuseas, vômitos, diarreia, dificuldade respiratória, dor torácica; lacrimejamento, salivação e sudorese, até tremores, câimbras, fraqueza, ausência de reflexos, paralisia muscular, sonolência, confusão mental, fraqueza generalizada, depressão do centro respiratório, convulsões e coma. (SAÚDE, 2011).

2.2.3.2 Triazóis

Os fungicidas são compostos químicos empregados no controle de doenças de plantas causadas por fungos, bactérias ou algas. Atualmente, tem-se notado um aumento na prática da utilização de fungicidas no controle de doenças e plantas. Grandes culturas como soja e milho têm recebido no campo pulverização destas substâncias visando reduzir o progresso de manchas foliares. (JULIATTI, 2011).

A maioria dos fungicidas apresenta baixa toxicidade para os mamíferos, sendo seu impacto principal a toxicidade para os microrganismos do solo. Em 2009, 35,7 toneladas de fungicidas, de 87 ingredientes ativos, distribuídos em 325 marcas comerciais, foram comercializadas no Brasil. Na primeira colocação dos principais fungicidas orgânicos mais vendidos encontra-se o carbendazim, seguido do tiofanato metílico, mancozebe, tebuconazol, clorotalonil, piraclostrobina e metiram. (IBAMA, 2010).

Os triazóis são compostos orgânicos de ação sistêmica, permitem o acesso do princípio ativo a partes não expostas, e que apresenta elevada fungitoxicidade a inúmeros patógenos. (GHELLER, 2011).

Dentre os modernos fungicidas triazóis tem-se desde compostos extremamente seletivos e de alta translocação na planta até os menos seletivos e de baixa translocação. A relação entre a rápida translocação e a ação do fungicida na planta depende da sua lipossolubilidade e da sua hidrossolubilidade. (JULIATTI, 2011).

2.2.3.3 Ditiocarbamatos

Em 1942, Tisdale e Flener estudaram a ação dos derivados do ácido ditiocarbâmico com atividade fungicida. Como consequência, foi lançado no mercado o Dithane (nome comercial do princípio ativo mancozebe), precursor de outros compostos similares com atividade fungicida. (LARINI, 1999).

A sua principal utilização é na agricultura como fungicida de ação não sistêmica, inibindo apenas enzimas essenciais. Os ditiocarbamatos são empregados

de maneira efetiva contra um amplo espectro de fungos e bactérias patogênicas, em grande variedade de frutas, hortaliças e cereais, e devido a baixa toxicidade, combinado com forte atividade, baixo custo e curta persistência ambiental, a utilização dos ditiocarbamatos continua crescendo no mundo todo. (CALDAS et al, 2001; VRYZAS et al, 2002).

Este grupo apresenta outras aplicações além das agroquímicas. Devido as suas propriedades quelantes, os ditiocarbamatos são empregados como sequestrantes em tratamento de efluentes e por apresentarem uma alta atividade anti-viológica podem ainda ser empregados na medicina. O tiram, incorporado a sabonetes e loções, tem sido utilizado desde 1942 no tratamento de algumas dermatites tanto para uso humano quanto veterinário. (SILVA, 2005).

Os compostos pertencentes ao subgrupo etilenobisditiocarbamato apresentam as seguintes características: capacidade de liberar CS_2 , biotransformar-se em etilenotiureia (ETU) e habilidade de complexar íons. (EPA, 2001).

O principal subgrupo dos ditiocarbamatos são os etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), os quais podem formar quelatos poliméricos e são insolúveis tanto em água quanto em solventes orgânicos (BONNECHÈRE et al, 2011) O subgrupo dos EBDCs é notado pela alta instabilidade no meio ambiente ao quais são, geralmente, instáveis na presença de umidade, oxigênio e nos sistemas biológicos (GARCINUÑO et al, 2004b).

2.2.4 Toxicidade

Atualmente, muita atenção tem sido dada aos efeitos adversos dos pesticidas à saúde do homem e ao meio ambiente, pois durante a fase de produção dos alimentos, diversos produtos químicos são utilizados para garantir maior rendimento na colheita.

O emprego de pesticidas ainda é a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, a fim de garantir alimento suficiente e de qualidade para a população. No entanto, a elevada utilização de pesticidas sem os cuidados necessários, tem contribuído tanto para a degradação ambiental quanto para problemas na saúde dos trabalhadores rurais. Em geral, essas conseqüências

são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o emprego inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos e a falta de utilização de equipamentos de proteção bem como a falta de conhecimento dos riscos. (PIZZUTTI, 2006).

Os pesticidas atuam sobre determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar, no entanto, determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode atingir não somente o organismo que se espera controlar, como também outros organismos não alvo. (BAIRD, 2002).

Dados toxicológicos relacionados à nocividade de uma substância para um organismo são coletados mais facilmente determinando-se sua toxicidade aguda, que é o início rápido de sintomas que se seguem à absorção de uma dose da substância. No entanto, na toxicologia ambiental, as exposições crônicas são mais relevantes uma vez que levam em conta a exposição a doses individuais relativamente baixas de um produto químico tóxico presente no ar que respiramos, na água que bebemos ou nos alimentos que comemos, ao longo do tempo. (BAIRD, 2002).

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e os pesticidas podem acumular-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. (BAIRD, 2002).

A contaminação do homem por pesticidas pode ocorrer de duas maneiras: direta ou indireta. A primeira é consequência da exposição ocupacional que se dá principalmente entre os trabalhadores das indústrias fabricantes de pesticidas e os agricultores. Por exemplo, o simples fato de proteger as mãos (5,6% da superfície corpórea), durante a aplicação de pesticidas reduz a exposição de 30 a 80%. (ARAÚJO, 2001).

A forma indireta resulta da exposição da população aos pesticidas devido a acidentes, contaminação do ambiente, quer seja por resíduos industriais ou por aplicação dessas substâncias, ou ainda em consequência do consumo de alimentos contaminados por resíduos dessas substâncias. (ARAÚJO, 2001).

Em relação à classificação toxicológica dessas substâncias, os rótulos dos produtos comercializados no Brasil devem obrigatoriamente apresentar uma faixa que, de acordo com a cor, indica a classe toxicológica de cada pesticida (ARAÚJO, 2001; FAO, 1995), conforme demonstrado na Figura 5.

Classe I a	EXTREMAMENTE TÓXICO
Classe I b	ALTAMENTE TÓXICO
Classe II	MODERADAMENTE TÓXICO
Classe III	FRACAMENTE TÓXICO
Classe IV	POUCO TÓXICO

Figura 5 – Classificação toxicológica presente nos rótulos dos frascos de pesticidas. (adaptado de FAO, 1995).

Várias constatações foram feitas com trabalhadores rurais, que demonstraram relação entre a exposição crônica a pesticidas e doenças, principalmente do sistema nervoso central e periférico. Além disso, também ocorrem episódios de intoxicação aguda, colocando em risco a vida dos trabalhadores rurais.

Os riscos não se limitam ao homem do campo. Os resíduos das aplicações atingem os mananciais de água, o solo e o ar.

Os efeitos para o meio ambiente, ocasionados por um pesticida, dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e quáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente. (KURZ, 2007).

As intoxicações por ditiocarbamatos freqüentemente ocorrem através das vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos pela via cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite. (EPA, 2001).

Apesar de apresentarem baixa toxicidade aguda, o manuseio dessa classe de fungicidas merece cuidados especiais em virtude da possível presença de metabólitos extremamente injuriosos, como, por exemplo, a ETU.

Segundo estudo da Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA – EUA), animais de laboratório expostos a ditiocarbamatos apresentaram neuropatologias, tireoidismo e distúrbios no sistema nervoso central. Esses estudos sugerem que esses efeitos podem estar associados à formação de um metabólito em comum: o

CS₂, pois é conhecido que este induz a neuropatologias (EPA, 2001). O CS₂ pode causar ainda decréscimo no nível de testosterona sérica, mudanças degenerativas no tecido testicular, afetar a espermatogênese e provocar alterações epidídimas. (KSHEERASAGAR; KALIWAL, 2003).

Diversos estudos associam a exposição aos pesticidas comuns a inúmeras doenças, de asma a câncer, com destaque de maior risco para alguns grupos de pessoas como agricultores e as de fraca imunologia como idosos e crianças. (KUSSUMI, 2007).

De modo geral, os organofosforados podem causar muitos tipos de efeitos nos seres humanos desde falta de memória, tonturas, fadigas e dores de cabeça até disfunções pulmonares e respiratórias, inibição de atividades enzimáticas, depressão e câncer de fígado. (PIZZUTTI, 2006).

2.2.5 Limites Máximos de Resíduos (LMR)

Resíduos são definidos como qualquer substância presente nos alimentos ou ração animal resultante do uso de algum pesticida. Essa definição inclui qualquer produto de conversão, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas de relevância toxicológica. (BLUME; REICHERT, 2002).

Limites Máximos de Resíduos (LMR) é definido pela legislação nacional como a quantidade máxima de resíduos de pesticidas legalmente aceita nos alimentos, geralmente expressa em mg kg⁻¹, em decorrência da aplicação adequada de um produto numa fase específica da cultura, desde a sua produção até o seu consumo. No caso dos ditiocarbamatos o LMR é expresso em mg CS₂ kg⁻¹. Isto se deve ao fato de que todos os compostos pertencentes à classe dos ditiocarbamatos formam CS₂. (ANVISA, 2011).

O objetivo principal de estabelecer o LMR é garantir, com certa segurança, que a população ao consumir produtos cujos níveis de resíduos de pesticidas estejam dentro dos limites estabelecidos não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter nenhum problema de saúde associado a esta ingesta. (KUSSUMI, 2007; SILVA, 2005).

O emprego correto e eficaz de pesticidas na agricultura deve ser feito considerando os riscos toxicológicos envolvidos na aplicação, de modo que os resíduos sejam os menores possíveis e dentro dos LMR aceitáveis. A observância do período de carência, que corresponde ao intervalo entre a última aplicação e a colheita, pode prevenir o aparecimento de resíduos de pesticidas superiores aos LMR. (KUSSUMI, 2007).

Quando os pesticidas estão em níveis de concentração superiores aos LMR significa que houve violação das BPA. Se os LMR são excedidos, comparados a exposição da Ingestão Diária Aceitável (IDA) e/ou Dose de Referência (DRf), serão indicativos de um possível risco de contaminação crônica ou aguda. Os alimentos ou produtos agrícolas que estão de acordo com os LMR são considerados toxicologicamente aceitáveis. (KUSSUMI, 2007).

2.3 Métodos para determinação de pesticidas

Os alimentos estão expostos a uma enorme variedade de perigos, sendo os perigos químicos os de maior importância em alimentos, levando a população a sentir uma grande preocupação em relação a segurança alimentar, embora os órgãos competentes ainda não deem a devida atenção a este assunto.

O emprego indiscriminado de pesticidas tem feito com que sejam detectados resíduos destes nos mais variados tipos de matrizes.

A determinação de pesticidas consiste nas seguintes principais etapas: amostragem, processamento da amostra (extração dos analitos e purificação, quando necessário) e análise instrumental (identificação e quantificação). A cromatografia, associada a detectores, é a técnica mais utilizada para a separação, identificação e quantificação de pesticidas. (PINHO, 2009).

A escolha de um método analítico correto para este tipo de determinação é de suma importância, devido, principalmente, a garantir alimentos seguros para a população.

Os LMR para pesticidas da legislação brasileira diferem quando comparados com os de outros organismos internacionais como, por exemplo, o *Codex Alimentarius*. Assim, para produtos destinados a exportação, como por exemplo,

grãos, os LMR a ser obedecidos são referentes aos países de destino do produto, muitas vezes menores que os estabelecidos para o mercado brasileiro. (KUSSUMI, 2007).

Nos anos de 1950, os métodos espectrofotométricos eram amplamente empregados neste tipo de determinações que, associados a simples reações de formação de complexos, possibilitavam a detecção destes compostos. No entanto, ainda naquela década, os resíduos de pesticidas passaram a ser analisados por GC, (ERICKSON, 1999), e atualmente a técnica que mais tem sido escolhida é a LC-MS/MS, especialmente quando se trata de método multirresidual.

2.3.1 Métodos individuais

A elevada instabilidade na presença de umidade e oxigênio torna os fungicidas ditiocarbamatos difíceis de ser analisados, e devido a necessidade de hidrólise prévia a quantificação do CS₂ estes são analisados individualmente.

Sabendo-se da utilização em larga escala dos ditiocarbamatos como fungicidas, em ampla variedade de culturas agrícolas, muitos métodos analíticos estão sendo desenvolvidos para permitir tais determinações, em diferentes amostras, empregando variadas técnicas. (BERRADA et al, 2010).

Muitos desses métodos estão baseados na hidrólise ácida dos ditiocarbamatos empregando HCl na presença de SnCl₂, como proposto por Keppel (1971). Modificações do método original têm sido relatadas principalmente em relação ao pré-tratamento da amostra, com o objetivo de reduzir o tempo e as dificuldades do método de Keppel, além da preocupação ambiental, uma vez que o método original utiliza acetato de chumbo. No entanto, a maioria dos métodos comumente empregados ainda baseia-se na detecção do CS₂ gerado após a digestão ácida de algum ditiocarbamato presente na cultura. (GONZÁLVEZ, 2011). A partir de um mol de ditiocarbamato, sob condições ácidas e de alta temperatura, ocorre a formação de dois mol de CS₂. (HILL, 1992). Na Figura 6, está exemplificada a quebra da molécula de tiram, em meio ácido, gerando duas moléculas de CS₂. (WHO, 1988).

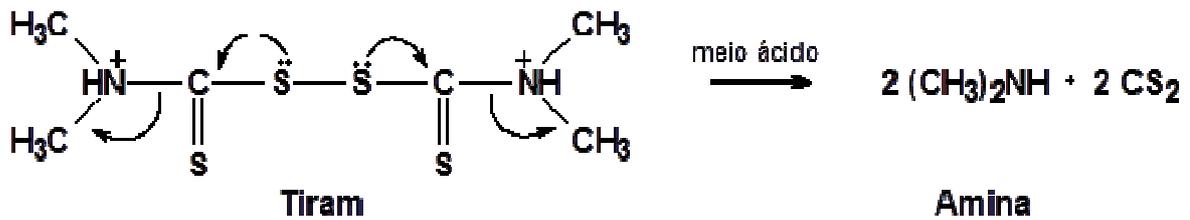


Figura 6 – Hidrólise ácida de tiram formando amina e CS₂.

A conversão entre a massa de qualquer DTC em CS₂ pode ser obtida através da Equação 1. (KEPPEL, 1971).

$$\text{CS}_2 \text{ (1 mg)} = \frac{\text{MM p.a.}}{2 \times \text{MM CS}_2} = \frac{\text{MM p.a.}}{152 \text{ g}} \quad (1)$$

Onde:

MM = massa molecular

p.a. = princípio ativo da classe dos ditiocarbamatos

Segundo Araújo (2001), o método mais antigo para determinação de ditiocarbamatos encontrado na literatura foi desenvolvido por Clarke et al, em 1951. O método proposto resume-se nas seguintes etapas: a) decomposição ácida dos ditiocarbamatos para gerar CS₂, b) absorção do CS₂ em solução alcoólica de KOH, onde ocorre a formação de xantato e, c) determinação do xantato através da titulação com iodo.

Desde então, diversos métodos foram propostos para esta finalidade, quer seja determinação direta, determinando os próprios compostos da classe dos ditiocarbamatos, ou na forma de CS₂. Muitos métodos baseados na análise espectrofotométrica (BOHRER et al, 1999; CALDAS et al, 2001; KEPPEL, 1971; KESARI; GUPTA, 1998; MALIK, 2000; PIZZUTTI et al, 2004; SILVA, 2005), por HPLC, com detecção no ultravioleta (UV) (GUSTAFSSOM; THOMPSON, 1983; IRTH et al, 1990; LO et al, 1996), fluorescência (MILES; ZHOU, 1991), por DAD (GARCINUÑO et al, 2004a) ou por espectrometria de massas (BLASCO et al, 2004;

BONNECHÈRE et al, 2011; CRNOGORAC; SCHWACK, 2007), estão presentes na literatura. Além destes, ainda há outros métodos desenvolvidos e que empregam voltametria de redissolução anódica (MATHEW et al, 1996), eletroforese capilar (LEE et al, 1997), imunoenensaio (QUEFFELEC et al, 2001), espectrometria de absorção atômica (AGARWAL et al, 2005) e infravermelho (GONZÁLVEZ et al, 2011).

A maioria dos métodos de determinação citados até então determinam individualmente os ditiocarbamatos, entretanto, a aplicabilidade destes métodos em programas de monitoramento em larga escala pode não ser prático, uma vez que a maioria dos países expressa os LMR em termos de CS₂. Assim, espectrofotometria UV-Vis ou a GC (BERRADA, et al, 2010; De KOK; Van BODEGRAVEN, 2002; HILL, 1992; KAZOS, et al, 2007; ROYER et al, 2001; SILVA, 2005; WOODROW et al 1995; VRYZAS et al, 2002) tem sido as técnicas mais utilizadas para a análise destes compostos. No entanto, o ditiocarbamto que deu origem ao CS₂ não pode ser determinado por ambos os métodos. (CALDAS et al, 2004).

Na determinação de resíduos de ditiocarbamatos, além da escolha de métodos sensíveis, é de grande importância ter cuidados especiais durante o preparo da amostra, pois se sabe que a maioria dos ditiocarbamatos é instável a umidade, oxigênio, temperatura e degradam-se facilmente em meio ácido, o que pode gerar perdas de CS₂. (GARCINUÑO et al, 2004b; KAZOS et al, 2007).

Outro cuidado importante que se deve ter na determinação de ditiocarbamatos é em relação à presença natural de CS₂ em algumas plantas, o que pode fornecer resultados errôneos (falso positivos). Um exemplo é o que ocorre com os vegetais pertencentes à família das *Brassicaceae*, principalmente a couve-flor e o repolho, que, devido à presença de compostos contendo enxofre, podem gerar naturalmente CS₂. (HILL, 1992).

2.3.2 Métodos multirresiduais

O método multirresidual para determinação de resíduos de pesticidas é normalmente adotado em laboratórios pela simplicidade de determinação de vários pesticidas, de diversas classes, e de grande número de princípios ativos, após a

extração e análise instrumental, facilitando a demanda rápida e eficiente de monitoramentos. (KUSSUMI, 2007).

O preparo da amostra é, geralmente, a fase crucial de um método multirresidual, devido a co-extração de diversos compostos e, muitas vezes, a ineficiência da extração dos analitos de interesse, como por exemplo, os pesticidas que apresentam composição química com diferentes estabilidades e polaridade, ou que muitas vezes se degradam rapidamente a seus metabólitos ou a outros produtos. (KUSSUMI, 2007).

As extrações com solventes, seguidas pelas etapas de partição líquido-líquido para os procedimentos de purificação, foram os métodos padrão em análise de resíduos por muito tempo e ainda são comumente utilizados. A principal vantagem desses, sobre os muitos e mais modernos procedimentos, é que não necessitam de equipamentos complexos e caros, e os solventes orgânicos de alta pureza são facilmente encontrados, mesmo que com preços elevados. (PIZZUTTI, 2006).

A cada ano, muitos métodos multirresiduais são disponibilizados na literatura, e os mais comumente utilizados para determinação de pesticidas em frutas e hortaliças envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila, ou acetato de etila, a partir da qual os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis e alguns pesticidas altamente polares.

No entanto, o método multirresíduo que tem sido mais amplamente empregado neste tipo de determinação é o método QuEChERS (ANASTASSIADES et al, 2003), o qual foi desenvolvido para gerar extratos que são diretamente aplicáveis tanto para as análises por GC quanto por LC. Durante o desenvolvimento desse método, grande ênfase foi colocada para a obtenção de um procedimento moderno e dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido a simplificação ou corte de etapas lentas, trabalhosas e impraticáveis.

Esse método envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguido por uma etapa de partição líquido-líquido após adição da mistura de $MgSO_4$ e NaCl, os quais facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz, e finalmente, uma etapa simples de purificação, onde o extrato é misturado com uma quantidade de adsorvente. Esse método está descrito de forma esquemática na Figura 7.

As vantagens desse método incluem a rapidez (preparo de 8 amostras em cerca de 30 min), simplicidade, confiabilidade, robustez (poucas e simples etapas), baixo custo, baixo consumo de solventes (somente 10 mL de acetonitrila), praticamente não necessita de vidrarias e cobre um amplo espectro de pesticidas extraídos (incluindo pesticidas com caráter ácido, básico e aqueles muito polares).

Atualmente, são encontradas na literatura várias modificações do método QuEChERS original (CHEN et al, 2011; CIESLIK et al, 2011; GONZÁLEZ-CURBELO et al, 2011; KOLBERG et al, 2011; LEE et al, 2011; PAREJA et al 2011; PARK et al, 2011; ROMERO-GONZÁLEZ, 2011; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011) a fim de se extrair resíduos de pesticidas das mais diferentes matrizes.

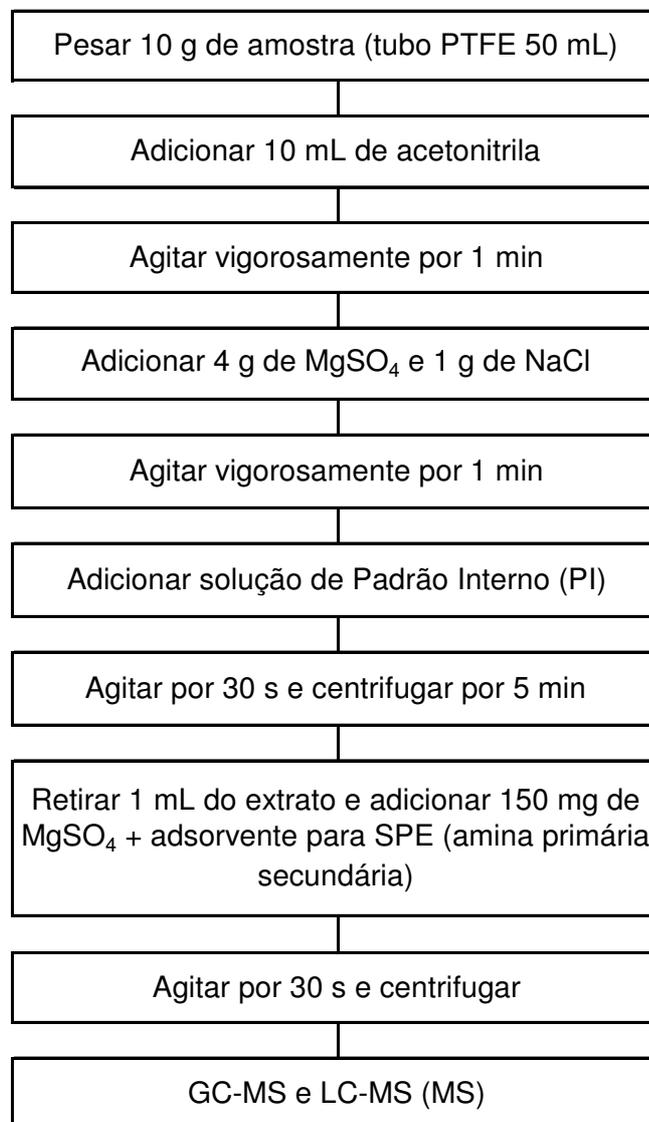


Figura 7 – Esquema da sequência do método QuEChERS.

2.3.3 Métodos de purificação

O preparo de amostras para a determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia requer a remoção completa de moléculas de alta massa molecular antes da análise cromatográfica, pois é sabido que compostos gordurosos podem reduzir fortemente o desempenho da GC devido ao acúmulo destes no injetor, na coluna e até mesmo na fonte de ionização, no caso de GC associada a MS, o que contribui em muito para a progressiva perda do desempenho do instrumento, incluindo a baixa detectabilidade. Por este motivo, a etapa de extração é usualmente seguida de um procedimento de purificação. (NAVARRO et al, 2006; SU, R et al, 2011; WU, et al, 2011).

A cromatografia por permeação em gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) foi utilizada pela primeira vez em 1972 por Tindle e Stalling para separar pesticidas de compostos gordurosos em pescados, e é, dentre as técnicas empregadas na purificação de extratos para a determinação de resíduo de pesticidas, uma das mais importantes, pois pode ser utilizada para extratos que são analisados tanto por GC como por LC, abrangendo uma vasta faixa de pesticidas. (WU, et al, 2011).

A GPC é uma técnica muito apropriada, pois separa os inúmeros co-extrativos pelos seus tamanhos moleculares relativos. No entanto, devido a algumas perdas adsorptivas de alguns pesticidas de caráter básico e separações insuficientes entre a fração gordurosa e a fração contendo pesticidas com alta massa molar, como, por exemplo, os piretróides, que são compostos lipofílicos. Associado a isto, tem-se o alto valor desta técnica, por isto outros procedimentos tem sido desenvolvido para a etapa de extração. (PIZZUTTI, 2006; WU, et al, 2011).

Os métodos amplamente utilizados para a etapa de purificação em substituição a GPC envolvem um ou combinação de alguns métodos como extração líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) dispersão da matriz em fase sólida (MSPE, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*) e dispersão em fase sólida, (dSPE, do inglês *Dispersive Solid -Phase Extraction*), utilizando diversos adsorventes, entre estes os mais comumente empregados são a sílica gel e o florisil[®]. (SU, R et al, 2011; SUBEDI et al, 2011).

Na década de 1970, foi introduzida a técnica denominada SPE utilizada para a extração e pré-concentração de pesticidas presentes em amostras aquosas. Esta técnica emprega adsorventes recheados em cartuchos de polipropileno contendo de 50 a 500 mg de adsorvente, com 46 a 60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. Na SPE a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo de um cartucho e aspirada com pequeno vácuo, percolando o cartucho. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, que é injetado no cromatógrafo. (LANÇAS, 2004).

Na dSPE, o solvente orgânico é misturado com o extrato da amostra e algumas miligramas ou gramas de adsorventes são adicionado para que ocorra a partição entre os analitos e os componentes da amostra e o solvente. Este procedimento requer menos tempo que a SPE tradicional e simultaneamente pode remover resíduos de água e interferentes da matriz. Após uma simples agitação em vortex ou centrifugação, o sobrenadante está pronto para a análise. (SATPATHY et al, 2011).

Desta forma, observa-se que a purificação de extratos orgânicos por dSPE torna-se mais simples, rápida e apresenta um custo mais baixo do que a tradicional SPE em cartucho, e por GPC. Assim, foi a técnica escolhida para os estudos de purificação dos extratos.

2.4 Técnicas analíticas

2.4.1 Cromatografia Gasosa

A GC é uma técnica que atingiu a maturidade e oferece alta capacidade de separação, tendo sua eficiência complementada por detectores, *hardware* e *software* adequados para a sua aplicação em diferentes áreas. (ZINI, 2009).

Os detectores seletivos em GC têm sua seletividade baseada nas diferentes propriedades de algumas moléculas/analito, como por exemplo, alguns átomos ou grupos funcionais. Nesta categoria encontra-se o PFPD, que fornece uma resposta

seletiva para todos aqueles compostos que contêm enxofre ou fósforo na sua estrutura. (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010a).

O acoplamento das técnicas GC-MS é uma poderosa ferramenta, sendo quase perfeita para a análise ambiental, de alimentos e de várias outras amostras de investigação, (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010b), pois juntas proporcionam uma excelente separação, detectabilidade e identificação estrutural dos compostos analisados. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

No entanto, a GC apresenta alguns inconvenientes tais como o emprego somente para a análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis, caso, contrário, há a necessidade de se formar um derivado com estas características, o que nem sempre é viável.

2.4.2 Cromatografia Líquida

Inventada a mais de um século, a LC é uma técnica analítica de separação de compostos muito bem estabelecida. A grande aplicabilidade da técnica é atribuída a sua capacidade de separação de moléculas não voláteis e termicamente frágeis, que constituem 80% dos compostos sintéticos e naturais. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

No entanto, a identificação em amostras complexas pode ser um problema para a LC usando detectores tradicionais. Compostos co-eluentes podem ser identificados por absorção molecular na região do ultravioleta (UV), ao se empregar a detecção por arranjo de diodos (DAD), porém esta técnica pode não ser específica o suficiente onde às diferenças espectrais são pequenas. Já a detecção por fluorescência pode oferecer maior seletividade e detectabilidade do que a detecção por UV, desde que os compostos sejam fluorescentes. Porém, se vários compostos necessitam ser analisados, nenhuma destas duas técnicas fornece os resultados adequados. (NUNEZ et al, 2005).

Pela combinação da MS com a LC, componentes das amostras são separados uns dos outros no tempo (por LC) e têm suas massas individuais analisadas (por MS) para isolar, identificar e quantificar qualquer componente ionizável. Desta forma, o acoplamento LC-MS tem sido utilizado com inúmeras

aplicações em vários campos da ciência e da análise química, e é usado para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como, por exemplo, as proteínas. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

2.4.3 Espectrometria de Massa

Com a MS, muitas classes, de diferentes analitos, presentes em uma enorme diversidade de matrizes, podem ser identificadas com grande precisão. Embora GC-MS seja uma técnica muito bem estabelecida para a análise de alimentos, é apropriada somente se os compostos forem voláteis e termicamente estáveis. (PIZZUTTI, 2006).

Entretanto, muitos compostos não apresentam estas características, além de muitos serem polares. Assim, esses compostos podem ser separados com sucesso através da técnica de LC que também se apresenta como uma poderosa ferramenta para análises nesta área. (PIZZUTTI, 2006).

Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a MS é atualmente uma das ferramentas analíticas mais valiosas em estudos de diversas áreas.

O fundamento da MS é a ionização das moléculas e identificação dos íons de acordo com a relação massa/carga (m/z). A formação de íons é uma etapa crítica de qualquer aplicação da MS, pois, independentemente do analisador, a análise de massas requer íons. Os principais componentes são a fonte de ionização e o analisador de massas. (PRIMER, 2001).

Os itens 2.4.3.1, 2.4.3.2 e 2.4.3.3 abordam sucinta e respectivamente as fontes de ionização, analisadores de massas e detectores utilizados na execução deste estudo.

2.4.3.1 Modos de Ionização

2.4.3.1.1 Ionização por Impacto de Elétrons

Os modos de ionização mais empregados no acoplamento GC-MS são o impacto de elétrons (EI) e a ionização química (CI), os quais operam sob baixa pressão (Figura 8). Dentre eles, o EI é o modo mais utilizado (cerca de 90% de todos os trabalhos em GC-MS utilizam EI), uma vez que usualmente fornece um grande número de íons que permitem a identificação dos compostos em estudo. (LANÇAS, 2009; PRIMER, 2004).

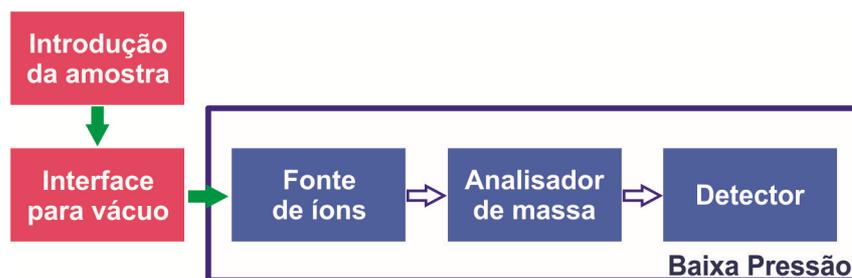


Figura 8 – Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons dentro de um sistema a baixa pressão (vácuo). Ionização por impacto de elétrons (adaptado de LANÇAS, 2009).

No modo EI, a molécula proveniente da coluna do cromatógrafo a gás é ionizada pela interação com uma corrente de elétrons, com energia relativamente elevada (70 eV). Essas colisões inicialmente produzem íons positivos. Sob ionização, as moléculas de uma determinada substância se fragmentam com um padrão muito reprodutível. (LANÇAS, 2009).

O modo EI é um processo direto, onde energia é transferida dos elétrons, através das colisões, para as moléculas das amostras. Este procedimento resulta numa fragmentação significativa das moléculas, cujo espectro resultante representa a abundância das várias razões massa/carga. O padrão espectral é usado para

identificação do composto. No entanto, para algumas amostras, talvez não haja seletividade suficiente no modo EI, pois a interferência causada por componentes da matriz pode dificultar a informação espectral. (PRIMER, 2004).

2.4.3.1.2 Ionização por *Eletrospray* (ESI)

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS foram baseadas no EI e CI, entretanto, devido as diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se inadequado para a análise de compostos em baixas concentrações. Assim, novas fontes foram desenvolvidas, e as que demonstram melhor desempenho no acoplamento LC-MS são aquelas onde a ionização ocorre sob pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*), conforme esquematizado na Figura 9. (LANÇAS, 2009).

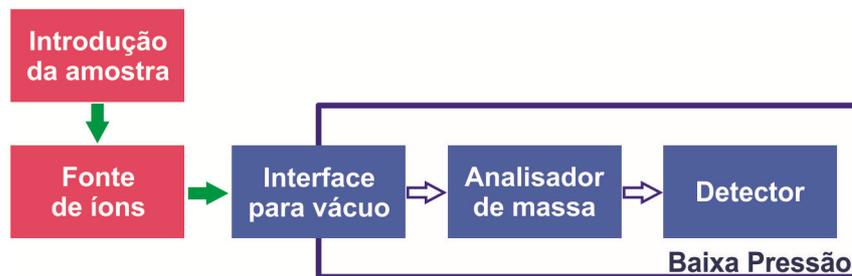


Figura 9 – Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons fora de um sistema a baixa pressão (vácuo). Ionização a pressão atmosférica (adaptado de LANÇAS, 2009).

Os modos de ionização mais utilizados no momento são: *Electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por Fótons a Pressão Atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*). As principais características destes modos de ionização podem ser visualizadas na

Figura 10. Dentre elas a ESI é o modo de ionização mais empregado no acoplamento LC-MS, seguida da APCI. (LANÇAS, 2009).

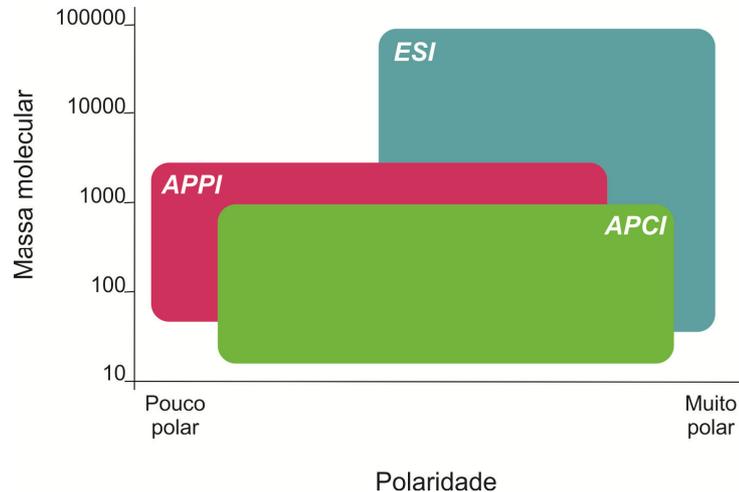


Figura 10 – Principais características dos modos de ionização a pressão atmosférica, empregadas em LC-MS (adaptado de LANÇAS, 2009).

A ionização por ESI é apropriada para determinação da estrutura de um composto, e preferencialmente aplicada para a análise de compostos iônicos grandes (massa molecular superior a 1000) ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo. Cabe ressaltar que compostos com baixa polaridade são melhores ionizados por EI, devendo-se desta forma utilizar GC. (PIZZUTTI, 2006).

Na ESI, o eluato da coluna cromatográfica entra na sonda da fonte com carga balanceada, mas, quando a deixa, carrega uma carga iônica líquida. A ESI pode ser operada no modo positivo ou negativo; no modo positivo, as gotículas que saem do aerossol terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá. (LANÇAS, 2009).

Neste processo, ao eluato dissolvido em um solvente, é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3 e 5 kV. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica e na presença de um forte campo eletrostático. As gotículas

formadas perdem sucessivamente o solvente, ou seja, formam um aerossol devido ao gás aquecido, os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo “vácuo” (Figura 11). Em contracorrente um gás aquecido, usualmente o N_2 , é utilizado para diminuir os aglomerados de íons indesejados que se formam, assim como para facilitar o processo de eliminação do solvente (dessolvatação). (LANÇAS, 2009; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

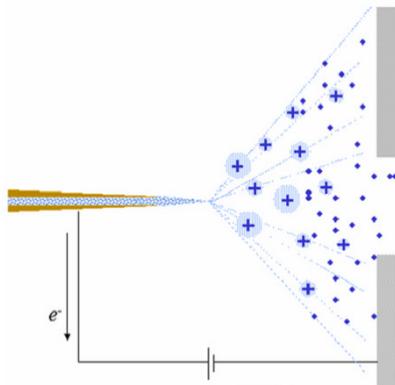


Figura 11 – Interface do tipo ESI, operando no modo positivo, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas (adaptado de LANÇAS, 2009).

2.4.3.2 Analisadores de massas

Após a ionização do eluato, os íons são direcionados para o analisador de massas que separa os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . (LANÇAS, 2009).

Existem vários tipos de analisadores de massas. Entre os mais frequentemente encontrados tem-se o quadrupolo e o aprisionador de íons; analisadores por tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e ainda os analisadores de ressonância ion-ciclotrônica com transformada de Fourier (FT-ICR, do inglês *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*). (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

2.4.3.2.1 Quadrupolo

O quadrupolo é o analisador mais amplamente usado, devido a sua facilidade de uso, faixa de massa, faixa linear de trabalho para determinações quantitativas, resolução e qualidade do espectro de massas. (RICCIO, 2011).

Um analisador de massas quadrupolo é composto de quatro barras cilíndricas feitas de metal, dispostas na forma de um quadrado onde os íons do analito são direcionados para o centro do quadrado. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (CC) e radio frequência (Rf) é aplicada nas barras. O par positivo atua como um filtro para valores de massas mais elevados, enquanto que o par negativo para as massas menores. Deve-se ter um controle preciso sobre as voltagens e também sobre a rádio frequência, aplicada às barras dos polos, que geram um campo eletrostático que age como filtro de massas. Esses campos determinam quais as razões m/z podem passar através dos filtros, em uma determinada voltagem, as quais serão detectadas. (LANÇAS, 2009).

Os demais íons terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados. (LANÇAS, 2009). Devido ao fato de cada íon possuir uma frequência própria que depende da sua massa, somente aqueles íons cuja frequência é coincidente com a do quadrupolo podem atravessá-lo, já que neste caso não experimentam a deflexão pelo campo. (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

Os analisadores de massas quadrupolo podem operar em 2 modos, sendo eles o modo varredura (*full scan*) e o monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *Select Ion Monitoring*). (LANÇAS, 2009).

No modo *full scan*, o analisador de massas monitora uma faixa de razões m/z . No modo SIM, o analisador de massas monitora somente poucos íons que são indicativos de um composto específico, ou seja, monitora razões m/z específicas. O modo SIM é significativamente mais sensível do que o modo *full scan*, mas somente fornece informações sobre os íons monitorados, isto é, podem-se perder informações importantes para a identificação do composto. O modo *full scan* é normalmente usado para análises qualitativas ou quantitativas, quando a informação espectral completa é considerada importante. Normalmente, o modo SIM é usado

para quantificação de um composto alvo, nas menores concentrações possíveis (nível de traços). (LANÇAS, 2009).

Com um equipamento do tipo triplo quadrupolo, podem-se realizar todos os tipos disponíveis de varredura. Existem quatro tipos de varredura para um quadrupolo sequencial, que são: varredura do íon produto, do íon precursor, da perda neutra e o monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). (RICCIO, 2011; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

O MRM é um dos métodos de aquisição mais interessante, pois proporciona especificidade, seletividade e detectabilidade ao detector de massas. (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b). Este modo de varredura consiste em selecionar uma reação de fragmentação. Neste caso, tanto o primeiro quanto o segundo analisador são focalizados nas massas selecionadas. Portanto, não há varredura, mas sim, algo análogo ao modo SIM. Os íons selecionados pelo primeiro analisador serão detectados caso os mesmos produzam um dado fragmento, através de uma reação selecionada. A ausência de varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o fragmento, aumentando a detectabilidade para o monitoramento, que é associada a um aumento na seletividade. (RICCIO, 2011; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

No triplo quadrupolo, o primeiro (Q1) e o último (Q3) quadrupolos operam ambos como um filtro/selecionador normal de massas, já o segundo quadrupolo (Q2), operado apenas com Rf permite que todos os íons selecionados pelo Q1 passem por ele sem serem selecionados. O Q2 serve como uma região/compartilhamento de íons totais ou ainda uma célula de colisão. Os controles de potenciais CC e Rf operam normalmente no Q1 e no Q3, enquanto que no Q2, apenas o potencial Rf fica disponível. (RICCIO, 2011; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010).

Resumindo, o MRM consiste em selecionar uma reação de fragmentação. Neste caso, tanto o primeiro quanto o segundo analisador são focalizados nas massas selecionadas. Portanto, não há varredura, mas sim, algo análogo ao modo SIM. Os íons selecionados pelo primeiro analisador serão detectados caso os mesmos produzam um dado fragmento, através de uma reação selecionada. A ausência de varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o fragmento, aumentando a detectabilidade para o monitoramento, que é associada a um aumento na seletividade. (RICCIO, 2011; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

Este modo é de particular importância para análise de compostos presentes em nível de traços em matrizes complexas, com muitas interferências, como por exemplo, a análise de resíduos de pesticidas. (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010b).

2.4.3.2.2 Aprisionadores de íons

Os aprisionadores de íons (ITD) também podem ser denominados de quadrupolo tridimensional. (LANÇAS, 2009).

Neste analisador, um eletrodo hiperbólico na forma de um anel (denominado *ring electrode*) é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos denominados eletrodos *end cap*. Uma voltagem de amplitude variável e com frequência ao redor de 1 MHz, é aplicada ao anel, enquanto que os *end cap* são aterrados. Os dois eletrodos *end cap* apresentam um orifício no centro; o eletrodo superior permite a passagem dos íons provenientes da ionização os quais são direcionados para o *ring electrode*, enquanto que o orifício do eletrodo de saída serve para direcionar os íons ejetados para detecção, (LANÇAS, 2009), conforme pode ser visualizado na Figura 12.

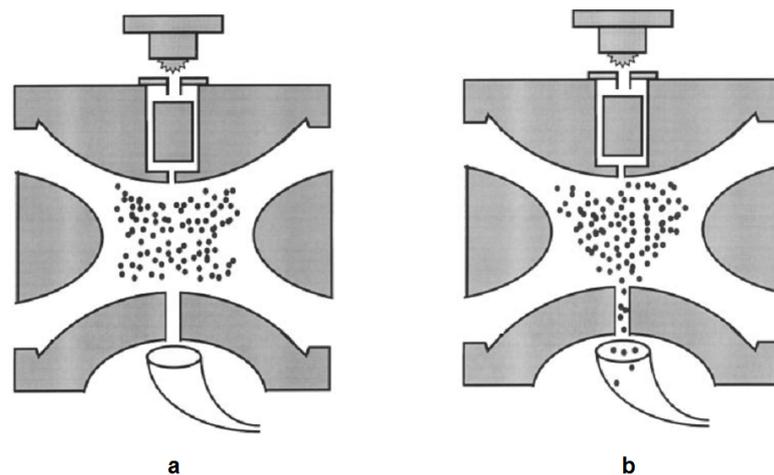


Figura 12 – Esquema de funcionamento do ITD, em (a) os íons estão aprisionados e em (b) os íons com as razões m/z selecionadas são ejetados e analisados. (MARCH, 1997).

2.4.3.3 Detector

O detector é o último módulo de um espectrômetro de massas. Existe uma grande variedade de detectores para MS, sendo a escolha efetuada a partir do projeto do espectrômetro, suas aplicações analíticas bem como da técnica cromatográfica utilizada na separação. (LANÇAS, 2009).

2.4.3.3.1 Detector baseado na multiplicação de elétrons

Os detectores baseados na multiplicação de elétrons (EM, do inglês *Electron Multiplier*) são os mais utilizados atualmente para detecção de íons. Ao sair do analisador, a corrente elétrica desses íons é medida, em um eletromultiplicador, depois é amplificada e convertida em sinal gráfico, isto é, a intensidade ou abundância do íon-fragmento em um espectro de massas. As multiplicações de elétrons utilizam como cátodo um metal, óxido metálico ou liga que apresenta facilidade em perder elétrons quando atingida por um íon. Os elétrons removidos do cátodo são direcionados para um eletrodo que apresenta uma diferença de potencial positiva em relação ao cátodo, atraindo os elétrons. Este processo é multiplicado em cascata em vários eletrodos, denominados dinodos. Cada dinodo apresenta uma diferença de potencial em relação ao anterior, facilitando a atração dos elétrons. Ao final do processo, um elevado número de elétrons é coletado no anodo para cada íon que chegou inicialmente no catodo. (LANÇAS, 2009; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

2.4.3.3.2 Detector baseado em fotomultiplicador dinolítico

Os íons ao sair do quadrupolo são convertidos em elétrons pelos dínodos de conversão. Estes elétrons encontram um átomo de fósforo que, quando ativado, emite fótons. Os fótons atingem um fotocátodo na frente da fotomultiplicadora para

produzir elétrons e o sinal é amplificado por esta fotomultiplicadora, a qual é selada em vidro e mantida sob vácuo, evitando a contaminação e permitindo que o detector mantenha o seu desempenho por um período consideravelmente mais longo do que os multiplicadores de elétrons convencionais. (WATERS, 2005).

2.5 Validação de métodos analíticos

Para garantir que as informações geradas por um novo método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação chamada de validação. (KUSSUMI, 2007).

Atualmente, há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores como de agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, que objetivam responder questões como: qual a função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada. (PIZZUTTI, 2006).

Considerando-se as diversas e inúmeras áreas que necessitam gerar dados confiáveis, é consenso que esses conceitos e definições não estão completa e rigidamente estabelecidos, mas continuam a evoluir e aprimorarem-se, no sentido de confirmar que o método proposto tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer, e que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe. (KUSSUMI, 2007; PIZZUTTI, 2006).

Desta forma, os parâmetros de validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais e algumas definições são diferentes entre diversos grupos. O que se pode notar é que organismos nacionais de credenciamento, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), exigem o item “validação de métodos analíticos” como um requisito fundamental para a qualidade assegurada e demonstração da competência técnica. (KUSSUMI, 2007).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação. (RIBANI et al, 2004).

2.5.1 Seletividade

A seletividade é definida como a habilidade de um método para a determinação do analito, de forma exata, em presença de interferentes provenientes da matriz da amostra. A seletividade é um importante parâmetro especialmente na análise de amostras complexas, como na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, (LANÇAS, 2004), e está relacionada ao evento de detecção. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. (INMETRO, 2007).

2.5.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração. (INMETRO, 2007).

Na prática, a linearidade é determinada através das chamadas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito. (LANÇAS, 2004).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (y , variável dependente) e a concentração do analito (x , variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão angular a (inclinação da curva/sensibilidade) e linear b (valor que y assume, quando $x = 0$). Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação r , com valores iguais ou superiores a 0,99 e 0,90 recomendados, respectivamente, pela ANVISA e pelo INMETRO. (CALLEGARI-JACQUES, 2003; PIZZUTTI, 2006). Já os valores do coeficiente de determinação r^2 são tidos como satisfatórios a partir de 0,98,

significando que 98% da variação observada da variável y é explicada estatisticamente pela variável x . (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para o qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho e linearmente correlacionada às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. (INMETRO, 2007).

2.5.3 Limite de Detecção e de Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostra com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. (INMETRO, 2007).

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) do método é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero. (INMETRO, 2007).

Há várias maneiras de se calcular a estimativa do valor do LOD, como através do método visual, método da relação sinal/ruído (3 ou 5 vezes) e aquele baseado em parâmetros da curva analítica. (INMETRO, 2007; PIZZUTTI, 2006).

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, após averiguar se a exatidão e a precisão alcançadas são satisfatórias. (INMETRO, 2007).

2.5.4 Exatidão

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. (INMETRO, 2007).

Os procedimentos normalmente utilizados para avaliar a exatidão do método são: uso de materiais de referência certificados, participação de ensaios interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. (INMETRO, 2007).

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (INMETRO, 2007), geralmente expressa em percentual, podendo esta ser calculada através da Equação 2.

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

Onde:

R% = Percentual de recuperação;

C₁ = Concentração determinada na amostra fortificada;

C₂ = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C₃ = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de pesticidas. (SANCO, 2009).

2.5.5 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, analisadas em condições definidas. As duas maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio-padrão. (INMETRO, 2007).

A precisão pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) (Equação 3).

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x_m = valor médio determinado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas:

- a) Desenvolvimento e validação de método individual para determinação de ditiocarbamatos em grãos de soja, arroz e milho empregando GC com dois sistemas de detecção: PFPD e ITD-MS.
- b) Desenvolvimento e validação de método multirresidual, empregando LC-MS/MS, para determinação de 75 pesticidas em grãos de milho e cereais matinais.
- c) Após a validação do método individual proposto, realizou-se o monitoramento de 12 amostras de arroz, sendo 6 amostras adquiridas nos supermercados da cidade de Santa Maria, RS, Brasil e as demais adquiridas na Holanda.

O desenvolvimento e a validação dos métodos bem como o monitoramento das amostras de arroz foram realizados no *The Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*, em Amsterdã, Holanda.

3.1 Equipamentos e materiais

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q[®] - resistividade 18,2 MΩcm (MilliPore[®], EUA);
- ✓ Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- ✓ Balança analítica de precisão com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- ✓ Lavadora automática de vidrarias G 7883 CD (Miele, EUA);
- ✓ Banho de ultrassom M3510 DHT (Branson, México);
- ✓ Banho termostaticado com agitação, tipo dubnoff (Thermo Haake, Alemanha);
- ✓ Homogeneizador Polytron PT 6000 (Polytron, Suíça);
- ✓ Centrífuga Falcon 6/300, Refrigerada (MSE, Inglaterra);

- ✓ Processador de Alimentos, modelo *La Moulinette* (Moulinex, França);
- ✓ Micropipetadores automáticos de várias capacidades (Brand, Alemanha);
- ✓ Pipetador *Hand Step* (Brand, Alemanha);
- ✓ Dispensette Organic, capacidade 50 mL (Brand, Alemanha);
- ✓ Seringas de volumes de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μL (Hamilton, Suíça);
- ✓ Cromatógrafo a Líquido L-7000 (Merck Hitachi, Japão) equipado com:
 - Amostrador automático L7250 (Merck Hitachi, Japão);
 - Válvula de injeção modelo 7010-120 (Rheodyne, EUA) equipada com alça de injeção de 100 μL ;
 - Bomba quaternária L7100 (Merck Hitachi, Japão);
 - Forno da coluna CH 500 (Eppendorf, EUA);
 - Coluna de Permeação em Gel PLgel, 300 mm de comprimento, 7,5 mm de diâmetro interno (d.i.) e 5 μm de tamanho de partícula, co-polímero de estireno divinilbenzeno, faixa de massa molar até 2000 unidades de massa (Polymer Laboratories, Inglaterra);
 - Detector DAD L7455 equipado com software D 7000 (Merck Hitachi, Japão);
 - Coletor de frações ASPEC XL equipado com software ASPEC-735 (Gilson, França);
 - Detector de dispersão de luz por evaporação (ELSD) ES 2000 equipado com sistema de aquisição de dados através do *software* ESLD 2000 *Control* (Alltech, EUA).
- ✓ Cromatógrafo a líquido, sistema UPLC-MS/MS (Waters, EUA) composto por:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação;
 - Coluna cromatográfica BECH C₁₈, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 μm de tamanho de partícula, com coluna guarda C₁₈, 4 mm de comprimento e 2,1 mm de d.i. (Waters, EUA);
 - Detector MS Triplo Quadrupolo, Quattro Premier XE (Waters Micromass, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Eletrospray* com interface (Z-spray), operando no modo positivo;

- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e Targetlynx 4.0 (Waters Micromass, Inglaterra);
- ✓ Cromatógrafo a gás 3800 (Varian, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático modelo 8400 (Varian);
 - Injetor 1079, modo *split/splitless*, com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm;
 - Coluna capilar CP Sil 8 CB (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 50 m de comprimento, 0,32 mm de d.i. e 1,2 µm de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
 - Detector ITD-MS Saturn 2000 (Varian, EUA) e sistema de aquisição de dados através da *workstation* 6.4 (Varian, EUA);
 - Detector PFPD, atuando no modo enxofre e sistema de aquisição de dados através do *software Atlas 2002* (Thermo Lab Systems, EUA);
- ✓ Mesa agitadora (GFL, Alemanha);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (Nalgene, EUA);
- ✓ Frascos de vidro âmbar, capacidade de 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueada e batoque de teflon e silicone (Bester, Holanda);
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.

3.2 Gases

- ✓ Argônio 99,999% de pureza (Air Liquid, França/ Air Gases, Brasil) (gás de colisão – LC-MS/MS);
- ✓ Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Holanda) (gás de dessolvatação - LC-MS/MS);
- ✓ Hélio 99,999% de pureza (Air Liquid, França) (gás de arraste - GC);
- ✓ Hidrogênio 99,999% de pureza (Air Liquid, França)(chama do PFPD);
- ✓ Ar sintético 99,999% de pureza (Air Liquid, França)(chama do PFPD);

3.3 Solventes e reagentes

- ✓ Acetonitrila, ácido acético glacial, acetona, metanol e tolueno, todos grau pesticida (Merck, Alemanha ou J. T. Baker Chemicals, EUA);
- ✓ Isoctano (2,2,4-trimetilpentano), grau pesticida (Lab-scan Analytical Science, Irlanda e Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Solução de SnCl_2 40% em HCl concentrado (m/v) (Lab-scan Analytical Science, Irlanda);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro, grau pesticida (Merck, Alemanha e J. T. Baker, EUA);
- ✓ Formiato de amônia analar normapur, grau resíduo (VWR, EUA);
- ✓ PSA, C_{18} , C_{18}OH , Sílica gel, alumina e florisil[®];
- ✓ Dissulfeto de carbono (CS_2), 99% de pureza (J. T. Baker Chemicals, EUA).

3.4 Pesticidas selecionados

Os padrões de pesticidas selecionados para este estudo foram adquiridos da companhia Dr. Ehrenstorfer (Alemanha), os quais estão listados na Tabela 4, contendo informações referentes à classe, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.

No método individual, o pesticida da classe dos ditiocarbamatos, estudado em grãos de soja, arroz e milho, empregando GC-PFPD e GC-ITD-MS, foi o tiram. Já para o método multirresidual, foram estudados 75 pesticidas para as matrizes de grãos de milho e cereais matinais.

3.5 Preparo das soluções analíticas

3.5.1 Soluções utilizadas no método individual

Preparou-se 10 mL de solução estoque de tiram, em tolueno, com concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (solução A). Essa solução foi preparada através da dissolução do padrão sólido no solvente mencionado. A partir da solução A preparou-se uma solução na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (solução B), também em tolueno. Empregaram-se ambas as soluções nos ensaios de fortificação e recuperação do analito. Estas soluções foram estocadas em frasco âmbar, em freezer, à $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para o preparo das curvas analíticas, primeiramente preparou-se uma solução de CS_2 , em isoctano, na concentração de $4,0 \text{ g L}^{-1}$ (solução estoque). A partir dessa solução, prepararam-se soluções nas concentrações $4,0$ e $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ (soluções de trabalho), no mesmo solvente, a partir das quais fez-se as diluições para posterior obtenção das curvas analíticas. A solução pode ficar armazenada por, no máximo, um mês. A Tabela 6 apresenta os dados referentes às soluções empregadas na obtenção das curvas analíticas, assunto discutido no item 3.7.3.3.

Tabela 4 – Pesticidas estudados com a respectiva classe, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.

(continua)

Pesticida	Classe	Grupo Químico	Classificação Toxicológica	Fórmula Molecular
Acefato	Inseticida	Organofosforado	III	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS
Acetamiprido	Inseticida	Neonicotinoide	II	C ₁₀ H ₁₁ CIN ₄
Azinfós-metílico	Inseticida	Organofosforado	I	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobirulina	III	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Bitertanol	Fungicida	Triazol	III	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂
Boscalida	Fungicida	Carboxamida	III	C ₁₈ H ₁₂ C ₂ N ₂ O
Buprofezina	Inseticida	Tiadiazinona	III	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS
Carbaril	Inseticida	Carbamato	I	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂
Ciproconazol	Fungicida	Triazol	III	C ₁₅ H ₁₈ CIN ₃ O
Ciprodinil	Fungicida	Anilinopiridina	III	C ₁₄ H ₁₅ N ₃
Clofentezina	Acaricida	Tetrazina	III	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄
Clorpirifos	Inseticida	Organofosforado	II	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorpirifos-metilico	Inseticida	Organofosforado	II	C ₈ H ₉ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorprofam	Herbicida	Carbamato	III	C ₁₀ H ₁₂ CINO ₂
Cresoxim-metílico	Fungicida	Estrobilurina	III	C ₈ H ₁₉ NO ₄
Diazinona	Inseticida	Organofosforado	II	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Diclorvós	Inseticida	Organofosforado	I	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	III	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Dimetoato	Inseticida	Organofosforado	II	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Dimetomorfo	Fungicida	Acido Cinâmico	III	C ₂₁ H ₂₂ CINO ₄
Diniconazol	Fungicida	Triazol	III	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O
Diurum	Herbicida	Uréia	III	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O
Espinosade A/D	Inseticida	Espinosina	IV	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀
Espiroxamina	Fungicida	Morfolino	II	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂
Etoprofós	Inseticida	Organofosforado	II	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂
Famoxadona	Fungicida	Oxazolidinediona	III	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄
Fembuconazol	Fungicida	Triazol	II	C ₁₉ H ₁₇ CIN ₄
Femproximoato	Acaricida	Pirasol	II	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄
Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina	II	C ₂₀ H ₃₃ NO
Fenexamida	Fungicida	Hidroxianilida	IV	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂
Fentiona	Inseticida	Organofosforado	II	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂
Flusilazole	Fungicida	Triazol	III	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si
Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	IV	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂
Flutriafol	Fungicida	Triazol	III	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O
Fosalona	Inseticida	Organofosforado	II	C ₁₂ H ₁₅ CINO ₄ PS ₂
Hexaconazol	Fungicida	Triazol	IV	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O
Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	II	C ₉ H ₁₀ CIN ₅ O ₂
Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	III	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃
Linurom	Herbicida	Uréia	III	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
Malationa	Inseticida	Organofosforado	III	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Mepanipirim	Fungicida	Anilinopirimidina	III	C ₁₄ H ₁₃ N ₃
Metalaxil	Fungicida	Fenilamida	III	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄
Metamidofós	Inseticida	Organofosforado	I	C ₂ H ₈ NO ₂ PS

Tabela 5 – Pesticidas estudados com a respectiva classe, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.

(conclusão)				
Pesticida	Classe	Grupo Químico	Classificação Toxicológica	Fórmula Molecular
Metidationa	Inseticida	Organofosforado	I	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$
Metiocarbe	Inseticida	Carbamato	I	$C_{11}H_{15}NO_2S$
Metomil	Inseticida	Carbamato	IV	$C_5H_{10}N_2O_2S$
Metoxifenoazida	Inseticida	Diazilidrazida	IV	$C_{22}H_{28}N_2O_3$
Miclobutanil	Fungicida	Triazol	III	$C_{15}H_{17}ClN_4$
Monocrotofos	Inseticida	Organofosforado	I	$C_7H_{14}NO_5P$
Ometoato	Inseticida	Organofosforado	I	$C_5H_{12}NO_4PS$
Oxadixil	Fungicida	Fenilamida	III	$C_{14}H_{18}N_2O_4$
Oxamil	Inseticida	Carbamato	I	$C_7H_{13}N_3O_3S$
Pencicurom	Fungicida	Feniluréia	IV	$C_{19}H_{21}ClN_2O$
Penconazol	Fungicida	Triazol	IV	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$
Picoxistrobina	Fungicida	Metoxiacrilato	II	$C_{18}H_{16}F_3NO_4$
Piraclostrobina	Fungicida	Metoxicarbamato	II	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$
Pirimetanil	Fungicida	Anilinopirimidina	IV	$C_{12}H_{13}N_3$
Pirimicarbe	Inseticida	Carbamato	II	$C_{11}H_{18}N_4O_2$
Piriproxifeno	Inseticida	Piripiloxipropílico	IV	$C_{20}H_{19}NO_3$
Procloraz	Fungicida	Imidazol	III	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$
Profenofós	Inseticida	Organofosforado	III	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$
Propargito	Acaricida	Sulfito de alquila	III	$C_{19}H_{28}O_4S$
Propiconazol	Fungicida	Triazol	II	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	III	$C_{16}H_{22}ClN_3O$
Tebufempirado	Acaricida	Pirazol	III	$C_{18}H_{24}ClN_3O$
Tebufenozido	Inseticida	Diazilidrazida	III	$C_{22}H_{28}N_2O_2$
Tetraconazol	Fungicida	Triazol	II	$C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$
Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	III	$C_{10}H_7N_3S$
Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	II	$C_{10}H_9ClN_4S$
Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinoide	III	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$
Tiram	Fungicida	Ditiocarbamato	II	$C_6H_{12}N_2S_4$
Triadimenol	Fungicida	Triazol	III	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$
Triclorfom	Inseticida	Organofosforado	II	$C_4H_8Cl_3O_4P$
Trifloxistrobina	Fungicida	Oximinoacetato	III	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$
Zoxamida	Fungicida	Benzidamida	II	$C_{14}H_{16}Cl_3NO_2$

Tabela 6 – Concentração das soluções de CS₂ da curva analítica e volumes medidos das soluções de trabalho, para preparar 10 mL de cada solução em isoctano.

Concentração (mg CS ₂ L ⁻¹)	Volumes medidos da solução de trabalho (μL)	Concentração da solução de trabalho (mg CS ₂ L ⁻¹)
0,02	50	4,0
0,05	125	
0,1	250	
0,2	50	40,0
0,5	125	
1,0	250	
2,0	500	

3.5.2 Soluções utilizadas no método multirresidual

Para o preparo das soluções analíticas estoque efetuou-se o cálculo para determinar a massa de cada padrão a ser pesada, de acordo com a pureza, a fim de se obter as soluções individuais, na concentração de 1000 mg L⁻¹.

Para isso, os padrões foram pesados individualmente, diretamente dentro de frascos de vidro âmbar (tampa contendo batoque de teflon[®]), com capacidade de 20 mL, sendo em seguida, dissolvidos com volumes adequados dos solventes apropriados, dependendo da solubilidade de cada um, e finalmente homogêneos por 5 minutos em banho de ultrassom. Estas soluções apresentam estabilidade de cerca de 8 anos, desde que armazenadas em freezer, a temperatura em torno de -20 °C, e corretamente manipuladas. (PIZZUTTI, 2006).

Em seguida, preparou-se 200 mL de uma mistura de todos os compostos a serem analisados por LC-MS/MS na concentração 5 mg L⁻¹, em metanol (contendo 0,1% de ácido acético). Esta solução intermediária foi armazenada em 4 frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 50 mL, para não manipular constantemente o volume total da solução e, desta forma, evitar problemas de contaminação e/ou evaporação. Esta solução é estável por cerca de 1 ano.

A partir desta solução intermediária, foram preparadas as soluções analíticas, através de sua diluição, em metanol (contendo 0,1% de ácido acético) ou extrato das

matrizes, nas concentrações de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 10,0; 20,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (estabilidade de aproximadamente 3 meses), para a confecção das curvas analíticas, estudos de linearidade e de efeito matriz (discutido no item 3.7.3.3), para cada composto.

Para os ensaios de fortificação, utilizou-se uma solução 1,0 mg L^{-1} , diluída a partir da solução 5,0 mg L^{-1} preparada também em metanol (contendo 0,1% de ácido acético).

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, antes de serem utilizadas, foram retiradas do freezer, deixadas para atingir temperatura ambiente e em seguida, colocadas por 5 minutos em banho de ultrassom para completa homogeneização.

3.6 Avaliação e armazenamento das amostras branco

Na ausência de material de referência, as amostras adquiridas foram avaliadas para uso como amostra branco, ou seja, amostras que não contém resíduos dos pesticidas em estudo.

As amostras dos grãos de arroz, soja, milho e cereais matinais, foram adquiridas no comércio da cidade de Amsterdã (Holanda). Todas as amostras foram moídas em multiprocessador de alimentos, até obtenção de um pó fino, e armazenadas em frascos de teflon[®] com tampa.

3.7 Desenvolvimento e validação do método individual

3.7.1 Avaliação da separação e condições cromatográficas

Para o método individual, os ditiocarbamatos foram determinados na forma de CS_2 , utilizando-se o método de padronização externa.

Para determinar o tempo de retenção do CS₂ foram injetados vapores deste. Posteriormente, injetou-se uma solução analítica de CS₂ na concentração de 4,0 mg L⁻¹, nas mesmas condições cromatográficas, confirmando o tempo de retenção do composto.

O modo de injeção, efetuado com o auxílio de amostrador automático, consistiu na aspiração de 0,5 µL de isoctano, 0,5 µL de ar e 4,0 µL de extrato ou de solução analítica. A velocidade de injeção foi de 0,5 µL s⁻¹.

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com o estudo de De Kok e Van Bodegraven (2002), e estão descritas a seguir.

3.7.1.1 Sistema GC-PFPD (modo enxofre)

- ✓ Temperatura do injetor: 250 °C;
- ✓ Programação da válvula do *split* do injetor: *split* na razão de 1:15;
- ✓ Coluna capilar: CP Sil 8 CB (especificações descritas no item 3.1);
- ✓ Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min⁻¹ até 250 °C;
- ✓ Volume de injeção: 4,0 µL;
- ✓ Vazão dos gases do detector:
 - Hidrogênio: 12 mL min⁻¹;
 - Ar sintético: 12 mL min⁻¹ (ar 1) e 20 mL min⁻¹ (ar 2);
- ✓ Vazão do gás de arraste constante em 2,0 mL min⁻¹ na coluna;
- ✓ Temperatura do detector: 250 °C.

3.7.1.2 Sistema GC-MS

- ✓ Temperatura do injetor: 250 °C;
- ✓ Programação da válvula do *split* do injetor: *split* na razão de 1:10
- ✓ Coluna capilar: CP Sil 8 CB (especificações descritas no item 3.1);

- ✓ Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min⁻¹ até 250 °C;
- ✓ Volume de injeção: 4 µL;
- ✓ Vazão do gás de arraste constante em 2,0 mL min⁻¹ na coluna.

As condições do ITD foram de 230 °C para o *transferline* e para o *trap*, e de 120 °C para o *manifold*. A voltagem aplicada ao *electron multiplier* foi de 1600 eV. Os íons 76 e 78 foram monitorados a fim de se ter os cromatogramas mais limpos. Para a quantificação utilizou-se o íon 76 que se trata do mais abundante e para a confirmação o 78. Nestes casos, onde o analito possui uma massa muito baixa, o emprego de um pico isótopo para a confirmação do mesmo é aceito. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

3.7.2 Análise dos solventes e reagentes

Para a verificação da pureza dos solventes e reagentes utilizados realizou-se a análise dos mesmos através dos procedimentos de extração, discutidos no item 3.7.3.6, sem adicionar a amostra. Como para todas as matrizes foi utilizada água, esta foi adicionada junto aos solventes e reagentes para avaliar a presença de interferências em relação à procedência da água.

3.7.3 Desenvolvimento e validação dos métodos (GC-PFPD e GC-ITD-MS)

A seguir, estão descritos os testes realizados na etapa de desenvolvimento e as informações referentes aos itens avaliados na validação dos métodos.

Na Figura 13, está representado o procedimento de extração de ditiocarbamatos para frutas e hortaliças, e enumerados os testes realizados para o desenvolvimento deste novo método, para análise de grãos. Os testes de 1 a 3 foram realizados para desenvolver etapa de purificação, e os testes 4 a 6 para

otimizar o procedimento de extração, conforme detalhado nos itens 3.7.3.1 e 3.7.3.2. É importante ressaltar que todos os testes iniciais foram realizados utilizando-se a soja, devido a esta ser a matriz mais complexa entre os três grãos estudados, principalmente devido ao maior teor de lipídeos (aproximadamente 20%) e a necessidade de se desenvolver um método de purificação do extrato. (KOBELITZ, 2011).

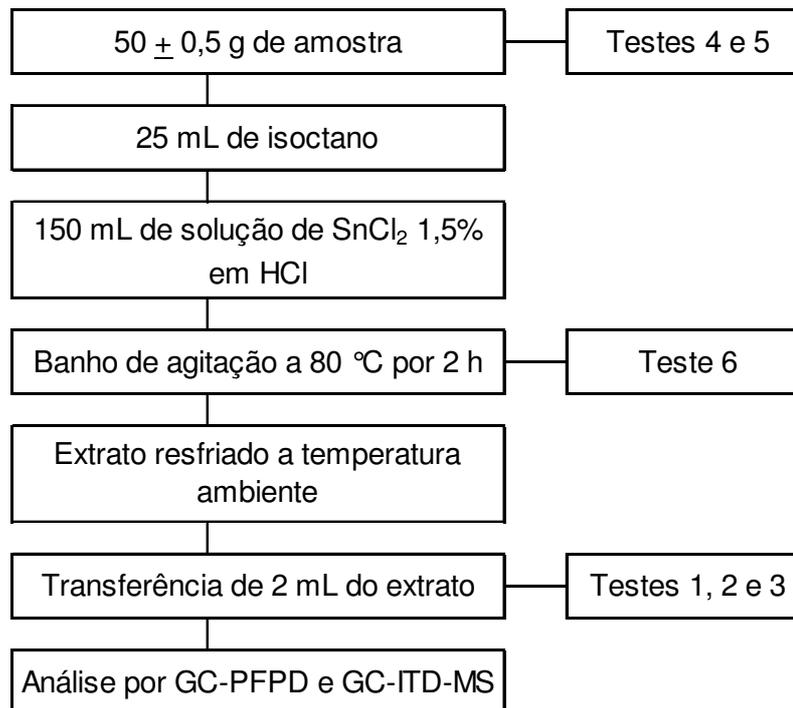


Figura 13 – Representação esquemática do método de determinação de resíduos de ditio-carbamatos em frutas e hortaliças.

3.7.3.1 Purificação da amostra (testes 1, 2 e 3)

Para se determinar o tempo de retenção da gordura presente na soja, primeiramente analisou-se uma alíquota de 10 μ L de solução de óleo de soja em isoctano, empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector evaporativo de dispersão de luz (ELSD, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*) e por DAD, sob nas seguintes condições:

- ✓ Coluna cromatográfica PLGel (300 mm x 7,5 mm d.i. , 5 μ m, 50 Å)
- ✓ Fase móvel: diclorometano
- ✓ Vazão da fase móvel: 0,5 mL min⁻¹
- ✓ Comprimento de onda (DAD): 230 nm

Após esta definição, foram testados 6 adsorventes para a etapa de purificação por dSPE (teste 1). Os adsorventes utilizados para esta finalidade e avaliados nesse projeto foram: amina primária e secundária (PSA), C₁₈OH, C₁₈, alumina, florisil[®] e sílica gel.

Para realizar o teste, preparou-se extrato branco com 10 g de grãos de soja moídos e 40 mL de água deionizada. Deixou-se em repouso por cerca de 2 horas. Após, adicionou-se 25 mL de isoctano, 150 mL de solução de SnCl₂ (1,5%) em solução de HCl 4 mol L⁻¹, e colocou-se no banho de água a 80 °C sob agitação, durante 2 horas. Em seguida, retirou-se do banho, deixando o frasco com extrato alcançar a temperatura ambiente e posteriormente colocou-se em um banho de água fria. Após, adicionou-se 2 mL do extrato ao adsorvente (100 mg) contido dentro de um tubo de ensaio (um tubo de ensaio para cada adsorvente testado) e agitou-se em um agitador tipo vortex durante 20 segundos, a 1000 rpm. Deixou-se 1 hora em repouso, retirou-se uma alíquota de 1 mL e injetou-se 10 μ L no HPLC-DAD-ELSD.

Para avaliar a eficiência de diferentes adsorventes na etapa de purificação do extrato de soja (remoção do material gorduroso) foram novamente testados os 3 adsorventes (teste 2) que demonstraram melhor desempenho no teste 1, sendo eles sílica gel, alumina e florisil[®], nas quantidades de 50, 70, 100 e 200 mg, no sistema HPLC-DAD-ELSD.

Para realizar o estudo, seguiu-se o mesmo procedimento realizado no teste 1, mudando somente a quantidade empregada no teste 1 (100 mg) dos adsorventes contidos nos tubos de ensaio, para as quantidades acima mencionadas.

O teste 3 foi realizado com a finalidade de verificar se o tempo de contato entre o adsorvente e o extrato orgânico influenciava na purificação do mesmo. Utilizaram-se 50 mg de sílica gel (seguindo também o procedimento descrito para o teste 1) e testaram-se diferentes tempos de contato (0; 10; 20; 30 e 40 minutos) entre o adsorvente e o extrato (2 mL).

3.7.3.2 Otimização do procedimento de extração (testes 4, 5 e 6)

No teste 4, diferentes quantidades de soja (10, 25 e 50 g) foram estudadas para verificação da influência deste parâmetro sobre os percentuais de recuperação, sem interferir na detectabilidade do método, ou seja, sem alterar negativamente os valores do LOD e LOQ.

Por se tratar de uma matriz seca, a soja foi primeiramente moída e uma quantidade de água adicionada (teste 5). Em 10 g de soja moída adicionou-se 40 mL de água (milliQ) e deixou-se em contato por 0, 15, 30 e 60 min. Em seguida, fortificou-se a mistura com 1 μL da solução de tiram com concentração de 1000 mg L^{-1} . Seguiu-se o procedimento de extração presente na Figura 13. Para purificar o extrato, adicionou-se 50 mg de sílica gel a 2 mL do extrato, seguidos de 20 segundos de agitação (em agitador tipo vortex) e analisou-se no sistema GC-PFPD.

O teste 6 foi realizado com a finalidade de avaliar o tempo de permanência dos frascos sob agitação. No procedimento de extração original são necessárias 2 horas de agitação. Intervalos de 30; 45; 60; 75; 90; 105 e 120 minutos foram estudados para avaliar a possibilidade de redução do tempo de extração.

3.7.3.3 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

Para a obtenção das curvas analíticas, diferentes volumes da solução de trabalho foram utilizados para preparar as soluções analíticas nas seguintes concentrações: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg $\text{CS}_2 \text{ L}^{-1}$. Injetou-se no sistema cromatográfico um volume de 4 μL de cada solução analítica obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado, com o auxílio dos *softwares Atlas 2002*[®] (GC-PFPD) e *Saturn 2000*[®] (GC-ITD-MS).

As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do CS_2 no eixo das abscissas e as áreas (raiz quadrada da área, no caso do PFPD, pois este apresenta resposta quadrática) obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft[®] Excel, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas. Através dos

dados obtidos para a construção das curvas analíticas, na faixa de concentração apresentada na Tabela 6, verificou-se a linearidade de cada método cromatográfico (GC-PFPD e GC-ITD-MS).

3.7.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o LOD e o LOQ do instrumento foram realizadas injeções ($n=6$) em ordem decrescente de concentração (2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02 mg L⁻¹) até que o pico atingisse uma altura referente a três vezes o ruído da linha de base, nas proximidades do tempo de retenção do pico de interesse.

Para a determinação do LOQ_i, adotou-se a altura do pico dez vezes superior ao ruído da linha de base. Ao multiplicar-se o valor encontrado para o LOQ_i (mg L⁻¹), pelos fatores de cada procedimento de extração (soja, arroz e milho) (Apêndice 1), obteve-se o LOQ_m (mg kg⁻¹) estimado calculado para o método.

3.7.3.5 Repetitividade e precisão intermediária

A precisão, em termos de repetitividade da resposta dos instrumentos (RSD_{ri}), empregados nos métodos cromatográficos, foi avaliada efetuando-se 6 injeções de cada concentração de solução de CS₂ (0,05; 0,2 e 1,0 mg CS₂ L⁻¹), em cada sistema. Cada injeção efetuada foi retirada de um *vial* diferente, para que não ocorresse perda do CS₂ no tempo de espera entre as injeções.

A repetitividade do método (RSD_{rm}) foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras branco fortificadas, em três níveis de concentração, com $n = 6$, conforme descrito no item 3.7.3.6.

Para avaliar a precisão intermediária dos sistemas cromatográficos, as soluções analíticas foram analisadas em 3 dias ($n = 6$). Verificou-se o RSD_{pji} injetando-se, em duplicata, as soluções analíticas nas concentrações 0,05; 0,2 e 1,0 mg CS₂ L⁻¹.

3.7.3.6 Procedimento de fortificação e extração das amostras

Para o procedimento de extração do método individual, pesaram-se 25 g \pm 0,25 g de soja ou milho moído adicionada de 25 g de água, ou 50 g da mistura arroz e água (20 g de arroz e 30 g de água), em frasco de vidro de 250 mL, com tampa rosqueável.

Para os estudos de recuperação do CS₂ a partir do princípio ativo tiram, fortificaram-se as amostras das matrizes em estudo com as soluções estoque A e B, em três níveis de concentração: 0,05; 0,1 e 0,5 mg CS₂ kg⁻¹.

Na sequência do procedimento, adicionaram-se 25 mL de isoctano e 150 mL de solução contendo 2,25 g de SnCl₂ em solução de HCl 4 mol L⁻¹.

Os frascos foram fechados e colocados em banho de água à 80 °C durante 1 h, sob agitação correspondente a rotação de 40 rpm. Após este período, os frascos foram retirados e resfriados até a temperatura ambiente, em banho de água fria. Retirou-se uma alíquota de aproximadamente 2 mL da fase orgânica superior, onde o CS₂ fica solubilizado em isoctano, seguindo-se da etapa de purificação para os extratos de soja e milho, e analisou-se por GC, nos dois sistemas cromatográficos (GC-PFPD e GC-ITD-MS).

O procedimento de extração foi realizado em 6 réplicas, tanto para as amostras branco quanto para aquelas fortificadas em cada nível de fortificação, conforme esquema representado na Figura 14.

É imprescindível que, após fortificar as amostras e adicionar os reagentes, o frasco de vidro seja imediatamente fechado. Isto é necessário porque os princípios ativos da classe dos ditiocarbamatos quando expostos a condições que proporcionem a quebra das moléculas irão formar CS₂, que poderá ser perdido devido a sua alta volatilidade.

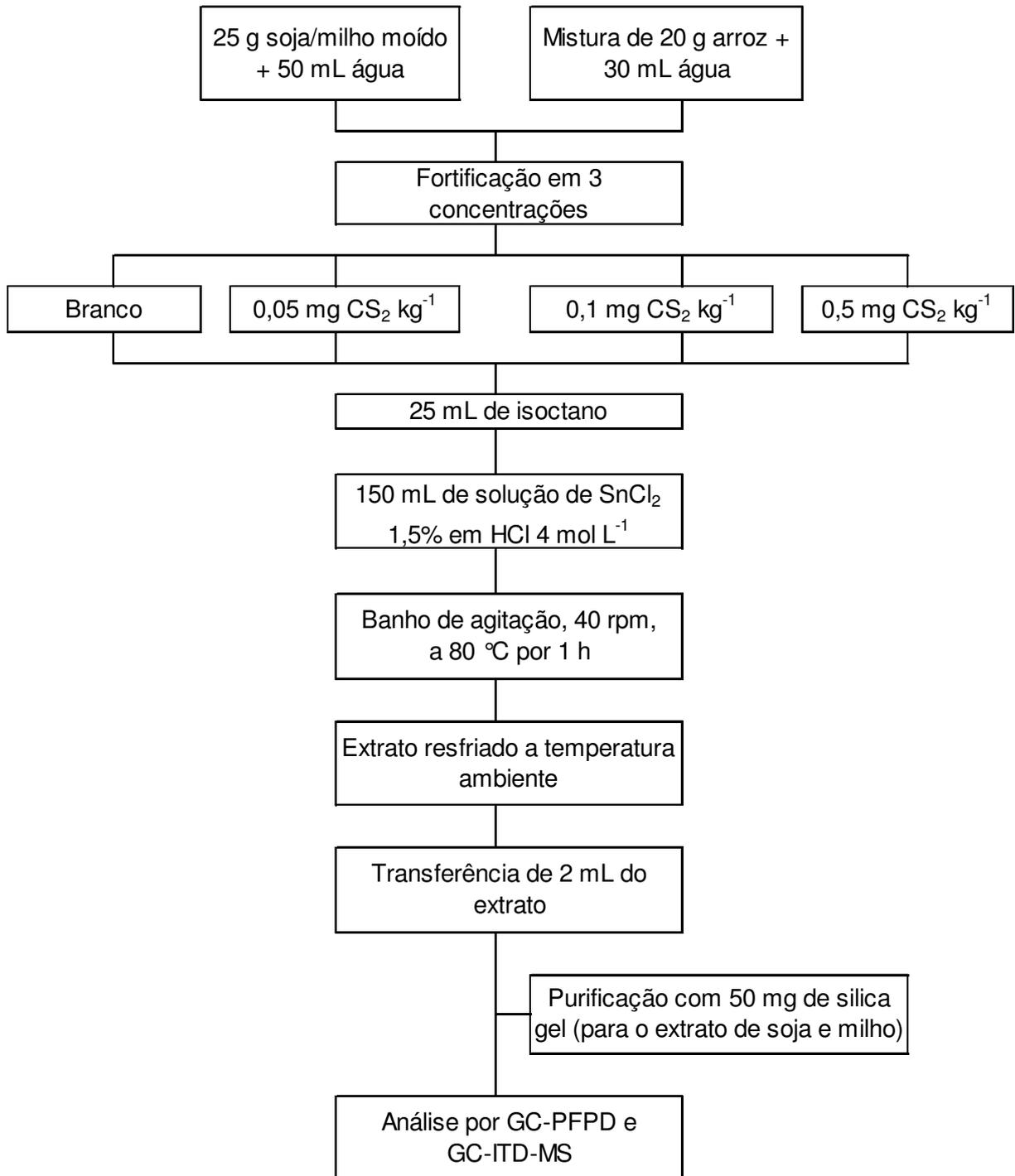


Figura 14 – Representação esquemática do método individual de análise de resíduos de ditiocarbamatos em grãos de soja, arroz e milho seguido de análise por cromatografia gasosa.

3.8 Desenvolvimento e validação de método multirresidual

3.8.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos de De Kok, Van Bodegraven e Hiemstra (2005), descritas nos procedimentos operacionais padrão do VWA.

As condições instrumentais empregadas para LC-MS/MS foram:

- ✓ Para o LC:
 - Volume de injeção de 2 μL , no modo *partil loop with needle overfill* realizado pelo amostrador automático;
 - Temperatura do forno da coluna constante: 60 $^{\circ}\text{C}$;
 - Programação do gradiente da fase móvel: 80% de solução aquosa de formiato de amônia 5 mmol L^{-1} e 20% de metanol, nos primeiros 11 minutos; aos 11 minutos, a fase móvel foi modificada até atingir 85% de metanol, sendo mantida essa composição por 1,5 minutos; aos 12,5 minutos o gradiente retornou a composição inicial de análise;
 - Vazão da fase móvel constante em 0,45 mL min^{-1} ;
 - Tempo total de corrida de 14 minutos.

- ✓ Para o MS:
 - Ionização por API com ESI no modo positivo;
 - Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar de 2,0 kV, voltagem do cone da amostra de 35 V, temperatura 110 $^{\circ}\text{C}$;
 - Temperatura do gás de desolvatação: 350 $^{\circ}\text{C}$;
 - Vazões de nitrogênio para desolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 800 e 50 L h^{-1} ;
 - Pressão de $3,5 \times 10^{-3}$ mbar de argônio para colisão e fragmentação dos íons;
 - O *dwell time* (tempo de permanência) do analito no analisador foi de 20 ms e o *inter channel delay* (tempo de espera entre a detecção de um e de outro fragmento) foi de 10 ms, para todos os compostos.

Duas transições MRM foram monitoradas para cada um dos compostos, de acordo com os parâmetros presentes na Tabela 7, sendo uma delas empregada para a quantificação do analito e a outra para a confirmação do mesmo. Para cada composto definiu-se uma razão (*ion ration*) entre as áreas destas transições.

Tabela 7 – Pesticidas analisados por LC-MS/MS, valores dos t_R , voltagem do cone, íons precursores, íons produtos e energia de colisão, para as duas transições.

(continua)

Pesticida	t_R (min)	Ion precursor	Voltagem do cone (V)	Transições			
				Quantificação		Confirmação	
				Ion produto	Energia de colisão (eV)	Ion produto	Energia de colisão (eV)
Acefato	0,90	183,9	20	142,8	10	94,6	25
Acetamiprido	2,39	223,1	35	125,9	22	90	35
Azinfós Metílico	6,24	318,1	20	132	17	159,9	33
Azoxistrobina	6,98	404,1	15	372	16	328,9	30
Bitertanol	9,17	338,1	15	98,9	14	70,1	10
Boscalida	7,21	343	30	307	20	271,2	30
Buprofezina	10,27	306,1	20	201	12	115,9	16
Carbaril	4,84	219	10	144,9	16	126,9	35
Ciproconazol	7,70	292,1	25	70,1	18	124,9	30
Ciprodinil	8,50	226,1	45	92,9	35	107,9	25
Clofentezina	9,00	303	20	137,9	14	101,9	35
Clorpirifos	10,40	350,1	25	97	33	197,9	19
Clorpirifos-metílico	8,96	322	40	125	19	289,9	19
Clorprofam	7,65	214	20	154	20	172	10
Cresoxim-metílico	8,38	314,2	15	115,9	14	131	25
Diazinona	8,85	305,1	25	169	22	96,9	35
Diclorvós	4,32	220,9	25	108,8	18	126,9	18
Difenoconazol	9,50	406,1	35	250,9	25	187,8	40
Dimetoato	2,30	230	20	198,8	10	124,8	22
Dimetomorfo	7,50	388,1	35	300,9	20	165	30
Diniconazol	9,23	326,1	35	70,1	25	158,9	30
Diuron	5,70	233	25	72	18	159,9	25
Espinosade A	11,56	732,6	50	142	31	98,1	59
Espinosade D	11,80	746,5	45	142,0	31	98,1	53
Espiroxamina	8,80	298,3	30	144	20	100	30
Etoprofós	8,00	243	30	131	20	173	15
Famoxadona	9,00	392,2	20	331,1	9	93	31
Fembuconazol	8,20	337,1	35	70,1	18	124,9	30
Femproximato	11,00	422,3	30	366,1	17	137,9	31
Fempropimorfe	11,83	304,2	45	147	31	130	25
Fenexamida	7,90	302,1	35	97	25	142,7	40
Fentiona	8,34	279	25	168,9	18	104,9	25
Flusilazole	8,40	316,1	35	165	25	247	18
Flutolanil	7,76	324,1	25	242	25	262	18
Flutriafol	5,80	302,1	25	122,9	16	70,1	30
Hexaconazol	9,00	314,1	30	70,1	20	158,8	40
Imidacloprido	1,94	256,1	25	174,9	20	209	12

Tabela 7 – Pesticidas analisados por LC-MS/MS, valores dos t_R , voltagem do cone, íons precursores, íons produtos e energia de colisão, para as duas transições.

(conclusão)

Pesticida	t_R (min)	Ion precursor	Voltagem do cone (V)	Transições			
				Quantificação		Confirmação	
				Ion produto	Energia de colisão (eV)	Ion produto	Energia de colisão (eV)
Iprovalicarbe	7,85	321,2	20	118,9	18	203	10
Linurom	6,55	249	20	159,9	20	181,9	16
Malationa	7,30	331	20	126,9	12	285	10
Mepanipirim	8,02	224,1	40	106	25	77	40
Metalaxil	6,10	280,1	25	220	12	192	18
Metamidofós	0,87	141,9	30	93,9	12	124,8	14
Metidationa	6,00	303	20	84,9	22	144,8	12
Metiocarb	6,85	226,1	20	121	20	168,9	10
Metomil	1,39	162,9	15	88	10	105,9	10
Metoxifenzida	7,88	369,2	15	148,9	20	313	10
Miclobutanil	7,60	289,1	30	70,1	18	124,9	30
Monocrotofós	1,60	224	20	126,8	16	97,9	14
Ometoato	1,00	214	25	124,8	22	182,8	10
Oxadixil	3,90	279,1	20	219	12	132,3	25
Oxamil	1,21	237	15	72	10	90	10
Pencicuum	9,30	329,1	30	124,9	30	218	16
Penconazol	8,60	284,1	30	70,1	16	158,9	30
Picoxistrobina	8,83	368,1	15	144,9	25	204,9	10
Piraclostrobina	9,00	388,1	25	163	25	193,9	12
Pirimetanil	6,70	200,1	45	106,9	25	82	25
Pirimicarbe	5,65	239,1	30	72	20	182	16
Piriproxifeno	10,30	322,2	25	95,9	15	184,9	23
Procloraz	9,15	376	20	307,9	12	70,1	25
Profenofós	9,90	372,9	30	302,6	20	127,9	40
Propargito	10,80	368,3	20	231,1	11	175	15
Propiconazol	8,90	342,1	35	158,9	20	69,1	30
Tebuconazol	8,68	308,2	30	70,1	24	124,9	40
Tebufempirado	10,20	334,2	45	116,9	35	144,9	25
Tebufenozido	8,45	353,2	15	132,9	18	297	10
Tetraconazol	8,07	372	35	158,9	35	70,1	22
Tiabendazol	3,40	202	45	174,9	25	130,9	30
Tiacloprido	2,84	253	35	125,8	20	90	40
Tiametoxam	1,44	292,1	20	210,9	12	180,9	22
Triadimenol	7,71	296,1	15	70	10	98,9	14
Triclorfom	2,39	256,9	25	108,8	20	126,8	18
Trifloxistrobina	9,70	409,2	25	185,9	14	145	40
Zoxamida	9,13	336	30	186,9	25	158,9	40

3.8.2 Seleção do padrão interno

Os compostos escolhidos para serem empregados como padrão interno são pesticidas, pois apresentam características semelhantes aos demais compostos analisados. Para assegurar que estes não estariam presentes nas amostras encaminhadas para análise, escolheram-se pesticidas banidos pelas legislações e/ou pouco encontrado nas análises de monitoramento.

Neste estudo, a finalidade dos padrões internos foi somente propiciar uma avaliação qualitativa, a fim de confirmar a eficácia do procedimento de extração e do sistema de injeção. A quantificação foi realizada por padronização externa, ou seja, levando-se em consideração apenas a área do pico do pesticida em estudo.

3.8.3 Análise dos solventes e reagentes

Para a verificação da pureza dos solventes e reagentes utilizados realizou-se a análise dos mesmos através dos procedimentos de extração, discutidos no item 3.8.4.3, porém sem a adição da amostra. O mesmo volume de água utilizado na etapa de extração foi adicionado junto aos solventes e reagentes para avaliar a presença de interferências em relação à procedência da água.

3.8.4 Validação dos métodos multirresiduais

3.8.4.1 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas, tanto em solvente, quanto nos extratos das matrizes, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Injetou-se primeiramente metanol, e, em seguida, 6 vezes a sequência das soluções analíticas.

Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média das áreas e do RSD %. As curvas analíticas ($y = ax + b$) foram obtidas colocando-se os valores de concentração de cada pesticida estudado no eixo das abscissas e as respectivas áreas obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft® Excel, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a), o coeficiente linear (b) (CALLEGARI-JACQUES, 2003) das curvas analíticas bem como a equação da reta, para cada composto analisado, para todas as matrizes.

Para a avaliação da existência do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico (metanol) e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos das matrizes. O cálculo foi efetuado através da Equação 4.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

A1: média das áreas da solução analítica de cada pesticida, preparada em extrato, numa dada concentração;

A2: média das áreas da solução analítica de cada pesticida, preparada em solvente, numa dada concentração.

Desta forma, pode-se verificar se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises. (ZROSTLIKOVA; HAJLSLOVA; GODULA, 2001).

3.8.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada um dos 75 pesticidas estudados, procedeu-se à determinação da estimativa do LOD do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do LOQ do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir, das áreas e do RSD% (6 réplicas) de cada composto, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicando-se a Equação 5 obteve-se a estimativa do LOD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$).

$$LOD_i (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \times RSD \times C \quad (5)$$

Onde:

RSD: desvio padrão relativo das áreas obtidas

C: concentração da solução analítica

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para cada um dos métodos de extração (Apêndice 2), obtém-se a estimativa do LOD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A partir do LOD_i , aplicando-se a Equação 6, obtém-se o LOQ_i .

$$LOQ_i (\mu\text{g L}^{-1}) = LOD_i \times 3,33 \quad (6)$$

Multiplicando-se o LOQ_i , pelos fatores (Apêndice 2) de cada método de extração, obtém-se o LOQ_m estimado calculado, para cada método. No entanto, o valor real do LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) é considerado como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com $RSD\% \leq a 20\%$. (PIZZUTTI, 2006)

3.8.4.3 Procedimento de fortificação e recuperação (Exatidão)

Para o procedimento de extração utilizou-se uma modificação do método QuEChERS original para frutas e hortaliças, devido ao fato de se estar trabalhando com grãos. (ANASTASSIADES; LEHOTAY; STAJNBAHER; et al, 2003)

Pesou-se $5 \pm 0,05$ g de milho moído, diretamente em tubos de teflon[®] com tampa rosqueável (capacidade de 50 mL), e adicionou-se 7,5 mL água. A mistura foi deixada em repouso, por aproximadamente 1 hora, para hidratação das amostras. Logo após, efetuou-se a fortificação, com a mistura dos pesticidas estudados, utilizando-se pipetador *Hand Step*[®], nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$,

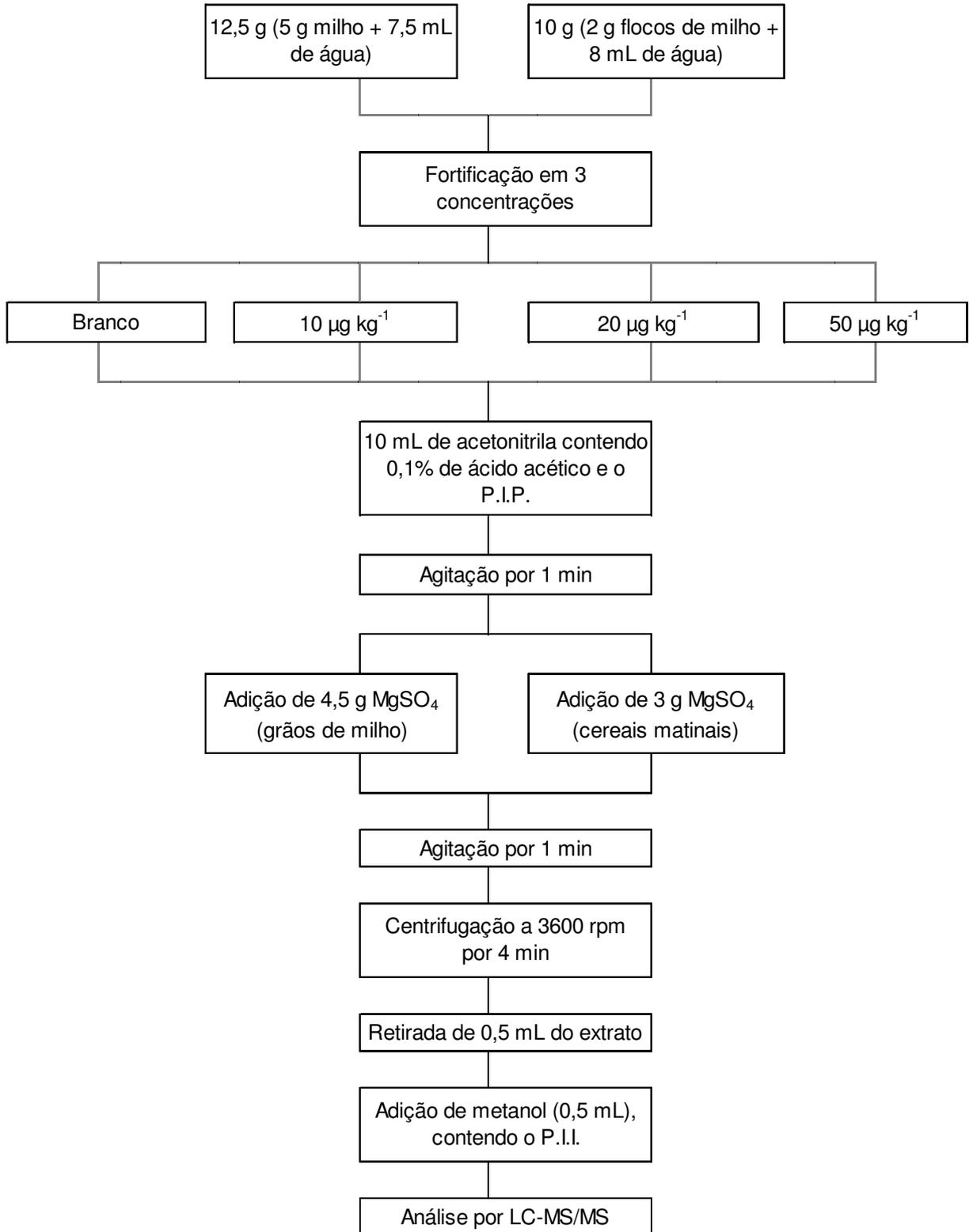
adicionando-se para isso, respectivamente, 50, 100 e 250 μL de uma solução analítica $1000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético e o padrão interno do procedimento (P.I.P), quinalfós, na concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação em mesa agitadora por cerca de 1 minuto. Em seguida, acrescentaram-se 4,5 g de sulfato de magnésio anidro (tendo o cuidado para não ficar nas bordas), e repetiram-se as agitações seguido da centrifugação a 4000 rpm, durante 4 minutos. Posteriormente, retirou-se 0,5 mL dos extratos e adicionaram-se 0,5 mL de metanol contendo o padrão interno do instrumento (P.I.I.), propoxur, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, seguindo, diretamente para a análise por LC-MS/MS, ou seja, sem passar por nenhum procedimento de purificação, mesmo se tratando de matrizes complexas.

O procedimento de extração para os cereais matinais foi praticamente o mesmo citado anteriormente, com a diferença de se utilizar $2 \pm 0,02$ g de amostra, 8 mL de água para hidratação e 3 g de sulfato de magnésio anidro.

Na Figura 15, está representado o procedimento do método multirresidual para as duas matrizes estudadas, baseado no método QuEChERS, o qual está representado na Figura 16. Percebe-se que a quantidade de amostra e de MgSO_4 foi modificada, bem como foi excluída a etapa de purificação do método.

Os procedimentos de fortificação foram realizados 6 vezes, para cada uma das 3 concentrações ($10, 20$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$), para cada uma das 2 matrizes estudadas (milho em grãos e cereais matinais), e também para as matrizes “branco” (aquelas sem a presença de pesticidas), para verificação da real ausência desses compostos na matriz. Este extrato da matriz é chamado de “branco” da matriz e também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas, quando em extrato da matriz.



Padrão interno do procedimento (P.I.P): quinalfós ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$)
 Padrão interno do instrumento (P.I.I.): propoxur ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)

Figura 15 – Representação esquemática do método de análise de resíduos de pesticidas em grãos de milho e cereais matinais, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de análise por LC-MS/MS.

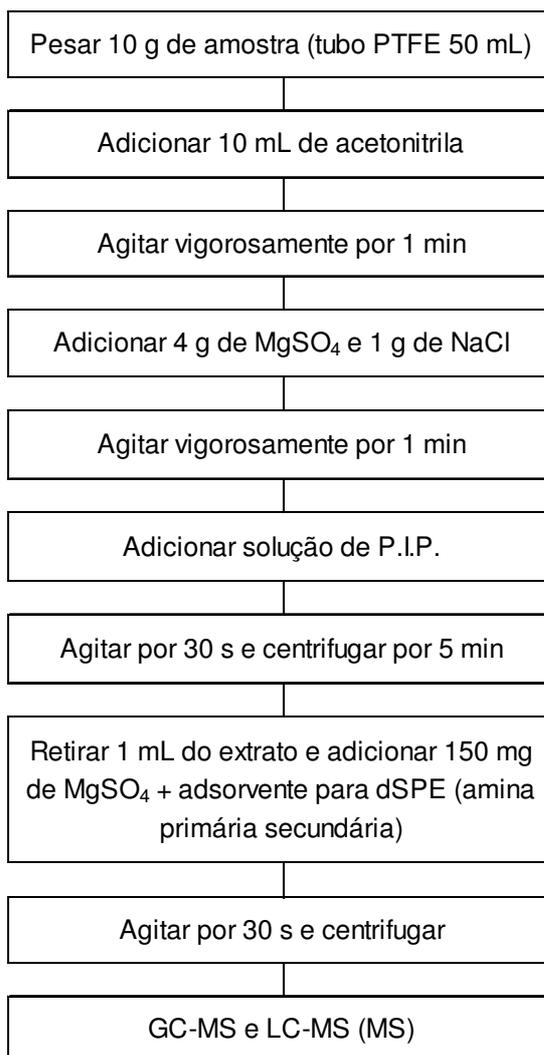


Figura 16 – Representação esquemática do método QuEChERS, utilizado para extração de pesticidas em frutas e hortaliças.

3.9 Análise de amostras reais

Após o desenvolvimento e a validação do método individual para determinação de ditiocarbamatos, 12 amostras de arroz polido foram adquiridas em supermercados das cidades de Santa Maria (RS, Brasil) e de Amsterdã (Holanda), e analisadas para avaliar a possível presença de resíduos destes fungicidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Método individual

Até o presente momento, não se tem conhecimento de nenhum método para determinação de ditiocarbamatos em grãos. Desta forma, os estudos para o desenvolvimento do método individual partiu de um método já existente na literatura para frutas e hortaliças proposto por De Kok; Van Bodegraven, 2002.

4.1.1 Avaliação da separação cromatográfica

O tempo de retenção do CS₂ foi de $5,0 \pm 0,02$ minutos, determinado conforme o item 3.7.1. O tempo total de análise foi de 21,5 min, necessário para limpar o sistema e não gerar interferências nas corridas cromatográficas seguintes.

4.1.2 Análise dos solventes e reagentes

A análise dos solventes e reagentes foi realizada conforme o procedimento presente no item 3.7.3.6. Apesar da presença de outros picos nos cromatogramas obtidos por GC-PFPD (Figura 17) e GC-ITD-MS, não se encontrou nenhum pico no tempo de retenção do CS₂, demonstrando desta forma que os mesmos não estavam contaminados com CS₂ e que poderiam ser utilizados.

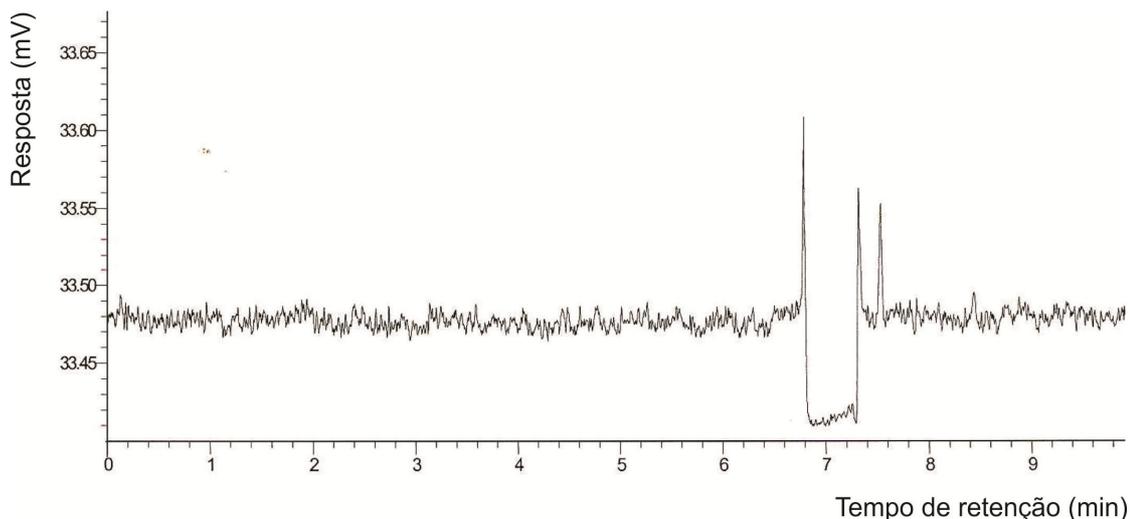


Figura 17 – Cromatograma obtido por GC-PFPD na análise do branco dos solventes e reagentes, durante o desenvolvimento do método individual de análise ditiocarbamatos.

4.1.3 Avaliação das amostras para uso como amostra branco

As amostras de soja, arroz e milho foram avaliadas para uso como amostra branco, conforme descrito no item 3.6. Na Figura 18, tem-se representado o cromatograma obtido para a amostra branco de soja, empregando GC-PFPD, onde pode ser observado a inexistência de picos no t_R do CS_2 . O mesmo comportamento foi observado para as demais matrizes.

Nas Figuras 19 e 20 estão presentes os espectros de massas de uma solução analítica de CS_2 ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e da amostra branco de arroz polido, respectivamente. Ao compararem-se as duas figuras, pode-se verificar que a amostra de arroz polido (Figura 20) não contém resíduos de ditiocarbamatos, pois o espectro não apresenta nenhum sinal nas razões m/z 76 e 78, características do CS_2 , no t_R deste (Figura 20).

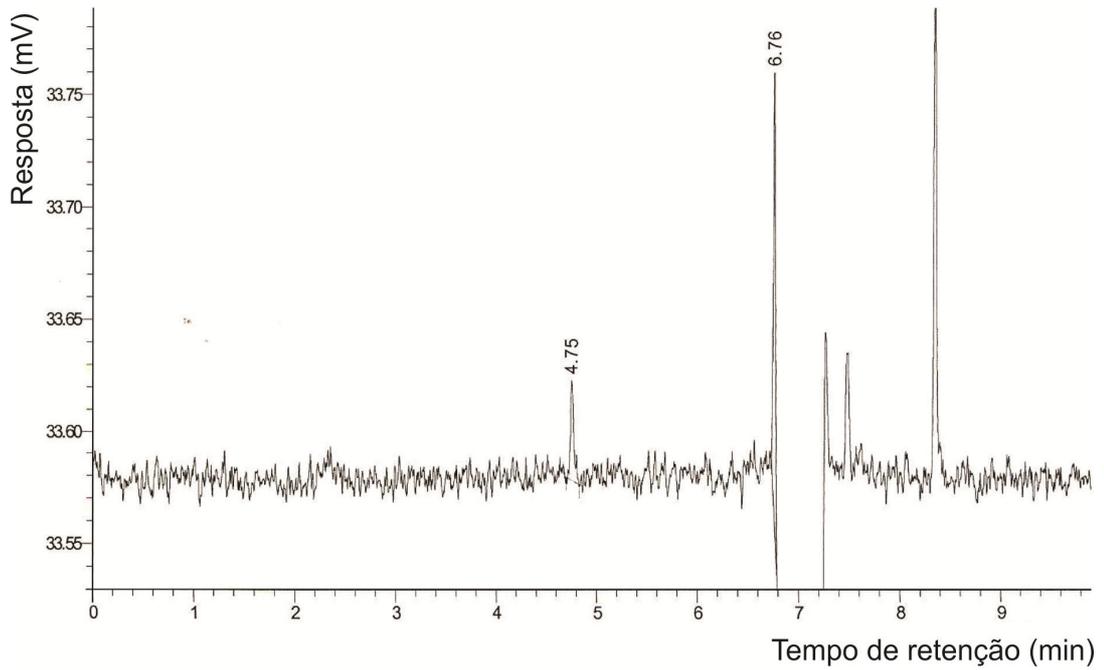


Figura 18 – Cromatograma obtido por GC-PFPD na análise da amostra branco de soja, durante o desenvolvimento do método individual de análise ditio carbamatos.

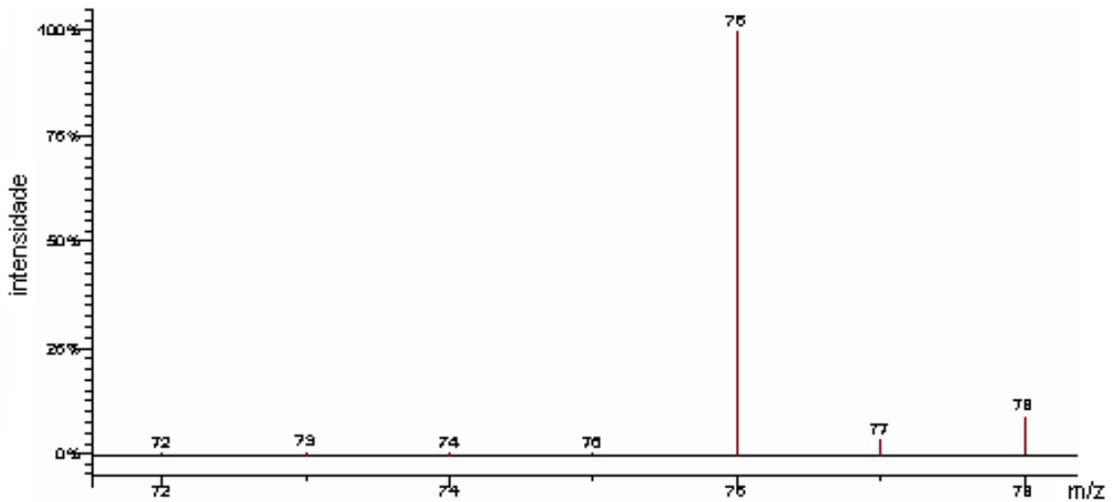


Figura 19 – Espectro de massas obtido por GC-ITD-MS para solução analítica de CS_2 4 mg L^{-1} , no t_R do CS_2 .

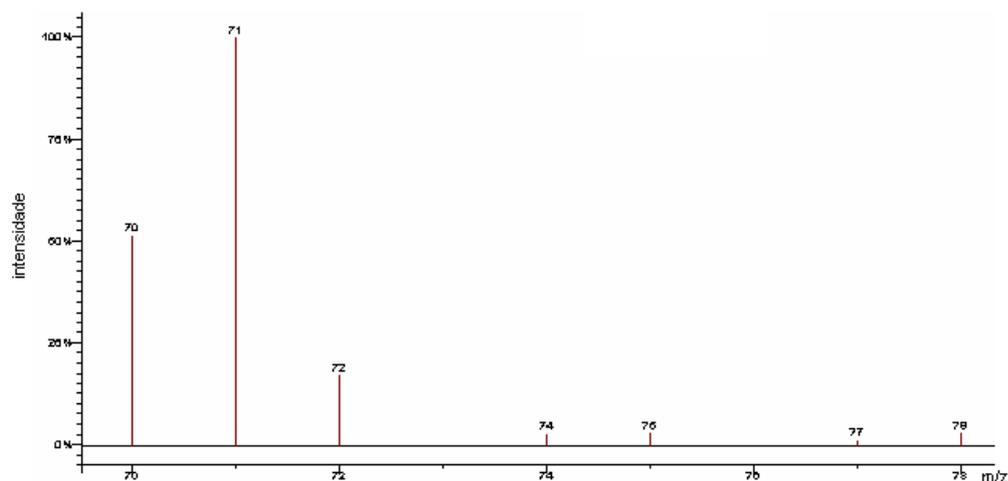


Figura 20 – Espectro de massas obtido por GC-ITD-MS na análise da amostra branco de arroz polido.

Para as amostras branco de milho, o perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao da soja e do arroz, tanto ao ser empregado o sistema GC-PFPD quanto o GC-ITD-MS.

4.1.4 Desenvolvimento e validação dos métodos (GC-PFPD e GC-ITD-MS)

4.1.4.1 Purificação da amostra (testes 1, 2 e 3)

Procedimentos de purificação de amostras são necessários devido à utilização de solventes apolares durante a extração, que fazem com que um grande número de interferentes migre da matriz para o extrato, os quais poderão causar danos tanto a coluna cromatográfica quanto ao sistema de detecção, bem como gerar resultados errôneos.

O cromatograma representado na Figura 21, demonstra que o tempo de retenção da gordura foi de aproximadamente 13,5 minutos, ao se injetar uma alíquota de 10 μL de solução de óleo de soja em isoctano ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$).

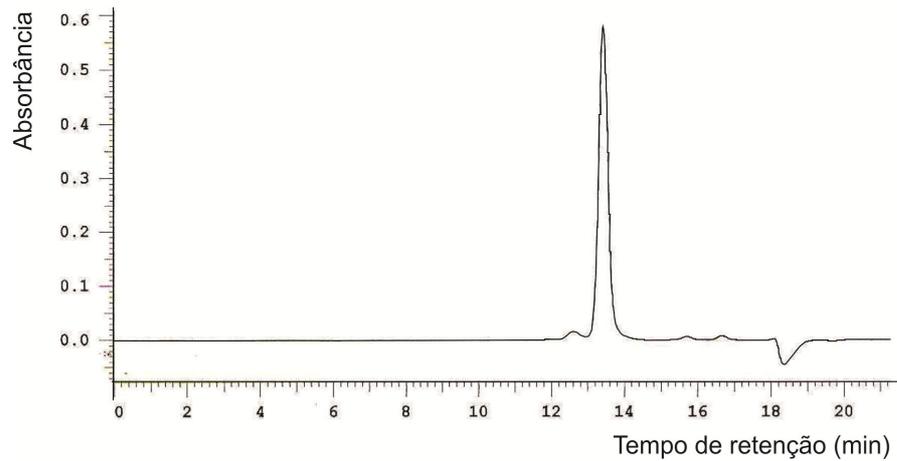


Figura 21 – Cromatograma obtido da análise cromatográfica de óleo de soja em isoctano por HPLC-DAD.

Entre os 6 adsorventes testados (teste 1), amina primária e secundária (PSA), $C_{18}OH$, C_{18} , alumina, florisil[®] e sílica gel, utilizando-se 100 mg dos mesmos, verificou-se que os que apresentaram melhor desempenho, em relação a eficiência de remoção de gordura do extrato foram sílica gel, alumina e florisil[®], conforme pode ser comprovado através da Figura 22.

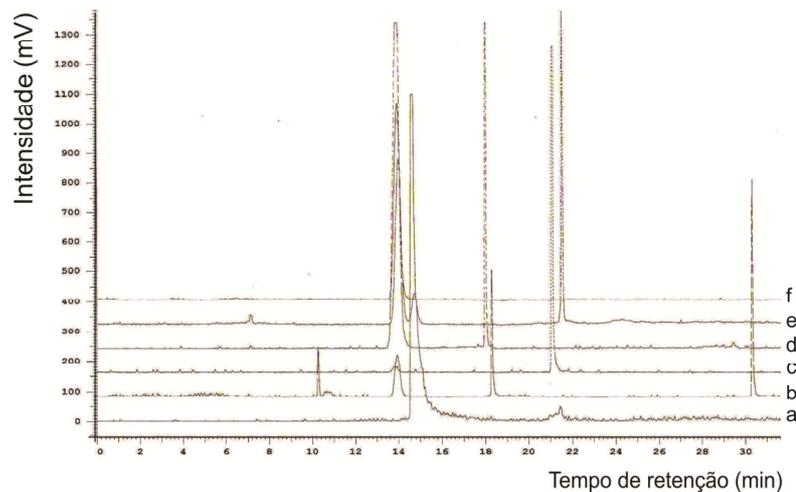


Figura 22 – Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE empregando 100 mg de (a) sílica gel, (b) florisil[®], (c) alumina, (d) C_{18} , (e) $C_{18}OH$ e (f) PSA.

Ao se utilizar 100 mg de sílica gel na dSPE nenhum pico no tempo de retenção da gordura foi obtido. Tanto os extratos purificados com florisil[®] quanto aqueles com alumina apresentaram picos de gordura com pequena intensidade quando comparados com os demais adsorventes. Assim, na continuidade do estudo, diferentes quantidades (50, 70, 100 e 200 mg) dos adsorventes sílica gel, alumina e florisil[®] foram estudados (teste 2), empregando HPLC-DAD e HPLC-ELSD.

O HPLC-ELSD apresentou melhor detectabilidade para compostos gordurosos frente ao sistema HPLC-DAD, uma vez que ao se utilizar este último, independentemente do tipo e da quantidade do adsorvente utilizado, os cromatogramas obtidos apresentaram sempre o mesmo perfil e nenhum sinal referente à gordura foi detectado, conforme pode ser observado na Figura 23.

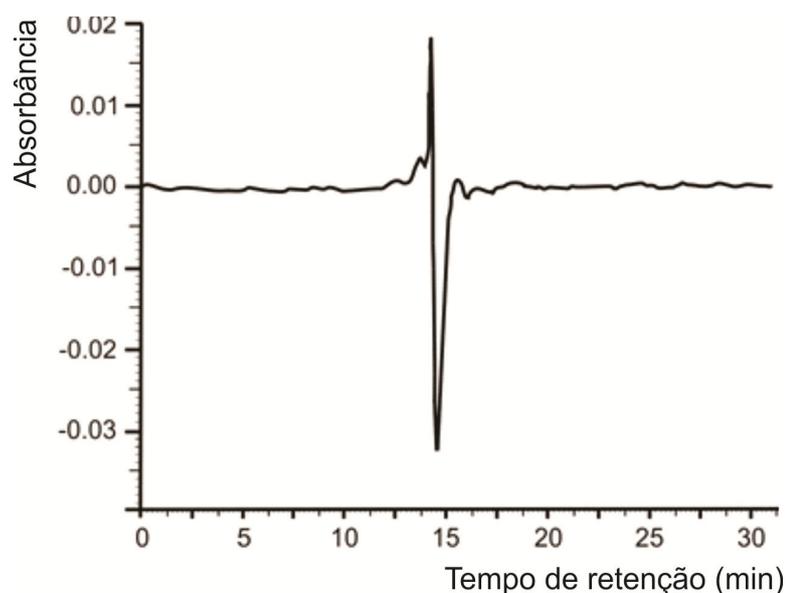


Figura 23 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD após a purificação dos extratos por dSPE com 50 mg de sílica gel.

Observando a Figura 24, verifica-se que uma quantidade superior a 200 mg de alumina é necessária para purificar o volume de 1,5 mL do extrato de soja. Cabe ressaltar que praticamente o mesmo comportamento foi obtido quando se avaliou o florisil[®].

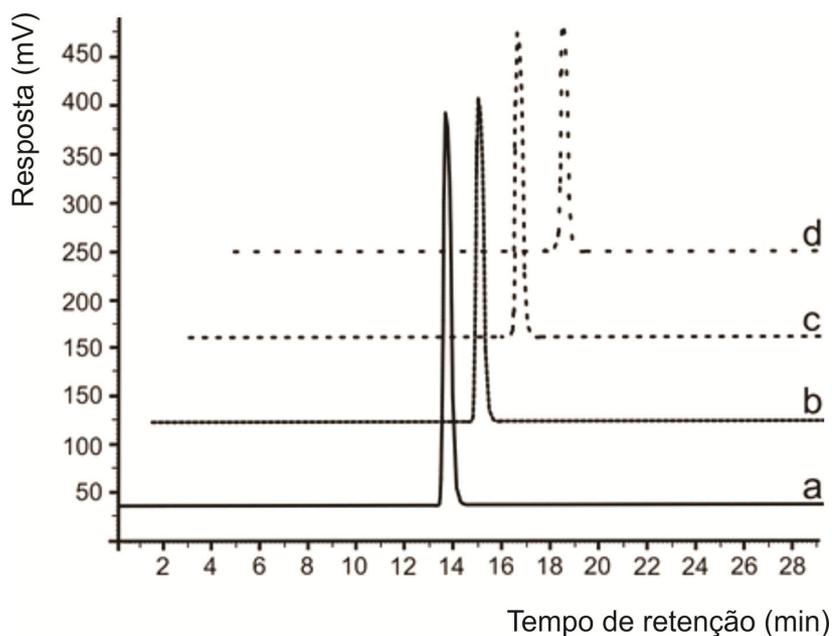


Figura 24 – Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE com (a) 50 mg, (b) 70 mg, (c) 100 mg e (d) 200 mg de alumina.

Como mencionado anteriormente, o sistema HPLC-ELSD apresentou melhor detectabilidade para gordura, sendo possível observar que apenas 50 mg de sílica gel Figura 25 foi o suficiente para a purificação do extrato de soja, enquanto que para os demais adsorventes é necessária uma quantidade maior. Com isto, após os testes, a sílica gel foi escolhida como o melhor adsorvente a ser utilizado para a purificação dos extratos, na etapa de validação do método, pois demonstrou ser um adsorvente efetivo, permitindo a determinação de ditiocarbamatos em soja por cromatografia gasosa sem perda da detectabilidade e/ou danos a coluna e/ou ao detector.

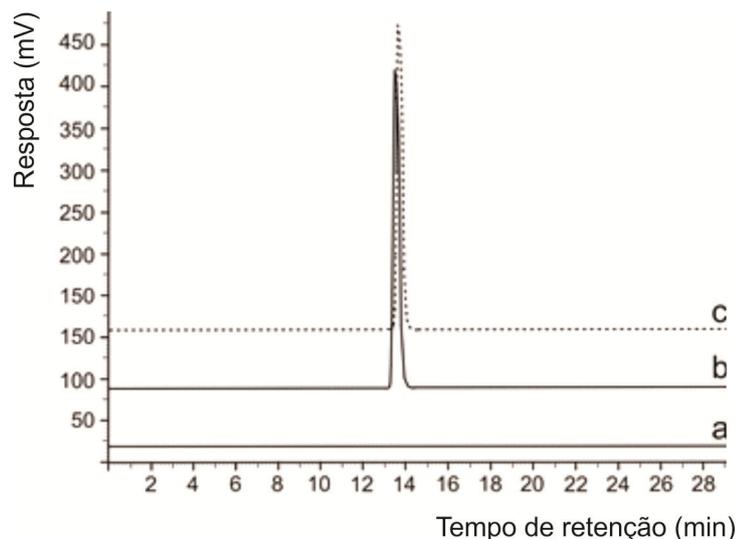


Figura 25 – Comparação entre os cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD após a purificação dos extratos por dSPE com 50 mg de (a) sílica gel, (b) alumina e (c) florisil[®].

A seguir, utilizou-se 50 mg de sílica gel, conforme definido pelo teste 2, para verificar o tempo de contato necessário, entre o adsorvente e o extrato, a fim de purificar o mesmo.

A análise cromatográfica foi realizada por GC-PFPD e o resultado obtido para os tempos avaliados de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos (teste 3) foi o mesmo, ou seja, não se observou nenhum pico no tempo de retenção da gordura,. Desta forma, a condição otimizada para a etapa de purificação foi de 50 mg de sílica gel e tempo de contato zero, ou seja, logo após que a sílica gel foi decantada, retirou-se uma alíquota do extrato e levou-o para a análise cromatográfica.

4.1.4.2 Otimização do procedimento de extração (testes 4, 5 e 6)

Outros parâmetros como a massa ideal de soja a ser utilizada no método, o tempo de contato entre a soja e a água, e o tempo de permanência dos frascos sob agitação também foram determinados através dos testes 4, 5 e 6.

Diferentes quantidades de soja (10, 25 e 50 g) foram avaliadas (teste 4) para determinar a massa ideal a ser empregada objetivando bons percentuais de recuperação sem interferir, no entanto, na detectabilidade do método, uma vez que o analito não permite etapas de concentração, as quais poderiam melhorar o LOD e LOQ.

Quando foi testado 50 g de amostra, não se obteve boa separação entre a fase do isoctano e a ácida, além do volume ser muito grande para um frasco de 250 mL de capacidade. Por outro lado, ao se utilizar 10 g de soja obtiveram-se valores muito altos de LOD e LOQ. Assim, 25 g demonstraram ser a massa ideal de soja a ser utilizada além de apresentar bons percentuais de recuperação e valores de LOQ.

Avaliou-se o tempo de contato entre a soja e a água (teste 5), a fim de verificar se este parâmetro teria influência sobre os resultados obtidos.

Os resultados obtidos em termos de percentual de recuperação, quando a amostra foi umidificada e imediatamente extraída (tempo 0), apresentaram-se praticamente os mesmos daqueles obtidos quando se deixou a soja em contato com água por 15, 30 ou 60 minutos. Na Tabela 8, tem-se os percentuais de recuperação e o RSD% entre eles, obtidos ao se fortificar as amostras de soja a $0,1 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$. Desta forma, optou-se por se utilizar tempo 0, ou seja, após a soja ser moída e a água ser adicionada, seguiu-se o procedimento de extração, não necessitando nenhum período de espera.

Tabela 8 – Percentuais de recuperação e RSD (%) obtidos das análises dos extratos de soja por GC-PFPD, após fortificação a $0,1 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$.

Tempo de contato (min)	Recuperação (%) [*]	RSD (%)
0	72	
15	79	4,3
30	77	
60	71	

^{*}n= 2

O teste 6 foi realizado com a finalidade de avaliar o tempo de permanência dos frascos sob agitação, em banho de água, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$. No método de extração para

frutas e hortaliças são necessárias 2 horas de agitação. Dentre os intervalos testados (item 3.7.3.2), os melhores percentuais de recuperação foram obtidos entre 60 e 120 minutos de extração. Desta forma optou-se por utilizar 60 minutos na etapa de extração.

Após concluir todas as avaliações necessárias (desenvolvimento do método), passou-se para a etapa de validação, empregando para isto o método otimizado o qual está representado na Figura 14.

4.1.4.3 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

A Tabela 9 apresenta o coeficiente angular (a), o coeficiente linear (b) e o coeficiente de determinação (r^2) das curvas analíticas, obtidas para as soluções analíticas de concentração 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg CS₂ L⁻¹, preparadas tanto em solvente quanto nos extratos das matrizes estudadas, e analisadas por GC-PFPD e GC-ITD-MS.

De acordo com as equações obtidas para as curvas analíticas, ambos os métodos apresentaram resposta linear, inclusive nas menores concentrações, pois o coeficiente de determinação (r^2) foi maior que 0,99, considerado excelente para a análise de resíduos. (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996)

Nas Figuras 26 e 27, têm-se a comparação entre as respostas obtidas para as curvas analíticas em solvente e nos extratos das matrizes, ao se empregar GC-PFPD e GC-ITD-MS, respectivamente.

Pode-se verificar que a resposta dos detectores foi bastante próxima ao se comparar as soluções analíticas preparadas em solvente e aquelas preparadas nos extratos das matrizes.

Considerando-se que o efeito matriz é o efeito que promove aumento ou diminuição da resposta do detector, de um analito presente no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico, pode-se dizer que o efeito matriz é muito baixo para as matrizes estudadas (soja, arroz e milho).

No entanto, é importante lembrar que após a troca do insersor, este deve ser desativado através de algumas injeções do extrato da matriz, antes de ser empregado.

Tabela 9 – Parâmetros das curvas analíticas obtidos na faixa de 0,02 a 2,0 mg L⁻¹ para CS₂.

Matriz/solvente	Sistema cromatográfico	a	b	Coefficiente de determinação (r ²)
Isoctano	GC-PFPD	10,053	0,1122	0,9997
	GC-ITD-MS	27669	18,715	0,9997
Soja	GC-PFPD	10,624	0,2361	0,9992
	GC-ITD-MS	19928	175,48	0,9997
Arroz polido	GC-PFPD	10,12	0,2698	0,9966
	GC-ITD-MS	22295	37,114	0,9998
Milho	GC-PFPD	10,04	0,4611	0,9959
	GC-ITD-MS	22300	248,67	0,9998

É importante ressaltar que a resposta do PFPD, quando empregado o modo enxofre, é quadrática. Assim sendo, é necessário extrair a raiz quadrada do valor obtido para a área, e usá-lo para se construir a curva analítica.

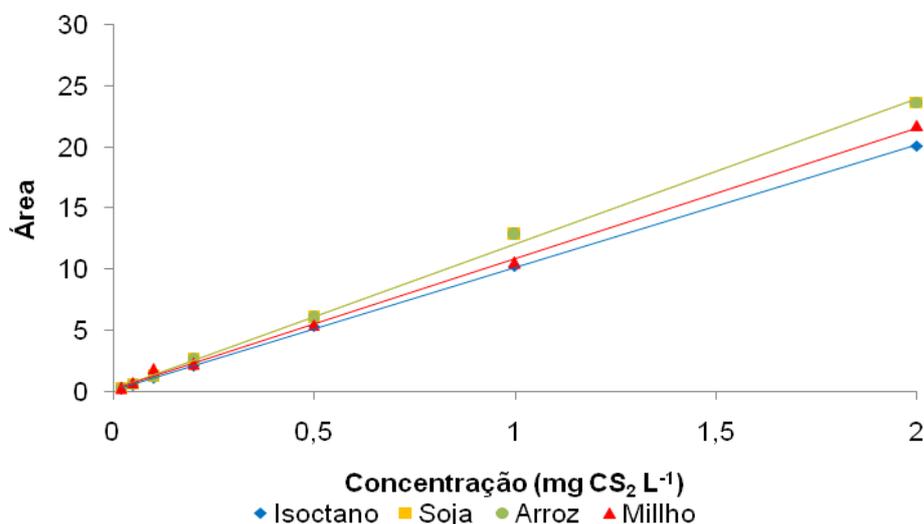


Figura 26 – Curvas analíticas com soluções de CS₂ em solvente e em extrato de soja, arroz e milho, na faixa de concentração de 0,02 a 2,0 mg CS₂ L⁻¹, analisadas por GC-PFPD.

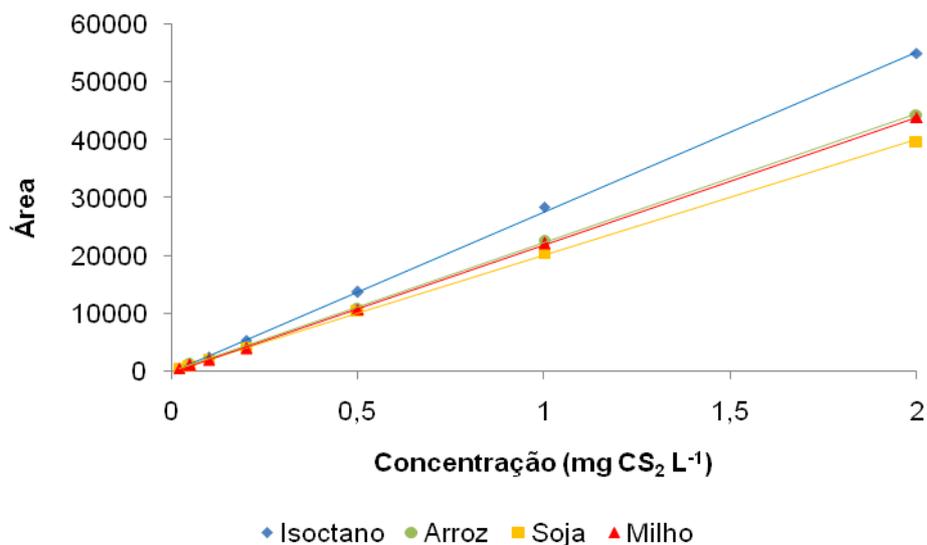


Figura 27 – Curvas analíticas com soluções de CS₂ em solvente e em extrato de soja, arroz e milho, na faixa de concentração de 0,02 a 2,0 mg CS₂ L⁻¹, analisadas por GC-ITD-MS.

4.1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 10 apresenta os valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método. Os resultados foram obtidos segundo os procedimentos descritos no item 3.7.3.4.

Tabela 10 – Valores de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos para o CS₂, nos dois sistemas cromatográficos, para as matrizes soja, arroz e milho.

Matriz	Sistema cromatográfico	Instrumental		Método	
		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Soja	GC-PFPD	0,02	0,05	20	50
	GC-ITD-MS				
Arroz polido	GC-PFPD	0,02	0,05	25	62
	GC-ITD-MS				
Milho	GC-PFPD	0,02	0,05	20	50
	GC-ITD-MS				

Em virtude do método não apresentar nenhuma etapa de pré-concentração, os resultados encontrados para LOD e LOQ do método não puderam ser reduzidos. Mesmo assim, são considerados excelentes, levando-se em conta a complexidade das matrizes analisadas e os valores de LMR permitidos pela ANVISA para ditiocarbamatos (Tabela 11).

Tabela 11 – Limites máximos de resíduos estabelecidos pela ANVISA para ditiocarbamatos em soja, arroz e milho. (ANVISA, 2011).

Matriz	LMR (mg CS ₂ kg ⁻¹)
Soja	0,3
Arroz	3,0
Milho	0,3

Nas Figuras 28 e 29 têm-se os cromatogramas obtidos por GC-PFPD onde estão demonstrados os sinais obtidos nas análises das soluções analíticas de CS₂, correspondentes ao LOD e ao LOQ do instrumento, respectivamente.

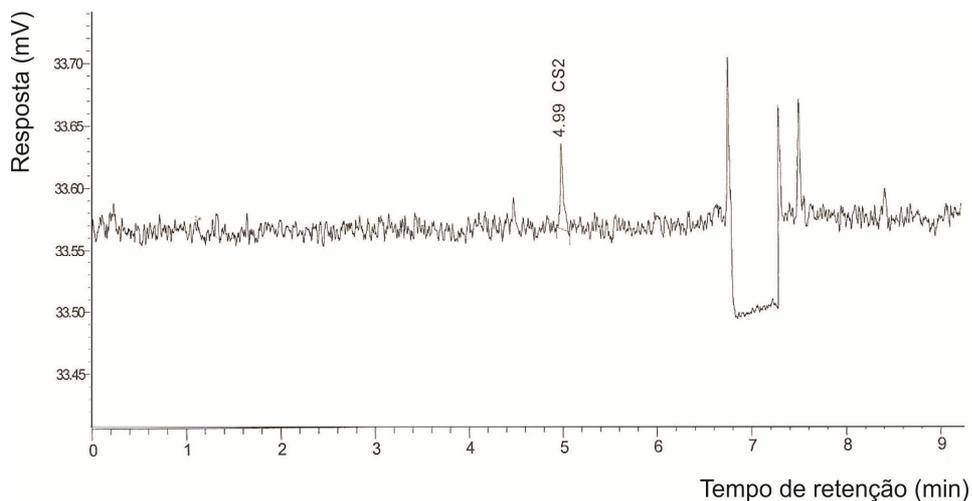


Figura 28 – Cromatograma obtido por GC-PFPD nas análises das soluções analíticas de CS₂, correspondente ao LOD (0,02 mg CS₂ L⁻¹).

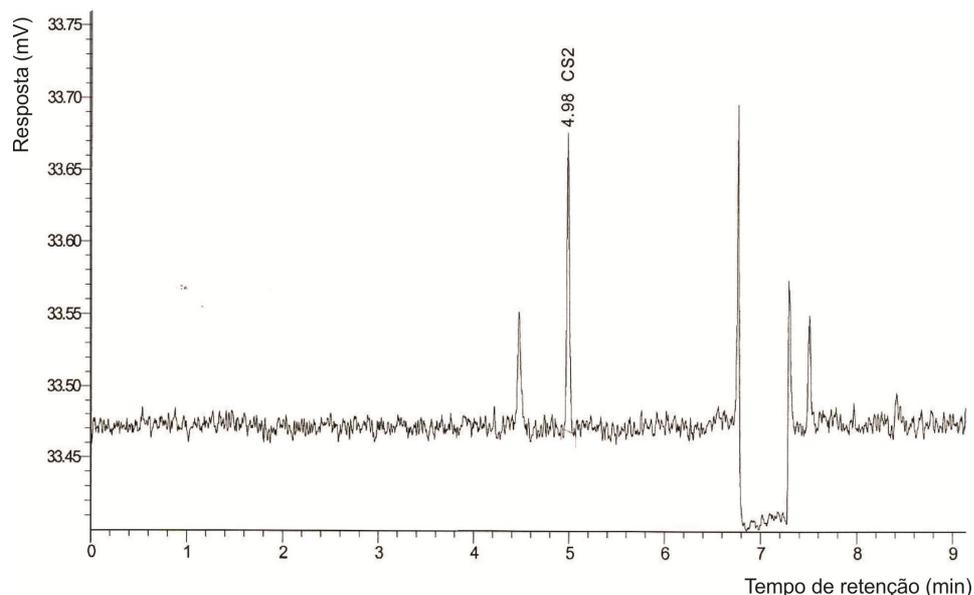


Figura 29 – Cromatograma obtido por GC-PFPD nas análises das soluções analíticas de CS₂, correspondente ao LOQ (0,05 mg CS₂ L⁻¹).

4.1.4.5 Repetitividade e precisão intermediária

Os resultados dos estudos de precisão, em termos de repetitividade e precisão intermediária do instrumento (soluções analíticas em solvente) e do método, estão descritos a seguir. A Tabela 12 apresenta a precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e de precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}) para a resposta, em termos de área, das soluções analíticas de CS₂ nas referidas concentrações. Os dados de repetitividade do método (RSD_{rm}) estão na Tabela 13.

Tabela 12 – Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e de precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração.

Sistema cromatográfico	Concentração (mg L^{-1})	RSD_{ri} (%)	RSD_{pii} (%)
GC-PFPD	0,05	6,1	4,1
	0,2	3,1	4,5
	1,0	1,7	2,3
GC-ITD-MS	0,05	6,3	2,3
	0,2	7,2	2,1
	1,0	5,8	1,9

Os resultados, em termos de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para o instrumento e para o método são muito bons, uma vez que estão bem abaixo do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos (SANCO, 2009), onde a precisão para valores de área deve ser $\leq 20\%$.

4.1.4.6 Recuperação

A Tabela 13 apresenta os valores de recuperação, com o respectivo $RSD_{rm}\%$, para fortificações em três níveis de concentração (0,05, 0,1 e 0,5 $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$). Os resultados de recuperação do CS_2 , empregando curva analítica, são satisfatórios para as concentrações estudadas, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas (SANCO, 2009), os quais devem estar entre 70 e 120%, com valores de RSD de até $\pm 20\%$.

Tabela 13 – Valores médios de recuperação e RSD%, em 3 níveis de fortificação, para soja, arroz polido e milho, analisados por GC-PFPD e GC-ITD-MS.

Matriz	Sistema cromatográfico	Nível de fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Recuperação* (%)	RSD _{rm} (%)
Soja	GC-PFPD	0,05	82	1,8
		0,1	86	4,9
		0,5	68	8,7
	GC-ITD-MS	0,05	86	7,1
		0,1	91	7,2
		0,5	74	7,6
Arroz	GC-PFPD	0,05	75	2,7
		0,1	89	2,6
		0,5	83	3,4
	GC-ITD-MS	0,05	88	3,5
		0,1	92	5,5
		0,5	84	3,9
Milho	GC-PFPD	0,05	88	3,4
		0,1	92	7,9
		0,5	63	5,8
	GC-ITD-MS	0,05	103	7,8
		0,1	96	3,0
		0,5	67	3,7

*n= 6 (6 extrações e 1 injeção cada)

Os percentuais de recuperação encontrados, para todos os níveis de fortificação estudados, foram excelentes e demonstram a exatidão dos métodos.

4.1.5 Análise das amostras reais

Ao aplicar-se o método desenvolvido e validado para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de arroz, não foram encontrados resíduos destes fungicidas acima do LOD e do LOQ do método, respectivamente, 25 e 62 µg CS₂ kg⁻¹.

O LMR permitido pela legislação nacional (ANVISA) para ditiocarbamatos é 3 mg CS₂ kg⁻¹, desta forma pode-se dizer que a população que ingeriu as amostras analisadas, consumiu um produto seguro em relação a presença de ditiocarbamatos.

4.2 Método multirresidual

O desenvolvimento e a validação de métodos multirresiduais são de grande valia, pois, através destes, pode-se determinar uma ampla faixa de pesticidas e seus metabólitos nas mais diversas matrizes. (HIEMSTRA; DE KOK, 2007).

A seguir, encontram-se os resultados obtidos na otimização e validação dos métodos cromatográficos para determinação de pesticidas em grãos de milho e cereais matinais, baseados nos procedimentos de extração do método QuEChERS. (ANASTASSIADES et al, 2003).

4.2.1 Análise dos solventes e reagentes

Ao efetuar-se o procedimento descrito no item 3.8.3, não se observou nenhuma contaminação dos solventes e reagentes utilizados para extração dos pesticidas das matrizes, inclusive da água, e puderam ser normalmente utilizados.

4.2.2 Otimização e validação dos métodos cromatográficos

4.2.2.1 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

Para o estudo de linearidade das curvas analíticas (faixa linear de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação) bem como do efeito matriz, todas as soluções analíticas foram preparadas em metanol e acetonitrila (50:50) e nos extratos das matrizes estudadas, para avaliar a influência dos extratos das matrizes sobre estes parâmetros, uma vez que o efeito matriz pode influenciar os resultados.

O intervalo linear e o r^2 obtidos para os pesticidas presentes nas soluções analíticas preparadas em solvente, e nos extratos das matrizes estudadas, apresentaram resultados satisfatórios e estão listados na Tabela 14.

Para as soluções preparadas em metanol, 73 pesticidas (97%) dos 75 presentes, apresentaram r^2 acima de 0,99, com faixa linear de análise de 0,1 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para 63% destes.

Os pesticidas presentes nas soluções preparadas no extrato branco de grãos de milho mostraram comportamento muito similar àqueles nas soluções em solvente, ou seja, para 97% dos pesticidas o r^2 obtido foi superior a 0,99, no intervalo linear de 0,1; 0,2 ou 0,5 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Já para as análises das soluções preparadas no extrato branco de cereais matinais, apenas 52% dos pesticidas apresentaram r^2 acima de 0,98, nos mesmos intervalos lineares obtidos para aquelas do grão de milho, valores estes aceitáveis para determinação de resíduos. (SANCO, 2009).

É importante ressaltar que valores de r^2 superiores a 0,99 significam que mais de 99% da variação dos valores de área obtidos pela análise cromatográfica, pode ser explicada pelo fato de que a concentração das soluções dos pesticidas também variou, segundo uma correlação positiva, indicando que há uma associação entre os valores de área e concentração do analito, os quais variam juntos, no intervalo estudado. (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Tabela 14 – Coeficiente de determinação e intervalo linear, para cada pesticida, obtidos pela análise cromatográfica de soluções analíticas preparadas em solvente e nos extratos das matrizes.

(continua)

Pesticida	Metanol:acetonitrila (50:50)		Grãos de Milho		Cereais matinais	
	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Acefato	0,9983	0,5 - 50	0,9986	1,0 - 50	0,9920	0,5 - 50
Acetamiprido	0,9981	0,1 - 50	0,9995	0,1 - 50	0,994	0,1 - 50
Azinfós-metílico	0,9862	0,5 - 50	0,9889	0,5 - 50	0,9949	0,1 - 50
Azoxistrobina	0,9982	0,1 - 50	0,9997	0,1 - 50	0,9975	0,1 - 50
Bitertanol	0,9979	0,1 - 50	0,9910	0,1 - 50	0,7667	1,0 - 50
Boscalida	0,9961	0,1 - 50	0,9968	0,1 - 50	0,9791	0,2 - 50
Buprofezina	0,9983	0,1 - 50	0,9994	0,1 - 50	0,9844	0,1 - 50
Carbaril	0,9969	0,2 - 50	0,9985	0,2 - 50	0,9966	0,5 - 50
Ciproconazol	0,9964	0,1 - 50	0,9993	0,1 - 50	0,9912	0,2 - 50
Ciprodinil	0,9968	0,2 - 50	0,9985	0,2 - 50	0,9960	0,2 - 50
Clofentezina	0,9970	0,1 - 50	0,9994	0,1 - 50	0,9800	0,1 - 50
Clorpirifós	0,9988	0,1 - 50	0,9975	0,1 - 50	0,9638	0,1 - 50
Clorpirifós-metílico	0,9892	0,5 - 50	0,9875	0,5 - 50	0,9606	0,5 - 50
Clorpropam	0,9958	0,5 - 50	0,9903	0,5 - 50	0,9851	0,5 - 50
Cresoxim-metílico	0,9910	0,2 - 50	0,9952	0,2 - 50	0,9862	0,5 - 50
Diazinona	0,9961	0,1 - 50	0,9983	0,1 - 50	0,9841	0,1 - 50
Diclorvós	0,9983	0,5 - 50	0,9994	0,5 - 50	0,9918	1,0 - 50
Difenoconazol	0,9961	0,1 - 50	0,9986	0,1 - 50	0,9626	0,2 - 50
Dimetoato	0,9985	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50	0,9955	0,2 - 50
Dimetomorfe	0,9986	0,2 - 50	0,9987	0,2 - 50	0,9666	0,5 - 50
Diniconazol	0,9969	0,1 - 50	0,9980	0,1 - 50	0,8737	1,0 - 50
Diurum	0,9962	0,2 - 50	0,9995	0,2 - 50	0,9947	0,5 - 50
Espinosade A	0,9972	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50	0,9821	0,1 - 50

Tabela 14 – Coeficiente de determinação e intervalo linear, para cada pesticida, obtidos pela análise cromatográfica de soluções analíticas preparadas em solvente e nos extratos das matrizes.

(continuação)

Pesticida	Metanol:acetonitrila (50:50)		Milho (grão)		Cereais matinais	
	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Espinosade D	0,9969	0,1 - 50	0,9993	0,1 - 50	0,9775	0,2 - 50
Espiroxamina	0,9983	0,1 - 50	0,9996	0,1 - 50	0,9973	0,1 - 50
Etoprofós	0,9968	0,2 - 50	0,9981	0,2 - 50	0,9994	0,5 - 50
Famoxadona	0,9931	0,2 - 50	0,9988	0,2 - 50	0,9803	0,5 - 50
Fembuconazol	0,9956	0,1 - 50	0,9984	0,1 - 50	0,9468	0,1 - 50
Fempiroximato	0,9981	0,1 - 50	0,9982	0,1 - 50	0,9620	0,1 - 50
Fempropimorfe	0,9984	0,1 - 50	0,9991	0,1 - 50	0,9975	0,1 - 50
Fenexamida	0,9962	0,1 - 50	0,9956	0,1 - 50	0,9344	1,0 - 50
Fentiona	0,9957	0,1 - 50	0,9937	0,1 - 50	0,9699	0,5 - 50
Flusilazol	0,9967	0,1 - 50	0,9994	0,1 - 50	0,9817	0,5 - 50
Flutalonil	0,9966	0,1 - 50	0,9981	0,1 - 50	0,9957	0,2 - 50
Flutriafol	0,9970	0,1 - 50	0,9976	0,1 - 50	0,9851	0,2 - 50
Fosalona	0,9973	0,1 - 50	0,9991	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50
Hexaconazol	0,9976	0,1 - 50	0,9980	0,1 - 50	0,9648	0,2 - 50
Imidacloprido	0,9973	0,2 - 50	0,9982	0,2 - 50	0,9099	0,5 - 50
Iprovalicarbe	0,9965	0,2 - 50	0,9989	0,2 - 50	0,9903	0,5 - 50
Linurom	0,9973	0,1 - 50	0,9984	0,1 - 50	0,9926	0,1 - 50
Malationa	0,9971	0,1 - 50	0,9992	0,1 - 50	0,9949	0,2 - 50
Mepanipirim	0,9978	0,1 - 50	0,9985	0,1 - 50	0,9974	0,5 - 50
Metalaxil	0,9971	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50	0,9924	0,5 - 50
Metamidofós	0,9979	0,2 - 50	0,9994	0,2 - 50	0,9979	1,0 - 50

Tabela 14 – Coeficiente de determinação e intervalo linear, para cada pesticida, obtidos pela análise cromatográfica de soluções analíticas preparadas em solvente e nos extratos das matrizes.

(continuação)

Pesticida	Metanol:acetonitrila (50:50)		Milho (grão)		Cereais matinais	
	r ²	Intervalo linear (µg L ⁻¹)	r ²	Intervalo linear (µg L ⁻¹)	r ²	Intervalo linear (µg L ⁻¹)
Metidationa	0,9978	0,2 - 50	0,9994	0,2 - 50	0,9972	0,1 - 50
Metiocarbe	0,9965	0,2 - 50	0,9941	0,2 - 50	0,9961	0,1 - 50
Metomil	0,9960	0,5 - 50	0,9970	0,5 - 50	0,9853	0,2 - 50
Metoxifenoazida	0,9976	0,1 - 50	0,9962	0,1 - 50	0,9888	0,2 - 50
Miclobutanil	0,9990	0,1 - 50	0,9986	0,1 - 50	0,9736	0,2 - 50
Monocrotofós	0,9972	0,1 - 50	0,9985	0,1 - 50	0,9966	0,2 - 50
Ometoato	0,9988	0,1 - 50	0,9992	0,1 - 50	0,9954	0,1 - 50
Oxadixil	0,9986	0,5 - 50	0,9994	0,5 - 50	0,9936	0,1 - 50
Oxamil	0,9931	0,2 - 50	0,9961	0,2 - 50	0,9780	1,0 - 50
Pencicurom	0,9973	0,1 - 50	0,9989	0,1 - 50	0,9936	0,1 - 50
Penconazol	0,9961	0,1 - 50	0,9925	0,1 - 50	0,9949	0,1 - 50
Picoxistrobina	0,9967	0,1 - 50	0,9990	0,1 - 50	0,9977	0,1 - 50
Piraclostrobina	0,9969	0,1 - 50	0,9990	0,1 - 50	0,9933	0,2 - 50
Pirimetanil	0,9976	0,1 - 50	0,9991	0,1 - 50	0,9971	0,1 - 50
Pirimicarbe	0,9977	0,1 - 50	0,9993	0,1 - 50	0,9971	0,2 - 50
Piriproxifeno	0,9956	0,1 - 50	0,9975	0,1 - 50	0,9781	0,1 - 50
Procloraz	0,9984	0,1 - 50	0,9972	0,1 - 50	0,9919	0,2 - 50
Profenofós	0,9968	0,1 - 50	0,9994	0,1 - 50	0,9831	0,5 - 50
Propargito	0,9972	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50	0,9889	0,1 - 50
Propiconazol	0,9968	0,1 - 50	0,9993	0,1 - 50	0,9875	0,5 - 50
Tebuconazol	0,9955	0,1 - 50	0,9951	0,1 - 50	0,9801	0,2 - 50
Tebufempirado	0,9975	0,1 - 50	0,9993	0,1 - 50	0,9970	0,2 - 50

Tabela 14 – Coeficiente de determinação e intervalo linear, para cada pesticida, obtidos pela análise cromatográfica de soluções analíticas preparadas em solvente e nos extratos das matrizes.

Pesticida	Metanol:acetonitrila (50:50)		Milho (grão)		Cereais matinais	
	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Tebufenozida	0,9939	0,2 - 50	0,9947	0,2 - 50	0,9899	0,5 - 50
Tetraconazol	0,9943	0,1 - 50	0,9973	0,1 - 50	0,9949	0,5 - 50
Tiabendazol	0,9979	0,2 - 50	0,9989	0,2 - 50	0,8448	0,5 - 50
Tiacloprido	0,9986	0,1 - 50	0,9988	0,1 - 50	0,9946	0,5 - 50
Tiametoxam	0,9970	0,2 - 50	0,9974	0,2 - 50	0,9922	1,0 - 50
Triadimenol	0,9948	0,5 - 50	0,9946	0,5 - 50	0,8191	0,5 - 50
Triclorfom	0,9971	0,2 - 50	0,9991	0,2 - 50	0,9798	0,5 - 50
Trifloxistrobina	0,9965	0,1 - 50	0,9994	0,1 - 50	0,9891	0,1 - 50
Zoxamida	0,9981	0,1 - 50	0,9965	0,1 - 50	0,9956	0,1 - 50

Como já mencionado anteriormente, o efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico.

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

Os resultados dos cálculos do efeito matriz e do LOQ_m para cada pesticida, nas matrizes estudadas, encontram-se na Tabela 15.

A fim de ser melhor visualizado os valores obtidos para o efeito matriz, na Figura 30 tem-se demonstrada a comparação entre o efeito matriz obtido para os 75 pesticidas, nas duas matrizes deste estudo.

Tabela 15 – Efeito matriz (%) e LOQ_m, obtidos para cada pesticida, nas matrizes estudadas.

(continua)

Pesticida	Efeito matriz (%)		LOQ _m (µg kg ⁻¹)	
	Grãos de milho	Cereais matinais	Grãos de milho	Cereais matinais
Acefato	0	-8	10	10
Acetamiprido	5	8	10	10
Azinfós-metílico	0	9	10	10
Azoxistrobina	3	2	10	10
Bitertanol	4	-1	20	n.q.
Boscalida	9	1	10	10
Buprofezina	1	-1	10	10
Carbaril	7	4	10	10
Ciproconazol	-10	-16	10	20
Ciprodinil	13	9	10	20
Clofentezina	-7	-14	10	50
Clorpirifós	12	-20	10	50
Clorpirifós-metílico	29	-29	20	n.q.
Cloropropam	22	23	10	20
Cresoxim-metílico	20	-8	10	n.q.
Diazinona	34	6	10	10
Diclorvós	-4	24	10	50
Difenoconazol	-2	3	10	10
Dimetoato	3	7	10	10
Dimetomorfe	26	-4	10	10
Diniconazol	9	16	10	50
Diurum	0	3	10	10
Espinosade A	6	-4	10	10
Espinosade D	1	0	10	20
Espiroxamina	3	14	10	10
Etoprofós	17	3	10	10
Famoxadona	0	-1	10	10
Fembuconazol	4	8	10	20
Fempiroximato	3	-5	20	10
Fempropimorfe	1	6	10	10
Fenexamida	-3	-3	10	50
Fentiona	-2	3	10	50
Flusilazol	-5	0	10	10
Flutalonil	-8	8	10	10
Flutriafol	-16	-27	10	10
Fosalona	-11	-5	10	10
Hexaconazol	4	-14	10	10
Imidacloprido	8	4	10	50

Tabela 15 – Efeito matriz (%) e LOQ_m, obtidos para cada pesticida, nas matrizes estudadas.

Pesticida	(conclusão)			
	Efeito matriz (%)		LOQ _m (µg kg ⁻¹)	
	Grãos de milho	Cereais matinais	Grãos de milho	Cereais matinais
Iprovalicarbe	-8	9	50	10
Linurom	-4	8	50	10
Malationa	7	2	10	10
Mepanipirim	-12	18	10	20
Metalaxil	5	9	10	10
Metamidofós	9	-21	10	10
Metidationa	4	2	10	10
Metiocarbe	6	19	10	10
Metomil	12	3	10	50
Metoxifenoazida	3	8	10	10
Miclobutanil	1	5	10	20
Monocrotofós	-2	-8	10	20
Ometoato	-5	-6	10	10
Oxadixil	2	19	10	10
Oxamil	4	20	10	10
Pencicurom	2	2	20	20
Penconazol	-26	-4	10	10
Picoxistrobina	0	4	10	10
Piraclostrobina	0	7	10	20
Pirimetanil	10	11	10	10
Pirimicarbe	4	-7	10	10
Piriproxifeno	9	-10	10	20
Procloraz	-4	1	10	10
Profenofós	-2	-12	10	50
Propargito	2	-5	10	10
Propiconazol	-9	2	10	10
Tebuconazol	-55	-5	10	50
Tebufempirado	0	-10	10	10
Tebufenozida	14	13	10	20
Tetraconazol	-13	0	10	10
Tiabendazol	7	0	10	20
Tiacloprido	7	6	10	10
Tiametoxam	2	-13	50	50
Triadimenol	-5	-5	10	50
Triclorfom	7	1	10	10
Trifloxistrobina	-1	1	10	10
Zoxamida	-60	-12	10	10

n.q.: não quantificado

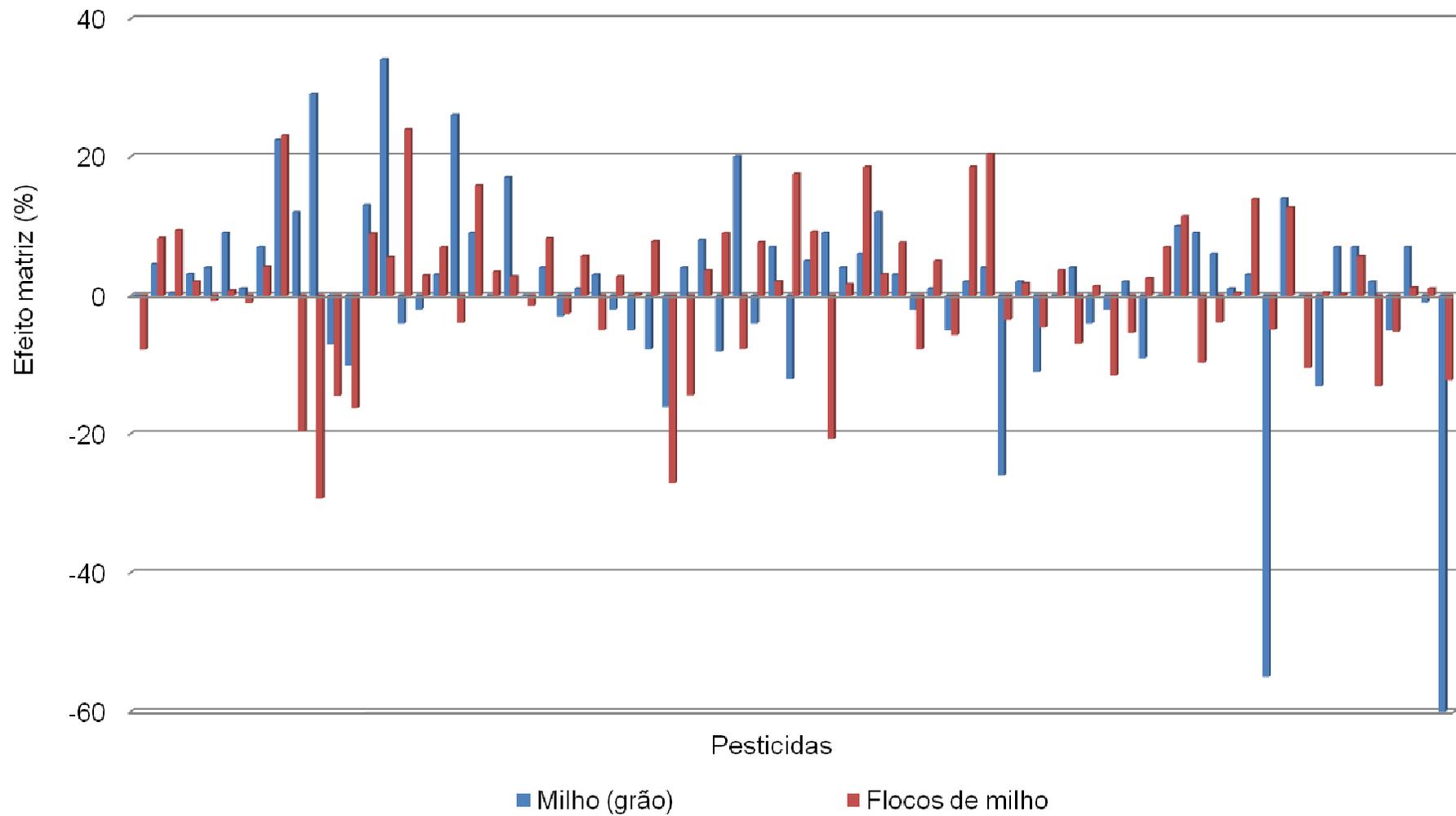


Figura 30 – Comparação entre os percentuais do efeito matriz obtidos para os 75 pesticidas, nas matrizes de grãos de milho e cereais matinais.

A partir dos dados apresentados na Tabela 15, observa-se que o efeito matriz para os pesticidas estudados pode ser considerado desprezível, pois os valores encontram-se na faixa de -20 a +20 na maioria dos casos, principalmente considerando que os extratos não passaram por nenhuma etapa de purificação.

Em LC-MS/MS, o efeito matriz é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo t_R que o analito e, por este fato, competem com o analito durante o processo de ionização. Além disto, é importante salientar que o efeito matriz pode facilmente tornar-se maior, em baixas concentrações do analito, pois ocorre um decréscimo na razão de concentração do analito em relação à concentração da matriz. (PIZZUTTI, 2006)

Estes fatos foram observados (Tabela 14) para os fungicidas penconazol, tebuconazol e zoxamida, presentes no extrato de grão de milho, os quais eluem ao mesmo tempo (8,6 minutos) e apresentaram efeito matriz negativo.

Na Figura 31, está representada a comparação entre as curvas analíticas obtidas com soluções preparadas tanto em metanol quanto no extrato de grãos de milho, nas 4 concentrações mais baixas analisadas (0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), para o pesticida zoxamida. Através desta representação gráfica pode-se confirmar o efeito matriz negativo observado na Tabela 14.

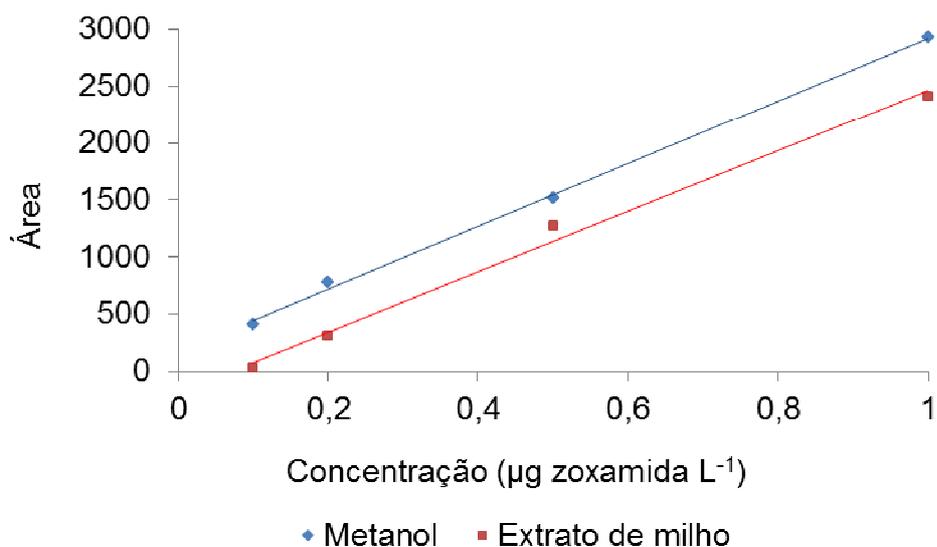


Figura 31 – Comparação das curvas analíticas obtidas com soluções de zoxamida preparadas em solvente e no extrato de grãos de milho na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Na Figura 32, estão demonstrados os cromatogramas obtidos pelas análises por LC-ESI-MS/MS, para as soluções de tebuconazol preparadas em solvente (1) e em extrato de grão de milho (2), na concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, para as transições de quantificação (a) e de confirmação (b).

Percebe-se que a intensidade do sinal da transição de quantificação da solução preparada no extrato de grão de milho (intensidade $1,59 \times 10^4$) corresponde a 76% da mesma solução quando preparada em solvente (intensidade $2,09 \times 10^4$), demonstrando assim que houve supressão do sinal, observada também para a transição de confirmação.

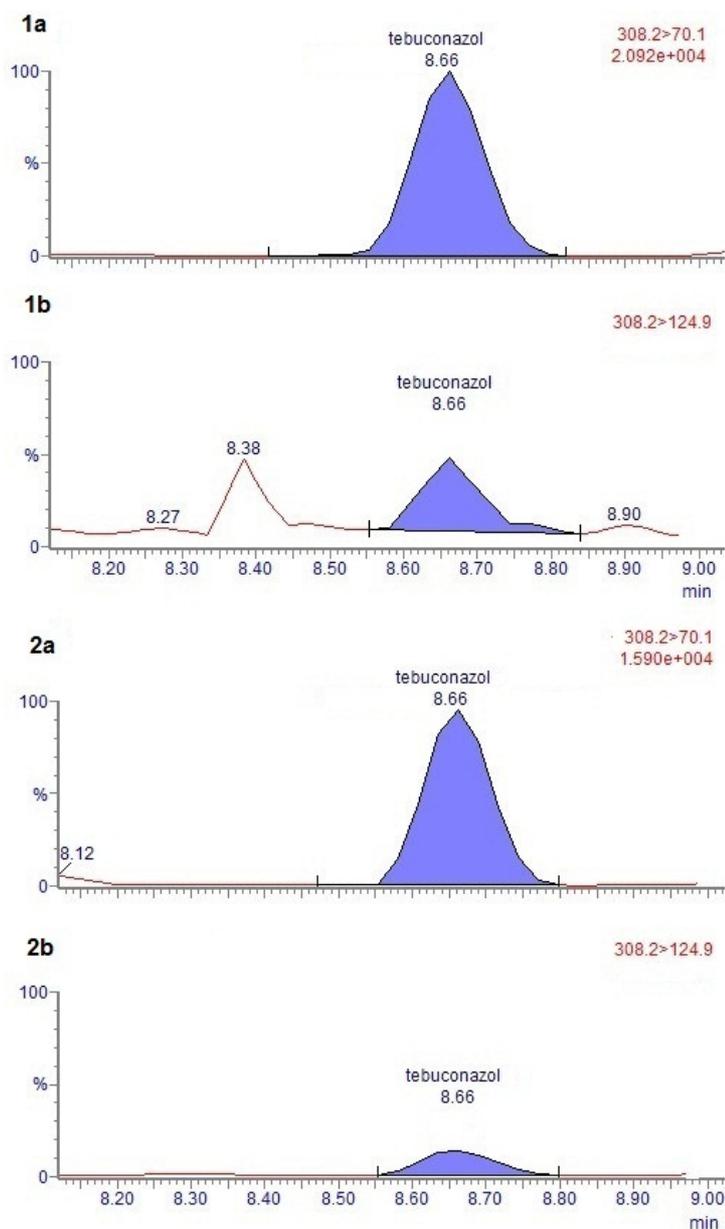


Figura 32 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para as transições de quantificação (a) e de confirmação (b) do pesticida tebuconazol, na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em (1) solvente e (2) extrato de grão de milho.

Os compostos que apresentaram maior efeito matriz positivo, no extrato de grão de milho, foram os inseticidas clorpirifós-metílico, diazinona e diclorvós (Tabela 15).

No caso das soluções preparadas em extrato de cereais matinais, mais de 93% dos pesticidas (70 compostos) apresentaram efeito matriz na faixa de -20 a +20. Para os demais, os valores obtidos ficaram ligeiramente fora da faixa, situando-

se entre -29 e +24. O leve efeito matriz positivo obtido para o inseticida diclorvós (Tabela 15) pode ser observado na Figura 33.

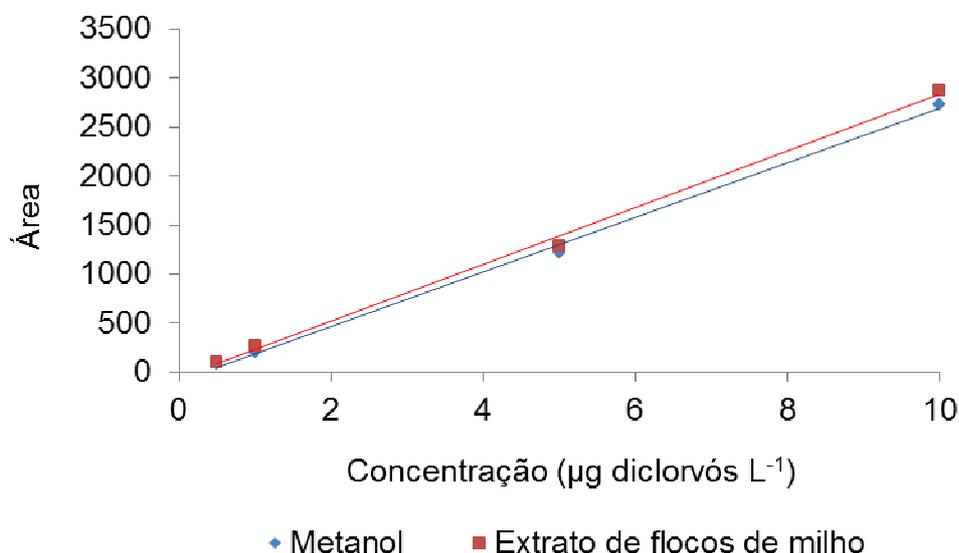


Figura 33 – Comparação das curvas analíticas obtidas com soluções de diclorvós preparadas em solvente e no extrato de cereais matinais, na faixa de concentração de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e analisadas por LC-ESI-MS/MS.

4.2.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para o estudo da determinação dos valores de LOD e LOQ (instrumento e métodos) as soluções analíticas foram preparadas em metanol e nos extratos das matrizes estudadas, para avaliar a influência dos extratos sobre este parâmetro.

O valor de LOQ_m para cada analito e para cada uma das matrizes foi determinado como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentou recuperações entre 70 e 120%, com $\text{RSD}\% \leq 20\%$ (item 3.8.4.2), e estão apresentados na Tabela 15.

O método para determinação de pesticidas em grãos de milho apresentou excelentes LOQ_m , sendo que para 91% dos pesticidas (68 deles) o valor determinado foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

No caso do método para cereais matinais, devido ao emprego de uma menor quantidade de amostra (2 g), 63% dos pesticidas estudados (47 do total de 75) apresentaram o LOQ_m de 10 µg kg⁻¹. Para 33% dos pesticidas o LOQ_m foi de 20 e 50 µg kg⁻¹, e para apenas 4% dos compostos (bitertanol, clorpirifós-metílico e cresoxim-metílico) o LOQ_m não pode ser determinado, uma vez que o RSD foi superior a 20%, para todas as concentrações de fortificação avaliadas (10, 20 e 50 µg kg⁻¹). Na Figura 34, estas informações podem ser melhor visualizadas.

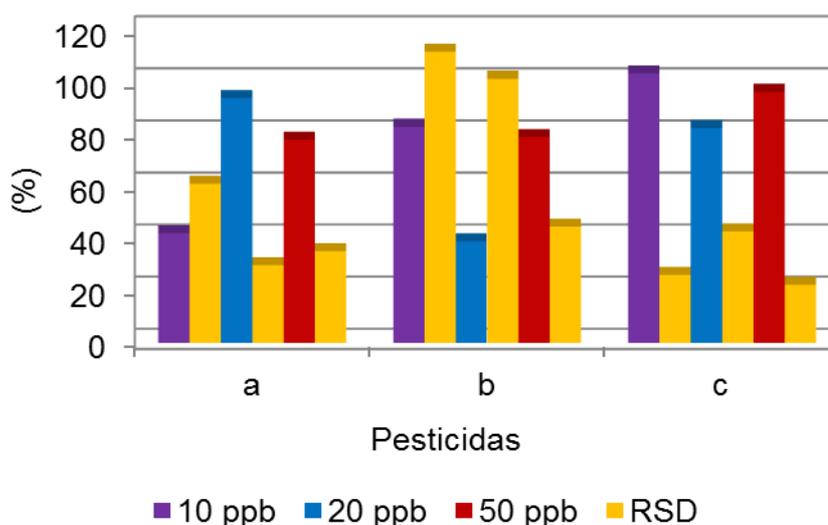


Figura 34 – Percentual de recuperação e de RSD dos pesticidas (a) bitertanol, (b) clorpirifós-metílico e (c) cresoxim-metílico que não tiveram o LOQ_m determinado.

Na Figura 35 está representado o cromatograma obtido para amostra de cereais matinais fortificada a 50 µg kg⁻¹ (nível de maior concentração) para o pesticida clorpirifós-metílico. Pode-se observar que o sinal obtido é muito baixo, na ordem de 10³, não podendo esta concentração ser considerada nem como o LOD_m, caso este fosse definido como sendo a concentração cujo sinal cromatográfico obtido é três vezes maior, em relação ao ruído da linha de base.

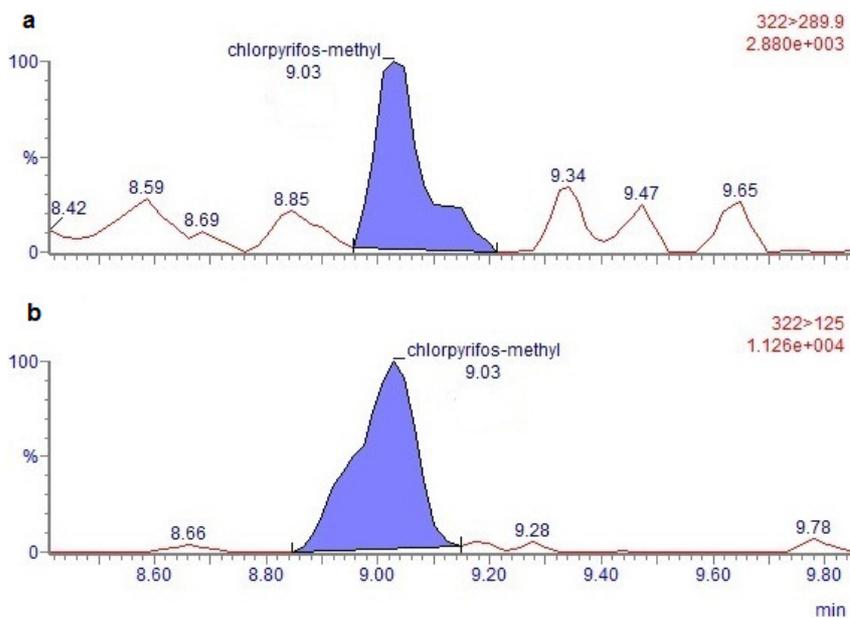


Figura 35 – Cromatograma obtido para clorpirifós-metílico, (a) transição de quantificação e (b) de confirmação, por LC-ESI-MS/MS, para cereais matinais fortificado a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.2.2.3 Fortificação e recuperação (Exatidão)

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados das recuperações médias ($n=6$) percentuais e o RSD%, para os pesticidas que foram fortificados em concentrações de 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, em grãos de milho e cereais matinais, respectivamente.

Tabela 16 – Percentuais de recuperação e RSD_r% para os 75 pesticidas estudados em grãos de milho, calculados com curva analítica em extrato da matriz.

(continua)

Pesticida	10 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)
Acefato	83	7,9	81	6,2	82	6,7
Acetamiprido	95	2,6	89	4,0	89	3,4
Azinfós-metílico	98	9,1	83	10,8	90	11,5
Azoxistrobina	96	7,1	94	5,0	92	2,6
Bitertanol	79	37,6	74	9,1	90	13,3
Boscalida	87	5,5	86	11,5	91	4,7
Buprofezina	85	6,6	80	6,3	86	4,6
Carbaril	92	7,2	89	7,0	92	4,2
Ciproconazol	77	13,7	74	11,7	84	9,0
Ciprodinil	88	26,0	83	16,3	86	3,2
Clofentezina	74	19,2	75	14,5	85	10,4
Cloropirifós	64	8,5	69	6,7	72	9,2
Cloropirifós-metílico	79	31,3	81	29,3	89	21,5
Cloropropam	76	11,0	71	17,5	86	15,5
Cresoxim-metílico	99	6,7	94	14,4	97	11,4
Diazinona	82	5,1	87	7,2	85	4,8
Diclorvós	97	10,0	106	7,2	111	6,7
Difenoconazol	87	18,6	89	12,0	92	3,0
Dimetoato	86	4,6	91	13,9	89	7,4
Dimetomorfe	87	7,3	84	9,1	84	9,9
Diniconazol	93	16,5	84	10,4	85	8,1
Diurom	90	8,0	84	4,9	87	2,0
Espinosade A	52	6,3	47	5,3	45	4,8
Espinosade D	28	14,3	24	7,1	20	4,8
Espiroxamina	95	6,2	92	10,0	94	7,0
Etoprofós	83	11,1	100	16,7	107	7,1
Famoxadona	102	22,0	83	16,7	81	10,2
Fembuconazol	90	17,1	88	9,7	88	8,6
Femproximato	73	5,5	72	9,2	73	11,0
Fempropimorfe	54	12,9	47	9,6	41	14,3
Fenexamida	88	13,2	88	19,6	94	9,1
Fentiona	82	35,1	84	18,0	88	7,3
Flusilazol	85	4,6	84	17,6	90	5,9
Flutalonil	85	9,3	87	13,9	90	4,3
Flutriafol	88	2,9	84	8,8	90	6,3
Fosalona	67	8,8	80	6,6	86	3,7
Hexaconazol	87	11,0	86	9,0	87	3,4
Imidacloprido	69	7,5	85	19,8	97	13,4
Iprovalicarbe	89	11,7	86	18,9	96	5,1
Linurom	86	11,7	90	6,9	92	4,5
Malationa	82	10,1	88	7,2	88	6,6

Tabela 16 – Percentuais de recuperação e RSD_r% para os 75 pesticidas estudados em grãos de milho , calculados com curva analítica em extrato da matriz.

(conclusão)

Pesticida	10 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)
Mepanipirim	84	7,7	84	5,3	88	8,1
Metalaxil	87	5,2	89	9,6	91	6,0
Metamidofós	72	7,3	76	9,0	76	6,6
Metidationa	83	6,6	87	7,4	90	4,3
Metiocarbe	90	10,2	93	9,4	93	8,1
Metomil	94	13,1	87	8,3	94	5,1
Metoxifenoazida	93	15,2	95	12,3	93	2,4
Miclobutanil	90	11,2	89	9,3	84	8,7
Monocrotofós	91	18,5	95	12,5	91	10,7
Ometoato	87	18,3	79	7,4	85	10,9
Oxadixil	89	5,8	89	5,9	93	6,3
Oxamil	95	17,1	92	13,7	94	13,0
Pencicurom	82	9,3	89	11,3	89	3,3
Penconazol	82	7,6	86	15,3	93	7,4
Picoxistrobina	87	10,6	88	11,7	88	9,5
Piraclostrobina	90	9,3	91	8,9	93	6,3
Pirimethanil	85	8,8	88	6,7	90	4,2
Pirimicarbe	87	3,8	89	6,3	88	4,6
Piriproxifeno	68	10,8	77	8,8	83	6,5
Procloraz	83	15,9	92	12,2	89	10,1
Profenofós	79	14,6	78	17,7	85	6,7
Propargito	70	4,2	72	6,9	72	6,4
Propiconazol	88	16,0	81	13,4	86	7,4
Tebuconazol	92	16,2	95	10,5	99	10,7
Tebufempirado	78	8,8	82	9,4	81	8,1
Tebufenozida	100	15,0	97	7,2	101	8,3
Tetraconazol	84	14,0	86	12,6	90	8,1
Tiabendazol	79	6,8	81	8,0	85	2,5
Tiacloprido	86	7,1	85	8,4	91	5,4
Tiametoxam	88	15,9	97	11,4	94	7,4
Triadimenol	98	29,7	72	26,4	95	10,1
Triclorfom	94	10,3	89	8,9	96	12,7
Trifloxistrobina	90	8,6	89	7,5	91	3,4
Zoxamida	107	11,5	104	20,6	105	9,4

Para as amostras de grãos de milho fortificadas a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os percentuais de recuperação ficaram na faixa de 70 a 120%, para 91, 95 e 96% dos pesticidas, respectivamente, demonstrando ótima exatidão do método estudado, conforme pode ser observado na Tabela 15 e Figura 36.

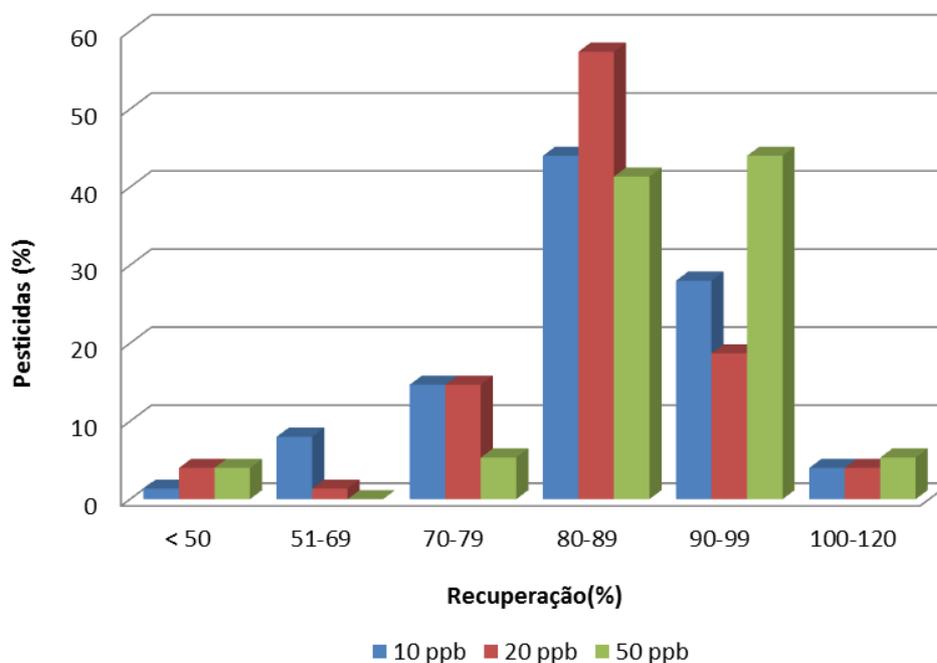


Figura 36 – Percentual de pesticidas em cada faixa de recuperação, para grãos de milho fortificado a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

Em relação ao RSD%, a Tabela 15 e a Figura 37 demonstram que os resultados obtidos também são excelentes, uma vez que 92, 96 e 99% dos valores de RSD ficaram abaixo de 20%, respectivamente, para os pesticidas fortificados aos níveis de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

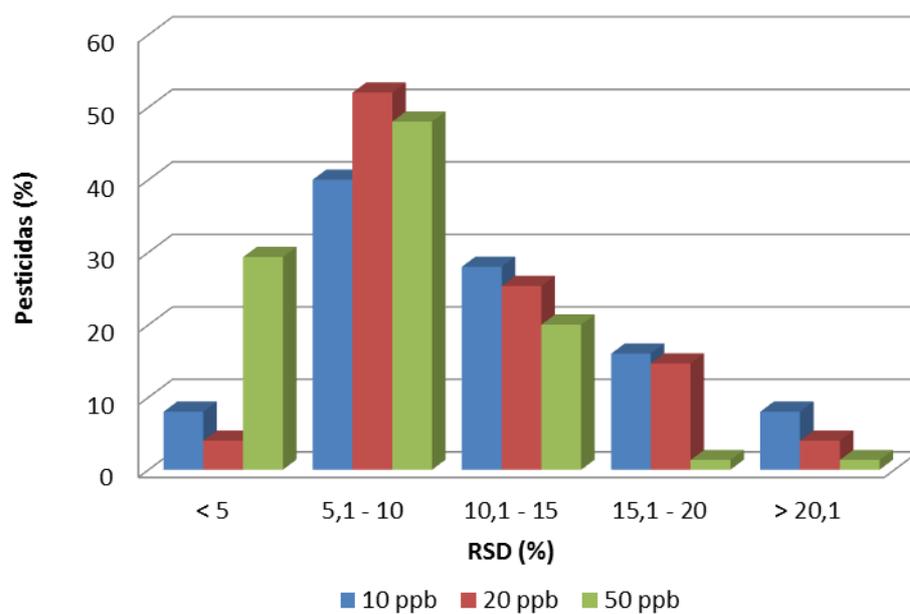


Figura 37 – Percentual de pesticidas em cada faixa de RSD%, para grãos de milho fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

Tabela 17 – Percentuais de recuperação e RSD_r% para os 75 pesticidas estudados em cereais matinais, calculados com curva analítica em extrato da matriz.

(continua)

Pesticida	10 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)
Acefato	99	18,7	101	7,5	99	6,0
Acetamiprido	98	14,6	94	9,9	94	6,1
Azinfós-metílico	97	13,7	86	19,3	89	10,7
Azoxistrobina	89	13,3	91	5,2	93	7,3
Bitertanol	42	61,1	94	29,8	78	35,2
Boscalida	92	10,4	66	10,8	94	13,0
Buprofeszina	84	18,8	68	21,2	91	11,0
Carbaril	89	6,7	96	5,6	98	3,3
Ciproconazol	86	30,0	94	17,7	96	7,4
Ciprodinil	93	23,1	86	12,2	89	9,0
Clofentezina	77	24,8	80	24,4	114	7,6
Cloropirifós	65	40,0	68	24,3	88	9,7
Cloropirifós-metílico	83	111,8	39	101,4	79	44,6
Cloropropam	76	36,3	76	18,4	102	9,7
Cresoxim-metílico	103	26,1	82	42,7	96	22,3
Diazinona	74	12,2	64	16,6	92	7,0
Diclorvós	85	44,4	93	36,6	100	8,2
Difenoconazol	86	18,4	89	26,8	90	8,4
Dimetoato	81	14,9	85	13,8	98	11,2
Dimetomorfe	93	15,2	88	15,4	95	9,9
Diniconazol	65	28,1	72	20,6	86	17,5
Diurom	91	11	93	5,8	9,7	3,1
Espinosade A	90	14,1	88	12,7	94	7,6
Espinosade D	96	20,8	95	12,4	90	16,8
Espiroxamina	99	8,0	90	10,4	99	4,5
Etoprofós	71	17,1	71	15,7	93	15,9
Famoxadona	91	10,6	75	29,1	86	14,4
Fembuconazol	82	22,9	84	16,3	87	15,5
Femproximoato	87	4,3	80	10,9	94	13,2
Fempropimorfe	84	13,8	69	15,6	86	13,1
Fenexamida	89	33,8	90	20,9	93	13,7
Fentiona	87	32,0	76	30,4	92	4,1
Flusilazol	86	17,7	83	14,0	93	18,9
Flutalonil	94	17,1	85	16,3	93	6,9
Flutriafol	96	15,9	87	9,3	98	6,0
Fosalona	73	8,4	65	12,2	92	15,9
Hexaconazol	77	16,1	84	17,6	93	9,5
Imidacloprido	79	49,2	70	29,3	97	19,4
Iprovalicarbe	95	14,9	86	12,7	98	8,5
Linurom	110	14,4	79	12,3	91	8,5
Malationa	86	19,0	82	12,0	88	11,2

Tabela 17 – Percentuais de recuperação e RSD_r% para os 75 pesticidas estudados em cereais matinais, calculados com curva analítica em extrato da matriz.

(conclusão)

Pesticida	10 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)	Recuperação (%)	RSD _r (%)
Mepanipirim	92	25,8	82	7,7	104	12,6
Metalaxil	80	8,2	92	4,6	97	2,6
Metamidofós	101	19,3	81	17,2	84	17,9
Metidationa	88	18,8	85	6,3	91	6,3
Metiocarbe	96	11,1	91	5,0	99	7,2
Metomil	91	46,2	100	22,3	105	16,2
Metoxifenoazida	83	16,2	94	25,7	97	8,7
Miclobutanil	86	25,7	95	16,4	103	5,2
Monocrotofós	113	21,9	116	18,3	109	16,2
Ometoato	88	14,7	93	10,0	93	13,3
Oxadixil	96	10,5	96	14,7	92	12,7
Oxamil	93	10,9	86	21,6	96	15,4
Pencicurom	77	20,3	82	16,2	89	14,7
Penconazol	94	17,4	86	13,3	105	9,9
Picoxistrobina	72	12,9	72	12,9	90	7,3
Piraclostrobina	82	46,8	81	15,7	104	9,6
Pirimethanil	92	15,7	75	23,6	95	9,2
Pirimicarbe	87	8,1	62	16,9	87	8,9
Piriproxifeno	58	25,9	63	14,5	83	14,1
Procloraz	108	13,5	70	13,5	92	8,5
Profenofós	76	28,9	65	27,0	104	12,3
Propargito	68	12,5	65	16,3	91	12,3
Propiconazol	92	12,5	87	18,3	86	17,6
Tebuconazol	69	40,3	91	21,6	92	14,5
Tebufempirado	73	19,0	75	18,9	77	11,7
Tebufenozida	87	20,6	81	14,2	104	14,8
Tetraconazol	99	19,0	90	11,6	96	17,5
Tiabendazol	92	25,2	102	12,9	105	10,0
Tiacloprido	84	4,6	82	16,0	96	4,0
Tiametoxam	80	31,5	82	20,5	101	11,2
Triadimenol	51	87,1	79	24,8	98	16,7
Triclorfom	106	18,0	95	14,6	92	4,6
Trifloxistrobina	75	11,4	72	16,2	90	13,1
Zoxamida	95	17,6	87	16,6	94	14,5

Conforme pode ser observado na Tabela 16 e Figura 38, os percentuais de recuperação ficaram na faixa de 70 a 120% para 91, 85 e 100% dos pesticidas, respectivamente, fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para as amostras de cereais matinais, demonstrando ótima exatidão do método estudado.

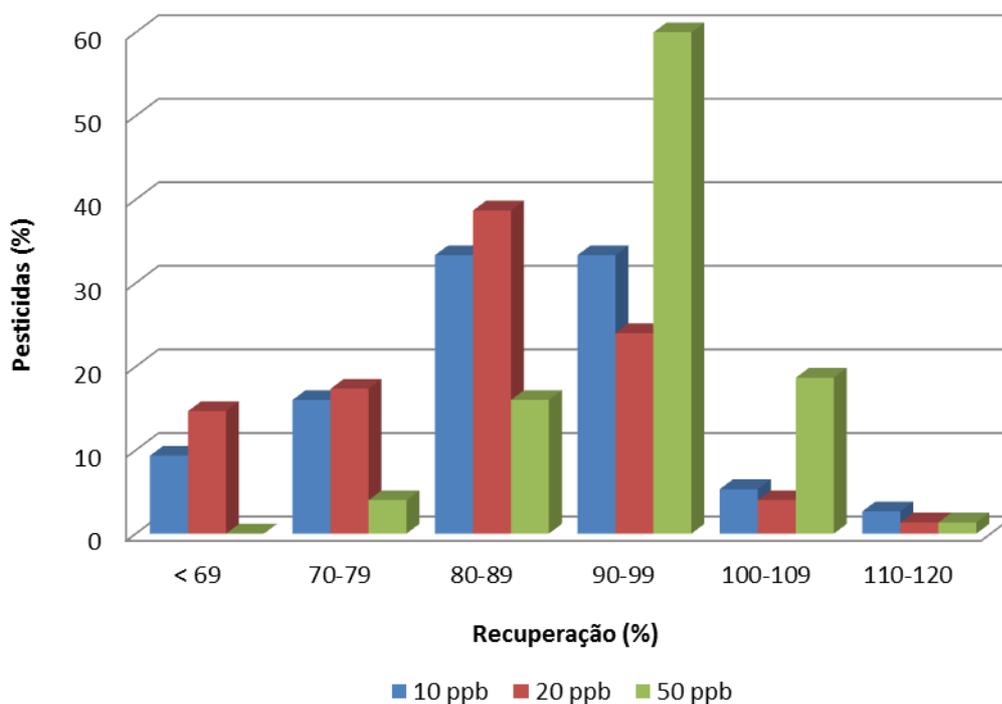


Figura 38 – Percentual de pesticidas em cada faixa de recuperação, para cereais matinais fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

De acordo com a Tabela 16 e a Figura 39, 65, 76 e 93% dos valores de RSD% obtidos para as amostras de cereais matinais, fortificadas a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ficaram abaixo dos 20% estipulados, e são considerados satisfatórios para análises de resíduos de pesticidas.

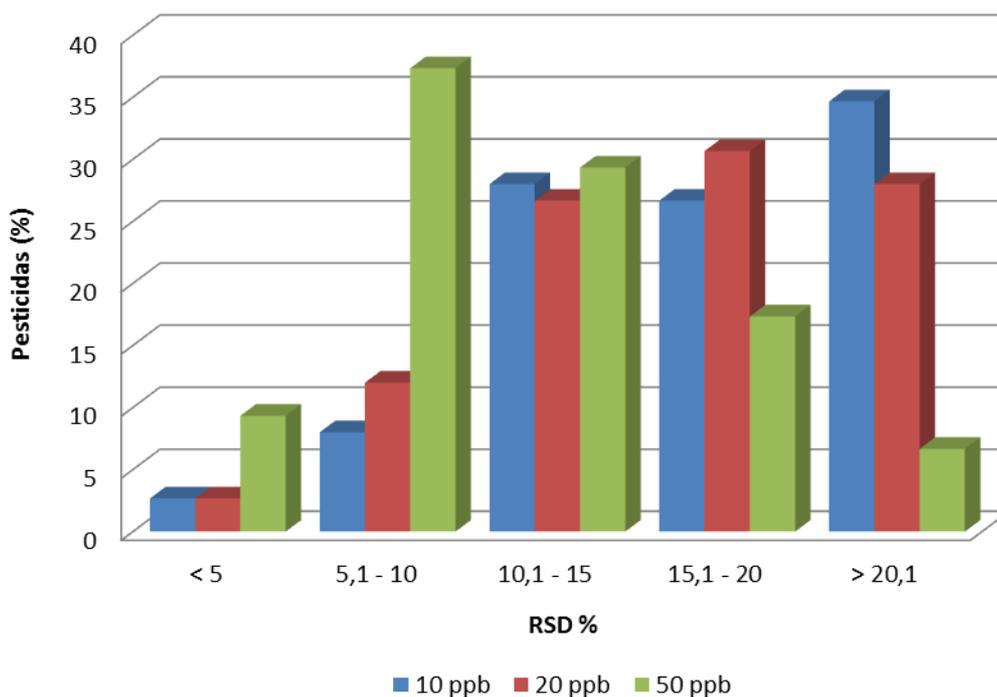


Figura 39 – Percentual de pesticidas em cada faixa de RSD%, para cereais matinais fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e analisados por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

Nas Figura 40 e 41, têm-se os cromatogramas obtidos para as duas transições (quantificação e confirmação) dos isômeros do pesticida ciproconazol, fortificado a 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, e analisado por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

O nível de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ corresponde ao LOQ_m para este composto, uma vez que a concentração 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentou um valor de RSD de 30%. Porém se comparando ambas as figuras, uma grande similaridade quanto ao formato e a resolução dos picos isômeros é observada. Portanto, uma quantificação confiável também poderia ser obtida ao nível de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, considerando que o resultado é expresso, para o ciproconazol, como sendo a soma das áreas obtidas para cada isômero.

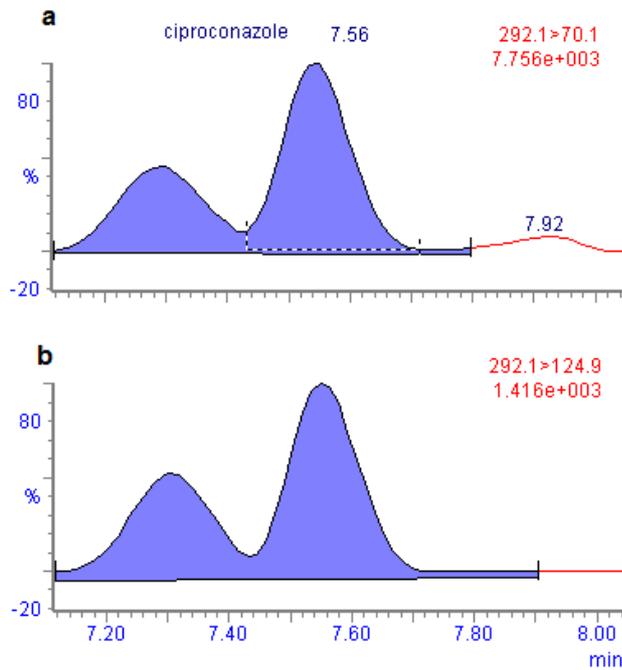


Figura 40 – Cromatograma obtido para as transições de (a) quantificação e de (b) confirmação para os isômeros do ciproconazol por LC-ESI-MS/MS para cereais matinais fortificado a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

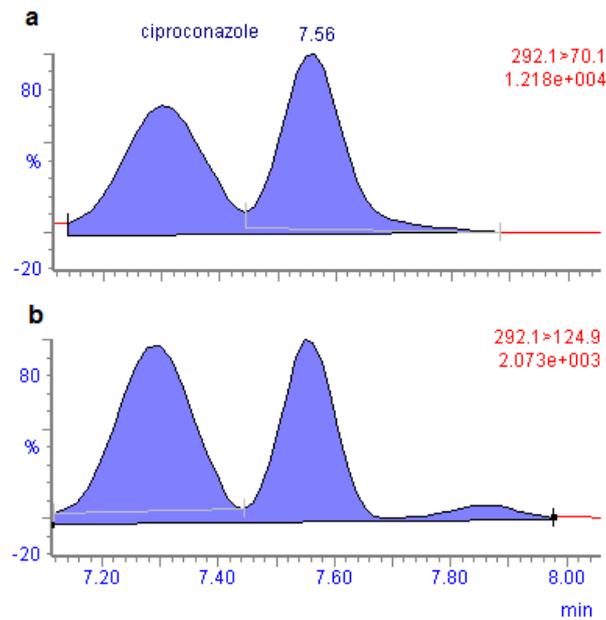


Figura 41 – Cromatograma obtido para as transições de (a) quantificação e de (b) confirmação para os isômeros do ciproconazol por LC-ESI-MS/MS para cereais matinais fortificado a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.3 Análise de amostras reais

Em nenhuma das 12 amostras de arroz polido, que foram adquiridas tanto nos supermercados da cidade de Santa Maria (RS, Brasil) quanto de Amsterdã (Holanda), foi possível detectar a presença de resíduos de ditiocarbamatos. Desta forma, as amostras analisadas indicam a segurança deste alimento em relação a presença destes fungicidas.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento e a validação de métodos para determinação de resíduos de pesticidas são de grande importância, pois através destes pode-se ter a garantia da qualidade dos alimentos que chegam aos consumidores.

O método individual para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em grãos de soja, arroz e milho, por meio da quantificação na forma de CS_2 , empregando dois sistemas cromatográficos, demonstrou ser eficiente, exato e preciso, uma vez que excelentes percentuais de recuperação (na faixa de 63 a 103%), com RSD inferior a 8,7% foram obtidos.

O procedimento de purificação desenvolvido para o extrato de soja apresentou desempenho satisfatório e alta eficiência para a retirada da gordura co-extraída pelo solvente orgânico. Além disto, trata-se de um procedimento simples, prático e de baixo custo, comparando-se, por exemplo, com a GPC.

O método desenvolvido para grãos é mais rápido, mesmo sendo utilizada uma etapa de purificação do extrato, que o original para frutas e hortaliças de De Kok & Van Bodegraven (2002). Ademais, a partir de uma concentração de $50 \mu\text{g CS}_2 \text{ kg}^{-1}$, para soja e milho, ou de $62 \mu\text{g CS}_2 \text{ kg}^{-1}$, no caso do arroz, já é possível a quantificação destes fungicidas.

O sistema GC-PFPD, o qual é altamente seletivo para compostos contendo enxofre, é uma ótima alternativa para a determinação de ditiocarbamatos, uma vez que devido a praticidade do dia-a-dia o equipamento deve ter seu emprego exclusivo para esta finalidade. No entanto, se o laboratório precisa ter os resultados confirmados para não ocorrer equívocos, o ideal é ter os dois sistemas para que a confirmação dos resultados possa ser feita por GC-ITD-MS, e assim não se ter riscos em relação a resultados falsos positivos ou falsos negativos. No entanto, é importante lembrar que o equipamento deve ser quase exclusivamente dedicado para este tipo de análise, pois há os pequenos inconvenientes que se tem com a inserção direta da coluna capilar a câmara de ionização. Por exemplo, quando é necessário trocar a coluna, é necessário esfriar o equipamento, além de ter que nivelar as pressões externa e interna.

Quanto ao método multirresidual, o procedimento de extração foi baseado no método QuEChERS, porém com algumas modificações: tipo de amostra e exclusão da etapa de purificação. No entanto, as vantagens desse método como a rapidez, simplicidade, confiabilidade, robustez (poucas e simples etapas), baixo custo e consumo de solventes (somente 10 mL de acetonitrila) foram mantidas. Além disso, praticamente não necessita de vidrarias e cobre um amplo espectro de pesticidas extraídos, podendo ser aplicado a diferentes tipos de matrizes.

Ao empregar-se o método QuEChERS modificado, para extração dos 75 pesticidas estudados, verificou-se que todos estes foram quantificados em grãos de milho e apenas 4% dos compostos não puderam ser quantificados para os cereais matinais.

Com relação aos valores de r^2 das curvas analíticas, 97% dos pesticidas dissolvidos ou em solvente orgânico e em extrato de grãos de milho, analisados por esta técnica, demonstraram $r^2 \geq 0,99$, ao passo que apenas 52% daqueles em extrato de cereais matinais apresentaram esses valores.

De forma geral, a faixa linear de concentração das curvas analíticas situou-se entre 0,1; 0,2; 0,5 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando a grande sensibilidade do método, mesmo com presença de co-extrativos das matrizes estudadas.

Os resultados obtidos através do cálculo do efeito matriz percentual possibilitam concluir que apenas 8 e 7% dos pesticidas, respectivamente, para extrato de grãos de milho e de cereais matinais, apresentaram efeito matriz fora da faixa de -20 a + 20, podendo assim dizer que este é mínimo.

Tendo em vista que as legislações internacionais tendem em direção ao estabelecimento da "Tolerância Zero", os níveis de fortificação estudados demonstraram ser adequados, sendo que a grande maioria dos pesticidas, 96 e 84%, respectivamente, para as matrizes de grãos de milho e cereais matinais, apresentaram LOQ_m de 10 ou 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com critérios de recuperação entre 70 e 120% e valores de $\text{RSD}\% \leq 20\%$.

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação do método apresentaram valores muito bons, correspondendo aos valores sugeridos pela literatura específica para a análise de resíduos de pesticidas. É importante ressaltar que o processo de validação exige um envolvimento bastante intenso, mas a validade dos dados obtidos é proporcional à qualidade do processo de obtenção dos mesmos.

A popularização do acoplamento LC-MS/MS tem demonstrado o que cada uma das técnicas tem de melhor: a cromatografia como uma técnica de separação e a espectrometria de massas, de identificação. Com isto, o emprego de LC-MS/MS no modo ESI positivo é atualmente o mais aplicado para as análises multirresiduais de pesticidas, pois além da maior detectabilidade e robustez do instrumento, o que possibilita maior diluição do extrato e introdução de menor quantidade de componentes da matriz, também permite a determinação de um grande número de compostos, neste estudo 75 pesticidas, em uma única análise cromatográfica de apenas 14 minutos, juntando-se a isto a melhor precisão dos resultados, o que pode ser verificado através dos valores de RSD%. Uma das poucas limitações dessa técnica é ainda em relação ao custo do equipamento, que atualmente situa-se ao redor de 450 mil dólares.

Ao aplicar-se o método proposto para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em arroz, não foi constatada a presença destes resíduos em nenhuma das 12 amostras de arroz, indicando assim um produto de qualidade dentro dos requisitos de segurança alimentar.

Portanto, os objetivos traçados para este trabalho foram alcançados com sucesso, pois se avaliaram e validaram-se métodos individual e multirresidual para determinação de pesticidas, visando o controle de qualidade em grãos e seus derivados, empregando análise por técnicas cromatográficas como GC-PFPD e GC-ITD-MS, e a moderna LC-MS-MS.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Aplicação dos métodos estudados na determinação de resíduos de ditiocarbamatos em outros produtos de relevância econômica como trigo e café;
- ✓ Otimização e validação de métodos para serem aplicados no controle de resíduos de pesticidas em produtos derivados do milho e da soja, como o óleo de soja, bem como em arroz parboilizado, entre outros;
- ✓ Otimização da técnica de purificação para outros grãos e em castanhas, cacau, entre outros, que necessitem deste procedimento antes de serem levados para a análise cromatográfica;
- ✓ Aplicação dos métodos validados para o monitoramento de identificação e quantificação de resíduos de pesticidas presentes em milho produzido no país, e em seus derivados como óleo e farinha de milho (trabalho já iniciado);
- ✓ Aplicação do método de extração proposto para, simultaneamente, extrair micotoxinas (trabalho já iniciado);
- ✓ Aplicação dos métodos desenvolvidos e validados para monitorar amostras de grãos e derivados da região central do RS.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. et al. **Talanta**, v. 65, p. 104-110, 2005.

AGROSOFT BRASIL. Disponível em:

<<http://www.agrosoft.org.br/agropag/218272.htm#continuacao>>. Acesso em: 22 de julho de 2011.

ALESSI, M. O. et al. **Ciências Exatas e da Terra**, v. 9, n. 2, p. 31-39, 2003.

ANASTASSIADES, M. et al. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. **Monografias autorizadas**. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7776ed8047459779a046f43fbc4c6735/t16_tiram.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>. Acesso em: 19 de agosto de 2011.

ARAÚJO, W. A. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de água empregando-se GC-ECD e HSA-SPME-GC-FPD**. Dissertação de Mestrado, USP, São Carlos, 2001.

AVISITE. **Milho: safra 2010/2011 pode não acontecer conforme o projetado**.

Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/default.asp?codnoticia=11577>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2011.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

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

BBMNET. Disponível em:

<http://www.bbmnet.com.br/pages/portal/bbmnet/pages/imprensa/destaques/2011/juho/produtividade-nacional-de-Arroz_supera-14-porcento-nesta-safra-diz-onab-08-06-2011.asp>. Acesso em 22 de julho de 2011.

BELDOMÉNICO, H. R. et al. **Resíduos químicos contaminantes de los alimentos**. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina, 2005.

BERRADA, H. et al. **Food Control**, v. 21, p. 36-44, 2010.

BLASCO, C. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 267-276, 2004.

BLUME, E. & REICHERT, J. M. Destino de pesticidas no ambiente agrícola. In: IV Seminário de Produção Integrada de Frutas. **Anais**, Bento Gonçalves, 2002.

BOHRER, D. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 212-216, 1999.

BONNECHÈRE, A. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4627-4631, 2011.

BORBA, A. M. et al. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 835-843, 2005.

CALDAS, E. D. et al. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1877-1883, 2004.

CALDAS, E. D. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CHEN G. et al. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1406-1411, 2011.

CIESLIK, E. et al. **Food Chemistry**, v. 125, p. 773-778, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residues in Food and Feed**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/index.html?expand=CT51>>. Acesso em: 19 de agosto de 2011.

CONAB – **Companhia Nacional do Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 10 de setembro de 2010.

CRNOGORAC, G. & SCHWACK, W. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 4009-4016, 2007.

CRUZ, J. C. et al. **Circular Técnica 81**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

DE KOK, A. et al. Food and Consumer Product Safety Authority. **Standard Operational Procedure CHE01-WV630**, The Hague, Holanda: Ministry of Health, Welfare and Sport, 2005.

DE KOK, A., & VAN BODEGRAVEN, P. 4th European Pesticide Residues Workshop: Pesticides in Food and Drink. **Anais**, Roma, 2002.

ECODEBATE. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2011/03/24/estudo-aponta-agrotoxico-em-leite-materno-de-mulheres-de-lucas-do-rio-verde-mt/>>. Acesso em 31 de julho de 2011.

EMBRAPA. Cultivo do arroz irrigado no Brasil, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FONTESHTML/arroz/ArrozIrrigadoBrasil>>. Acesso em 16 de novembro de 2010.

EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=113&cod_pai=35>. Acesso em 26 de julho de 2011

EPA. **The determination of whether dithiocarbamate pesticides share a common mechanism of toxicity**, Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, Washington, DC, EUA, 2001.

EQUILÍBRIO NUTRICIONAL. Disponível em: <<http://www.equilibrionutricional.com.br/atualidades-nutricionais-e-receitas/atualidades-nutricionais/320-cereais-matinais-por-que-fazem-bem.html>>. Acesso em 26 de julho de 2011.

ERICKSON, B. **Analytical Chemistry**, p. 101-124, 1999.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation. **Good Laboratory Practice on Pesticides in Food**. Rome, 1995.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2005.

GARCIA, J. C. et al. **Circular Técnica 74**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

GARCINUÑO, R. M. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 35-41, 2004a.

GARCINUÑO, R. M. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 225-229, 2004b.

GHELLER, J. A. Disponível em:

<<http://www.fag.edu.br/professores/jorgea/DEFESA%20FITOSSANIT%C1RIA/FUNGICIDA%20TRAZ%D3IS%20OUTROS.pdf>>. Acesso em 31 de JULHO de 2011.

GLOBO. Disponível em:

<<http://g1.globo.com/bom-dia-brasil/noticia/2011/03/presenca-de-agrotoxicos-em-leite-materno-assusta-mulheres-de-mt.html>>. Acesso em 31 de julho de 2011.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. **Food Chemistry**, v. 125, p.1083-1090, 2011.

GONZÁLVEZ, A. et al. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, 191-196, 2011.

GUSTAFSSON, K. H. & THOMPSON, R. A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 729-732, 1981.

HIEMSTRA, M., & DE KOK, A. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

HILL, A. R. C. Headspace methods for dithiocarbamates. In: **Moderns methods for pesticides analysis: emerging strategies for pesticide analysis**. CAIRNS, T., SHERNA, J. (Eds.), CRC Press, London, p. 213-231, 1992.

IBAMA. **Pesticides an related commercialized in Brasil in 2009: an environmental approach**. Brasília, 2010.

IDEC. Disponível em:
<www.idec.org.br: <http://www.idec.org.br/emacao.asp?id=2570>>. Acesso em 31 de julho de 2011.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 2, 2007.

IRGA. (2011). Disponível em: <<http://200.96.107.174/coma-arroz/paginas/nutricao.php>>. Acesso em 26 de julho de 2011b.

IRGA. Disponível em:
<<http://www.irga.rs.gov.br/inde.php?principal=1&secao=1&id=2875>>. Acesso em 26 de julho de 2011a.

IRTH, H. et al. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 39, p. 129-139, 1990.

JULIATTI, F. C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos**. 2011. Diapositivo.

KAUSHIK, P. & KAUSHIK, G. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 102-111, 2007.

KAZOS, E. A. et al. **Chemosphere**, v. 68, p. 2104-2110, 2007.

KEPPEL, G. E. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 54, p. 528-532, 1971.

KESARI, R. & GUPTA, V. K. **Talanta**, v. 45, p. 1097-1102, 1998.

KOBLITZ, M. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KOLBERG, D. I. et al. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1436-1442, 2011.

KSHEERASAGAR, R. L. & KALIWAL, B. B. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, p. 9-17, 2003.

KURZ, M. S. **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a determinação de resíduos de pesticidas em águas e da degradação a campo.** Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2007.

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

LANÇAS, F. M. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**, v. 6. São Carlos: RiMa. 2004.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999.

LEE, A. W. M. et al. **Analytica Chimica Acta**, n. 339, p. 123-129, 1997.

LEE, S. W. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4366-4377, 2011.

LO, C. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2720-2723, 1996.

MAGALHÃES, P. C. et al. **Circular Técnica 22**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.

MALIK, A. K. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5808-5811, 2000.

MARCH, R. E. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, p. 351-369, 1997.

MATHEW, L. et al. **Talanta**, v. 43, p. 73-76, 1996.

MILES, C. J., ZHOU, M. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 74, n. 2, P. 384-388, 1991.

MUNDSTOCK, C. M. **Qualidade de grãos de milho**. Porto Alegre, 2006.

NAVARRO, P. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, p. 10-16, 2006.

NUNEZ, O. et al. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 683-703, 2005.

PAES, M. D. **Circular Técnica 75**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

PAREJA L. et al. **Talanta**, v. 83, p. 1613-1622, 2011.

PARK, J-Y. **Food Chemistry**, v. 128, p. 241-253, 2011.

PIMENTEL, M. F. & BARROS NETO, B. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PINAZZA, L. A. **Cadeia Produtiva da Soja**, v. 2. Brasília: MAPA/SPA, 2007a.

PINAZZA, L. A. **Cadeia produtiva do milho**. Brasília: MAPA/SPA, 2007b.

PINHO, G. P. et al. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 987-995, 2009.

PIZZUTTI, I. R. et al. 5th European Pesticide Residues Workshop - Pesticides in Food and Drink. **Anais**, Estocolmo, 2004.

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

PRIMER, A. **Basics of LC/MS**. EUA: Agilent Technologies, 2001.

PRIMER, A. **Food safety: applications in mass spectrometry**. EUA: Agilent Technologies, 2004.

QUEFFELEC, A-L. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1675-1680, 2001.

RIBANI, M. et al. **Química Nova**, v. 27, 771-780, 2004.

RICCIO, M. F. **Analisadores de massas.** Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9>>. Acesso em 29 de julho de 2011.

ROMERO-GONZÁLEZ, R. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1477-1485, 2011.

ROYER, A. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2152-2158, 2001.

SANCO. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Documento nº SANCO/10684/2009.

SATPATHY, G. et al. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1300-1308, 2011.

SAÚDE. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/Intoxicacao_por_Agrotoxicos.pdf>. Acesso em 31 de julho de 2001.

SILVA, J. M. et al. **Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada: Efeitos à saúde provocados pela exposição aos agrotóxicos**, Ministério da Saúde, 2006.

SILVA, R. C. **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**, Dissertação de Mestrado, Santa Maria, UFSM, 2005.

SINDAG. 17 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2143>. Acesso em 31 de julho de 2011.

SINDAG. 8 de agosto de 2009. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1755>. Acesso em 30 de julho de 2011

STASHENKO, E. E., & MARTÍNEZ, J. R. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 33-59, 2010a.

STASHENKO, E. E., & MARTÍNEZ, J. R. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4, p. 25-48, 2010b.

STERTZ, S. C., & FREITAS, R. S. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 45-52, 2003.

SU, R et al. **Journal of Chromatography B**, doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.016, 2011.

SUBEDI, B. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6278-6284, 2011.

TAKEUCHI, K. P. et al. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 78-85, 2005.

TICHÁ, J. et al. 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. **Anais**, Praga, 2005.

VRYZAS, Z. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2220-2226, 2002.

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

WATERS. **Operator's guide: Quattro Premier**. Milford, EUA, 2005.

WHO, **Dithiocarbamate pesticides, ethilenethiourea and propilenethiourea: a general introduction**, Geneva: World Health Organization, 1988.

WILKOWSKA, A. & BIZIUK, M. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

WOODROW, J. E. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1524-1529, 1995.

WU, G. et al. **Food Chemistry**, v. 126, p. 646-654, 2011.

ZINI, C. A. **Scientia Chromatographia**, v. 1, n. 1, p. 31-49, 2009.

ZROSTLIKOVA, J. et al. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 73-86, 2001.

APÊNDICE 1 – Ensaio de recuperação do método individual.

	Soja e Milho			Arroz		
Nível de fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	0,05	0,1	0,5	0,05	0,1	0,5
Concentração da solução de tiram (mg L ⁻¹)	100	100	1000	100	100	1000
Volume adicionado da solução de tiram (µL)	20	40	20	16	32	16
Massa da amostra (g)	25			20		
Volume de água adicionado (mL)	50			30		
Volume do solvente de extração (isooctano) (mL)	25			25		
Concentração de CS ₂ em solução correspondente (mg L ⁻¹)	0,05	0,1	0,5	0,04	0,08	0,4
Fator*	1			1,25		

APÊNDICE 2 – Ensaio de recuperação do método multirresidual.

	cereais matinais			Grãos de milho		
Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10	20	50	10	20	50
Concentração da solução de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1000			1000		
Volume adicionado da solução de fortificação (μL)	20	40	100	50	100	250
Massa da amostra (g)	2			5		
Volume de água adicionado (mL)	8			7,5		
Volume de acetonitrila (mL)	10			10		
Concentração dos pesticidas antes da extração (ng mL^{-1})	2	4	10	5	10	25
Volume da alíquota retirado (mL)	0,5			0,5		
Volume de metanol adicionado (mL)	0,5			0,5		
Volume no vial antes da injeção no LC-MS (mL)	1,0			1,0		
Concentração dos pesticidas antes da injeção no LC-MS (ng mL^{-1})	1	2	5	2,5	5	12,5
Fator	10			4		