



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

**ESTUDO DO EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM DIFERENTES TIPOS DE ARROZ PELO
MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

Lizara da Costa Cabrera

Santa Maria-RS, Brasil

2012

**ESTUDO DO EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM DIFERENTES TIPOS DE ARROZ PELO
MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

por

Liziara da Costa Cabrera

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

DOUTOR EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2012

**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

**ESTUDO DO EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM DIFERENTES TIPOS DE ARROZ PELO
MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

elaborada por

Liziara da Costa Cabrera

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong (FURG)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (co-orientador, FURG)

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime (UFSM)

Dr. Manoel Leonardo Martins (UFSM)

Santa Maria, 30 de março de 2012

**A minha amada filha
Paula Cabrera Claro que é a
minha vida, meu tudo, a você
dedico esse trabalho e todos
esses anos de estudo.**

**Aos meus amados pais e irmão
que são meu alicerce,
meu porto seguro.
Obrigada por tudo
Amo vocês demais**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof Dr Renato Zanella, pelo qual tenho imensa admiração e orgulho por ter sido sua orientada. Agradeço a oportunidade, amizade, todo o apoio e paciência durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof Dr Ednei Gilberto Primel, com quem tenho aprendido muito durante todos esses anos de convivência. Agradeço por todas as oportunidades, pela amizade, pela paciência enfim, por ter sido o “culpado” pela realização deste sonho.

A Prof^a Dra Eliana Badiale-Furlong pela participação na banca examinadora, pelas valiosas sugestões e colaborações. Pelo carinho e apoio num momento tão tenso.

Ao Prof. Dr Manoel Leonardo Martins pela participação na banca examinadora e na qualificação, por todas sugestões e considerações. Assim como agradeço a participação da Prof^a Marta Adaime e pelo carinho com que ela sempre me recebeu na UFSM.

A equipe do LACOM, Ana Laura, Bruno Guimarães, Bruno Meira, Catia, Gabi, Sergi, Lucas, Maria, Juliana Maciel, Edinho, Juliana Guilherme, Felipe, Fabricia, Lisiane, Liziane, Natiele, Jaime, Jean, Renata, Maristela, Vanessa e um agradecimento especial aqueles que estiveram mais próximos me apoiando nesses momentos finais da tese ...

A minha amiga Sergi, por todo apoio e ajuda no laboratório, pela sua incansável disposição de estar sempre ajudando a todos. E também, é claro, pelos bons momentos de descontração de muitas risadas e muitas histórias nesses últimos seis anos.

A minha colega, amiga, cunhada, Renata, obrigada por toda ajuda, pela amizade e apoio.

Ao meu ex aluno e hoje colega e amigo Bruno Meira, obrigada pela amizade, incentivo, apoio, ajuda estatística e pela voz que nos encanta sempre.

Ao meu colega e amigo Éderson Pereira (Edinho), cabeçação você “mora no meu coração e não paga aluguel”, agradeço pela amizade, carinho e incentivo. Obrigada por tudo!

Ao Lucas, que mesmo tendo chegado recentemente no LACOM, tem sido um grande apoio. Ainda teremos muito trabalho pela frente!!!

Ao Prof Dr Fábio Andrei pela amizade e pelo incentivo.

A Juliana Guilherme pela ajuda no preparo de amostra.

Aos amigos e ex colegas que hoje não fazem mais parte da equipe do Lacom, os quais contribuíram muito o tempo que estiveram aqui e deixaram muita saudade...

A minha amiga Adriana Neves Dias pela parceria de muitas histórias, por me escutar me aconselhar em fim por todo carinho que a distância não apaga.

As minhas amigas Adriana Demoliner e Sherol pelos bons momentos vividos no Lacom, pela oportunidade de ter convivido com pessoas tão alto astral e de coração tão grande, agradeço também pela ajuda na fase inicial do trabalho.

A Fabi, obrigada por todos esses anos de convívio, muitos bons momentos, de muitas conversas, discussões e até alguns delírios sobre nossos trabalhos. Também pelos momentos de descontração históricos no Lacom.

A direção da Escola de Química e Alimentos Prof. Dr Marcos Amarante e Prof Dr Marcelo Doca por todo apoio sempre que foi necessário.

A todos os colegas do EQA em especial o pessoal da secretária Jean, Rosane, Viviane e Débora.

Aos colegas e amigos do Campus de Sto Antonio da Patrulha Lenise, Fernanda, Fernando Kokubun e demais professores e colegas e, especialmente a Márcia e Fábio companheiros de Rio Grande a SAP.

A toda equipe do LARP em especial Márcia e Carol que sempre me receberam com muito carinho.

Ao Prof Dr Osmar Prestes pela participação no exame de qualificação e agradeço também por tudo que aprendi especialmente sobre QuEChERS.

Aos colegas do PPGQ em especial meus amigos Fernanda Lima e Luis Manoel. E aos professores do PPGQ da UFSM.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, Simoni, Carlos, Bira, Márcio, Clarissa e também aos amigos e colegas da graduação Jackson, Gisele, Renata e a minha amiga Dra Patricia Costa que nessas indas e vindas voltamos a nos encontrar.

As minhas amigas queridas de toda vida.... Obrigada gurias amo vocês!!!

Ana Matilde, obrigada por acreditar em mim, torcer e pelo orgulho que sei que você tem. Assim como eu tenho muita admiração e orgulho por você.

A minha "pior amiga" Carmen Garcia, vou ter mais tempo agora, espero. Obrigada pela amizade que resistiu a tudo.

A Bianca Seyffert, que sei que mesmo a distância sempre esteve torcendo para que tudo desse certo. Obrigada Bi!!!!

A minha amigona e irmã patrulhense Fernanda Knevez, agradeço o apoio, os ouvidos, o incentivo, enfim a sua amizade que foi essencial para minha sobrevivência nos últimos anos.

Ao meu amigo Sandro, pela amizade, por me socorrer várias vezes, pelas caminhadas, conversas, chimarrão com rapadura etc...te adoro meu amigo.

A minha Teacher Ligia pela paciência e por todos os ensinamentos de inglês.

Aos meus familiares, Tia Laine, Dindo, Dinda e primos queridos, agradeço o apoio hoje e nos primeiros anos de vida escolar.

Ao meu irmão Diego, pela amizade, apoio e incentivo. Te amo muito Maninho. Aos meus pais, Homero e Irá, aos quais não tenho palavras para agradecer todo apoio, todo amor, vocês são muito especiais sem vocês eu não seria nada. Obrigada pela vida, educação, princípios e todo amor que me fez chegar até aqui.

A minha Melzinha pelo amor incondicional e pela companhia sem pedir nada em troca. Você enche de alegria minha vida.

A minha filha amada Paula, que cresceu nessa vida acadêmica, desculpa a ausência, você é meu tudo te amo muito, muito, muito.

RESUMO

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

ESTUDO DO EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM DIFERENTES TIPOS DE ARROZ PELO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

AUTORA: LIZIARA DA COSTA CABRERA

ORIENTADOR: PROF. Dr. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: 30 de março de 2012, Santa Maria

O arroz tem grande importância social e econômica, pois é um dos componentes principais da alimentação de mais da metade da população mundial. O Brasil está entre os principais produtores mundiais de arroz, sendo que o estado do Rio Grande do Sul contribui com cerca de 60% da produção nacional. Atualmente, este cereal vem sendo reconhecido pelas suas características funcionais, neste sentido, apesar de um grupo ainda restrito de consumidores, cresce a demanda por cultivares especiais, como arroz cateto, arroz negro e arroz vermelho, pois este tem uma composição nutricional bastante complexa e maior valor agregado. É de extrema importância para a segurança alimentar que seja monitorado a qualidade desses grãos. Um parâmetro determinante nessa qualidade é a investigação de resíduos de agrotóxicos. Nesse trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresíduos para determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série (LC-MS/MS) empregando o método QuEChERS acetato no preparo de amostra. Na etapa de limpeza do extrato, foram otimizados o tipo e a quantidade de sorvente, sendo avaliados além dos sorventes geralmente empregados, como PSA e C18, outros materiais, até então nunca investigados para este fim, como a quitosana e terra diatomácea. Para esse estudo após otimização foi escolhido 150 mg de C18 como sorvente. A eficiência e confiabilidade do método foram avaliadas através de alguns parâmetros de validação como linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), efeito matriz e robustez. As curvas analíticas apresentaram linearidade ($r^2 \geq 0,99$) para todos analitos no solvente e para 80% dos analitos considerando a curva trabalho. As recuperações foram entre 54-112; 50-112; 48-116 e 51-122% para o arroz vermelho, integral, cateto e branco, respectivamente, com RSD menor que 20%. Os limites de quantificação do método foram na faixa de 5 a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em relação ao efeito matriz, o efeito foi baixo ($< 20\%$) para maioria dos analitos, ocorrendo supressão para 80% dos analitos. Esse efeito foi compensado com calibração por superposição na matriz. O método apresentou robustez para a variação de matriz, uma vez que pode ser aplicado em diferentes tipos de arroz mantendo a exatidão e precisão. Portanto, concluiu-se que o método proposto pode ser aplicado de forma eficiente para a determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz, uma vez que todos os parâmetros de validação encontram-se de acordo com os limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Arroz, Efeito Matriz, QuEChERS, sorvente, LC-MS/MS

ABSTRACT

Doctoral Thesis

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

STUDY OF THE MATRIX EFFECT FOR PESTICIDE DETERMINATION IN DIFFERENT TYPES OF RICE BY MODIFIED QuEChERS METHOD AND LC-MS/MS

AUTHOR: LIZIARA DA COSTA CABRERA

ADVISOR: PROF. Dr. RENATO ZANELLA

Date and Place: March 30th, 2012, Santa Maria.

Rice is socially and economically important because it is the main component of the diet of more than half of the world's population. Brazil is one of the main rice producers in the world and Rio Grande do Sul state yields about 60% of the national production. This grain has been recently recognized by its functional characteristics; therefore, the demand for special cultivars, such as cateto rice, black rice and red rice, has increased lately, due to their complex nutritional composition and higher value, even though the number of consumers is still low. The quality of these grains must be monitored to guarantee food safety. A fundamental parameter of the quality is the investigation of pesticide residue. This study has developed and validated a method for pesticide multiresidue determination in different types of rice by Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) employing the acetate QuEChERS method in sample preparation. In the cleanup step, the type and the quantity of sorbent were optimized. Besides the sorbents which are frequently used, like PSA and C18, others that had never been tested so far, such as chitosan and diatomaceous earth, were also evaluated. After the optimization, 150 mg of C18 as sorbent was chosen.

The efficiency and the reliability of the method were evaluated according to some parameters, such as linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision (repeatability and intermediate precision), matrix effect and robustness. Analytical curves showed adequate linearity ($r^2 \geq 0.99$) for all analytes. Recovery ranges were 54-112; 50-112; 48-116 and 51-122% for red, whole, cateto and white rice, respectively, with RSD lower than 20%. The limits of quantification ranged from 5 to 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The study of the matrix effect has shown low values (< 20%) for most of analytes. Suppression was the predominant effect for 80% of the analytes. This effect was compensated by matrix-matched calibration. The method analytes has shown the robustness of the different types of rice with accuracy and precision. Therefore, the proposed method can be efficiently applied to determine pesticides in different types of rice because all validation parameters comply with the limits recommended for the validation of chromatographic methods.

Key words: Pesticide, Rice, Matrix Effect, QuEChERS, sorbent, LC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Constituintes do grão de arroz	24
Figura 2 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	46
Figura 3 - Sistema de infusão pós-coluna. Fonte CASSIANO <i>et al.</i> , 2009.....	52
Figura 4 - Representação esquemática do método QuEChERS acetato modificado	61
Figura 5 - Cromatogramas do LOQ e LOD do método com respectivos valores de sinal/ruído determinado para Imidacloprido nos níveis de 10 µg kg para LOQ e 2,5 µg kg para o LOD.....	65
Figura 6 - Intensidade de cada fragmento em diferentes voltagens do capilar em kV. Utilizando vazão do eluente de 0,3 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, temperatura da fonte de 100°C.	71
Figura 7 - Intensidades de cada fragmento em diferentes vazões do eluente. Utilizando 3,5 kV como voltagem do capilar, volume de injeção de 20 µL, temperatura da fonte de 100°C.	72
Figura 8 - Intensidades de cada fragmento em diferentes volumes de injeção. Utilizando 3,5 kV de voltagem do capilar, vazão do eluente de 0,3 mL min ⁻¹ , temperatura da fonte de 100°C.	73
Figura 9 - Intensidades da resposta dos analitos no sistema LC-MS/MS com diferentes proporções de metanol e água, sem modificador, na fase móvel, vazão do eluente de 0,3 mL.....	74
Figura 10 - Intensidades da resposta dos analitos com menor intensidade no sistema LC-MS/MS com diferentes proporções de metanol e água, sem modificador, na fase móvel, vazão do eluente de 0,3 mL.....	75
Figura 11 - Intensidade dos compostos analisados com maiores intensidades, em ESI positivo em diferentes fases móveis	76
Figura 12 - Intensidade dos compostos analisados com menores intensidades em ESI positivo em diferentes fases móveis.....	76
Figura 13 - Intensidade dos compostos analisados por ESI negativo em diferentes fases.....	76
Figura 14 - Cromatogramas de íons totais (TIC)- Segmento 1, 2, 3.....	78

Figura 15 - Recuperações usando diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza.....	79
Figura 16 - Recuperações usando quitosana como sorvente durante a etapa de limpeza no método QuEChERS.....	80
Figura 17 - Efeito das quantidades de C18 empregadas na etapa de limpeza no método QuEChERS (Barras de erros indicam valores de RSD).....	81
Figura 18 - Cromatogramas do bentazone extraído pelo método QuEChERS, nível de 50 µg kg ⁻¹ : (a) solvente, (b) extrato da matriz com etapa de limpeza e (c) extrato da matriz sem etapa de limpeza.....	81
Figura 19 - Recuperações em diferentes condições de fortificação, a frio e a temperatura ambiente.....	82
Figura 20 - Valores de recuperação obtidos após diferentes tempos de fortificação	82
Figura 21 – Fluxograma do método QuEChERS otimizado.....	84
Figura 22. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado e não fortificado (branco) para azoxistrobina.....	85
Figura 23 - Curvas no solvente e na matriz para 2,4 D na faixa de 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	90
Figura 24 - Curvas no solvente e na matriz para o 3,4 DCA na faixa de 10-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 µg L ⁻¹ (b).....	91
Figura 25 - Curvas no solvente e na matriz para o azoxistrobina na faixa de 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	91
Figura 26 - Curvas no solvente e na matriz para o bentazona na faixa de 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	92
Figura 27 - Curvas no solvente e na matriz para o bispiribaque-sódico na faixa de 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	92
Figura 28 - Curvas no solvente e na matriz para carbendazim na faixa de até 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	93
Figura 29 - Curvas no solvente e na matriz para clomazona na faixa de até 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	93
Figura 30 – Curvas no solvente e na matriz para difenoconazol na faixa até 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	94
Figura 31 - Curvas no solvente e na matriz para epoxiconazol na faixa de 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	94
Figura 32 - Curvas no solvente e na matriz para fipronil na faixa de 1-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L ⁻¹ (b).....	95
Figura 33 - Curvas no solvente e na matriz para imazapique na faixa de 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	95
Figura 34 - Curvas no solvente e na matriz para imazetapir na faixa de 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	96
Figura 35 - Curvas no solvente e na matriz para imidacloprido na faixa de 5-500 µg L ⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L ⁻¹ (b).....	96

Figura 36 - Curvas no solvente e na matriz para malationa na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	97
Figura 37 - Curvas no solvente e na matriz para metamidofós na faixa de 10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	97
Figura 38 - Curvas no solvente e na matriz para metsulfurom-metilico na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	98
Figura 39 - Curvas no solvente e na matriz para piraclostrobina na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	98
Figura 40 - Curvas no solvente e na matriz para pirazossulfurom na faixa de 10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	99
Figura 41 - Curvas no solvente e na matriz para pirimifós-metilico na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	99
Figura 42 - Curvas no solvente e na matriz para propanil na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	100
Figura 43 - Curvas no solvente e na matriz para propiconazol na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	100
Figura 44 - Curvas no solvente e na matriz para tebuconazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	101
Figura 45 - Curvas no solvente e na matriz para tetraconazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	101
Figura 46- Curvas no solvente e na matriz para tiabendazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	102
Figura 47 - Curvas no solvente e na matriz para tiametoxam na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	102
Figura 48 - Curvas no solvente e na matriz para trifloxistrobina na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)	103
Figura 49 - Efeito matriz para cada um dos analitos analisados, calculado através dos coeficientes angulares das curvas de calibração.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido	26
Tabela 2 - Principais insetos prejudiciais a cultura de arroz irrigado	29
Tabela 3 - Agrotóxicos e organismos alvo	31
Tabela 4 - Agrotóxicos indicados para o cultivo de arroz no Brasil	32
Tabela 5 - Métodos utilizados para determinação de agrotóxicos em grão de arroz	35
Tabela 6 - Informações sobre os agrotóxicos em estudo	57
Tabela 7 - Composição das fases móveis utilizadas na otimização	59
Tabela 8 - Sorventes testados durante a etapa de limpeza	63
Tabela 9 – Parâmetros de fragmentação no LC-ESI-MS/MS, modo de ionização (positivo ou negativo), massa molar, tempo de retenção, usando <i>dwell time</i> de 0,05 s	69
Tabela 10 - Comparação das curvas analíticas determinadas em diferentes composições de fase móvel MEOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	77
Tabela 11 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS	78
Tabela 12 - Limites de detecção e quantificação do instrumento e do método	86
Tabela 13 - Percentuais de recuperação (exatidão) e RSD para a repetitividade do método de extração (n= 9)	87
Tabela 14 - Percentuais de recuperação (R%) e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 100 µg kg ⁻¹ (n=9)	89
Tabela 15 – Efeito matriz calculado através dos coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz	103
Tabela 16 - Robustez do método utilizando arroz vermelho, integral, cateto e branco num nível de fortificação de 100 µg kg ⁻¹ (n= 9)	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*
- APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
- APPI - Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric pressure photoionization*
- ASE - Extração Acelerada por Solventes do inglês, *accelerated solvent extraction*
- C18 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
- C8 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C8
- CAS - *Chemical Abstracts Service*
- CEN – *Commite Européen de Normalisation*, do inglês *European Committee for Standardization*
- CID - Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision Induced Dissociation*
- CODEX - *Codex Alimentarius*
- CCPR - *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*
- d.i. - diâmetro interno
- DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano
- DL - dose letal
- DLLME - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*
- D-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*
- EM – Efeito de Matriz, do inglês *matrix effect*
- EMATER- Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESI - Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

ESI(-) - Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês *Electrospray Ionization Negative Mode*

ESI (+) - Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*

FAO - *Food Agriculture Organization*

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

GBC – Carbono grafitizado do inglês, *Grafitized Carbon Black*

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

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

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IRGA - Instituto riograndense de arroz

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

K_H – Constante de Henry

LACOM – Laboratório de Análise de Contaminantes Orgânicos e Metais

LARP - Laboratório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

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

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

LMR - Limite Máximo de Resíduos

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

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

LOD_m - Limite de Detecção do método

LOQ_m - Limite de Quantificação do método

LOD_i - Limite de Detecção do instrumento

LOQ_i - Limite de Quantificação do instrumento

m/z - razão massa-por-carga

MAE - Extração assistida por microondas, do inglês *microwave assisted extraction*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MASE- Extração com membrana assistida por solvente, do inglês *membrane assisted solvent extraction*

MeCN – Acetonitrila

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

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*

n – número de replicatas

NCI – ionização química negativa

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

pH - Potencial hidrogeniônico

PLE - Extração Líquida Pressurizada (do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) também chamada de ASE

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

PV – Pressão de vapor

pKa- Produto da Constante ácida

QqQ – Analisador de massas triplo quadropolo

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r - Coeficiente de correlação linear

r^2 - coeficientes de determinação

R - Recuperação

rpm - rotação por minuto

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

SANCO - Directorate General for Health and Consumer Policy

SFE – Extração por fluido supercrítico, do inglês, *supercritical fluid extraction*

SIM - Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

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

SPME- Microextração em fase sólida dispersiva, do inglês *solid-phase microextraction*

TOF - Analisadores de massas de Tempo-de-Vôo, do inglês *Time-of-Flight*

TIC –Cromatograma de íons total, do inglês, *Total Ion Chromatogram*

t_R - tempo de retenção

USE - Extração ultrassônica do inglês, *ultrasonic extraction*

US-EPA- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States – Environmental Protection Agency*.

UV - ultravioleta

v/v - volume por volume

UE – União Européia

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 O arroz	22
2.1.1 Características botânicas e morfológicas.....	22
2.1.2 Cultivo do arroz	22
2.1.3 Histórico do cultivo de arroz no Brasil	23
2.1.4 Importância Nutricional e Composição.....	23
2.1.5 Diferentes tipos de arroz	24
2.1.6 Aspectos econômicos e produção na região sul	27
2.2. Pragas que atacam a cultivo de arroz.....	28
2.3 Agrotóxicos	29
2.3.1 Definição	29
2.3.2 Classificação	30
2.3.3 Controle de pragas no arroz.....	30
2.3.4 Principais características dos agrotóxicos em estudo	34
2.4 Determinação de agrotóxicos em arroz	34
2.4.1 Preparo de amostra	34
2.4.1.1 Evolução das técnicas de preparo de amostra	36
2.4.1.2 Método QuEChERS	39
2.4.1.3 Modificações do método QuEChERS	41
2.4.1.4 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS	42
2.4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas na análise de agrotóxico	44

2.4.2.1 Fontes de ionização	46
2.4.2.1.1 Ionização por eletronebulização.....	46
2.4.2.1.2 Ionização química a pressão atmosférica	47
2.4.2.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica.....	48
2.4.2.1.4 Dissociação Induzida por Colisão (CID).....	49
2.4.2.2 Analisador de massas	49
2.4.2.2.1 Sistemas Quadrupolo.....	49
2.4.2.2.2 Analisadores de Tempo-de-Vôo (Time-of-Flight – TOF)	49
2.4.2.3 Sistemas Armadilha de íons (Ion-trap).....	50
2.4.2.3.1 Triplo Quadrupolo (QqQ).....	50
2.4.2.3.2 Sistemas de MS em tandem (MS/MS)	50
2.4.2.3.3 Detector	51
2.5 Efeito Matriz	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 Instrumentação	54
3.2 Reagentes, solventes e outros materiais	55
3.3 Agrotóxicos selecionados	56
3.4 Preparo das soluções analíticas	58
3.5 Otimização dos parâmetros operacionais do LC-ESI-MS/MS.....	58
3.6 Otimização das condições cromatográficas.....	59
3.7 Procedimento de fortificação e extração: Método QuEChERS modificado.....	60
3.7.1. Preparo do extrato branco da matriz (<i>slurry</i>).....	60
3.7.2. Método QuEChERS modificado.....	610
3.7.3 Otimização da etapa de limpeza no método QuEChERS	62
3.7.3.1 Otimização da quantidade de C18	62
3.7.4 Otimização do tempo de fortificação e resfriamento	63
3.8 Validação do método	63
3.8.1 Determinação da linearidade do instrumento e do método	64
3.8.2 Determinação da estimativa dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do instrumento e do método	64
3.8.3 Exatidão	65
3.8.4 Precisão (Repetitividade e precisão intermediária)	65
3.8.5 Avaliação do efeito matriz	66

3.8.6 Aplicabilidade do método e robustez com relação à matriz	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
4.1 Otimização dos parâmetros para ionização e fragmentação dos compostos no MS.....	68
4.2 Escolha da fase móvel	74
4.2.1 Proporções de metanol e água	74
4.2.2 Comparando modo positivo com negativo de ionização	75
4.2.3 Fase móvel escolhida	75
4.2.4 Condições empregadas no sistema cromatográfico	77
4.3 Otimização do Método QuEChERS	79
4.3.1 Efeito de diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza	79
4.3.2 Diferentes quantidades de C18.....	80
4.3.3 Resfriamento.....	82
4.3.4 Tempo de fortificação.....	82
4.4 Método de extração QuEChERS modificado	83
4.5 Validação do método empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS.....	83
4.5.1 Seletividade.....	83
4.5.2 Curva Analítica e Linearidade	85
4.5.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ	85
4.5.4 Exatidão	87
4.5.5 Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária)	88
4.5.6. Efeito Matriz	90
4.6. Robustez do método quanto a matriz	105
CONCLUSÃO	106
DESTINAÇÃO DE RESÍDUOS GERADOS.....	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXO I - Principais características e propriedades dos agrotóxicos em estudo	121

1. INTRODUÇÃO

A orizicultura tem grande importância social e econômica, em especial no estado do Rio Grande do Sul, o qual se destaca como maior produtor nacional. O arroz é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassado pelo milho e trigo. Esse cereal, ainda tem destaque, por ser um alimento básico para a maioria da população. No Brasil, o tipo de arroz mais consumido é o arroz branco polido. No entanto, segundo a EMBRAPA a procura por outros tipos especiais de arroz vem crescendo nos últimos anos. Isso se deve a preocupação de parte da população com alimentação mais saudável e mais rica nutricionalmente. Alguns tipos de arroz como negro, selvagem, vermelho, cateto, entre outros, se destacam por uma composição nutricional mais rica comparada ao arroz branco (EMBRAPA, 2007).

Ainda no sentido de qualidade da alimentação, destaca-se a preocupação com a presença de resíduos de agrotóxicos. Alguns autores sugerem que a ingestão de alimentos contaminados é a principal rota de contaminação por agrotóxicos (KEIKOTLHAILE *et al.*, 2010). A cultura de arroz é atacada por diversas pragas, e, para que não ocorram perdas na produção e na qualidade é necessária a utilização de agrotóxicos. No entanto, a permanência de resíduos no produto final pode ocorrer oferecendo riscos à saúde humana (PEIXOTO, 2010).

Por isso, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e sensíveis, que atendam às exigências de agências e normas reguladoras nacionais (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003) e internacionais (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), são de suma importância para garantia da qualidade dos alimentos.

As análises de agrotóxicos em alimentos incluem uma etapa preliminar de preparo da amostra, a qual é fundamental para garantir a eficiência do processo analítico, especialmente quando o método é aplicado para determinação de multirresíduos em matrizes complexas. O preparo de amostra a ser empregado depende das características da matriz, das propriedades do analito e do nível de concentração da substância a ser determinada.

Entre as técnicas e métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em alimentos, destaca-se o método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que foi desenvolvido com o objetivo de superar

limitações práticas dos métodos de extração multirresíduos, como os uso de grandes quantidades de solvente, tempo elevado de extração, necessidade de automação e alto custo. Esse método, que tem como vantagens, como seu próprio nome se refere, de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido a simplificação das etapas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O método QuEChERS com modificações (“QuEChERS acetato”) se tornou método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007) e, em 2008, a *European Committee for Standardisation* oficializou o método “QuEChERS citrato” como referência na Comunidade Européia (CEN, 2008).

Para determinação de agrotóxicos são empregadas técnicas cromatográficas bem estabelecidas como a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*). Essas técnicas podem ser acopladas a diferentes detectores, sendo que alta seletividade e sensibilidade são alcançados pelo acoplamento com à Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

Considerando a importância da orizicultura na região, o trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um método para determinação de agrotóxicos em grãos de arroz empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS, com ênfase a um estudo do efeito de matriz e aplicação a diferentes tipos de arroz. Tendo como objetivos específicos: i) otimizar a etapa de limpeza através da D-SPE (Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*), com o uso de diferentes materiais sorventes; ii) avaliar o emprego do método em diferentes tipos de arroz; iii) avaliar o efeito matriz no método otimizado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O arroz

2.1.1 Características botânicas e morfológicas

O arroz (*Oryza sativa*, L.) pertence à família *Gramineae* e subfamília *Pooideae*. Segundo a FAO (2011) (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) já foram identificadas mais 40.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são: origem genética (japônica ou índica), dimensões (curto, médio e longo) e composição do amido quanto ao teor de amilose (baixo, médio ou alto), o que está relacionado com suas características de cozimento como a soltura dos grãos.

2.1.2 Cultivo do arroz

É a terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassada pelo milho e trigo. Entre os cereais cultivados, é o que mais se destaca, por ser alimento básico da maioria da população. Acredita-se que o cultivo de arroz (orizicultura) iniciou há mais de sete mil anos, sendo desenvolvido paralelamente em vários países do sudeste asiático que compreende a região leste da Índia, Indochina e sul da China. No século VII foi levado à Europa pelas mãos dos árabes, de lá chegou ao Brasil, trazido pelos portugueses (PRESTES, 2007).

Segundo o Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), o cultivo de arroz pode ser realizado no sistema irrigado, cujas lavouras concentram-se em sua grande maioria no Sul do País, ou no sistema de terras altas (ou de sequeiro), que é mais utilizado no cerrado brasileiro (IRGA, 2012).

A orizicultura irrigada é responsável por 65% da produção nacional. O cultivo do arroz irrigado está presente em todas as Regiões brasileiras mais o destaque é para Região Sul, onde predomina essa forma de cultivo. O Estado do Rio Grande do Sul (RS) é responsável, atualmente, por mais de 60% da produção total deste cereal (IRGA, 2012; IBGE, 2012). A produção nacional na safra 2010-2011 foi cerca de 12

milhões de toneladas. Com uma área plantada de 2,7 milhões hectares (IBGE, 2012).

2.1.3 Histórico do cultivo de arroz no Brasil

Historiadores relatam que o Brasil foi o primeiro país a cultivar arroz no continente americano. Integrantes da expedição de Pedro Álvares Cabral, regressando de uma viagem pelo país, trouxeram amostras da planta colhida em solo brasileiro, isto seria apenas a confirmação de registros feitos anteriormente por Américo Vespúcio que já havia constatado a presença do cereal em áreas alagadas do país. Entre os índios tupis era conhecido como milho d'água (do tupi *abatiuaupé*).

Em 1587, lavouras de arroz já ocupavam terras na Bahia e em 1745 no Maranhão. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, era notada acentuadamente em meados do século XVIII (EMBRAPA, 2005).

A partir da primeira metade do século XIX iniciou o cultivo do arroz de sequeiro nas colônias sul-riograndenses. A lavoura de arroz irrigado no RS surgiu no ano de 1903 no município de Pelotas, a partir do cultivo com irrigação mecânica (EMBRAPA, 2005).

2.1.4 Importância Nutricional e Composição

O arroz é considerado pela FAO como um dos alimentos mais importantes para a garantia de suprimento alimentar no mundo. Além de fornecer um excelente balanceamento nutricional é uma cultura extremamente rústica, o que a faz ser considerada a espécie de maior potencial de aumento de produção para o combate à fome do mundo (FAO, 2011).

Atualmente, o cereal vem sendo reconhecido pelas suas características funcionais. Rico em carboidratos complexos, o arroz em sua forma natural, é um alimento essencialmente energético. Segundo a FAO (2011) o arroz fornece 20% da energia e 15% das proteínas necessárias ao homem e se destaca pela sua fácil digestão. Devido a isto, o arroz ocupa a base da pirâmide alimentar, que está estruturada em 4 níveis e 8 grupos de produtos escalonados de acordo com a sua participação relativa no total de calorias de uma dieta saudável.

A composição nutricional deste grão sofre variações em função das diferentes formas de processamento. O arroz é consumido principalmente como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas que podem ser visualizados na Figura 1. A porção do grão de arroz preferencialmente consumida é o endosperma. As demais porções do beneficiamento são usadas como ingrediente em produtos processados (WALTER, 2009). As vitaminas e sais minerais deste cereal estão concentrados no pericarpo e germe, sendo que a remoção dessas camadas, durante o processo de beneficiamento, causa uma grande redução do seu valor nutricional, sendo o endosperma basicamente amido (PRESTES, 2007; WALTER, 2009).

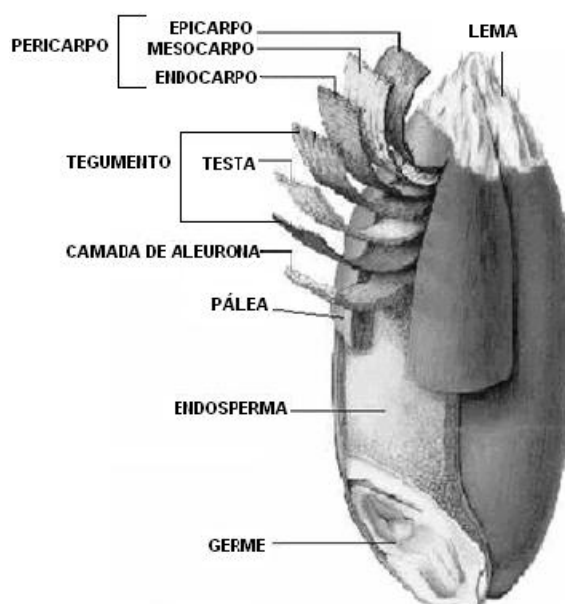


Figura 1. Constituintes do grão de arroz

2.1.5 Diferentes tipos de arroz

O arroz branco polido é o mais consumido no Brasil. Esse passa por um processo de polimento após a retirada de sua casca. No processo de polimento ocorre a etapa de brunição, onde é separado o germe e o farelo. Esse tipo de arroz não é o mais nutritivos. O seu ponto forte é ser o mais barato, mais fácil de encontrar e o que tem maior funcionalidade, podendo ser usado em vários tipos receitas (WALTER, 2009). Já o arroz integral passa por um processo de brunição mais brando, onde é retirada apenas a camada mais externa, conservando as suas

principais qualidades e contém três vezes mais fibras do que o polido, cinco vezes mais vitaminas e quatro vezes mais magnésio (DORS, 2006; WALTER, 2009).

O arroz parboilizado passa por um tratamento hidrotérmico, que consiste em cozinhar parcialmente os grãos com casca, onde parte das vitaminas e minerais passam da casca para o interior do arroz, aumentando o valor nutritivo do grão. Antes de ser submetido às operações hidrotérmicas, o arroz, ainda em casca, passa por um conjunto de equipamentos para a realização de operações complementares de limpeza e seleção, que pode incluir de máquinas de ar e peneiras a mesas densimétricas. Completadas as operações hidrotérmicas e passado o período de temperagem, os grãos são descascados, produzindo o arroz integral parboilizado, ou então passam por processos de polimento e estão prontos para serem comercializados (AMATO *et al.*, 2002, DORS, 2006).

Segundo a EMBRAPA, 2007, no Brasil vêm crescendo gradativamente a demanda por cultivares especiais, como arroz cateto, arroz negro, arroz vermelho. Essa demanda está associada a aspectos tradicionais, culturais e até mesmo econômicos, pois o preço encontrado em supermercados, chegando a custar quatro vezes mais do que o arroz branco. Os tipos especiais, em geral são plantados por pequenos agricultores, como lavoura de subsistência, cujo excedente da produção é comercializada na região de plantio ou vendida em outros centros consumidores, mas esses têm despertado interesse entre os produtores que utilizam de tecnologias mais avançadas, principalmente a produção do arroz cateto e vermelho, têm aumentado em algumas regiões de cultivos no país (EMBRAPA, 2007).

O arroz-cateto é um grão curto e mais arredondado que, depois de cozido, mantém-se inteiro. Ele é mais macio e forma uma liga especial de consistência tenra e cremosa é comercializado principalmente na forma integral (EMBRAPA, 2007).

O arroz japonês e o arroz arbóreo (típico da culinária italiana) são os tipos de arroz que contém maior quantidade de amido, por isso apresentam uma consistência mais cremosa após o cozimento. O arroz japonês (ou arroz moti) é um grão curto, curvado e um pouco transparente. O arbóreo é um grão mais arredondado e amarelado (EMBRAPA, 2007).

O arroz vermelho é uma espécie não tão comumente consumida, sendo no Brasil cultivado na região nordeste e, essa denominação deve-se à coloração avermelhada do pericarpo dos grãos, devido ao acúmulo de tanino ou de

antocianina. As opiniões quanto à origem do arroz vermelho são divergentes. Uma teoria defende o atrativismo, ou seja, a forma originária das atuais cultivares de arroz possuía pericarpo vermelho. Outra teoria hipotetiza que o arroz com pericarpo vermelho surgiu em uma população de arroz branco, devido à degeneração deste. De qualquer modo, a manifestação da coloração vermelha do pericarpo do grão é proveniente de um par de genes (Rd e Rc) com dominância simples. Estudos mostram maior concentração de minerais como ferro e zinco em arroz vermelho, assim como no arroz preto (AGOSTINETTO *et al.*, 2001).

O arroz negro é popular na China há milhares de anos, este tipo de arroz contém 20% a mais de proteínas e 30% a mais de fibras em relação ao arroz integral, tem um elevado teor de ferro, menos gordura. Quando não é polido, o aspecto e composição do grão natural não são modificados: ele é apenas descascado, ficando com a fina película mais escura que o recobre (KONG e LEE, 2010)

O arroz selvagem é um grão preto, longo e fino. Nativo da região dos lagos de água doce do norte do Canadá, é um arroz silvestre, nasce naturalmente. Sua composição parece com a da aveia: baixos teores de gordura (menos de 1%), altos teores de proteínas (12 a 15%) e com alto teor de ferro (4 a 5%). O arroz selvagem não pertence à família *Oryza* e sim à família *Zizania* que é outra gramínea.

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

Constituinte	Arroz integral	Arroz branco polido	Arroz parboilizado polido
Amido total	74	88	85
Proteínas	10	9	9
Lipídios	2	0,4	0,7
Cinzas	1	0,3	0,7
Fibra total	12	3	4
Fibra insolúvel	9	1	2
Fibra solúvel	3	2	2

Fonte: Adaptado de STORCK, 2004

2.1.6 Aspectos econômicos e produção na região sul

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população. No Brasil, desempenha, juntamente com o feijão, um importante papel como componente da dieta básica, sendo parte essencial da chamada “cesta básica”. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 12 milhões de toneladas. Essa produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: irrigado e de sequeiro (MAPA, 2012).

A lavoura de arroz irrigado no RS, produz anualmente cerca de 8 milhões de toneladas, sendo considerado estabilizador da safra nacional. Esta produção representa cerca 4% do PIB (Produto Interno Bruto). A produtividade média está próxima das obtidas em países tradicionais no cultivo de arroz irrigado, ficando pouco abaixo das obtidas nos EUA, Austrália e Japão.

Em Santa Catarina, o cultivo de arroz é realizado 100% no sistema pré-germinado. O Estado ocupa o segundo lugar na produção de arroz irrigado, sendo estimado para última safra cerca 1 milhão de toneladas, segundo recente dados do IBGE (IBGE, 2012). No Paraná, a área de cultivo é de 14,4 mil hectares. A estimativa de produção é de cerca de 100 mil toneladas ocupando o oitavo lugar na produção nacional (IBGE, 2012). No RS o arroz irrigado é cultivado nas seguintes regiões: Fronteira Oeste, Depressão Central, Campanha, Litoral Sul, Planície Costeira Externa da Lagoa dos Patos e Planície Costeira Interna da Lagoa dos Patos. Essas regiões apresentam diferenças quanto a topografia, clima, solos, disponibilidade de água para irrigação, tamanho de lavoura, determinando variações em termos de produção.

As principais regiões produtoras de Santa Catarina são: Sul do Estado, produzindo 42% do total; Litoral Sul, 13%; Alto Vale do Itajaí, 10%; Litoral Norte, 22%; Litoral Centro, 2% e Baixo e Médio Vale do Itajaí, 11% da produção Estadual. Em Santa Catarina existem 10 mil produtores de arroz (EMBRAPA, 2005).

A quase totalidade do arroz produzido no Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresenta tipo de grão longo-fino de alta qualidade de cocção, características

exigidas no mercado brasileiro, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Cerca de 12% do arroz produzido no RS e 30% da produção de Santa Catarina são consumidos nos respectivos Estados, o restante é exportado para os demais centros consumidores (EMBRAPA, 2005).

2.2. Pragas que atacam a cultivo de arroz

O arroz, como qualquer outra cultura agrícola, está sujeito a uma série de fatores do ambiente que, direta ou indiretamente, influenciam o rendimento, qualidade e custo de produção. Dentre estes fatores, está o ataque de pragas como insetos, moluscos, pássaros e plantas daninhas que causam efeitos negativos observados no crescimento, desenvolvimento e produtividade. As plantas daninhas assumem lugar de destaque, pois o sistema de cultivo do arroz irrigado propicia um ambiente especial para a infestação. As infestações de plantas daninhas afloram nos meses mais quentes do ano, onde, além da temperatura e luminosidade adequadas ao crescimento vegetal, somam-se os efeitos da umidade do solo e da adição de nutrientes. Esses fatores tornam as plantas daninhas responsáveis pelos maiores problemas agrônômicos desta cultura, especialmente devido à interferência que provocam no arroz (EMBRAPA, 2005).

Existem diferentes plantas daninhas que podem estar presentes na lavoura de arroz, variando conforme a região de plantio e manejo utilizado. Algumas espécies são predominantes, como capim arroz e arroz vermelho. A invasão indesejada pode ser controlada através do uso de sementes certificadas, da rotação de culturas e de sistema de plantio adequado, e pelo uso de herbicidas. No caso da utilização de herbicidas, esses são aplicados em duas etapas. A primeira é realizada no período de pré-emergência, onde o herbicida é aplicado logo após a semeadura do arroz até início da emergência. A segunda etapa é realizada no período pós-emergência, após o surgimento das plantas daninhas.

A eficiência da aplicação dos herbicidas pode ser afetada por diversos fatores como, por exemplo, modo de aplicação, temperatura no momento da aplicação, umidade do solo, tipos de solo, velocidade do vento e estágio de desenvolvimento das plântulas (CONCENÇO *et al.*, 2006)

A Tabela 2 apresenta as principais espécies de insetos que prejudicam o cultivo de arroz irrigado. *Pomacea canaliculata* e *Argelaius ruficapilus* são as espécies de molusco e pássaros, respectivamente, mais prejudiciais a cultura de arroz.

Tabela 2 - Principais insetos prejudiciais a cultura de arroz irrigado

Nome Científico	Nome Popular
<i>Agrotis ipsilon</i>	Lagarta rosca
<i>Chaetocnema sp.</i>	Pulga do arroz
<i>Helodytes foveolatus</i>	Gorgulho aquático
<i>Mocis latipes</i>	Curuquerê dos capinzais ou Mocis
<i>Ochetina sp.</i>	Gorgulho aquático ou Ochetina
<i>Oryzophagus oryzae</i>	Bicheira da raiz do arroz ou Gorgulho aquático do arroz
<i>Rhopalosiphum rufiabdominale</i>	Pulgão da raiz
<i>Spodoptera eridania</i>	Lagarta das folhas ou Lagarta das vagens
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lagarta do cartucho ou Lagarta militar
<i>Tibraca limbativentris</i>	Percevejo

Fonte: Adaptado de MAPA, 2012.

O conhecimento sobre técnicas do Manejo Integrado de Pragas é essencial para o controle eficaz das espécies citadas, na busca de redução de custos de produção e de riscos de impactos ambientais negativos (EMBRAPA, 2005).

2.3 Agrotóxicos

2.3.1 Definição

Grupo de substâncias naturais ou sintéticas que são empregadas com o objetivo de controlar ou combater vários tipos de pragas, plantas daninhas ou doenças são frequentemente chamado de pesticida, agrotóxico, praguicida, defensivo agrícola, biocida entre outros. No presente trabalho o termo adotado foi agrotóxico, tendo como base o decreto nº 4.074 de 2002, que regulamenta a lei 7802/1989, onde é definido como: “*produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados*

nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

De acordo com o *Codex Alimentarius*, um órgão subsidiário da FAO, pesticida é definido como sendo “*toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição /e processamento do alimento ou ração animal*” (FAO, 2011). Ainda conforme BAIRD (2002), os pesticidas eliminam ou controlam o organismo alvo de alguma maneira (por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo). Todos os pesticidas químicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos.

2.3.2 Classificação

Os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em classes conforme apresentado na Tabela 3. Além disso, podem ser divididos em dois grupos principais, agrotóxicos de contato ou não sistêmicos e agrotóxicos sistêmicos.

Os agrotóxicos de contato ou não sistêmicos não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente, não são translocados ou transportados dentro do sistema vascular das plantas. Os primeiros inseticidas, herbicidas e fungicidas pertenciam a esse grupo, e tiveram como desvantagem o fato de serem susceptíveis aos efeitos do clima (vento, chuva, sol), deixando a planta desprotegida contra o ataque de pragas. O caráter sistêmico foi introduzido nos agrotóxicos que vieram após 1940. Estes penetram na cutícula da planta sendo transportados pelo seu sistema vascular. São pouco afetados pelo clima e conferem imunidade em todo o crescimento da nova planta (SILVA e FAY, 2004).

2.3.3 Controle de pragas no arroz

O controle de inseticidas no arroz irrigado se dá através da aplicação na água de irrigação e pulverização. No arroz de terras altas os inseticidas são aplicados preferencialmente na forma preventiva, através do tratamento das sementes e em menor escala em pulverização (MAPA, 2012).

Tabela 3 - Agrotóxicos e organismos alvo

Agrotóxicos/Classe	Organismo-alvo
acaricida	ácaros
algicida	algas
avicida	pássaros
bactericida	bactérias
desinfetante	microorganismos
fungicida	fungos
herbicida	plantas
inseticida	insetos
larvicida	larvas de insetos
moluscicida	caracóis, lesmas
nematicida	nematóide
piscicida	peixes
raticida	roedores

Fonte: SILVA e FAY, 2004

O controle das plantas daninhas pode ser realizado através das seguintes formas:

- Controle Cultural: através do uso de sementes certificadas, rotação de culturas, sucessão e integração pecuária, sistema de plantio e cultivo mínimo de verão;
- Controle Manual: no caso de baixa infestação;
- Controle Químico: o uso de herbicidas, com método de aplicação pré-emergente ou pós-emergente. No método pré-emergente o herbicida é aplicado após a semeadura do arroz até o início emergência das plântulas. No pós-emergente a aplicação é realizada após o surgimento das plantas daninhas. Pode ser classificado como pós-emergência inicial, quando as plantas apresentarem de 2 a 4 folhas e, pós-emergência tardia, quando as mesmas estiverem com 4 a 8 folhas, no geral com surgimento de perfilhos, necessitando de doses maiores de herbicidas.

A Tabela 4 apresenta os agrotóxicos permitidos para a cultura de arroz irrigado no Brasil segundo MAPA (2011).

Tabela 4 - Agrotóxicos indicados para o cultivo de arroz no Brasil

Princípio Ativo	Grupo Químico	Classe(s)	Modo de ação
2,4-D	ácido ariloxialcanóico	Herbicidas	Sistêmico
Acetato de fentina	organoestânico	Fungicidas	Contato
Azimsulfurom	sulfoniluréia	Herbicidas	Sistêmico
Azoxistrobina	estrobilurina	Fungicidas	Sistêmico
Benfuracarbe	metilcarbamato de benzofuranila	Inseticidas	Sistêmico
Bentazona	benzotiadiazinona	Herbicidas	Contato
Beta-ciflutrina	piretróide	Inseticidas	Contato
Beta-Cipermetrina	piretróide	Inseticidas	Contato
Bifentrina	piretróide	Acaricidas/Formicida/ Inseticidas	Contato
Bispiribaque-sódico	ácido pirimidiniloxi-benzóico	Herbicidas	Sistêmico
Carbaril	carbamato	Inseticida	Contato
Carbofurano	carbamato	Inseticidas	Sistêmico
Carbosulfano	metilcarbamato de benzofuranila	Acaricidas/Inseticidas/ Nematicidas	Sistêmico
Carboxina	carboxanilida	Fungicidas	Sistêmico
Carfentrazona-etílica	triazolona	Herbicidas	Contato
Carpropamida	amida	Fungicidas	Sistêmico
Cialofope-butílico	ácido ariloxifenoxi-propiónico	Herbicidas	Sistêmico
Ciclossulfamurom	sulfoniluréia	Herbicidas	Sistêmico
Ciflutrina	piretróide	Inseticidas	Contato
Cipermetrina	piretróide	Formicidas/Inseticidas	Contato
Clomazona	isoxazolidinona	Herbicidas	Sistêmico
Clorotalonil	isofaltonitrila	Fungicidas	Contato
Deltametrina	piretróide	Formicidas/Inseticidas	Contato
Dibrometo de diquate	bipiridílio	Herbicidas	Contato
Dicloreto de paraquate	bipiridílio	Herbicidas	Sistêmico
Difenoconazol	triazol	Fungicidas	Sistêmico
Edifenfós	fosforotioato de arila	Fungicidas	Contato
Esfenvalerato	piretróide	Inseticidas	Contato
Etiprole	Fenilpirazol	Inseticidas	Contato
Etoxissulfurom	sulfoniluréia	Herbicidas	Sistêmico
Fenoxapope-etílico	ácido ariloxifenoxipropiónico	Herbicidas	Sistêmico
Fipronil	pirazol	Cupinicidas/Formicidas/ Inseticidas	Contato
Ftalida	ftalida	Fungicidas	Contato
Furatiocarbe	metilcarbamato de benzofuranila	Inseticidas	Sistêmico
Glifosato	glicina substituída	Herbicidas	Sistêmico
Hidróxido de fentina	organoestânico	Fungicidas	Contato
Imazapique	imidazolinona	Herbicidas	Sistêmico
Imazetapir	imidazolinona	Herbicidas	Sistêmico

Princípio Ativo	Grupo Químico	Classe(s)	Modo de ação
Imidacloprido	neonicotinóide	Inseticidas	Sistêmico
Iodosulfurom- metílico	sulfoniluréia	Herbicidas	Sistêmico
Lambda-cialotrina	piretróide	Inseticidas	Contato
Malationa	organofosforado	Acaricidas/Inseticidas	Contato
Mancozebe	alquilenobis(ditiocarbamato)	Acaricidas/Fungicidas	Sistêmico
Metsulfurom- metílico	sulfoniluréia	Herbicidas	Sistêmico
Molinato	tiocarbamato	Herbicidas	Sistêmico
Oxadiazona	oxadiazolona	Herbicidas	Contato
Oxifluorfem	éter difenílico	Herbicidas	Contato
Parationa-metílica	organofosforado	Acaricidas/Inseticidas	Contato
Pendimetalina	dinitroanilina	Herbicidas	Sistêmico
Penoxsulam	sulfonanilida triazolopirimidina	Herbicidas	Sistêmico
Permetrina	piretróide	Formicidas/Inseticidas	Contato
Picloram	ácido piridinocarboxílico	Herbicidas	Sistêmico
Pirazossulfurom- etílico	sulfoniluréia	Herbicidas	Contato
Pirimifós-metílico	organofosforado	Acaricidas/Inseticidas	Contato
Piroquilona	quinolinona	Fungicidas	Sistêmico
Profoxidim	oxima ciclohexanodiona	Herbicidas	Sistêmico
Propanil	anilida	Herbicidas	Contato
Propiconazol	triazol	Fungicidas	Sistêmico
Quincloraque	ácido quinolinocarboxílico	Herbicidas	Sistêmico
Sulfosato	glicina substituída	Herbicidas	Sistêmico
Tebuconazol	triazol	Fungicidas	Sistêmico
Tiabendazol	benzimidazol	Fungicidas	Sistêmico
Tiametoxam	neonicotinóide	Inseticidas	Sistêmico
Tiobencarbe	tiocarbamato	Herbicidas	Sistêmico
Tiodicarbe	metilcarbamato de oxima	Inseticidas	Contato
Tiofanato-metílico	benzimidazol (precursor de)	Fungicidas	Sistêmico
Tiram	dimetilditiocarbamato	Fungicidas	Contato
Triciclazol	benzotiazol	Fungicidas	Sistêmico
Triclopir-butotílico	ácido piridiniloxialcanóico	Herbicidas	Sistêmico
Triclorfom	organofosforado	Acaricidas/Inseticidas	Contato
Trifloxistrobina	estrobilurina	Fungicidas	Sistêmico
Trifluralina	dinitroanilina	Herbicidas	Sistêmico
Zeta-cipermetrina	piretróide	Inseticidas	Contato

FONTE: ANVISA, 2012; MAPA, 2011; TOMLIN, 2003.

2.3.4 Principais características dos agrotóxicos em estudo

As características físico-químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico e neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura: halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, heteroátomos que possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. No Anexo-I são apresentadas as estruturas, as principais propriedades físico-químicas e a classe toxicológica dos agrotóxicos em estudo. Quanto a classe toxicológica esses variam de pouco tóxico a extremamente tóxico. Sendo cerca de 50% desses compostos classificados como mediamente tóxico e 25% como altamente tóxico. Além disso, a maioria desses compostos são sistêmicos; o que ressalta a importância da determinação desses compostos no grão de arroz.

2.4 Determinação de agrotóxicos em arroz

De modo geral, as perdas na agricultura são imensas, devido a ação de pragas. Os agrotóxicos, desde seu desenvolvimento, desempenharam um importante papel no crescimento da agricultura moderna. No entanto, alguns autores sugerem que a ingestão diária de alimentos contaminados é a principal rota de exposição à agrotóxicos (HOWSAN *et al.*, 2004; GIVENS *et al.*, 2007; OTAKE *et al.*, 2009). Portanto, a preocupação com a saúde humana e segurança alimentar, promove o desenvolvimento de vários métodos analíticos aplicados à determinação de resíduos destes compostos em diferentes tipos de alimentos (PANG *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários trabalhos abordaram a determinação de agrotóxicos, utilizando diferentes técnicas de preparo de amostra e determinação com cromatografia gasosa ou líquida (PAREJA *et al.*, 2011a). Na Tabela 5 são apresentados alguns trabalhos que determinaram agrotóxicos em arroz comparando técnica de preparo de amostra e de determinação.

2.4.1 Preparo de amostra

Nas análises de resíduos de agrotóxicos, as concentrações do analito geralmente são muito baixas e as amostras são muito complexas para serem analisadas sem

uma etapa prévia. Desta forma, a preparação da amostra é a série de etapas necessária para transformar uma amostra, de tal forma que ela se torne apropriada para análise. A preparação de uma amostra pode incluir a sua dissolução, a extração do analito de uma matriz complexa, a concentração de um analito diluído a um nível dentro dos limites de determinação, a conversão química do analito a uma forma que seja detectável e, finalmente, a remoção ou mascaramento de espécies interferentes (HARRIS, 2008). Um preparo de amostra eficiente aliado à detecção de níveis traços dos analitos é importante para obter resultados confiáveis. O preparo de amostra é a etapa fundamental para assegurar a eficiência dos métodos analíticos, especialmente nas análises de substâncias traços em alimentos (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008)

Tabela 5 - Métodos utilizados para determinação de agrotóxicos em grão de arroz

<i>Métodos</i>	<i>Analitos</i>	<i>% R (RSD)</i>	<i>Referências</i>
SFE, LC-MS	18 agrotóxicos	36-90 (3-8)	Kaihara <i>et al.</i> , 2002
MSPD, GC-ECD	malationa, paration-metílico e endosulfam	116 (< 15)	Dórea <i>et al.</i> , 2004
Extração com solvente/GPC, GC- MSPD, GC-MS	109 agrotóxicos	70-110 (<20)	Zhang <i>et al.</i> , 2006
QuEChERS, GC-MS	97 agrotóxicos	25-199 (1-15)	Libin <i>et al.</i> , 2006
QuEChERS, GC-MS	97 agrotóxicos	22-197 (0,5-10)	Liu <i>et al.</i> , 2007
QuEChERS, GC-MS	109 agrotóxicos	80-115 (<15)	Nguyen <i>et al.</i> , 2007
QuEChERS, GC-MS	multiresíduos	70-120 (<20)	Prestes, 2007
QuEChERS, LC-ESI- MS/MS	13 herbicidas fenóxi-ácidos	45-104 (<15)	Koesukwiwat <i>et al.</i> , 2008
Extração com solvente/GPC, GC- ECD	22 agrotóxicos	75-104 (1,5-10)	Mou <i>et al.</i> , 2008
PLE, GC-MS	10 agrotóxicos	71-114 (1-9)	Otake <i>et al.</i> , 2009
QuEChERS	185 agrotóxicos	59-122 (4-31)	Mastovska <i>et al.</i> , 2010
QuEChERS, GC-ECD	10 agrotóxicos	80-120 (<20)	Peixoto, 2010
QuEChERS, LC-MS	16 herbicidas 4 agrotóxicos	70-120 (<20) 84-119 (<20)	Pareja <i>et al.</i> , 2011b Dors <i>et al.</i> , 2011

2.4.1.1 Evolução das técnicas de preparo de amostra

Novos métodos analíticos, visando à determinação de resíduos de agrotóxicos em alimento, vêm sendo desenvolvidos. Estes avanços têm como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, emprego de grandes volumes de solvente, alto custo, etc. (PRESTES *et al.*, 2009).

Em 1960 surgiu o primeiro método multirresíduo para extração de agrotóxicos, desenvolvido por Mills e colaboradores nos EUA. O método baseia-se em uma extração com acetonitrila, sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não gordurosas. A extração é seguida por uma etapa de partição com éter de petróleo. Compostos organofosforados apresentavam baixos percentuais de recuperação quando analisados por esse método. Devido a essas baixas recuperações, Storherr e colaboradores em 1971 realizaram algumas modificações no método de Mills, substituindo o éter de petróleo por diclorometano e, a etapa de limpeza foi realizada com carvão ativo. Essas modificações possibilitaram que o método de Mills fosse aplicado a compostos organoclorados e organofosforados em frutas e vegetais (PRESTES, 2011).

O desenvolvimento e aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como organofosforados e organonitrogenados, demandaram novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos. Luke e colaboradores (1975) desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração com acetona, seguida de uma partição líquido-líquido com éter de petróleo e diclorometano, a fim de remover a água da amostra, sendo utilizados 100 mL de cada. Com o objetivo de obterem-se maiores percentuais de recuperação para os compostos polares, adicionou-se cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa para favorecer a transferência destes para a fase orgânica. Este é o primeiro método em que é adicionado cloreto de sódio para promover o efeito de “*salting out*”. A etapa de limpeza, quando realizada, é feita com coluna de florissil.

Na década de 80 e 90 surge uma nova fase dos métodos de preparo de amostra, devido a preocupação ambiental e de saúde surge a necessidade de desenvolvimento de métodos que não utilizem solventes clorados e que reduza a quantidade de solvente e a exposição do analista. Nessa fase surgiu o método de

extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio (HIEMSTRA e KOK, 2007). A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação (< 70%) foram obtidos para agrotóxicos polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. Como um método de extração alternativo, foi desenvolvida uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 90, no qual foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares (PRESTES *et al.*, 2009).

Atualmente, os avanços da Química Analítica em consonância com o conceito sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de várias técnicas de extração. No final da década de 80, Barker e colaboradores em 1989 propuseram a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*). A MSPD envolve a mistura de uma amostra (viscosa, sólida ou semi-sólida) com um suporte sólido, seguido de uma etapa de eluição (BARKER, 2000; RODRIGUES, 2010). Particularmente para determinação de agrotóxicos em arroz, a MSPD foi testada por Dórea e colaboradores em 2004 e mais recentemente por Tsochatzis e colaboradores (2010). Ambos os trabalhos obtiveram faixas boas de recuperação (70-120%) para maioria dos analitos.

Ainda no final da década de 90 surge a Extração com Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) nessa técnica a amostra é arrastada em alta pressão e extraída com CO₂ supercrítico. Os extratos são coletados em solventes ou trap sólido e eluído posteriormente (RISSATO *et al.*, 2004; MENDIOLA *et al.*, 2007). Uma das vantagens dessa técnica que o extrato obtido, em geral, não necessita de uma etapa de limpeza. No entanto, para amostras gordurosas é necessária uma etapa de limpeza, pois os lipídios são solúveis no CO₂ (VALVERDE *et al.*, 2009). Aguilera e colaboradores, em 2005 determinaram 22 agrotóxicos em arroz branco e integral, obtendo os melhores resultados com 15 mL de CO₂ e temperaturas de 40-60 °C. Valverde e colaboradores em 2009 testaram a mesma técnica para também 22 pesticidas. As recuperações foram superiores a 70%, exceto para dimetoato e captafol.

Na extração ultrassônica (USE, do inglês *Ultrasonic Extraction*) a amostra com solvente é submetida ao banho com ultrassom (REZIC *et al.*, 2005). A USE

também tem sido associada a outras técnicas como a MSPD (GARCÍA-VALCÁRCEL e TADEO, 2009). Lee e colaboradores, (2009), utilizaram a um banho de ultrassom após a amostra de arroz ter sido agitada por 20 minutos da com acetonitrila. Os resultados foram recuperações de 70-140% para 41 dos 47 agrotóxicos analisados. Em 2006 Pengyan e colaboradores testaram a extração de 40 agrotóxicos em arroz em banho de ultrassom com diclometano e após, uma etapa de limpeza em cartuchos de SPE de florisil.

A extração Líquida Pressurizada (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) também chamada de ASE (Extração Acelerada por Solventes do inglês, *accelerated solvent extraction*). Nessa técnica, amostra e solvente são aquecidos e submetidos à alta pressão. Com a pressão e temperatura elevada, muda a viscosidade do solvente e assim aumenta a mobilidade dos analitos (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005). É uma técnica de extração rápida e que reduz consideravelmente a quantidade de solvente (CHUANG *et al.*, 2001). Com a otimização de alguns parâmetros como temperatura, pressão e polaridade do solvente é possível obter boas recuperações com a PLE (CHO *et al.*, 2008), no entanto a dificuldade para análise de multirresíduos se deve as diferentes propriedades físico-químicas dos agrotóxicos. Otake e colaboradores (2009) obtiveram boas recuperações (70-120%) para 10 agrotóxicos em arroz, utilizando a PLE. Assim como Cho e colaboradores (2008) determinaram isoprodiona e diazinon. Em 2010, Brutti e colaboradores descreveram um método utilizando PLE para determinação de inseticidas da classe benzoiluréia em arroz, obtendo recuperações de 88-99%.

A Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave-assisted extraction*) foi utilizada pela primeira vez para extração de compostos orgânicos por Ganzler *et al.*, 1986, no entanto se tornou mais popular na última década. Nessa técnica a amostra é imersa num frasco aberto ou fechado contendo solvente, e é irradiada com microondas. A principal limitação da técnica é o uso de solventes que absorvam energia de microondas, pois solventes não polares não absorvem essa energia (CAMEL, 2000; SATAPATHY *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012). Além disso, em geral é necessária uma etapa de limpeza (CHEN *et al.*, 2007). A MAE foi utilizada para extração de 6 organoclorados em arroz obtendo recuperações de 86-91% (CHEN *et al.*, 2007).

A PLE, MAE, USE e ASE são exemplos de métodos que apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, entretanto geralmente demandam investimento considerável em instrumentação (BARRIADA-PEREIRA *et al.*, 2007).

Os métodos que têm como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos em determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo (WARDENCKI *et al.*, 2004).

2.4.1.2 Método QuEChERS

Anastassiades e colaboradores em 2003 introduziram um novo método de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e legumes. O método foi denominado QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), sendo a pronúncia recomendada pelos autores como “catchers” por possuir características de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Este método baseia-se na extração dos analitos da matriz com um solvente orgânico (comumente acetonitrila) e partição líquido-líquido simultânea (adição de $MgSO_4$ e NaCl), seguido da etapa de limpeza com extração em fase sólida dispersiva (JARDIM *et al.*, 2009; WIKOWSKA e BIZIUK, 2011). O método QuEChERS possibilita a extração compostos polares a apolares, em geral, com alto rendimento e com número mínimo de etapas (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008).

O método original desenvolvido por Anastassiades e colaboradores baseia-se na extração dos analitos partindo de 10 g da amostra com 10 mL de acetonitrila, por uma etapa de partição devido à adição de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio). Ocorre, logo após, uma etapa de limpeza com Extração em Fase Sólida Dispersiva, com amina primária secundária (PSA).

A escolha da acetonitrila como solvente de extração se deve ao fato que esta extrai uma faixa mais ampla de analitos, extraíndo menores quantidades de co-extrativos lipofílicos (como ceras, graxas e pigmentos), comparada aos outros solventes de extração como, acetona ou acetato de etila (MASTOVSKA e LEHOTAY, 2004).

Outra característica importante é que a acetonitrila quando acidificada, permite recuperações satisfatórias para agrotóxicos que, geralmente, apresentam problemas de estabilidade (PRESTES *et al.*, 2009; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Ainda, há uma grande vantagem em relação a acetonitrila ser mais adequada que acetona e acetato de etila quando é empregada a técnica de LC-MS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). No método QuEChERS original a acetonitrila foi escolhida como solvente de extração empregando-se 10 mL do solvente para 10 g de amostra, resultando uma relação 1 g de amostra por 1 mL de solvente, sem envolver etapa de evaporação. Este valor é considerado baixo se comparado a outros métodos de extração que normalmente apresentam uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g por 1 mL no extrato final.

Após a adição do solvente, ocorre a agitação que pode ser manual ou em Vortex. Esse procedimento possui vantagens de possibilitar a extração em um único frasco fechado, sem exposição do analista e, ainda possibilitar a extração em campo, quando for necessário (PRESTES, 2011).

A etapa de partição, com a adição de sais promovendo o efeito "salting out" possibilita a obtenção de melhores percentuais de recuperação para analitos polares, pois ocorre diminuição da solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como, a quantidade de água na fase orgânica diminui (STAHN, 2000; PIZZUTTI *et al.*, 2007; PRESTES, 2011). Junto com o NaCl é adicionado o $MgSO_4$ que além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração especialmente das substâncias apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; REYNOLDS, 2005; PRESTES *et al.*, 2009).

A etapa de limpeza é realizada para remover co-extrativos que posteriormente possam afetar a confiabilidade dos resultados. Componentes não voláteis da matriz podem aderir ao sistema de injeção e também a coluna cromatográfica, aumentando a frequência de manutenção, além de alterar a resposta do sistema (LEHOTAY, 2007; PRESTES *et al.*, 2009). No método original 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente PSA e 150 mg de $MgSO_4$. A etapa de limpeza ocorre simultaneamente com a remoção de água residual. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares. O sorvente retém as

interferências da matriz sendo que, após agitação manual e centrifugação, o extrato está apto para ser injetado no sistema cromatográfico. Nessa etapa de limpeza, algumas vezes pode diminuir a recuperação devido à perda dos analitos mais polares que são eliminados junto com os interferentes, ou então por ficarem retidos no material sorvente. Rodrigues e colaboradores, Tomazini e colaboradores e Sampaio em 2011 validaram métodos para extração de agrotóxicos por QuEChERS sem etapa de limpeza para cebola, cana de açúcar e mel, respectivamente, pois alguns dos agrotóxicos analisados nesses trabalhos ficaram muito retidos no material sorvente, diminuindo os valores de recuperação (RODRIGUES *et al.*, 2011, TOMAZINI *et al.*, 2011, SAMPAIO, 2011).

2.4.1.3 Modificações do método QuEChERS

O método QuEChERS é amplamente empregado para diversas matrizes, principalmente de alimentos. Dependendo da matriz e dos analitos, o método apresenta diversas modificações.

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%) (MAJORS, 2010). Apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados em diferentes tipos de amostras, alguns compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (LEHOTAY *et al.*, 2005ab; CVUA, 2006; PAYÁ *et al.*, 2007; ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Para solucionar esse problema, foi tamponado o meio (pH 5,0), obtendo assim recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH, como por exemplo, imetrozina, imazalil e tiabendazol. (LEHOTAY, 2005b; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

Lehotay e colaboradores (2005b) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato”, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007) Anastassiades e colaboradores (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato”, este utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquiidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o

European Committee for Standardisation, oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na UE (CEN, 2008).

2.4.1.4 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS

O primeiro material sorvente utilizado na etapa de d-SPE foi o PSA (Amina Primária Secundária, do inglês Primary Secondary Amine). O PSA é um trocador aniônico, com forte interação com compostos ácidos, sendo usados para remoção de vários interferentes. A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Por isso, esse sorvente, algumas vezes pode reter alguns analitos interferindo no resultado, por outro lado, não é tão eficiente na remoção de gorduras. Portanto uma modificação bastante relevante foi a adição do sorvente octadecilsilano (C18), (LEHOTAY *et al.*, 2005c) juntamente com PSA na etapa de d-SPE, para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006; LEHOTAY *et al.*, 2010a; LEHOTAY *et al.*, 2010b; KOESUKIWIWAT *et al.*, 2010).

A combinação do método QuEChERS com limpeza do extrato à baixa temperatura, visando a redução dos co-extrativos lipídicos, também foi empregada com sucesso. Porém, a adição do sorvente C18 na etapa de D-SPE é mais rápida e fácil, e promove uma remoção igualmente eficaz dos lipídios (LEHOTAY *et al.*, 2010a). C18 é mais utilizado para matrizes cujo teor de gordura é $\geq 2\%$ pois retém substâncias graxas e lipídios (LEHOTAY, 2007; KOESUKIWIWAT *et al.*, 2008).

Além destas modificações, a redução do teor de clorofila nos co-extrativos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza, (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ANASTASSIADES *et al.*, 2007), obtido através da adição de uma pequena quantidade de carvão ativado e/ou carbono grafitizado (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006, LEHOTAY *et al.*, 2010a). O carvão disponível comercialmente para fins cromatográficos, comumente chamado de GBC é uma mistura de carbono grafitizado, cuja superfície é apolar, e carvão ativo, obtido por oxidação de material orgânico à baixa temperatura, que

contem grupos funcionais polares (COLLINS *et al.*, 2010; MAYER-HELM, 2009) usou GBC em d-SPE na determinação de 52 agrotóxicos em tabaco.

Koesukwiwat e colaboradores. (2008) testaram a extração de agrotóxicos da fenoxiácidos, como 2,4 D, quincloraque, picloram e outros, por QuEChERS modificado, utilizando como sorvente na d-SPE alumina combinada com C18. A alumina ou óxido de alumínio (Al_2O_3) tem características alcalinas, embora possa também ser preparada para apresentar característica neutra ou ácida, é geralmente empregada na separação de compostos lipofílicos e, pelo fato de poder ser preparada com características ácida, neutra ou alcalina, é bastante útil na separação de substâncias que apresentem variações dessas características. Ela separa bem hidrocarbonetos policíclicos, alcalóides, aminas e vitaminas lipossolúveis (COLLINS *et al.*, 2010).

Nguyen e colaboradores (2010) utilizaram florisil na d-SPE para limpeza de amostra de óleo de soja para determinação de 95 agrotóxicos. Esse sorvente é utilizado para separação de analitos com baixa polaridade.

Terra diatomácea também denominada como diatomita; diatomita calcinada; diatomita fluxo calcinada; sílica diatomácea; sílica amorfa. Destaca-se pelo seu baixo custo e alta área superficial e baixa massa específica, tem como componente majoritário a sílica a qual é encontrada na forma hidratada. Além da sílica, outros componentes podem estar presente em menores proporções como alumínio, ferro, magnésio, sódio e potássio. Sua coloração varia do branco ao cinza escuro e seu tamanho está distribuído entre 4 e 500 μm . É originado a partir de frústulas ou carapaças (paredes silicosas) de organismos unicelulares vegetais. Dentre estes organismos destacam-se as algas microscópicas aquáticas, marinhas ou lacustres, encontradas nas camadas geológicas da crosta terrestre.

A terra diatomácea já foi utilizada em técnicas de preparo de amostra como na MSPD para extração de agrotóxicos (CHU *et al.*, 2005; RODRIGUES, *et al.*, 2010). Também pode ser usada como agente secante (SANCO, 2012). Até o momento não há relato de nenhum trabalho que tenha utilizado terra diatomácea como sorvente no método QuEChERS. Assim como a terra diatomácea, a quitosana também não foi utilizada ainda nesse processo.

Quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, através de

um processo de alcalinização sob altas temperaturas. Quitina e quitosana são biopolímeros renováveis, de baixo custo e suscetíveis a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção (DOTTO *et al.*, 2011).

2.4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas na análise de agrotóxico

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ou somente CL ou LC é uma técnica analítica de separação de compostos muito bem estabelecida, podendo separar misturas que contêm um grande número de compostos similares (COLLINS *et al.*, 2010). Acoplada a um detector é capaz de identificar e quantificar diversos compostos em diferentes tipos de amostra. No entanto, as características desses analitos devem ser moléculas não voláteis e termicamente estáveis, que constituem 80% dos compostos sintéticos naturais. Com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como as frágeis biomoléculas, por exemplo, as proteínas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A Cromatografia Gasosa era utilizada com maior frequência para análise de agrotóxicos, pois os detectores para GC disponíveis na época eram mais sensíveis que os de LC. Porém, com desenvolvimento de agrotóxicos polares, que apresentam em geral menor persistência e toxicidade quando comparados com os compostos apolares, exigiu a adequação dos métodos de análise existentes, uma vez que a maioria destes novos compostos não apresenta uma boa resposta quando analisados por GC (GARRIDO-FRENICH *et al.*, 2004).

O espectrômetro de massas é um dos detectores utilizados na Cromatografia Líquida. Esta é uma das técnicas analíticas mais importantes, uma vez que é capaz de prover informação sobre: a composição qualitativa e quantitativa de analitos em misturas complexas; as estruturas de uma grande variedade de espécies moleculares, assim como a razão isotópica de átomos em amostras (SKOOG e LEARY, 1992; FERNÁNDEZ-ALDA, 2005). As maiores vantagens em relação a outros detectores é o fato de ser altamente seletivo para o constituinte de interesse,

podendo a separação cromatográfica não ser completa; permitir análises de substâncias não voláteis, o que não é possível na Cromatografia Gasosa sem a etapa de derivação, e melhor razão sinal/ruído, conseqüente melhor limite de quantificação (HARRIS, 2008).

A potencialidade do acoplamento entre LC e MS já havia sido reconhecida há várias décadas, entretanto, houve uma grande demora no desenvolvimento do acoplamento LC-MS, devido incompatibilidades relacionada a transferência dos constituintes do eluato da coluna, que se encontra em uma fase líquida para uma fase gasosa na forma de íons, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (SKOOG e LEARY, 1992; FERNÁNDEZ-ALDA, 2005). As vazões utilizadas em LC são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. Assim uma das mais importantes funções de uma interface empregada em LC-MS é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008). Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por LC são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá-lo utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na MS. Desta forma, para o acoplamento da LC à MS foi necessário o desenvolvimento de novas interfaces (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O sistema básico de um espectrômetro de massas é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de ionização, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de amostras, cuja representação pode está na Figura 2.

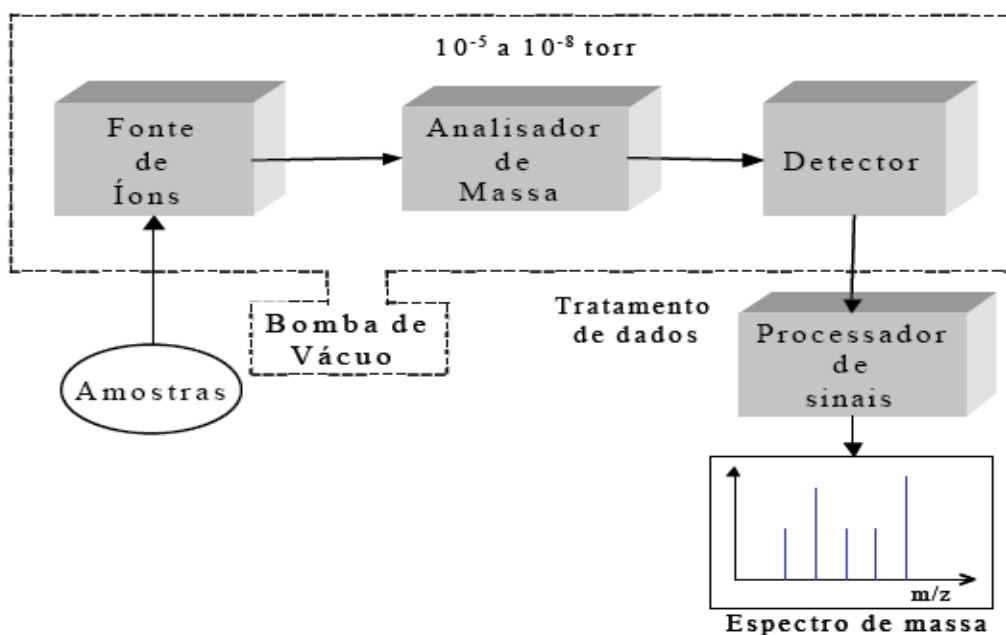


Figura 2. Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

2.4.2.1 Fontes de ionização

As fontes de ionização, empregadas com sucesso no GC-MS, ionização por impacto eletrônico (EI) e na ionização química (CI), não foram possíveis de serem aplicadas para LC devido às diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (LANÇAS, 2009).

O desenvolvimento de fontes de ionização que operam à pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) como a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), possibilitou a produção de vários instrumentos robustos e confiáveis estão disponíveis. Essas ainda são as duas interfaces mais utilizadas em LC (ALDER *et al.*, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008).

2.4.2.1.1 Ionização por eletronebulização

A Ionização por eletronebulização (ESI do inglês, *Electrospray Ionization*) tornou-se uma das técnicas mais importantes para analisar pequenas moléculas polares, peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos e outros compostos de alto peso molecular (HARRIS, 2008). A ESI permite a formação de íons a pressão atmosférica.

O analito que se encontra dissolvido no eluente passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem (tipicamente entre 3 a 4 kV). Na saída do capilar o líquido se encontra à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas são sucessivamente dessolvatadas. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do *spray*. Em relação ao mecanismo da eletronebulização, ainda há muita controvérsia. Há dois mecanismos, mais aceitos, que explicam o processo. Um deles é o mecanismo proposto por Dole em 1968, conhecido como mecanismo do resíduo de carga ou da fissão. Segundo Dole, à medida que as gotículas evaporam, sua carga permanece inalterada, como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da carga imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores, denominada “explosão” coulômbica. Outro mecanismo de evaporação do íon foi proposto por Iribarne e Tomson em 1976, onde pequenas gotículas também são formadas na explosão coulômbica, no entanto, a partir da formação das gotículas, a força de campo elétrico na superfície destas é suficientemente elevada para removê-las da superfície, transferindo diretamente para a fase gasosa energeticamente mais favorável para íons solvatados (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003, CHIARADIA *et al.*, 2008, LANÇAS, 2009).

Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003). Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente grandes pois, como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons, o intervalo de “massa” de aplicabilidade do instrumento pode ser expandido por um fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, um íon com m/z 1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20.000 Da (ARDREY, 2003). Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida (VÉKEY, 2001).

2.4.2.1.2 Ionização química a pressão atmosférica

A ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) é uma técnica apropriada para determinação de

massas molares menores do que 2000 unidades e da estrutura molecular. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo (*Positive Chemical Ionization, PCI*) e negativo (*Negative Chemical Ionization, NCI*) (FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

No modo APCI, o eluato é vaporizado através de um vaporizador aquecido (na faixa de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química). A APCI pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis ou termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa (ARDREY, 2003; NUÑEZ *et al.*, 2005) e também porque APCI é aplicável a vazões de eluente cromatográfico maiores que as suportadas por ESI (0,5 a 2,0 mL min⁻¹) (ARDREY, 2003).

2.4.2.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica

A Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI do inglês, *Atmospheric pressure photoionization*) – é uma técnica de ionização que pode ser considerada complementar às outras técnicas de ionização à pressão atmosférica (ESI e APCI), uma vez que certos grupos de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, só podem ser analisados por LC-MS quando se aplica a fotoionização (BOS *et al.*, 2006). A fonte da APPI é muito semelhante à APCI, sendo constituída por um nebulizador aquecido que transforma o eluente da coluna cromatográfica em um *spray* e gera sua dessolvatação parcial (CHIARADIA *et al.*, 2008). Entretanto, no lugar da corona de descarga da APCI a APPI possui um lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ocasionar a ionização das moléculas do analito presentes nas gotículas do *spray*. A detectabilidade em APPI é comparável a APCI, quando são empregadas altas vazões do eluente é superior, quando utilizadas baixas vazões. Esta fonte de ionização é também menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente que a ESI e a APCI (BOS *et al.*, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008).

2.4.2.1.4 Dissociação Induzida por Colisão (CID)

As técnicas de ionização sob pressão atmosférica (API) citadas até aqui são todas chamadas de técnicas brandas de ionização, nas quais os espectros de massas resultantes são geralmente o íon molecular como os íons $(M+H)^+$, $(M-H)^-$, $(M + NH_4)^+$, a menos que técnicas de fragmentação sejam aplicadas. A informação resultante sobre a massa molar é importante, mas informações sobre a estrutura da molécula são geralmente necessárias (FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

Para se obter informações da estrutura os íons dos analitos são fragmentados através de colisões com moléculas neutras de um gás, num processo denominado dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation*, CID). Aplicam-se voltagens para acelerar os íons dos analitos, aumentando a energia, para a colisão com o gás, gerando mais fragmentos (FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

2.4.2.2 Analisador de massas

Da fonte de íons, os íons são transferidos para o analisador de massas, onde são separados de acordo com seus valores de massa-por-carga (m/z). O analisador de massas opera sob vácuo, para assegurar que os íons se desloquem com eficiência máxima. Existem vários tipos de analisadores de massas:

2.4.2.2.1 Sistemas Quadrupolo

Os analisadores de massas quadrupolo são compostos por quatro eletrodos em forma de bastões paralelos organizados em um quadrado para gerar campos elétricos que filtram os íons com base em sua relação massa/carga enquanto se deslocam pelos eletrodos. Em determinadas magnitudes e frequências, apenas íons com a massa selecionada atingem o detector. Alterando os campos elétricos, as massas de todos os íons podem ser varridas sequencialmente gerando um espectro de massas (SKOOG e LEARY, 1992; ARDREY, 2003).

2.4.2.2.2 Analisadores de Tempo-de-Vôo (Time-of-Flight – TOF)

Os analisadores TOF baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a

mesma energia cinética, de maneira que as suas velocidades serão apenas diferenciadas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isso, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um tubo de vôo para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008).

4.2.2.3 Sistemas Armadilha de íons (Ion-trap)

O *ion-trap* é um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são liberados do *trap* (ARDREY, 2003).

2.4.2.2.4 Triplo Quadrupolo (QqQ)

Em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo é formado pela junção de três quadrupolos em sequência. No primeiro um íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons. No segundo quadrupolo este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou Ar. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos fragmentos iônicos formados para enviar ao detector. O triplo quadrupolo tem sido o mais utilizado para análises quantitativas (MALIK *et al.*, 2010).

2.4.2.2.5 Sistemas de MS em tandem (MS/MS)

A MS/MS é a técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios da Espectrometria de Massas (Q_1 e Q_2), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer

uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (ARDREY, 2003).

2.4.2.3 Detector

O detector mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z . A maioria dos sistemas de MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector, combinado a um amplificador de sinal. O registro de todas as cargas detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas (ARDREY, 2003).

Assim como ocorre com GC-MS/MS, a LC-MS/MS permite um aumento de seletividade e detectabilidade proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos em uma única análise. LC-MS/MS tornou-se uma ferramenta indispensável em laboratórios que trabalham com análise multirresíduo de agrotóxicos e outros contaminantes orgânicos. Apesar do alto custo que envolve a aquisição e manutenção destes equipamentos, estes apresentam uma série de vantagens, entre elas alta eficiência analítica e menor tempo no desenvolvimento de métodos.

2.5 Efeito Matriz

Efeito matriz é o termo que tem sido utilizado para determinar a supressão ou enriquecimento na medida do sinal do analito devido a componentes da matriz. Esse efeito pode impactar a exatidão e seletividade do método analítico, portanto deve ser sempre avaliado durante a validação de um método (YADAV *et al.*, 2012).

LC-MS/MS é uma técnica poderosa de determinação, pois combina a separação dos analitos por LC e a alta seletividade e sensibilidade da detecção por espectrômetros de massa sequenciais (TAYLOR, 2005). Através do modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) é possível obter o registro do sinal de interesse sem a observação do sinal de outros compostos. No entanto, isto não significa que a técnica não esteja sujeita as interferências provenientes da matriz, embora estes nem sempre sejam visíveis nos cromatogramas gerados, a coeluição

de componentes da matriz com o composto de interesse pode alterar a eficiência da ionização dos analitos (ZROSTLIKOVA *et al.*, 2003; SANNINO *et al.*, 2004).

Os primeiros autores que estudaram o efeito matriz foram Tang e Kebarle em 1993. Os autores observaram a variação da resposta de uma base orgânica, empregando ESI como fonte de ionização. Os dois métodos mais comuns para determinar o efeito matriz, é o método de infusão pós-coluna definido por Bonfiglio e colaboradores em 1999 e o pós-extração proposto por Matuszewski e colaboradores em 2003.

O método da infusão pós-coluna (Figura 3) determina as regiões no cromatograma mais prováveis de haver o efeito. Segundo CASSIANO e colaboradores em 2009, neste modo, uma bomba de infusão é usada para produzir uma vazão constante do analito. A infusão é feita no eluente após a coluna cromatográfica e antes da fonte de ionização do espectrômetro de massas. A matriz extraída (sem adição do analito) é cromatografada, na condição cromatográfica desenvolvida, e a resposta do analito infuso é registrada.

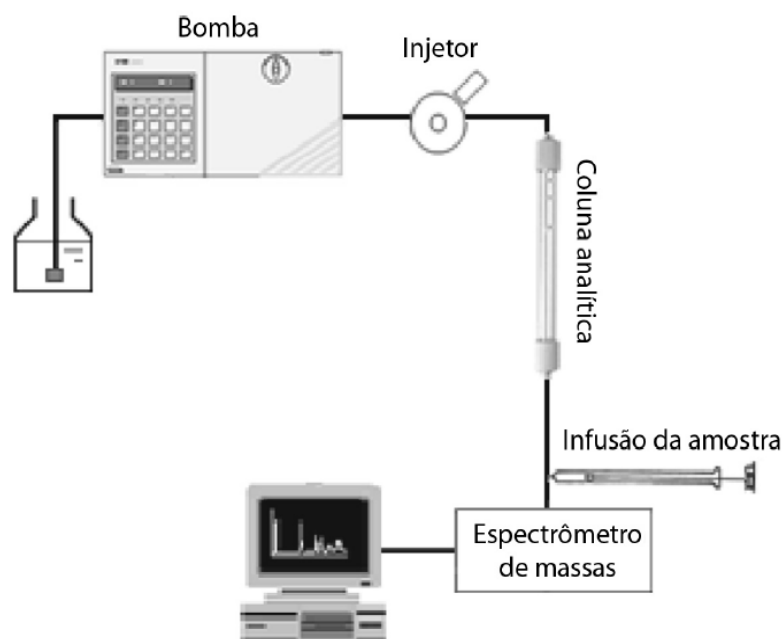


Figura 3 - Sistema de infusão pós-coluna. Fonte CASSIANO *et al.*, 2009

Esse método fornece apenas informações qualitativas, além disso, na determinação de multiresíduos, todos os compostos devem ser infundidos separadamente para investigar o efeito matriz para cada analito. Outra limitação deste sistema é que os analitos são infundidos em concentrações mais elevadas

que o limite de quantificação (LOQ), não sendo possível investigar o efeito matriz para os níveis mais baixos de concentração.

No método pós-extração, a resposta do padrão do analito no solvente com a resposta do analito no branco da matriz fortificado é comparada. Matuszewski e colaboradores em 2003 compararam as áreas obtidas com a injeção do padrão do analito no solvente e na matriz para uma determinada concentração.

Em 2006 Matuzewski propôs a determinação do efeito matriz utilizando a inclinação das curvas analíticas no solvente e no extrato de diferentes lotes de biofluidos.

O efeito matriz depende fortemente da natureza química do analito do método de preparo da amostra utilizado e dos parâmetros instrumentais tais como fonte de ionização, composição e vazão da fase móvel. Dessa forma, supressão ou enriquecimento da resposta do analito podem variar consideravelmente de matriz para matriz e com qualquer mudança dos fatores citados.

Recentemente Ghosh e colaboradores testaram a diferença no efeito matriz para duas configurações de fontes de ionização, uma em “z” chamada de “z-spray” e outra ortogonal. Os autores observaram que para amostras de plasma, na fonte em “z” a supressão foi nula, mas ocorreu enriquecimento e na fonte ortogonal prevaleceu a supressão, no entanto os autores não afirmam uma tendência para cada formato de fonte, a supressão ou enriquecimento segundo os autores está mais dependente da característica de cada analito (Ghosh *et al.*, 2012).

Para minimizar ou compensar o efeito matriz alguns procedimentos tem sido adotados como: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (*matrix matched standards*); 4) diluição do extrato da matriz; entre outras alternativas (PICÓ *et al.*, 2004, KRUIVE *et al.*, 2009; FERRER *et al.*, 2011).

Não há um consenso sobre os limites aceitáveis para o efeito matriz. Segundo Economou e colaboradores um efeito entre -20 e +20% é considerado baixo; entre -50 e -20% ou entre +20 e +50% é considerado médio; e os valores abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

Alguns autores consideram que acima de 20% há influencia do efeito matriz nas análises (PIZZUTTI *et al.*, 2007; ZROSTLIKOVÁ *et al.*, 2001), outros autores já consideram uma faixa mais restrita até 10 % (HAJSLOVÁ e ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação de um método para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de arroz, utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série com fonte de ionização por eletronebulização (LC-ESI-MS/MS) para as determinações. Primeiramente, otimizou-se os parâmetros de ionização e fragmentação dos analitos para determinação simultânea no modo de ionização positivo e negativo, assim como a composição da fase móvel que proporcionou melhor detectabilidade para a mistura dos agrotóxicos. Para o preparo da amostra foi empregado o método QuEChERS modificado, buscando melhor eficiência no preparo de amostra, diferentes materiais sorventes para a limpeza do extrato da matriz foram estudados. O efeito matriz foi avaliado para o método proposto, assim como as demais figuras de mérito utilizadas para validação. O efeito matriz foi avaliado através da inclinação das curvas no extrato branco da matriz e do solvente. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- Balança Analítica modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- Bomba a vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL), Labmate (Varsóvia, Polônia);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex (Torrence, USA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3[®] Millipore (Bedford, USA);
- Ultrassom Quimis[®] modelo Q335D (Diadema, Brasil);
- Processador de alimentos, modelo Mega Master Plus RI 3170, 500w, Walita (São Paulo, Brasil);
- Homogeneizador ultraturrax Polytron[®] PT 6000 (Luzern, Suíça)

- Vortex modelo Certomat[®] MV-B. Braun. - Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A. (São Paulo, Brasil);
- Centrífuga de tubos modelo Quimis[®] Q222T - (Diadema, Brasil)
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass[®] Quatro Micro[™] API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra[®] MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.), Waters (Milford, USA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda (Escócia).

3.2 Reagentes, solventes e outros materiais

- Ácido fórmico p.a. 98%, Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido acético p.a 99%, Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido trifluoracético 98%, Sigma-Aldrich (St Louis, Estados Unidos)
- Formiato de amônio 99%, Sigma-Aldrich (St Louis, Estados Unidos)
- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®] Millipore, resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore (Bedford, USA);
- Metanol e acetonitrila, grau HPLC, J.T Baker (Mallinckrodt, Estados Unidos);
- Sulfato de magnésio anidro J.T. Baker (Mallinckrodt, Estados Unidos);
- C18 – Bondesil 40 µm, Varian (Sta Clara, Estados Unidos);
- Amina primária-secundária (PSA, *primary secondary amine*) – Bondesil PSA 40 µm, Varian (Sta Clara, Estados Unidos);
- Florisil - diâmetro de partícula de 140-250 µm, J.T Baker (Mallinckrodt, Estados Unidos);
- Alumina neutra pH 6,8-7,8; óxido de alumínio com atividade igual a 90, diâmetro de partícula de 60-200 µm, Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- Carvão ativo puro em pó (Hannover, Alemanha);
- Terra Diatomácea (Celite 545) 99% pureza, diâmetro de partícula 62-76 µm, ProQuimios (Rio de Janeiro, Brasil);

- Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa, *Farfantepenaeus brasiliensis*) 62-76 µm de diâmetro de partícula. (Rio Grande, , Brasil) .
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS, White Martins (Rio de Janeiro, Brasil);
- Detergente Extran[®] neutro, Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- Membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro, Millipore (São Paulo, Brasil);
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro (*via*), capacidade de 2,0 mL, Waters (Milford, USA);
- Tubos de polipropileno, 50 e 15 mL de capacidade, Sarstedt (Numbrecht, Alemanha);
- Dispensador 10 - 50 mL, *Dispenser* Boeco (Hamburg, Alemanha);
- Homogeneizador ultraturrax Polytron[®] PT 6000 (Polytron, Suíça).
- Vidraria comum de rotina (balões e pipetas volumétricas, béquer, etc.);
- Padrões sólidos de agrotóxicos: Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e Sigma Aldrich (Estados Unidos).

3.3 Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos selecionados para este estudo estão listados na Tabela 6, com seus dados de pureza, fornecedor, classe, grupo químico, classificação toxicológica, fórmula molecular e limite máximo de resíduos (LMR) para o arroz.

Foram determinados 26 compostos sendo, 25 agrotóxicos e 1 produto de degradação. A seleção desses compostos foi baseada na lista de compostos recomendados pela ANVISA, MAPA (Sistema AGROFIT) e conforme contato com produtores locais e através de sindicatos rurais e informações fornecidas pelo IRGA - Rio Grande. Dentre esses compostos foram selecionados aqueles com características para serem determinados por LC, com padrões válidos disponíveis no laboratório.

Tabela 6 - Informações sobre os agrotóxicos em estudo

Pesticida	Pureza (%)	Fornecedor	Classe	Grupo Químico	Classificação Toxicológica	ANVISA	LMR CODEX mg kg ⁻¹	EU
2,4 D	99,6	Sigma Aldrich	H	Acido ariloxialcanóide	I	0,20	0,1	0,05
3,4 DCA	99,9	Sigma Aldrich	PD	-	-	-	-	-
Azoxistrobina	97,0	Sigma Aldrich	F	Estrobirulina	III	0,10	5,0	5,0
Bentazona	99,1	Sigma Aldrich	H	Benzotiadiazinona	III	0,02	0,1	0,1
Bispiribaque-sódico	99,0	Dr Ehrenstorfer	H	Ácido Pirimidiniloxibenzóico	III	0,05	-	-
Carbendazim	99,0	Dr Ehrenstorfer	F	Benzimidazol	III	0,05	2,0	0,01
Clomazona	97,4	Sigma Aldrich	H	Isoxazolidinona	III	0,10	-	0,01
Difenoconazol	99,0	Sigma Aldrich	F	Triazol	I	1,00	*	0,05
Epoxiconazol	99,0	Dr Ehrenstorfer	F	Triazol	III	0,30	-	0,1
Fipronil	96,5	Dr Ehrenstorfer	I	Pirazol	II	0,01	0,01	0,005
Imazapique	99,0	Dr Ehrenstorfer	H	Imidazolinoma	II	0,05	-	0,01
Imazetapir	99,9	Sigma Aldrich	H	Imidazolinona	III	0,05	-	-
Imidacloprido	98,0	Dr Ehrenstorfer	I	Neonicotinóide	III	0,05	*	0,05
Malationa	99,0	Dr Ehrenstorfer	I, A	Organofosforado	III	8,00	*	8,0
Metamidofós	98,5	Dr Ehrenstorfer	I, A	Organofosforado	I	-	*	0,01
Metsulfurom-metílico	99,0	Dr Ehrenstorfer	H	Sulfoniluréia	III	0,02	-	0,05
Piraclostrobina	97,5	Dr Ehrenstorfer	F	Estrobilurina	II	-	*	0,02
Pirazossulfurom-etílico	99,7	Sigma Aldrich	H	Sulfoniluréia	III	0,01	*	-
Pirimifos-metílico	99,0	Dr Ehrenstorfer	I, A	Organofosforado	III	10,00	7,0	5,0
Propanil	99,7	Sigma Aldrich	H	Anilida	III	2,00	-	0,2
Propiconazol	99,0	Sigma Aldrich	F	Triazol	II	0,10	*	0,05
Tebuconazol	99,6	Sigma Aldrich	F	Triazol	IV	0,10	*	2,0
Tetraconazol	98,5	Dr Ehrenstorfer	F	Triazol	II	1,00	-	0,05
Tiabendazol	99,9	Sigma Aldrich	F	Benzimidazol	IV	0,20	*	0,05
Tiametoxam	98,0	Dr Ehrenstorfer	I	Neonicotinóide	III	1,00	*	0,05
Trifloxistrobina	99,0	Dr Ehrenstorfer	F	Estrobilurina	II	0,20	5,0	0,02

H- herbicida; F – fungicida; I – inseticida; A- acaricida; PD- produto de degradação

Classe Toxicológica – I-extremamente tóxico; II-altamente tóxico; III-mediamente tóxico; IV- pouco tóxico

3.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas “estoques” foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L^{-1} . Efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado, logo a seguir, a massa pesada foi transferida para balões volumétricos calibrados de 25 mL os quais foram aferidos com metanol. Com exceção do carbendazim que foi preparado em acetona. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas a temperatura de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

A partir das soluções estoque foi preparada a mistura padrão contendo os 26 analitos. A primeira solução mistura (estoque) foi preparada adicionando 1 mL da solução individual de 1000 mg L^{-1} de cada analito, e aferida a 50 mL resultando numa concentração de 20 mg L^{-1} . A partir desta solução, preparou-se a solução trabalho na concentração de 1 mg L^{-1} . Para as diluições das misturas foi utilizado acetonitrila.

Soluções analíticas também foram preparadas no extrato do arroz. A forma de preparo do extrato está descrita no item 3.7.1. O preparo das soluções em solvente e no extrato possibilita o estudo de efeito da matriz conforme descrito no item 3.8.5.

3.5 Otimização dos parâmetros operacionais do LC-ESI-MS/MS

As otimizações das condições de ionização e fragmentação dos compostos e reações dos íons no sistema foram obtidas através de infusões diretas no MS das soluções padrões individuais de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Nesta etapa foram ajustados o modo de ionização (eletronebulização positiva ou negativa); a voltagem do cone para selecionar o íon precursor, a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; a temperatura da fonte; a temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente; a voltagem do capilar e do cone extrator.

Essa etapa de otimização é determinante para selecionar os íons a serem monitorados para identificação e quantificação, assim como, obter a melhor resposta e maior sinal para os analitos estudados. A fonte de ionização API foi empregada com interface ESI, devido à moderada polaridade da maioria dos analitos. ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH. Na ESI ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, a transformação destes em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

3.6 Otimização das condições cromatográficas

Todos os solventes empregados na preparação da fase móvel (metanol, acetonitrila e água ultrapura) foram filtrados e desgaseificados por 30 min. em banho de ultra-som antes de serem usados no sistema cromatográfico.

As determinações da vazão e do volume de injeção foram obtidas através dos seguintes procedimentos: primeiramente foi injetada a mistura padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, utilizando diferentes vazões do eluente, 0,3, 0,4 e 0,5 mL min^{-1} . Após a escolha da vazão adequada, foram testados três volumes de injeção 5, 10 e 20 μL . A escolha da vazão e do volume de injeção foi possível através da comparação das intensidades do sinal obtido para cada fragmento usado para quantificação.

Foram testadas diferentes composições dos solventes da fase móvel, com diferentes modificadores adicionados na água numa concentração de 0,1% (v/v), como descrito a seguir na Tabela 7, sem uso de gradiente. Para verificar o efeito na composição da fase móvel foram comparadas as intensidades do sinal de cada fragmento usado para quantificação, obtidos pela injeção de uma solução mistura de concentração de 1 mg L^{-1} no sistema LC-ESI-MS/MS utilizando as fases móveis descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição das fases móveis utilizadas na otimização

Solventes	Proporção (v/v)	Modificadores
metanol/água	70:30	ácido acético
		ácido fórmico
		ácido trifluoracético
		formiato de amônio
		sem modificadores
metanol/água	60:40	ácido acético
		ácido fórmico
		ácido trifluoracético
		formiato de amônio
		sem modificador
acetonitrila/água	60:40	ácido acético
		ácido fórmico
		ácido trifluoracético
		formiato de amônio
		sem modificadores

A seguir, foram construídas curvas analíticas nas duas fases móveis consideradas mais satisfatórias para a análise. Através do programa MassLynx 4.1 foram geradas as equações de regressão linear, fornecendo os coeficientes de determinação (r^2), os coeficientes angulares (a) e os coeficientes lineares (b) de cada composto. Uma vez que a sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (PASCHOAL, 2008; LANÇAS, 2004), foi possível comparar a sensibilidade para cada analito nas diferentes fases móveis pelos seus coeficientes angulares, permitindo a seleção da fase móvel mais adequada para a determinação da mistura dos agrotóxicos.

3.7 Procedimento de fortificação e extração: Método QuEChERS modificado

O método descrito a seguir foi o mesmo utilizado por PRESTES (2007) sendo que posteriormente foram otimizados diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza do extrato.

3.7.1. Preparo do extrato branco da matriz (*slurry*)

Inicialmente, preparou-se uma mistura de grãos de arroz e água na proporção (1:1 m/m) da seguinte forma: porções de 100 g de grãos de arroz polido orgânico comercial foram processadas em liquidificador por 10 min, obtendo uma farinha de arroz. Logo após o arroz triturado foi transferido para o processador de alimento, onde para cada parte do material particulado obtido foi adicionado igual quantidade de água ultrapura, ficando em agitação máxima por 5 min. Para garantir uma total homogeneização do *slurry* obtido, este foi colocado em processador "ultra-turrax" à 1800 rpm por 1 min. Em uma porção da amostra assim preparada foi realizada a extração empregando o procedimento descrito no item 3.7.2 e a determinação por LC-MS-MS, nas condições descritas no item 4.2.4. Uma vez que não foram detectados os analitos selecionados para este estudo, esta amostra foi denominada "branco da matriz" e utilizada para validação do método analítico.

3.7.2 Método QuEChERS modificado

Para aplicação do método QuEChERS modificado (Figura 4) pesou-se $10,0 \pm 0,1$ g do *slurry*, diretamente em tubos de polipropileno de 50 mL com tampa rosqueada. Logo após, efetuou-se a fortificação, nos níveis que variaram de 5 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

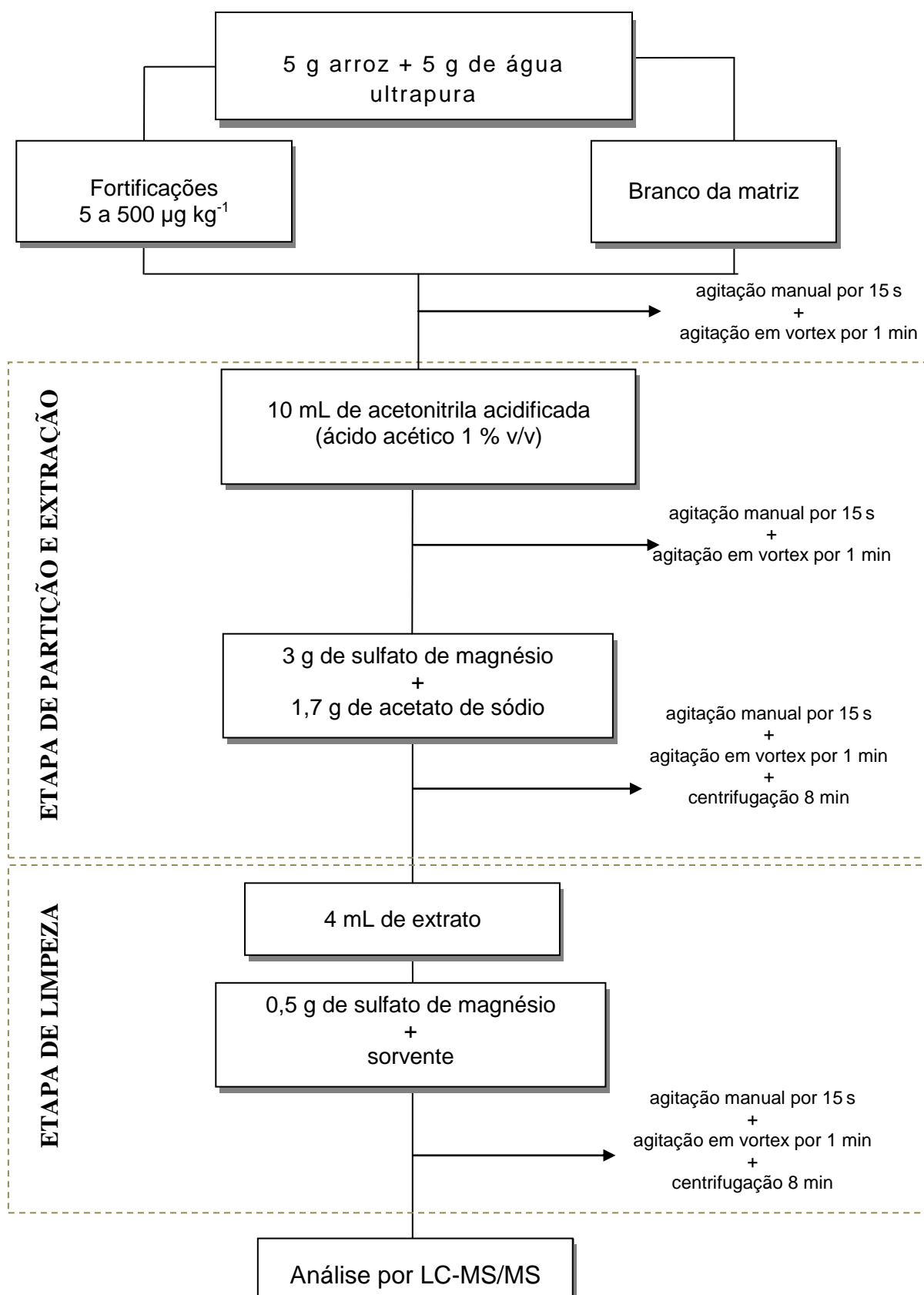


Figura 4 - Representação esquemática do método QuEChERS acetato modificado

Após fortificação realizou-se agitação manual por 15 s e em vortex por 1 min, garantindo a interação da amostra com os analitos. Adicionou-se, através de um

dispensador automático, 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v), em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação manual e vigorosa por 15 s e agitação em vortex por 1 min. Em seguida, acrescentou-se 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g acetato de sódio anidro. Repetiram-se as agitações manuais e em vortex, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos. Em seguida, os tubos foram levados para serem centrifugados a 4000 rpm, durante 8 min. Posteriormente, na etapa de limpeza transferiu-se diretamente 4 mL do extrato para outro tubo de polipropileno de 15 mL contendo 0,5 g de sulfato de magnésio anidro e determinada quantidade de sorvente, sendo novamente agitados manualmente de forma vigorosa, e também centrifugados como citado anteriormente. Este procedimento foi realizado 3 vezes, para cada um dos níveis de fortificação e também para o “branco” da matriz (n = 3).

3.7.3 Otimização da etapa de limpeza no método QuEChERS

Após realização do método descrito anteriormente, foi realizada a otimização da etapa de limpeza usando os sorventes descritos na Tabela 8 e 0,5 g de sulfato de magnésio.

Todos sorventes foram testados no nível de fortificação de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. E os testes com somente C18, PSA e mistura de ambos foram realizados em 2 níveis, 20 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A escolha do melhor sorvente para limpeza foi realizada através da comparação das recuperações nos níveis testados.

3.7.3.1 Otimização da quantidade de C18

Foram utilizadas quantidades de C18; 0,15; 0,3 e 0,6 g. Para a seleção da quantidade ideal, foram comparadas as recuperações obtidas e efeito matriz para o nível de fortificação de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 8 - Sorventes testados durante a etapa de limpeza

Sorvente	Massas (g) e combinações testadas	Legenda
Quitosana	0,25	S1
Florisil	0,25	S2
Alumina	0,25	S3
Terra diatomácea	0,25	S4
Carvão Ativo	0,1	S5
C18 + Quitosana	0,1 + 0,1	S6
C18 + Terra diatomácea	0,1 + 0,1	S7
C18 + Carvão Ativo	0,1 + 0,1	S8
C18 + PSA	0,25 + 0,25 e 0,5 + 0,125	S9
C18 + Florisil	0,5 + 0,25	S10
C18 + Alumina	0,5 + 0,25	S11
PSA	0,125	S12
C18	0,15	S13
C18	0,3	S14
C18	0,6	S15

3.7.4 Otimização do tempo de fortificação e resfriamento

Para o tempo de fortificação e resfriamento foram testadas 3 condições diferentes: fortificado e mantido a temperatura ambiente por 30 min; resfriada a 4 °C por 30 min antes da extração e; extraída diretamente, sem tempo de fortificação. As diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelo percentual de recuperação e efeito matriz para cada tratamento.

3.8 Validação do método

O método desenvolvido foi validado empregando figuras analíticas de mérito: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Parâmetros sugeridos para validação de métodos analíticos pelo INMETRO (2011). Também foi avaliado o efeito de matriz, como sugerido pelo Guia de Validação para Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos da Comissão Europeia (SANCO, 2012).

3.8.1 Determinação da linearidade do instrumento e do método

As linearidades do instrumento e método foram avaliadas pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente, por sobreposição da matriz e pela curva trabalho, com soluções analíticas nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150, 200 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A padronização externa no solvente foi realizada por diluições da solução padrão de trabalho com acetonitrila. Para padronização externa por sobreposição da matriz foram preparadas as soluções analíticas através de diluições da solução padrão de trabalho com o extrato branco da matriz, extraído por QuEChERS modificado.

A curva trabalho foi construída, de forma que as amostras de arroz “branco da matriz” foram fortificadas em cada nível com a solução padrão dos analitos, passando então pela etapa de preparo de amostra otimizada. Esta curva é aplicada para avaliar o desempenho do método proposto e para os cálculos de recuperação (TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Cada solução foi injetada três vezes, sendo injetados também três vezes o solvente (acetonitrila) e o extrato branco da matriz.

Posteriormente, foram realizados os cálculos da média das áreas e do desvio padrão relativo percentual (RSD) no programa Microsoft Office Excel. As equações das curvas analíticas bem como dos coeficientes de determinação (r^2) e dos coeficientes de correlação linear (r) foram obtidos com auxílio do *software* (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. Com base nesses dados foram determinadas as faixas de linearidade para cada analito.

3.8.2 Determinação da estimativa dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do instrumento e do método

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada um dos 26 analitos, procedeu-se à determinação da estimativa do LOD do instrumento (LODi) e do método (LODm), bem como do LOQ do instrumento (LOQi) e do método (LOQm). O LODi foi determinado através da diluição da mistura padrão analisada até obtenção de um pico, cuja relação sinal/ruído seja igual ou superior a 3. O LOQi foi a menor concentração do analito que pode ser determinado com um nível aceitável de precisão e exatidão. Para sua determinação foram efetuados os mesmos procedimentos para determinação do LOD, porém considerando uma razão sinal/ruído igual ou superior 10.

O LODm e o LOQm foram obtidos realizando os ensaios de recuperação para diferentes níveis de concentração, onde os extratos obtidos foram injetados e

determinada a relação sinal/ruído da mesma forma que para os limites do instrumento. A razão sinal ruído foi obtida através do *software* do equipamento (Masslynx 4.0 Waters) como indicado na Figura 5.

3.8.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em função dos ensaios de recuperação, de acordo com as determinações da ANVISA (2003) e do ICH (do inglês, *International Conference Harmonisation*) (RIBANI *et al.*, 2004). O branco da matriz foi fortificado nos níveis de 5 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dependendo do LOQ de cada analito, a partir da adição de um volume conhecido de solução padrão de trabalho com a mistura dos agrotóxicos a 5,0 g de amostra. Logo a seguir foi realizado todo o procedimento do método QuEChERS, já descrito no item 3.7. Os resultados das extrações foram comparados a concentração do padrão diluído no extrato branco da matriz, através dos cálculos de recuperação demonstrados na equação 1. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e injetado três vezes ($n=9$)

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada após a fortificação

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C_3 = concentração esperada para o nível de fortificação

3.8.4 Precisão (Repetitividade e precisão intermediária)

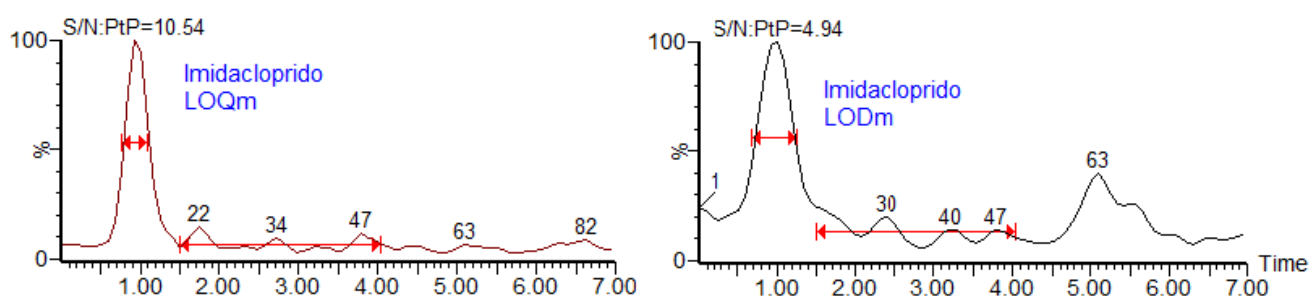


Figura 5 - Cromatogramas do LOQ e LOD do método com respectivos valores de sinal/ruído determinado para Imidacloprido nos níveis de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para LOQ e 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o LOD.

A precisão instrumental foi avaliada a partir de injeções sucessivas de solução analítica padrão com a mistura dos agrotóxicos ($n=3$) e estimada através do RSD com relação a média das áreas de todas as injeções.

A precisão do método foi avaliada em função da repetitividade (RSDr) e da precisão intermediária (RSDpi). Para o estudo da repetitividade foi realizada a extração por QuEChERS em diferentes níveis de fortificação (na concentração correspondente ao LOQ e 2 e 10 vezes maior a esta concentração), em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes (n= 9). A partir das determinações foi calculado o RSD%. A precisão intermediária foi avaliada assim como a repetitividade, mas, em diferentes dias e com diferentes analistas. O valor numérico para avaliar a precisão, RSD%, foi calculado através da equação 2.

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

3.8.5 Avaliação do efeito matriz

A avaliação do efeito matriz (EM) nas determinações por LC-ESI-MS/MS foi realizada conforme proposto, primeiramente, por Matuszewski *et al.* (2006). Realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato do arroz. O cálculo foi efetuado através da Equação 3.

$$EM(\%) = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (3)$$

onde:

x_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato do arroz (matriz);

x_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em acetonitrila (solvente).

Além do cálculo da equação também foram traçadas os gráficos das curvas analíticas obtidas pela injeção das soluções analíticas diluídas em solvente, em extrato da matriz, em extrato da matriz sem etapa de limpeza, em extrato da matriz com etapa de limpeza e dos extratos da curva de trabalho. Neste trabalho foi considerado um efeito matriz baixo, valores até 20%.

3.8.6 Aplicabilidade do método e robustez com relação à matriz

Após a validação, o método foi aplicado para 3 diferentes tipos de arroz: integral, cateto e vermelho. Com cada amostra foi preparado um *slurry*, e posteriormente estes foram extraídas pelo método QuEChERS.

A aplicabilidade e a robustez foram acompanhadas de ensaios para avaliar a exatidão. Com isto, além da robustez, foi possível avaliar o efeito de matriz para as diferentes amostras. As amostras escolhidas foram de arroz do tipo cateto, e de arroz vermelho. Essas variedades foram escolhidas, pois tem características bem distintas do arroz branco polido. O arroz cateto tem maior quantidade de amido, já o arroz vermelho é rico em pigmentos naturais.

As amostras de arroz foram obtidas em estabelecimentos comerciais na cidade de Rio Grande.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização dos parâmetros para ionização e fragmentação dos compostos no MS

A Tabela 9 apresenta os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS, o modo de ionização ESI+ ou ESI-, modo de aquisição MRM, os íons precursores e íons produtos, sendo que foram selecionadas duas transições características para cada analito. O fragmento mais intenso (mais estável) foi utilizado para a quantificação e o segundo mais intenso para a confirmação. A energia de colisão, voltagem do cone e o tempo de retenção dos analitos estudados também são apresentados na Tabela 9. Além da energia de colisão e voltagem do cone, outros parâmetros que influenciam a fragmentação foram otimizados para a mistura dos analitos. Os parâmetros foram: voltagem do capilar (2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 kV) (Figura 6), temperatura de dessolvatação (300 a 450 °C), vazão do eluente (0,1, 0,3 e 0,5 mL min⁻¹) (Figura 7) e volume de injeção (2,5; 5; 10 e 20 µL) (Figura 8).

A voltagem do capilar utilizada foi 3,5 kV, embora a variação dessa energia não tenha apresentado diferença na estabilidade para maioria dos compostos. No entanto, compostos com baixa sensibilidade, como propanil, propiconazol e tiametoxam apresentaram intensidades dos seus fragmentos maiores nesse valor (Figura 6). A temperatura de dessolvatação foi determinada pela vazão tendo sido utilizada 350 °C, a vazão do eluente foi de 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. Esses dois últimos parâmetros devem ser otimizados de tal forma que a quantidade de solvente que chegue a interface seja facilmente volatilizado e ao mesmo tempo não comprometa a eluição. A temperatura da fonte foi fixada em 100 °C.

Tabela 9 – Parâmetros de fragmentação no LC-ESI-MS/MS, modo de ionização (positivo ou negativo), massa molar, tempo de retenção, usando *dwell time* de 0,05 s

Agrotóxico	Modo de ionização	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Transição (m/z) *		Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	t _R (min)	Segmento
			Íon precursor Identificação	Íon produto Confirmação				
Carbendazim	+	192,1	192>160	192>132	28	28	0,93	1
					28	29		
Metamidofós	+	141,1	142>94	142>125	20	19	0,93	1
					20	15		
Tiabendazol	+	201,3	202>131	202>158	47	25	0,93	1
					47	25		
Imidacloprido	+	255,7	256>209	256>175	30	14	1,01	1
					30	14		
Tiametoxam	+	291,7	292>181	292>122	23	30	1,01	1
					25	31		
Metsulfurom-metílico	-	381	380>139	380>214	15	30	1,36	2
					10	30		
Imazapique	+	275	276>231	276>185	40	20	1,58	1
					40	30		
Azoxistrobina	+	403	404>372	404>329	20	20	1,69	1
					15	30		
Imazetapir	+	289	290>230	290>177	40	20	1,74	1
					40	20		
Clomazona	+	240	240>125	240>100	25	20	1,86	1
					30	15		
Propanil	+	218	218>127	218>162	25	28	2,12	3
					30	14		
Malationa	+	330	331>99	331>127	24	30	2,16	3
						10		

Agrotóxico	Modo de ionização	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Transição (m/z) *		Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	t _R (min)	Segmento
			Íon precursor Identificação	Íon produto Confirmação				
3,4 DCA	+	162	162>127	162>109	33	20	2,25	3
					35	22		
Tetraconazol	+	372	372>159	372>70	35	35	2,61	3
					35	22		
Bispiribaque-sódio	+	452	453>297	453>275	35	25	3,10	3
					35	22		
Fipronil	-	437	435>330	435>250	15	30	3,22	2
					26	25		
Tebuconazol	+	308	308>70	308>88	40	20	3,60	3
					33	50		
Pirazossulfurom-etílico	-	414	413>232	413>154	15	35	3,74	2
					26	35		
Propiconazol	+	342,2	342>159	342>69	32	22	3,9	3
					30	20		
Epoconazol	+	329,8	330>123	333>101	27	30	3,99	3
					27	50		
Piraclostrobina	+	387,5	388>194	388>163	20	15	4,16	3
					20	15		
Bentazona	-	240	239>132	239>197	25	35	4,46	2
					20	35		
Difenoconazol	+	405	406>251	406>337	31	31	5,25	3
					32	20		
Trifloxistrobina	+	408	409>186	409>145	25	14	5,72	3
					25	40		
2,4-D	-	219	219>161	219>89	20	15	6,01	2
					30	15		

*Íon precursor foi utilizado para quantificação e o íon produto foi utilizado para confirmação

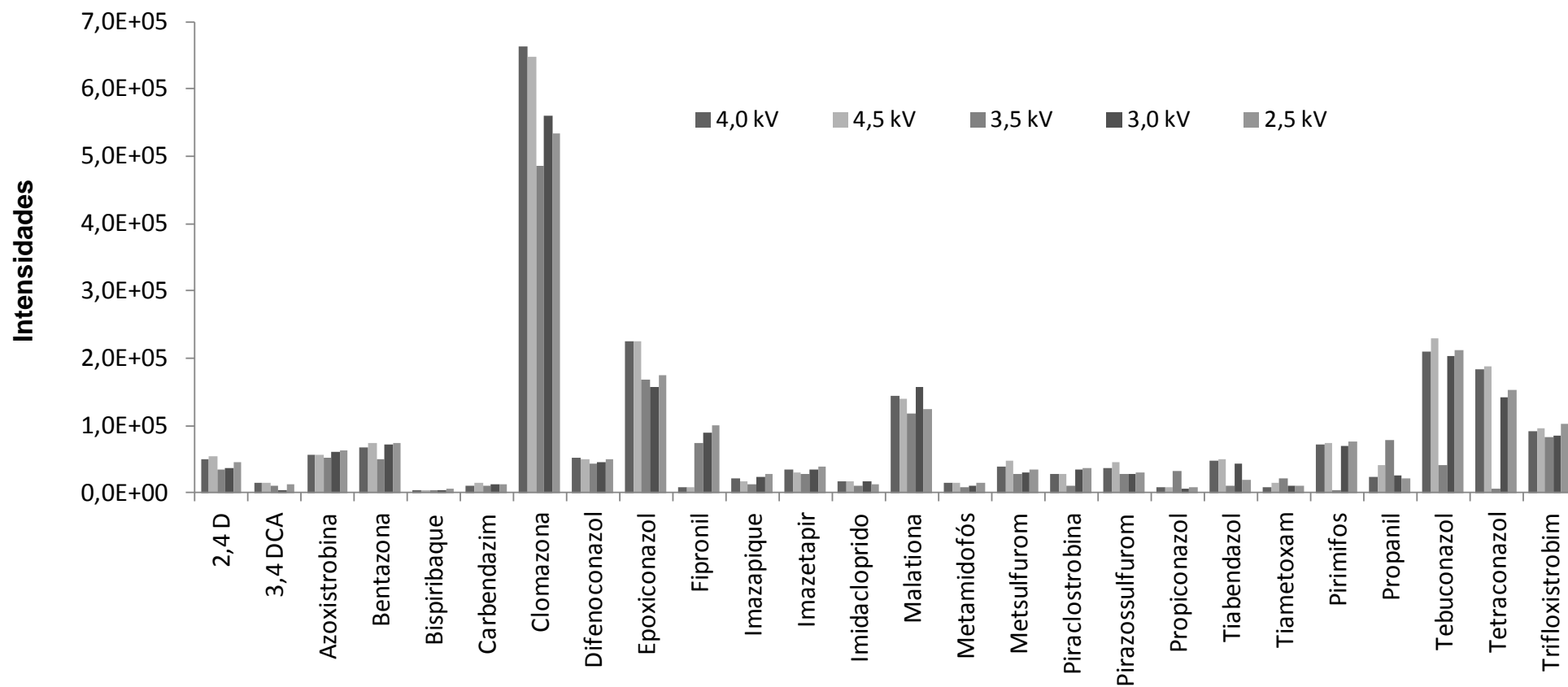


Figura 6 - Intensidade de cada fragmento em diferentes voltagens do capilar em kV. Utilizando vazão do eluente de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$, temperatura da fonte de 100°C .

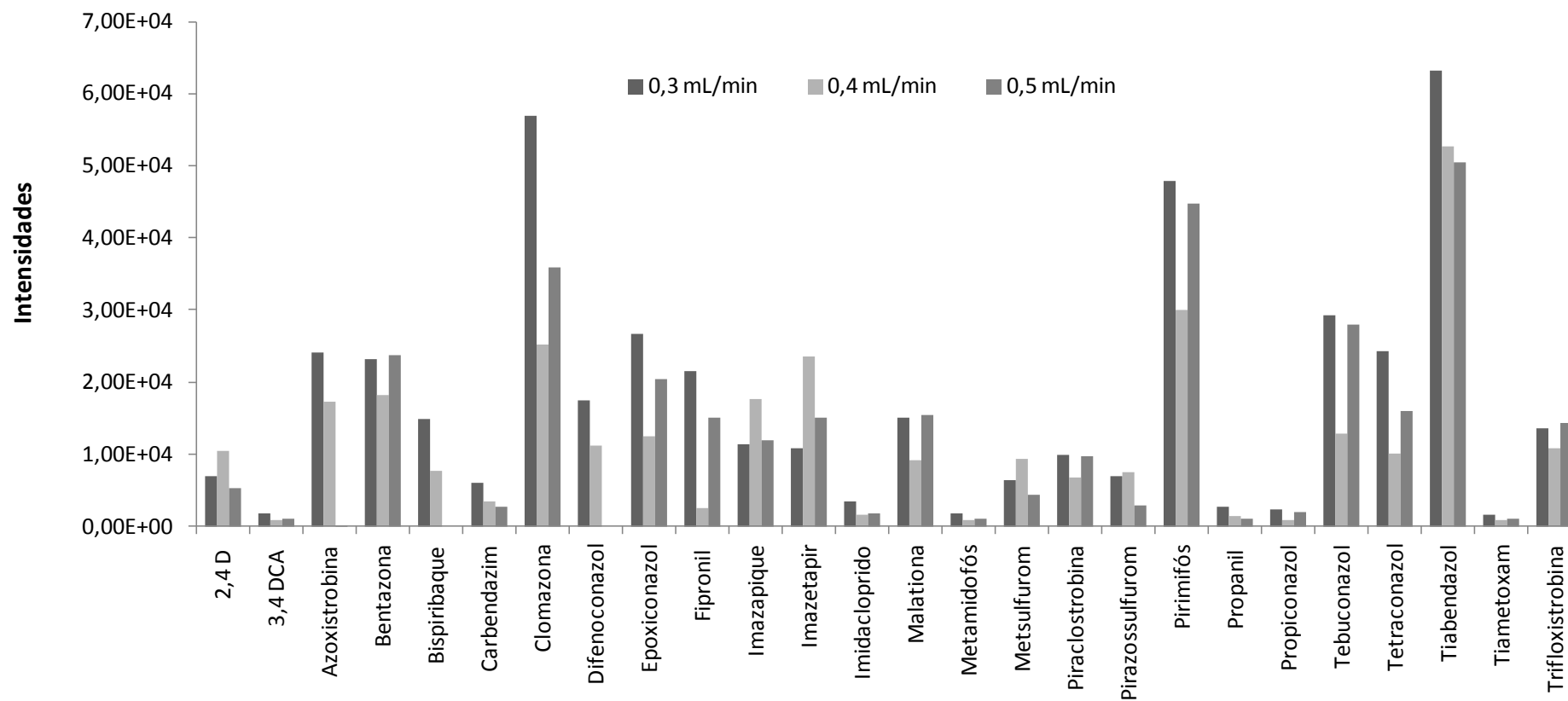


Figura 7 - Intensidades de cada fragmento em diferentes vazões do eluente. Utilizando 3,5 kV como voltagem do capilar, volume de injeção de 20 μ L, temperatura da fonte de 100°C.

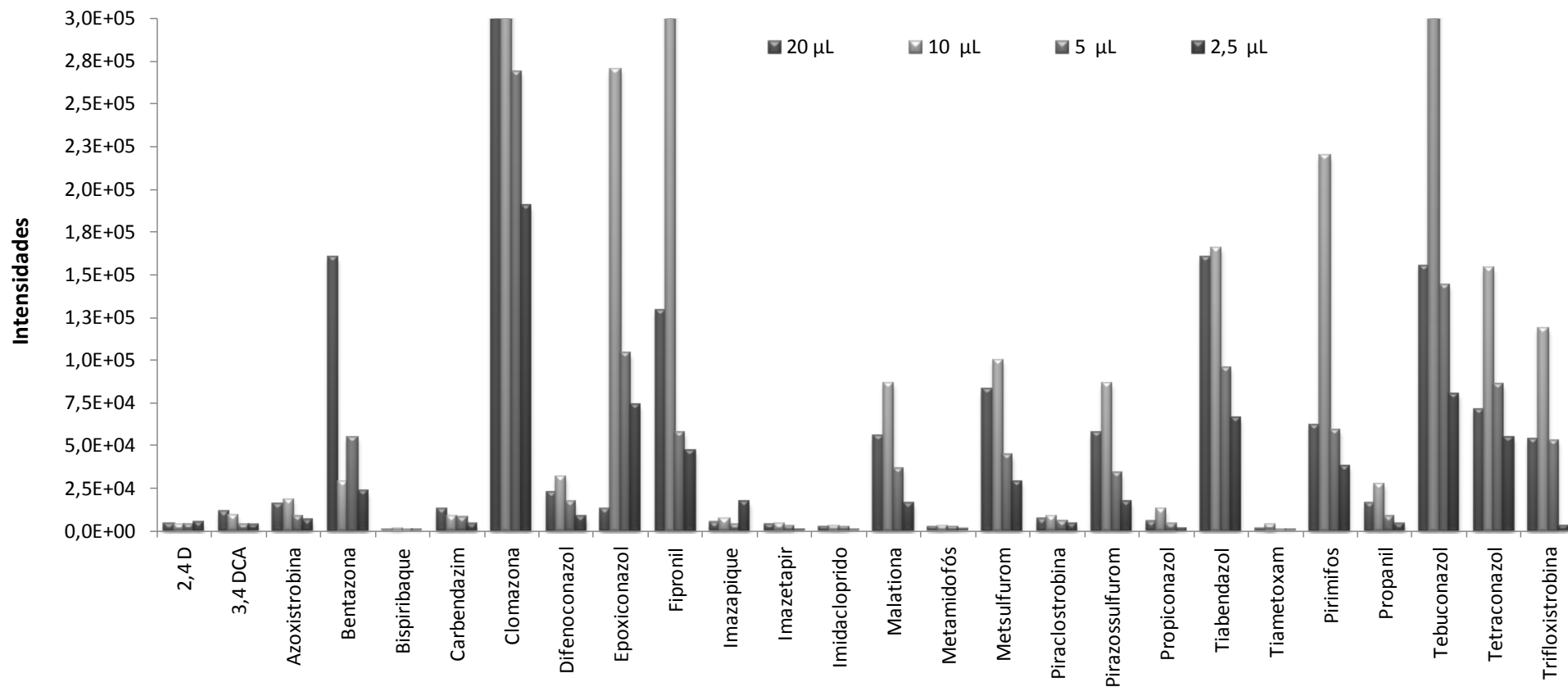


Figura 8 - Intensidades de cada fragmento em diferentes volumes de injeção. Utilizando 3,5 kV de voltagem do capilar, vazão do eluente de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da fonte de 100°C .

4.2 Escolha da fase móvel

4.2.1 Proporções de metanol e água

A fase móvel constituída de metanol e água na proporção 50:50 (v/v) apresentou baixa intensidade dos fragmentos comparadas com as demais fases móveis. Desta forma, esta foi eliminada da comparação.

Na Figura 9 é apresentado a comparação da proporção 60:40 e 70:30 (v/v) de metanol e água, no entanto, devido a variação de intensidade foi separado na Figura 10 os analitos com baixa intensidade. Para maioria dos compostos com baixa intensidade, como bispiribaque-sódico, 3,4-DCA, carbendazim, piraclostrobina, propiconazol, trifloxistrobina e, em especial no modo negativo, como 2,4-D, bentazona, fipronil, metsulfurom-metilico e pirazossulfurom-metilico, a maior proporção de solvente orgânico, facilitou a ionização devido à facilidade de quebra das gotículas e pela diminuição da tensão superficial da água pela presença do solvente orgânico.

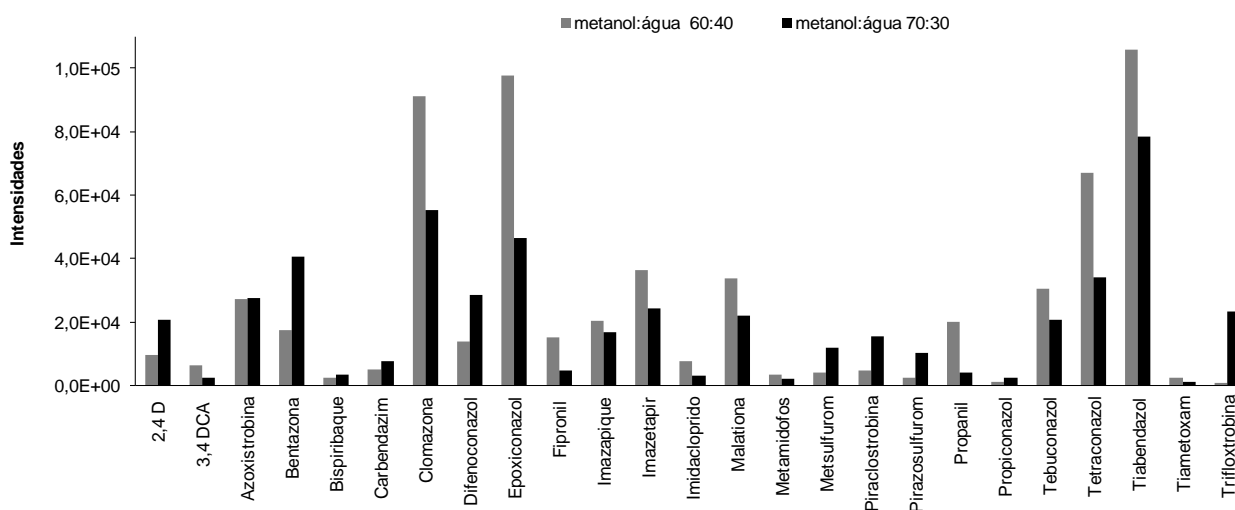


Figura 9 - Intensidades da resposta dos analitos no sistema LC-MS/MS com diferentes proporções de metanol e água, sem modificador, na fase móvel, vazão do eluente de 0,3 mL.

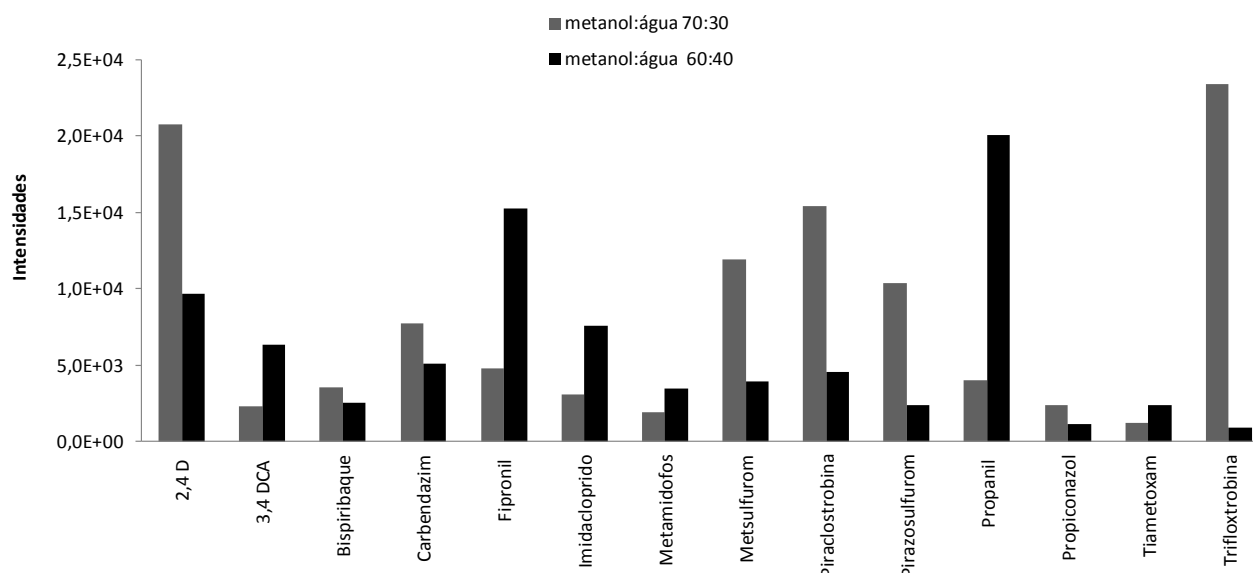


Figura 10 - Intensidades da resposta dos analitos com menor intensidade no sistema LC-MS/MS com diferentes proporções de metanol e água, sem modificador, na fase móvel, vazão do eluente de 0,3 mL.

4.2.2 Comparando modo positivo com negativo de ionização

Nas Figuras 11 a 13 são apresentadas as respostas dos compostos analisados por ionização em *electrospray* no modo negativo (ESI-) foram inferiores ao modo positivo (ESI+).

4.2.3 Fase móvel escolhida

Comparando todas as fases móveis testadas a que apresentou os fragmentos mais intensos para a maioria dos compostos foi a fase móvel composta por metanol e água na proporção de 70:30 (v/v) com a água acidificada com ácido fórmico (pKa 3,75) 0,1% (v/v). No entanto, este resultado é devido a maioria dos compostos em estudo serem analisados no modo de ionização positivo, pois para os compostos analisados no modo negativo os fragmentos foram mais intensos com a utilização da água com formiato de amônio 0,1% (m/v). A mesma proporção metanol e água, sendo a água acidificada com ácido acético (pKa 4,76) 0,1% (v/v), obteve valores intermediários de intensidade para ambos os modos de ionização.

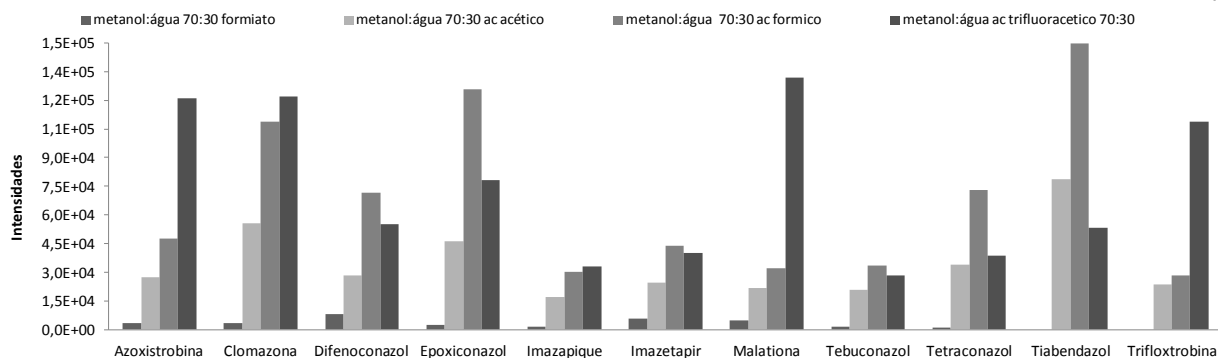


Figura 11 - Intensidade dos compostos analisados com maiores intensidades, em ESI positivo em diferentes fases móveis

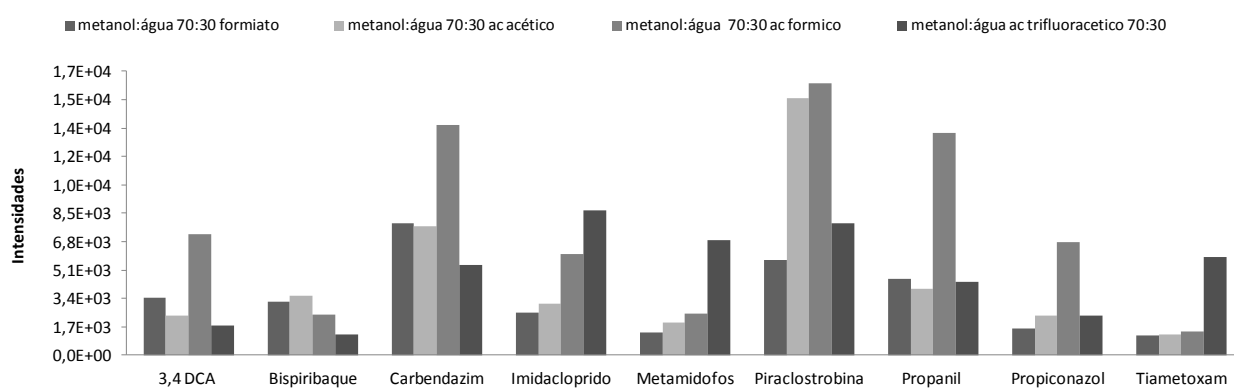


Figura 12 - Intensidade dos compostos analisados com menores intensidades em ESI positivo em diferentes fases móveis.

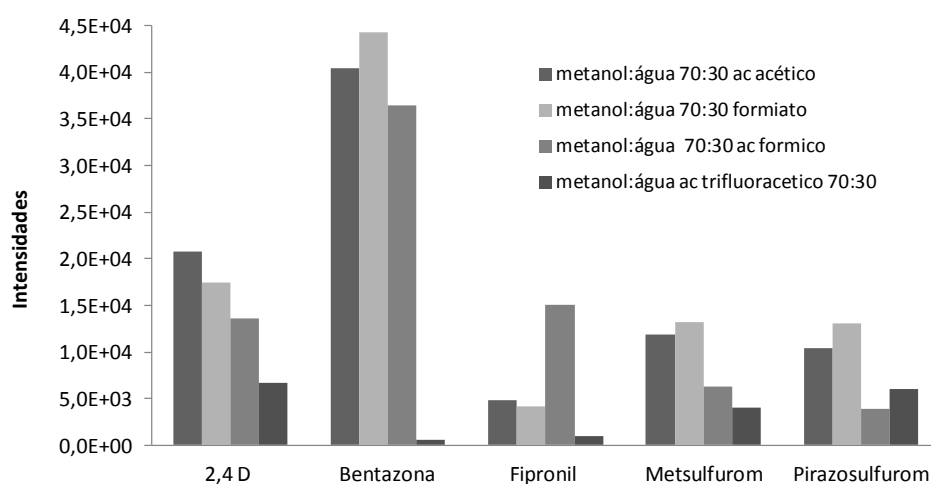


Figura 13. Intensidade dos compostos analisados por ESI negativo em diferentes fases

A variação entre os resultados apresentados em função dos diferentes modificadores se deve a formação de adutos da molécula do analito com as espécies

iônicas presentes na fase móvel como Na^+ , K^+ , NH_4^+ , HCOO^- e CH_3COO^- . Esses adutos quando formados interferem no monitoramento do íon molecular.

A confirmação da escolha desta fase móvel metanol:água 70:30 (v/v) acidificada com de ácido acético 0,1% (v/v) como a ideal para o estudo foi dada pela comparação dos coeficientes angulares obtidos através da regressão linear de uma curva analítica determinada com as condições de fase móvel com 0,1% de ácido acético (v/v) e 0,1% de formiato de amônio (m/v). Sendo que, acidificando o eluente com ácido acético foram obtidos maiores coeficientes angulares para a maioria dos analitos (Tabela 10). Somente esses dois modificadores foram selecionados, pois se mostraram os mais adequados para o modo negativo e este é menos sensível que o modo positivo.

Tabela 10 - Comparação das curvas analíticas determinadas em diferentes composições de fase móvel MEOH:H₂O 70:30 (v/v)

ANALITO	FORMIATO DE AMÔNIO 0,1% (m/v)			ACIDO ACÉTICO 0,1% (v/v)		
	r	r ²	curva analítica (y= ax + b)	r	r ²	curva analítica (y= ax + b)
2,4 D	0,997	0,995	2310,37x+0,54	0,995	0,990	4993,6x +2,41181
3,4 DCA	0,949	0,900	292,5x+8,566	0,945	0,893	1052,73x - 0,274175
Azoxistrobina	0,997	0,993	43640,4x+16,544	0,985	0,969	25026,7x - 35,5484
Bentazona	0,982	0,965	10702,8x+30,49	0,985	0,970	14985,6x +17,7859
Bispiribaque sódio	0,998	0,996	8109,65x - 2,117	0,996	0,992	7156,52x - 3,75967
Carbendazim	0,989	0,979	1562,28x+17,67	0,996	0,991	1726,44 x -0,337556
Clomazona	0,996	0,993	42578x+10,22	0,987	0,975	45962,3x - 32,601
Difeconazol	0,996	0,992	24854x - 6,271	0,980	0,960	21351,1x - 9,10432
Epoxiconazol	0,997	0,994	29176,5x+ 5,55	0,982	0,964	35657x - 26,8574
Fipronil	0,999	0,998	25064,5x+6,437	0,998	0,996	32881,5x - 34,6459
Imazapique	0,996	0,992	7611,37x+8,79	0,993	0,986	2258,73 x - 2,13837
Imazetapir	0,995	0,991	5490,9x+4,627	0,997	0,995	2050,54x + 6,00651
Imidacloprido	0,989	0,979	2494x+4,4817	0,974	0,948	1831,27 x - 2,71056
Malationa	0,997	0,995	45608x+40,669	0,994	0,989	28079,3x - 91,0142
Metamidofos	0,993	0,986	2214x+12,92	0,933	0,870	1275,52x - 1,75619
Metsulfurom-metilico	0,998	0,997	31021x+12,144	0,999	0,998	49011x-12,284
Piraclostrobina	0,998	0,997	23967x - 0,735	0,985	0,971	14520,1x - 154701
Pirazossulfurom	0,963	0,928	1161,2x+0,103	0,991	0,983	3173,57x - 0,159366
Pirimifos-metilico	0,998	0,997	16966,9x - 4,593	0,993	0,986	34055,9x +28,6374
Propanil	0,986	0,974	1567x+15,15	0,982	0,965	2165,21x +1,87775
Propiconazol	0,988	0,977	1612,8x+3,27	0,990	0,981	1622,49 x - 1,21854
Tebuconazol	0,997	0,995	9905,1x+1,998	0,995	0,990	131815,9x - 28,2356
Tetraconazol	0,999	0,998	16801,4x + 0,932	0,989	0,978	24189,7x - 21,6975
Tiabendazol	0,987	0,974	19036,7x+80,53	0,995	0,989	18053,9 x - 3,24332
Tiametoxam	0,997	0,995	1348x+0,61	0,990	0,980	1138,04x - 14,5626
Trifloxistrobina	0,997	0,994	45297,9x - 1,831	0,963	0,926	32933,6x - 63,0246

4.2.4 Condições empregadas no sistema cromatográfico

Com base nas otimizações anteriores, as condições empregadas no sistema cromatográfico foram as descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS

Parâmetros	
Fase Móvel	70% de Metanol 30% água acidificada com ácido acético 0,1%
Vazão	0,3 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Fonte de ionização	ESI
Voltagem do capilar	3,5 kV
Temperatura da fonte	100 °C
Temperatura de dessolvatação	350 °C
Gás de dessolvatação	N ₂
Gás de colisão	Ar
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS

Os analitos foram divididos em 3 segmentos (*Time Window*) em função dos tempos de retenção para melhor seletividade. Foram monitorados na primeira função 22 transições, na segunda 10 transições e na terceira 26 transições. Sendo os segmentos 1 e 3 no modo positivo e o 2 no modo negativo (Figura 14).

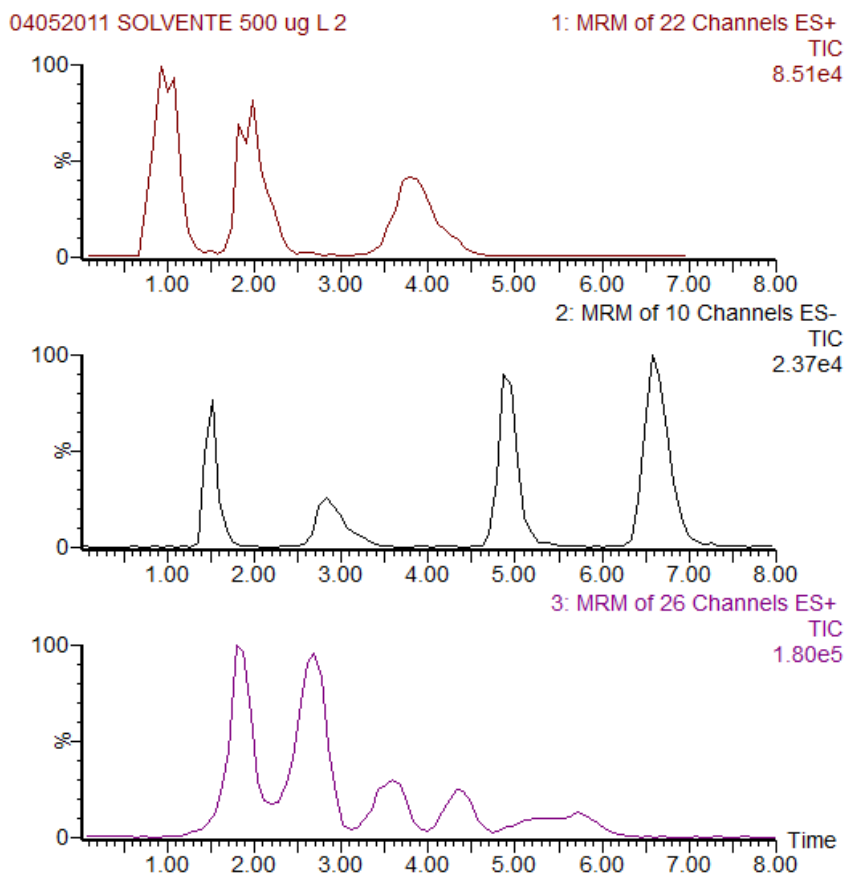


Figura 14. Cromatogramas de íons totais (TIC)- Segmento 1, 2, 3

4.3 Otimização do Método QuEChERS

4.3.1 Efeito de diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza

Entre os sorventes testados, o que apresentou melhores resultados foi o C18 (S13), com recuperações de 51 a 118% e 20 compostos dos 26 analisados com recuperação na faixa de 70 a 120%, conforme apresentado na Figura 15.

Embora outros sorventes e misturas com C18 também apresentaram resultados similares. PSA, por exemplo, apresentou recuperações de 33 a 127% e 19 compostos dentro da faixa ótima. Quitosana apresentou recuperações de 45 a 170% e 18 compostos na de 70 a 120%, assim como florisil, no entanto esse último sorvente apresentou recuperações mais extremas de 22 a 145%. Porém, carvão ativo e terra diatomácea apresentaram maior número de compostos com recuperação fora da faixa de 70 a 120% (Figura 15).

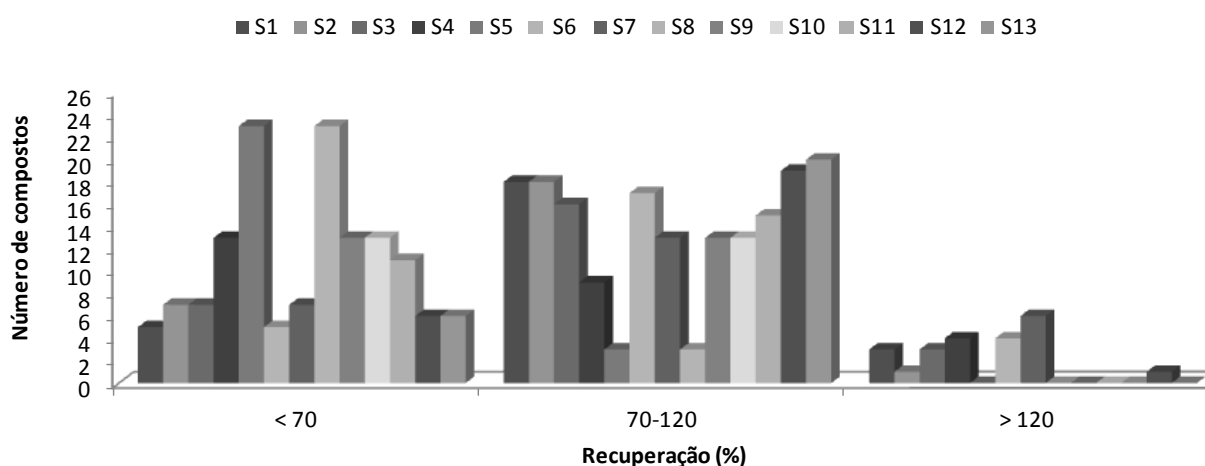


Figura 15. Recuperações usando diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza.

onde, **S1**- Quitosana; **S2**- Floresil; **S3**- Alumina; **S4**- Terra Diatomacea; **S5**- Carvão ativo; **S6** – C18 + Quitosana; **S7** - C18 + Terra Diatomácea; **S8** - C18 + Carvão ativo; **S9**- C18 + PSA; **S10** – C18 + Floresil; **S11** - C18 + Alumina **S12**- PSA; **S13**- C18

Entre os sorventes com melhores resultados C18 e PSA, foi realizado *teste t* (ANOVA), para determinar a diferença significativa entre os sorventes para cada analito. A maioria dos analitos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, exceto metamidofós onde a recuperação melhor foi com PSA e com bentazone e clomazone onde as melhores recuperações foram com C18. Portanto C18 foi escolhido como sorvente para esse trabalho.

Outro sorvente que apresentou resultados satisfatórios foi a quitosana (Figura 16),. Não se tem dados até o momento da utilização da quitosana em alguma técnica

de preparo de amostra para análise de agrotóxico, no entanto, como já citado anteriormente no método proposto nesse trabalho a limpeza com quitosana apresentou 18 dos 26 compostos analisados na faixa de recuperação de 70-120% e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) do C18 e PSA, para a maioria dos compostos (ANOVA, com teste de *post-hoc* de Tukey).

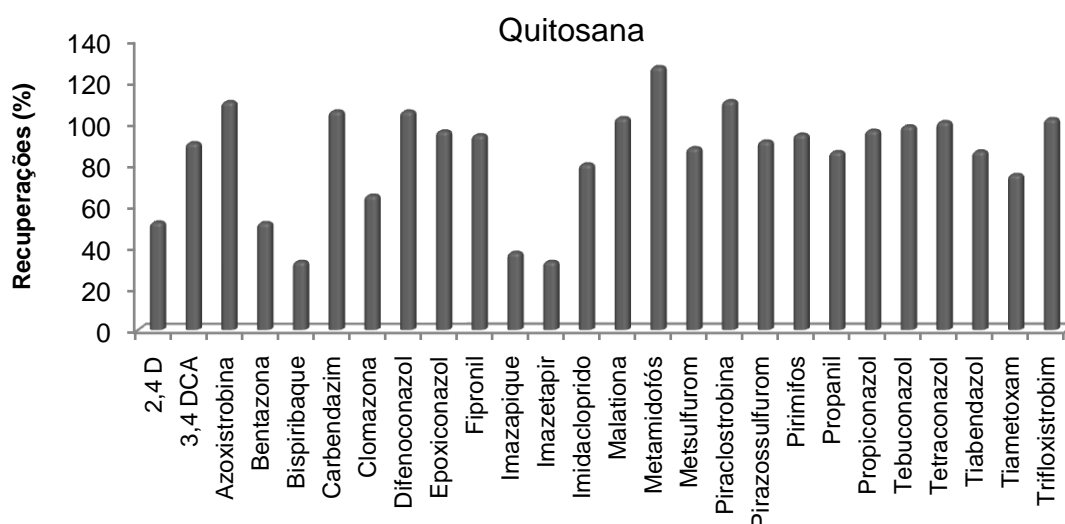


Figura 16 - Recuperações usando quitosana como sorvente durante a etapa de limpeza no método QuEChERS

4.3.2 Diferentes quantidades de C18

Após a escolha de C18 como sorvente para a etapa de limpeza utilizada no método, foi otimizada a quantidade de C18 necessária. Conforme apresentado na Figura 17, a redução da quantidade de C18 não alterou os resultados das recuperações. A análise estatística ANOVA, com teste *post-hoc* de Tukey, mostrou não haver diferença significativa entre as quantidades testadas ($p > 0,05$), o que é um aspecto bastante positivo em função do alto custo desse material. As recuperações foram de 55 a 124%, 50 a 128% e 50 a 128% com 600, 300 e 150 mg, respectivamente.

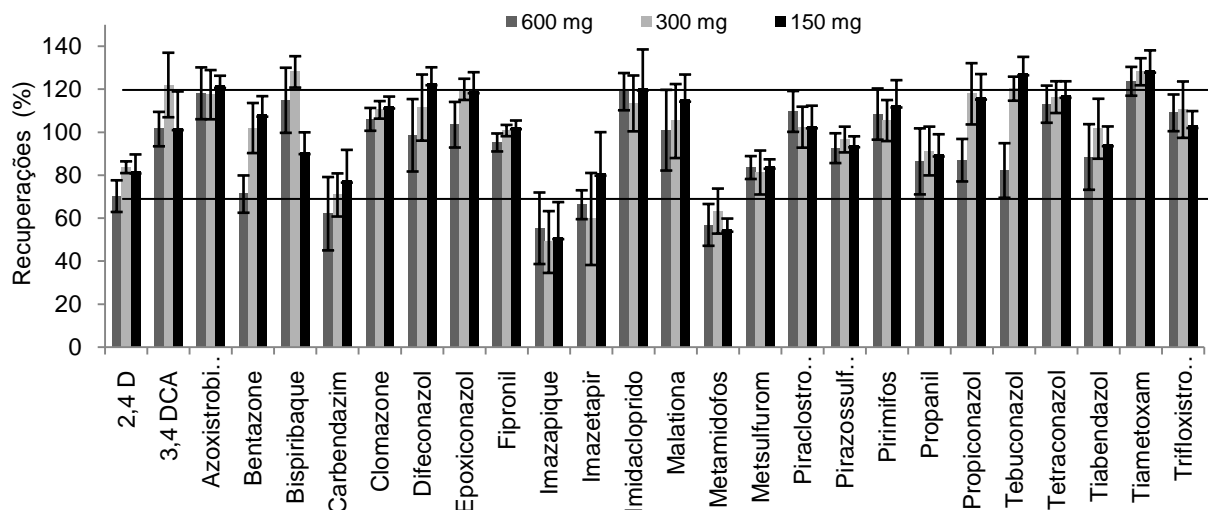


Figura 17. Efeito das quantidades de C18 empregadas na etapa de limpeza no método QuEChERS (Barras de erros indicam valores de RSD)

Georgakopoulos e colaboradores em 2011 otimizaram a quantidades de C18 na limpeza do extrato de alimentos infantis. Nesse trabalho os autores obtiveram as melhores recuperação com cerca de 200 mg de C18, sendo a quantidade de C18 diretamente relacionada a quantidade de gordura de cada amostra.

Além destes testes, também foi realizado um teste com amostras extraídas sem emprego da etapa de limpeza, mas alguns compostos, como bentazone, apresentaram alargamento e deformação do sinal cromatográfico, como ilustrado na Figura 18, comprovando a importância desta etapa, principalmente em amostras complexas, como alimentos.

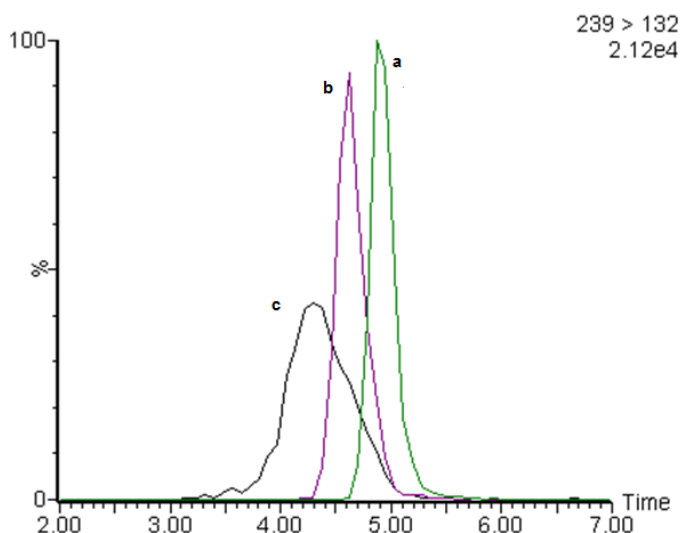


Figura 18. Cromatogramas do bentazone extraído pelo método QuEChERS, nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$: (a) solvente, (b) extrato da matriz com etapa de limpeza e (c) extrato da matriz sem etapa de limpeza.

4.3.3 Resfriamento

O resfriamento da amostra não apresentou nenhum efeito de melhora nas recuperações (Figura 19) e a amostra extraída logo após a fortificação apresentou melhores recuperações.

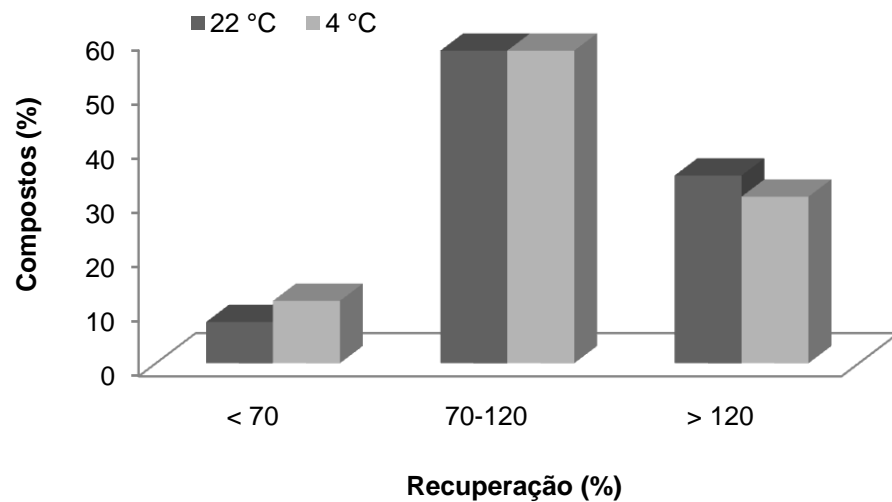


Figura 19. Recuperações em diferentes condições de fortificação, a frio e a temperatura ambiente

4.3.4 Tempo de fortificação

Na Figura 20 é observado que a extração logo após a fortificação apresentou maior numero de compostos dentro da faixa ótima de recuperação (70-120%). Portanto, esse foi o procedimento adotado para o método.

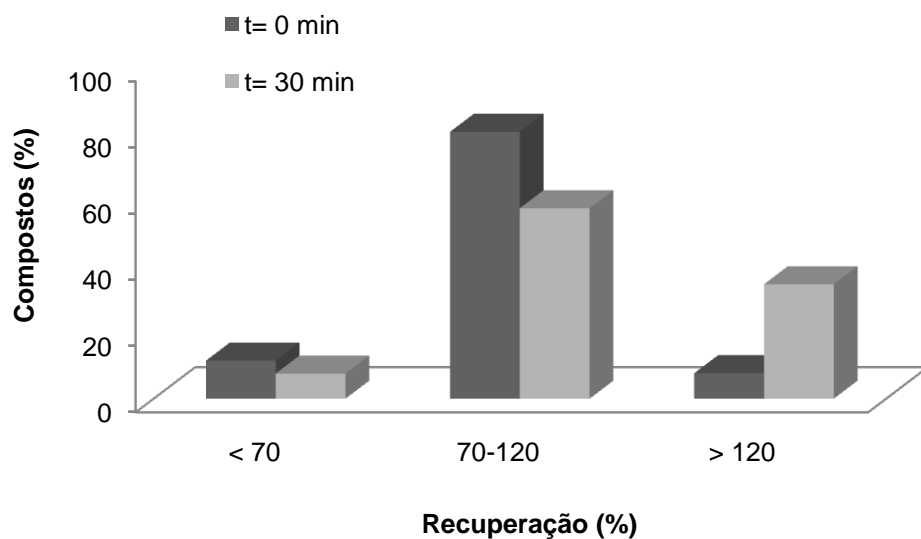


Figura 20 - Valores de recuperação obtidos após diferentes tempos de fortificação

4.4 Método de extração QuEChERS modificado

A partir dos testes realizados, e conforme os resultados apresentados, o procedimento de extração mais adequado para a validação do método proposto foi selecionado para a aplicação na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (Figura 21).

O método prevê uma etapa de extração com acetonitrila acidificada, seguida de uma etapa de partição com os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido. Uma faixa de pH entre 4 e 5, proporciona boas recuperações (> 70%) para pesticidas sensíveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles pesticidas sensíveis em meio alcalino (PRESTES *et al.*, 2009). Para não aumentar o número de etapas do método original, a adição dos reagentes que formam o tampão foi efetuada da seguinte forma: o ácido acético (1% v/v) foi adicionado à acetonitrila e o acetato de sódio foi adicionado no lugar de cloreto de sódio (LEHOTAY *et al.*, 2005b).

A etapa de limpeza foi realizada com 150 mg de C18 e 0,5 g de sulfato de magnésio.

4.5 Validação do método empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS

Os parâmetros para validação do método analítico utilizados nesse estudo foram: seletividade, curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária) (SANCO, 2012; INMETRO, 2010; ANVISA, 2003).

4.5.1 Seletividade

A análise por LC-ESI-MS/MS é considerada altamente seletiva (KOSTIAINEN *et al.*, 2009). A seletividade do método foi assegurada pela ausência de compostos com mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de retenção dos analitos avaliados em amostras branco da matriz (Figura 22).

Em nenhuma das matrizes foi verificado a presença de resíduos de agrotóxicos. Desta forma, as amostras de arroz avaliadas foram utilizadas para a confecção das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

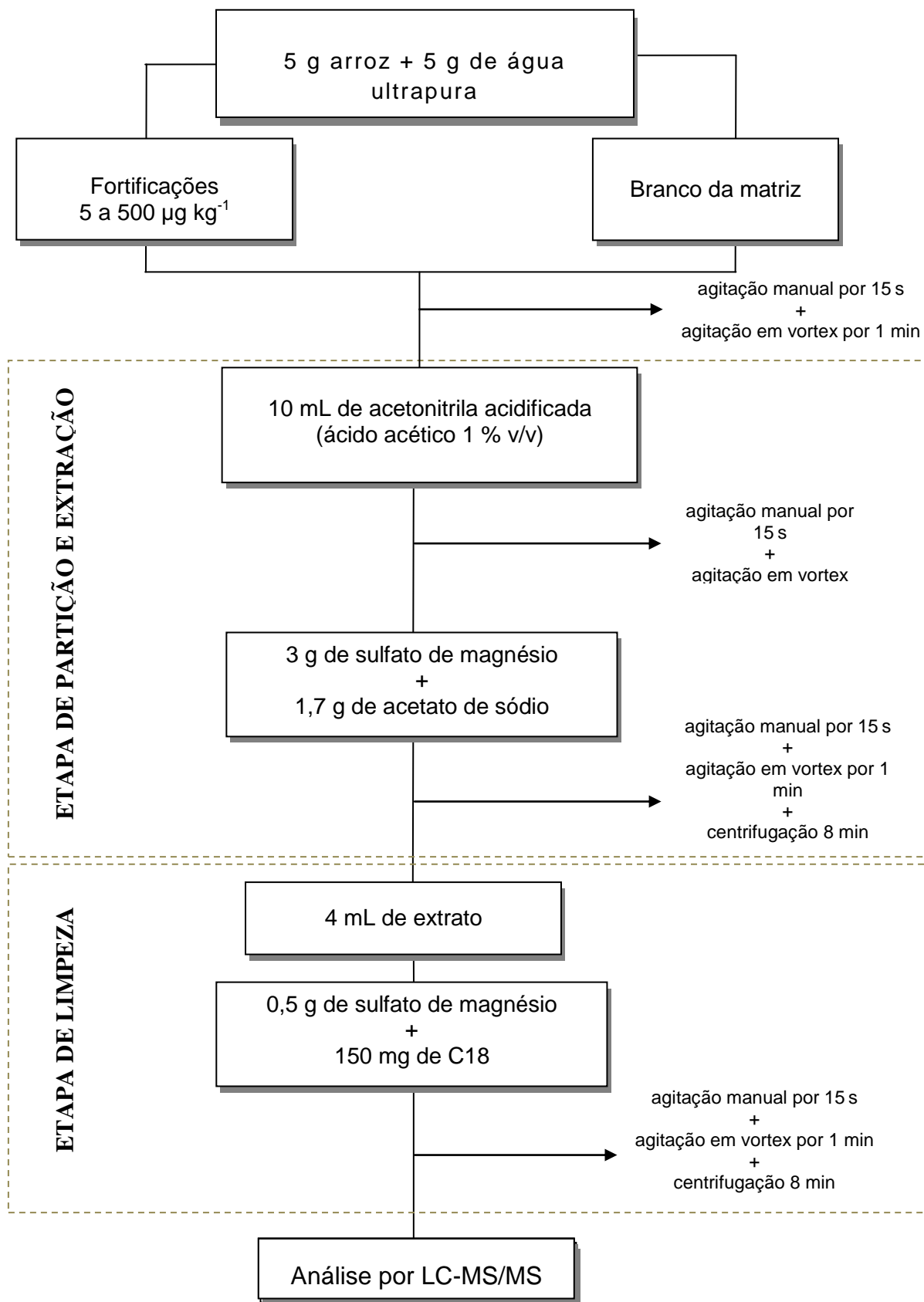


Figura 21 – Fluxograma do método QuEChERS otimizado

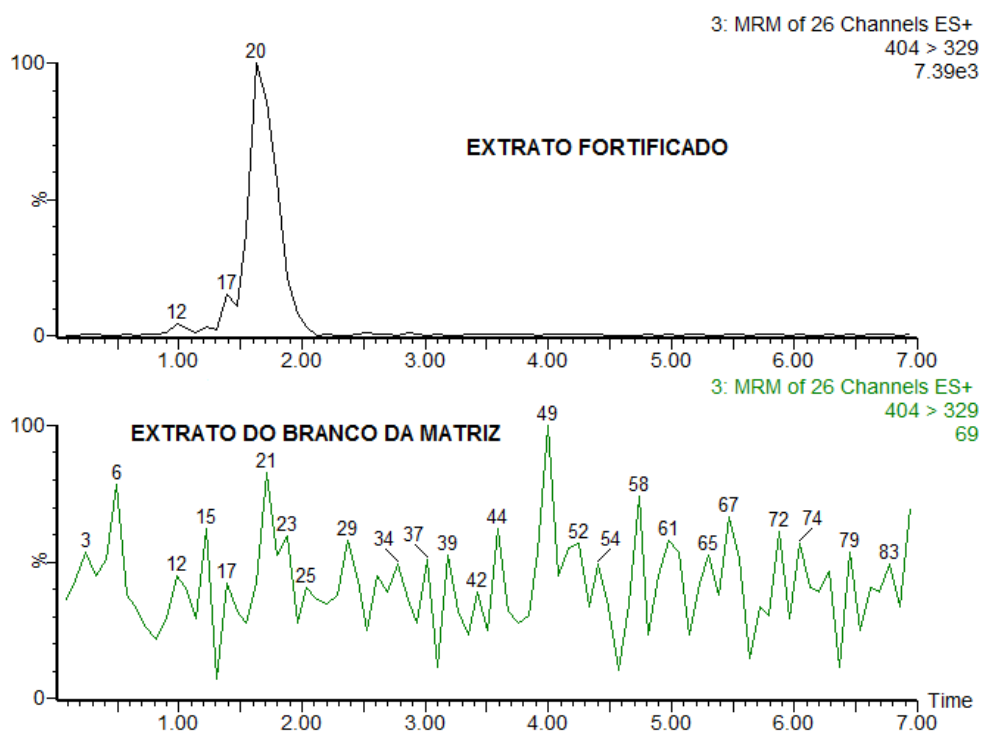


Figura 22. Cromatogramas do extrato da matriz fortificado e não fortificado (branco) para azoxistrobina

4.5.2 Curva Analítica e Linearidade

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas obtidas no LC-MS/MS é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. As curvas no solvente (linearidade do instrumento) apresentaram valores de r^2 superiores a 0,99. Aproximadamente 80% das curvas trabalho dos agrotóxicos apresentaram r^2 de no mínimo de 0,99 (linearidade do método) dentro da faixa de trabalho de 5 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Desta forma, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA (2003) e do INMETRO (2011).

4.5.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ

Os valores calculados dos LOD e LOQ estimados, tanto para o instrumento quanto para o método, foram calculados conforme o item 3.8.2. Os LOD_i e LOQ_i foram na faixa de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,0 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Estes valores foram estimados tanto nas soluções preparadas no solvente, como no extrato obtido a partir da matriz avaliada. O LOD_m e o LOQ_m foram calculados da mesma forma que para o instrumentos, porém a partir dos resultados da curva trabalho. Assim, os compostos apresentaram valores estimados de LOD_m e LOQ_m de 2,5 a 10 e 5 a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$,

respectivamente (Tabela 12). Todos os limites de quantificação estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela ANVISA, CODEX ALIMENTARIUS e pela União Européia, exceto o fipronil e o imazapique que tem limites superiores ao estabelecido pela União Européia, e no caso do fipronil também superior a ANVISA.

Tabela 12 - Limites de detecção e quantificação do instrumento e do método

Analitos	LODi	LOQi	LODm	LOQm	LMR		
					ANVISA	CODEX	EU
$\mu\text{g kg}^{-1}$							
2,4 D	0,1	5,0	2,5	10,0	200	100	50
3,4 DCA	2,5	10,0	5,0	20,0	-	-	-
Azoxistrobina	0,5	1,0	2,5	5,0	100	500	500
Bentazona	0,5	1,0	2,5	5,0	20	10	100
Bispiribaque	2,5	5,0	10,0	20,0	50	-	-
Carbendazim	2,5	5	2,5	10,0	50	2000	10
Clomazona	0,25	1,0	2,5	5,0	100	-	10
Difenoconazol	0,5	1,0	2,5	5,0	1000	*	50
Epoxiconazol	0,25	1,0	2,5	5,0	300	-	100
Fipronil	0,5	1	5,0	20,0	10	10	5
Imazapique	2,5	5,0	10,0	25,0	50	-	10
Imazetapir	2,5	5,0	10,0	20,0	50	-	-
Imidacloprido	2,5	5,0	2,5	10,0	50	*	50
Malationa	0,5	1,0	10,0	20,0	8000	*	8000
Metamidofos	5,0	10,0	5,0	10,0	-	*	10
Metsulfurom	2,5	5,0	5,0	10,0	20	-	50
Piraclostrobin	2,5	5,0	2,5	10,0	-	*	20
Pirazosulfurom	2,5	5,0	2,5	10,0	10	*	-
Pirimifos-metilico	0,5	1,0	5,0	10,0	10000	7000	5000
Propanil	2,5	5,0	10,0	20,0	2000	-	200
Propiconazol	2,5	5,0	2,5	10,0	100	*	50
Tebuconazol	0,5	1,0	2,5	5,0	100	*	2000
Tetraconazol	0,25	1,0	2,5	5,0	1000	-	50
Tiabendazol	0,5	1,0	5,0	10,0	200	*	50
Tiametoxam	2,5	5,0	10	20,0	1000	*	50
Trifloxistrobina	0,5	1,0	2,5	10,0	200	5000	20

4.5.4 Exatidão

A exatidão foi determinada em 3 níveis de fortificação, no LOQm, aproximadamente duas e dez vezes o LOQm, por exemplo, para 2,4 D foi avaliada a exatidão nos níveis 10, 20 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o LOQm para esse analito. Para azoxistrobina foi realizada a exatidão nos níveis de 5, 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o LOQm, os resultados estão na Tabela 13. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2012).

Tabela 13 - Percentuais de recuperação (exatidão) e RSD para a repetitividade do método de extração (n= 9)

Agrotóxicos	$\mu\text{g kg}^{-1}$	R (%)	RSDr	Agrotóxicos	$\mu\text{g kg}^{-1}$	R (%)	RSDr
2,4 D	10	124	7	Malationa	20	127	5
	20	81	7		50	105	7
	100	58	8		100	102	16
3,4 DCA	20	63	7	Metamidofós	10	128	16
	50	106	21		50	61	14
	100	107	14		100	98	14
Azoxistrobina	5	117	19	Metsulfuron- metílico	10	142	19
	10	77	15		50	112	19
	50	75	18		100	89	9
Bentazona	5	112	14	Piraclostrobina	10	70	11
	10	90	13		20	104	14
	50	100	11		100	71	7
Bispiribaque	20	101	13	Pirazossulfurom etílico	10	107	6
	50	104	22		20	115	14
	100	99	8		100	85	14
Carbendazim	10	65	10	Pirimifos- metílico	10	89	15
	20	65	12		20	98	20
	100	95	15		100	98	9
Clomazona	5	87	16	Propanil	20	117	6
	10	99	5		50	106	6
	50	101	3		100	105	12
Difeconazol	5	52	17	Propiconazol	10	111	12
	10	101	19		20	85	11
	50	77	15		100	82	6
Epoxiconazol	5	66	13	Tebuconazol	5	101	21
	10	84	13		10	97	19
	50	101	11		50	100	14
Fipronil	20	123	9	Tetraconazol	5	65	16
	50	116	8		10	114	17
	100	113	12		50	97	12
Imazapique	25	46	16	Tiabendazol	10	136	13
	50	64	5		20	105	26
	100	41	5		100	104	9
Imazetapir	20	114	12	Tiametoxam	20	93	16
	50	74	2		50	112	16
	100	118	14		100	95	19
Imidacloprido	10	75	3	Trifloxistrobina	10	92	14
	50	121	17		20	62	11
	100	117	10		100	80	19

4.5.5 Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária)

A precisão do método QuEChERS modificado foi avaliada em termos de repetitividade e de precisão intermediária, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA (2003). Os valores de RSDr e RSDpi são apresentados juntamente aos resultados de recuperação, nas Tabelas 13 e 14.

Os valores para o estudo da repetitividade e precisão intermediária dos agrotóxicos ficaram abaixo de 20% para a maioria dos compostos avaliados. Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (SANCO, 2012).

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2012). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos para a maioria dos compostos analisados.

Tabela 14 - Percentuais de recuperação (R%) e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 100 µg kg⁻¹ (n=9)

Analitos	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	R%	RSDi	R%	RSDi	R%	RSDi
2,4 D	82	8	62	10	68	15
3,4 DCA	103	17	121	10	130	10
Azoxistrobina	122	5	91	15	157	7
Bentazona	108	8	83	8	77	12
Bispiribaque	91	9	41	9	106	24
Carbendazim	78	14	76	7	95	22
Clomazona	112	5	83	4	116	4
Difenoconazol	123	7	75	3	117	8
Epoxiconazol	119	9	89	7	120	8
Fipronil	102	3	85	11	100	3
Imazapic	51	22	37	11	53	14
Imazetapir	81	19	56	13	81	22
Imidacloprido	120	20	68	9	122	16
Malationa	115	12	87	12	118	15
Metamidofós	55	5	78	15	65	34
Metsulfurom	84	3	73	11	85	4
Piraclostrobina	103	10	105	12	107	10
Pirazossulfurom	94	4	76	7	94	4
Pirimifos	112	12	95	13	111	15
Propanil	90	9	74	12	97	19
Propiconazol	116	11	82	12	108	9
Tebuconazol	127	8	68	5	113	16
Tetraconazol	117	7	68	7	125	8
Tiabendazol	94	8	81	6	108	15
Trifloxistrobina	103	7	92	9	111	13
Tiametoxam	82	8	115	16	129	14

4.5.6. Efeito Matriz

Através da inclinação das curvas de calibração na matriz e no solvente foram determinados o efeito matriz para cada analito (Figura 23 a 48). O efeito matriz foi diferente para cada analito, sendo observado tanto supressão como enriquecimento. Alguns compostos não apresentam efeito matriz, como pode ser observado para os compostos epoxiconazol (Figura 31), metsulfurom-metílico (Figura 37), pirimifós-metílico (Figura 41.) e tetraconazol (Figura 45); onde pode ser observado que as curvas analíticas ficaram totalmente sobrepostas, mostrando que não há diferença na inclinação da reta quando a curva é preparada em acetonitrila e a quando a curva é preparada com o extrato branco da matriz.

Além do cálculo do efeito matriz na faixa linear de cada analito, um estudo para verificação do efeito matriz em faixas lineares mais próximas do LOQ foi realizado. O 2,4 D apresentou enriquecimento de sinal com efeito matriz de 16%, no entanto quanto menor a concentração ($5\text{-}100\ \mu\text{g L}^{-1}$) o efeito aumenta chegando a 28% (Figura 23).

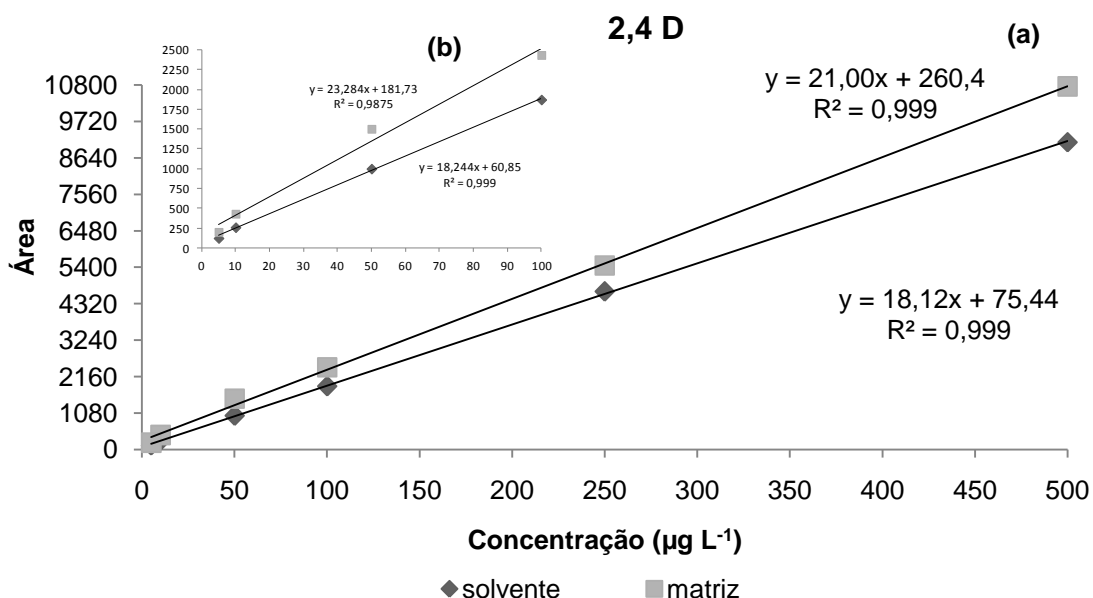


Figura 23 - Curvas no solvente e na matriz para 2,4 D na faixa de $5\text{-}500\ \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de $5\text{-}100\ \mu\text{g L}^{-1}$ (b)

O efeito matriz para o 3,4 DCA foi de 61% de enriquecimento na faixa de trabalho até $500\ \mu\text{g L}^{-1}$. Esse alto valor de efeito matriz é influenciado pela faixa mais alta de concentração, pois nas concentrações menores (na faixa de $10\text{-}100\ \mu\text{g L}^{-1}$) o efeito é bastante reduzido ocorrendo supressão de 14% (Figura 24).

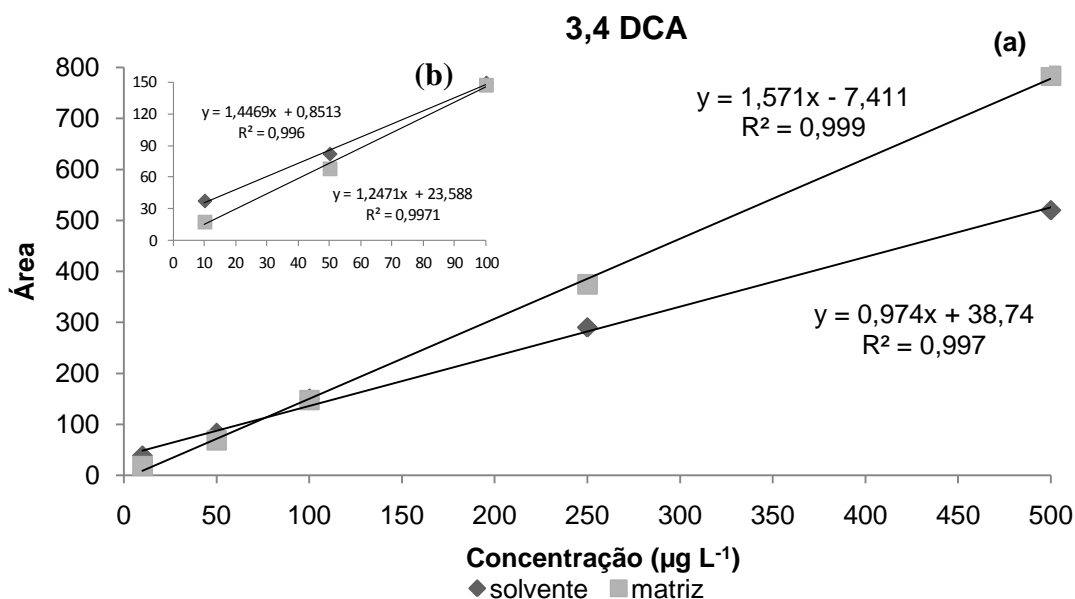


Figura 24 - Curvas no solvente e na matriz para o 3,4 DCA na faixa de 10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

O efeito matriz para azoxistrobina foi baixo e não variou acentuadamente com a concentração. Ocorreu supressão de 7% (10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 10% (10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 25). O mesmo efeito foi encontrado por Rodrigues e colaboradores em 2011 para determinação desse agrotóxico em cebola. Lehotay e colaboradores encontraram uma variação de 10% de supressão a 15% de enriquecimento para azoxistrobina em diferentes frutas, utilizando diferentes modificações do método QuEChERS (Lehotay *et al.*, 2010a)

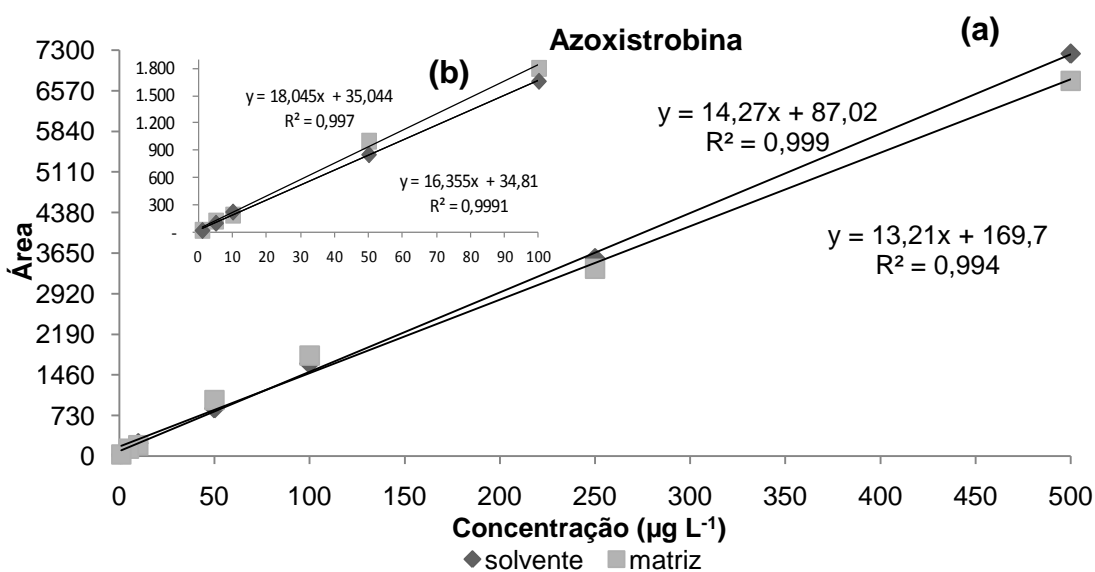


Figura 25 - Curvas no solvente e na matriz para o azoxistrobina na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Bentazone apresentou efeito matriz baixo, 12% de enriquecimento, apresentando o mesmo valor em toda faixa de concentração (Figura 26).

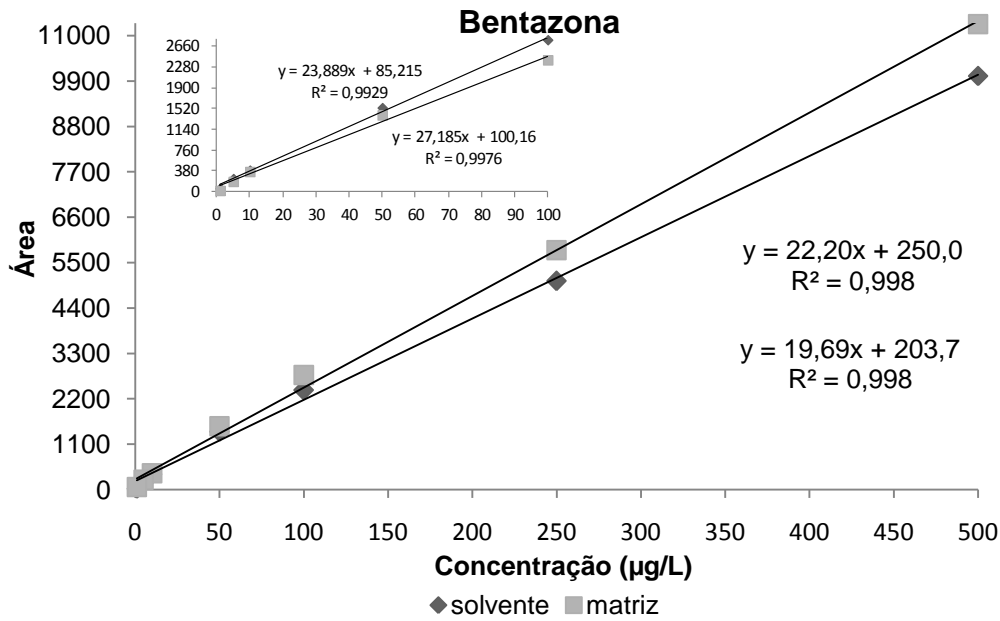


Figura 26 - Curvas no solvente e na matriz para o bentazona na faixa de 1-500 µg L⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 µg L⁻¹ (b)

Bispiribaque-sódico apresentou enriquecimento de 18% (5-500 µg L⁻¹), o qual foi acentuado para 49% nas concentrações menores (5-100 µg L⁻¹) (Figura 27).

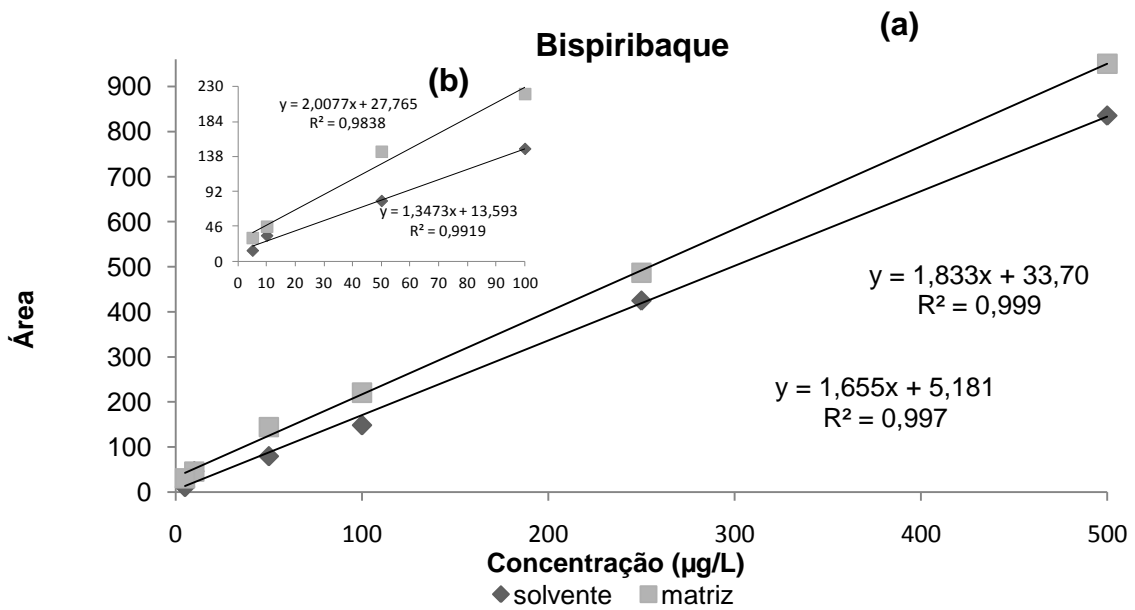


Figura 27 - Curvas no solvente e na matriz para o bispiribaque-sódico na faixa de 5-500 µg L⁻¹ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 µg L⁻¹ (b)

Para o carbendazim ocorreu supressão de 25% e 57% nas faixas de 5-500 e 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 28). Krueve e colaboradores em 2008 encontraram supressão de 20 % para esse composto em frutas e vegetais.

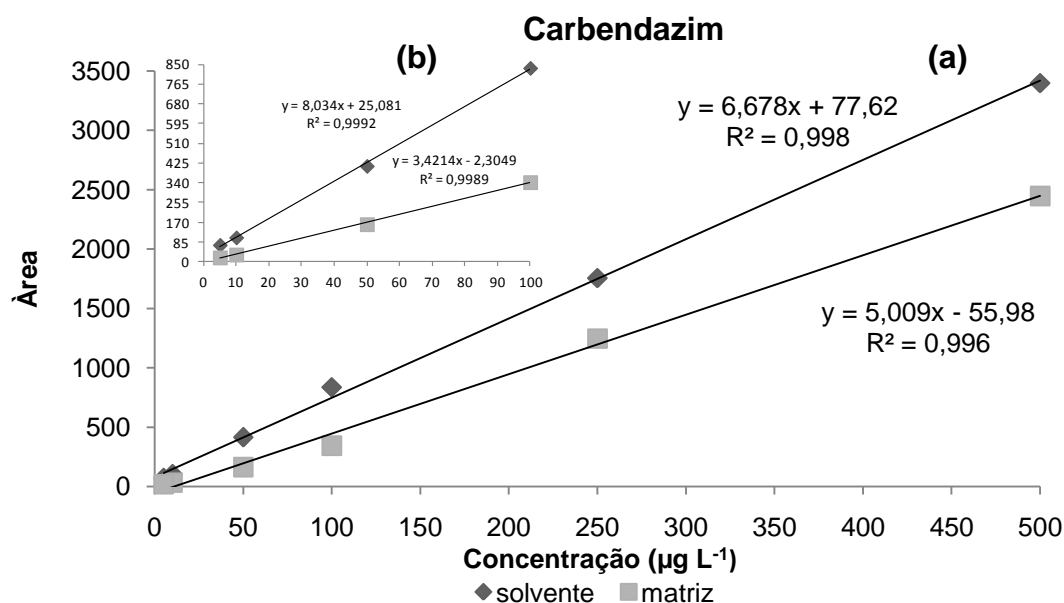


Figura 28 - Curvas no solvente e na matriz para carbendazim na faixa de até 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Clomazona apresentou supressão de 18% sendo um pouco acentuado (23%) na faixa de concentração (1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 29).

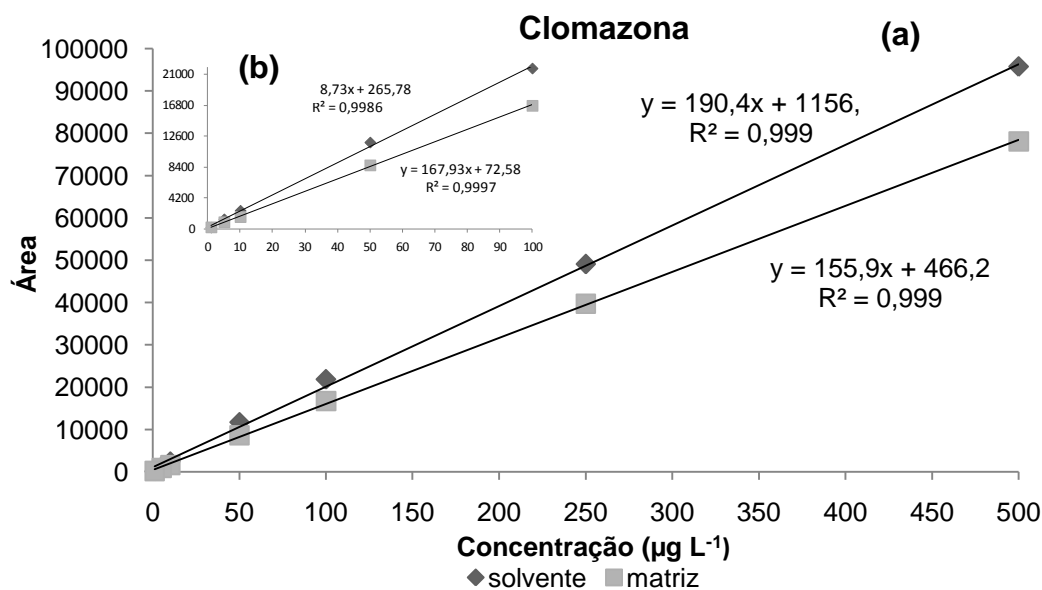


Figura 29 - Curvas no solvente e na matriz para clomazona na faixa de até 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

O efeito matriz para o difenoconazol foi baixo com supressão de apenas 4% (1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 9% (1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 30).

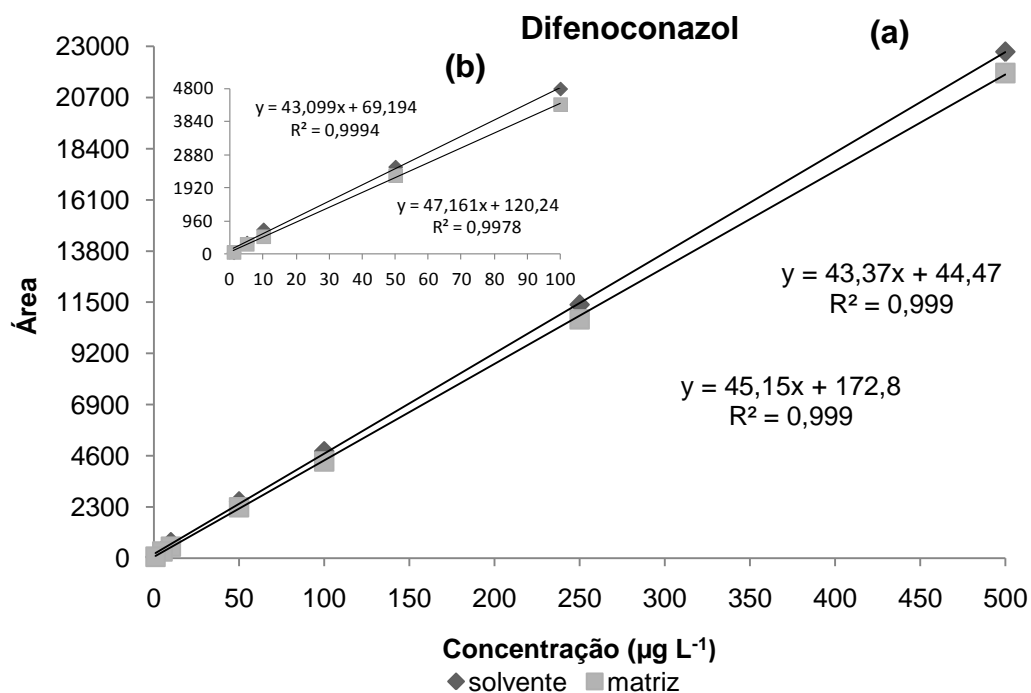


Figura 30 – Curvas no solvente e na matriz para difenoconazol na faixa até 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Epoxiconazol não apresentou efeito matriz ocorrendo supressão de apenas 3%, sendo que na faixa de (1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) a supressão aumentou para 12% (Figura 31).

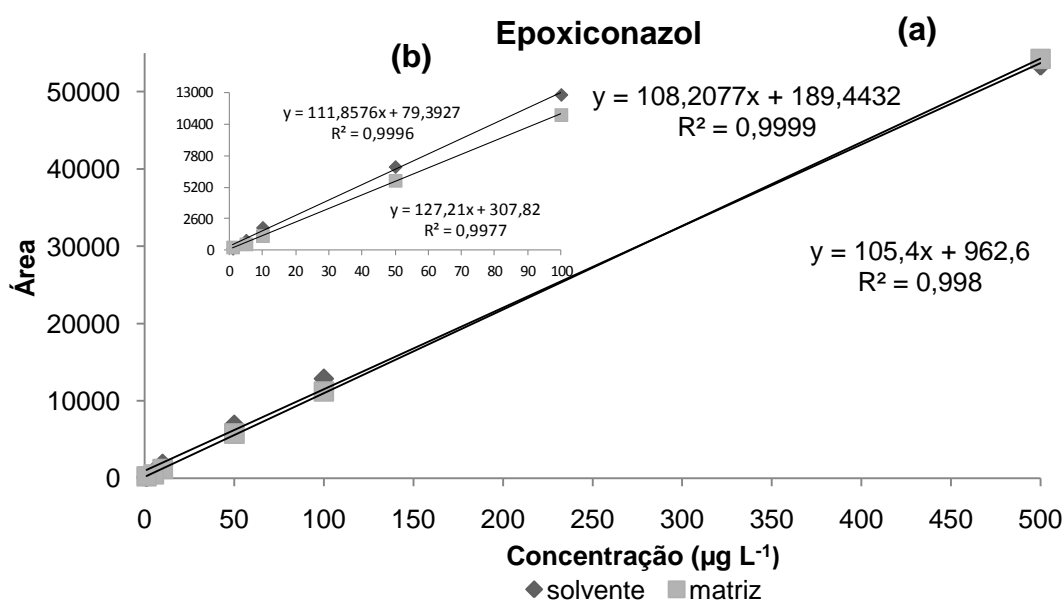


Figura 31 - Curvas no solvente e na matriz para epoxiconazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Fipronil apresentou 10% de supressão na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5% na faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 32).

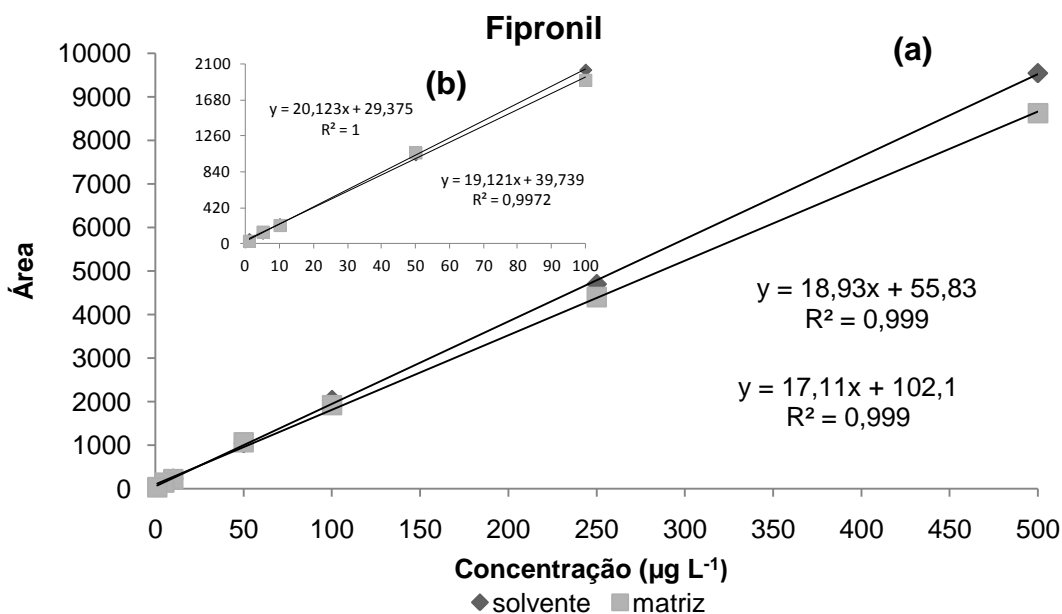


Figura 32 - Curvas no solvente e na matriz para fipronil na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Para o imazapique a supressão foi mantida em 16% em toda faixa de concentração (Figura 33).

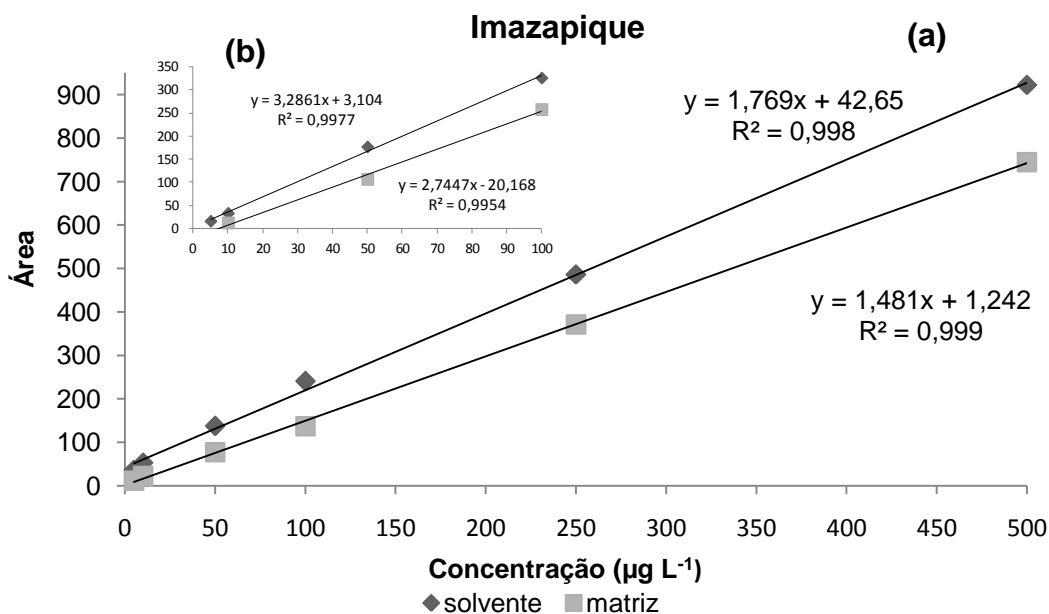


Figura 33 - Curvas no solvente e na matriz para imazapique na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Imazetapir apresentou 4% de supressão na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$, no entanto na faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a supressão aumentou para 38% (Figura 34).

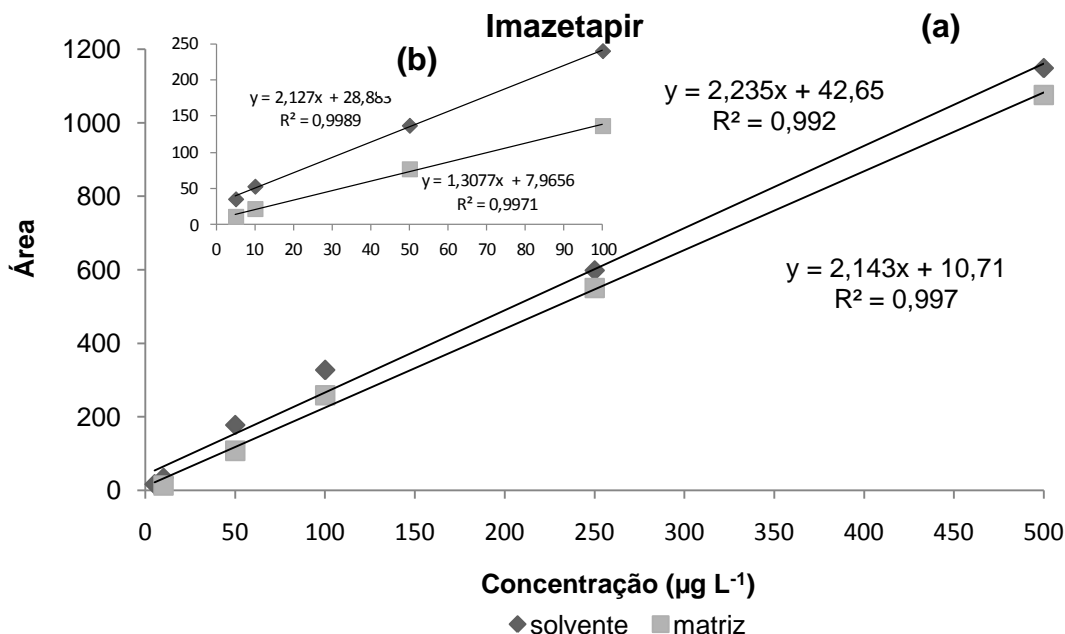


Figura 34 - Curvas no solvente e na matriz para imazetapir na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Imidacloprido apresentou supressão de 41% (5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$), sendo reduzida a 16% (5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 35). Lehotay e colaboradores em 2010 encontraram supressão de 5 a 50% na determinação de imidacloprido em diferentes frutas (Lehotay *et al.*, 2010a).

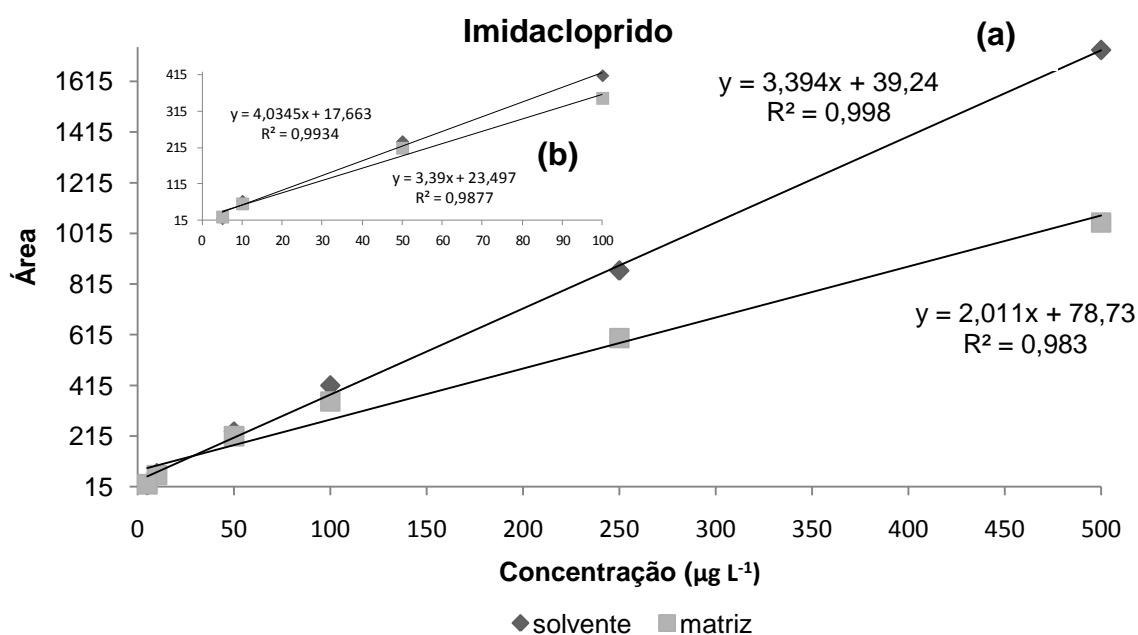


Figura 35 - Curvas no solvente e na matriz para imidacloprido na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Malationa apresentou supressão de 9% e 4% na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 36).

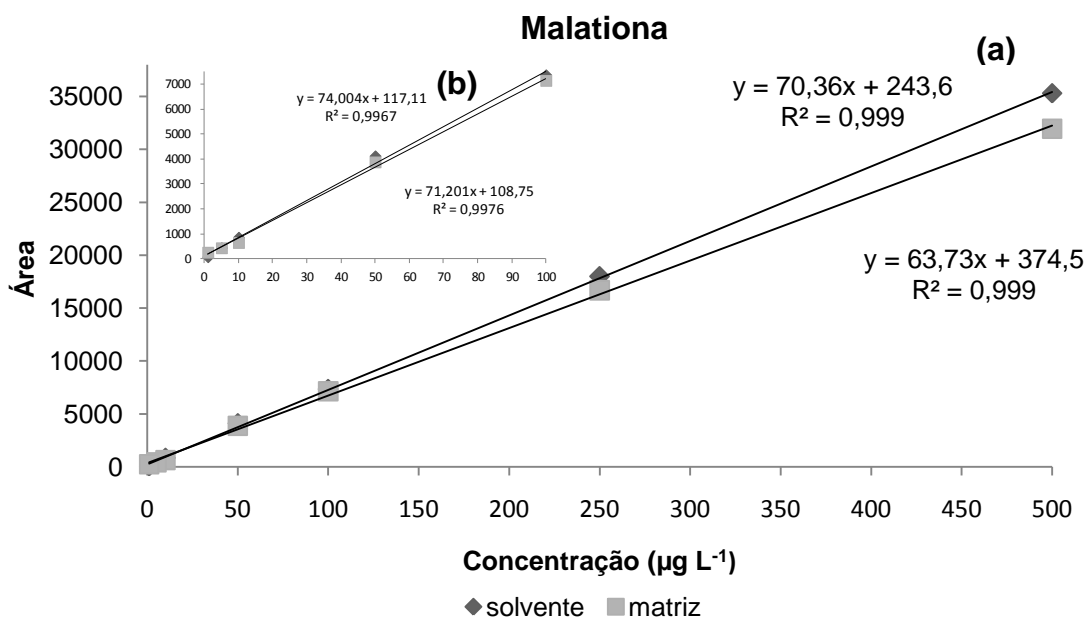


Figura 36 - Curvas no solvente e na matriz para malationa na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Metamidofós apresentou efeito matriz alto com supressão de 57 e 72%, nas faixas de 10-500 e 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 37). Lehotay e colaboradores encontraram efeito de supressão de 40% a zero para esse agrotóxico em diferentes frutas (Lehotay *et al.*, 2010a).

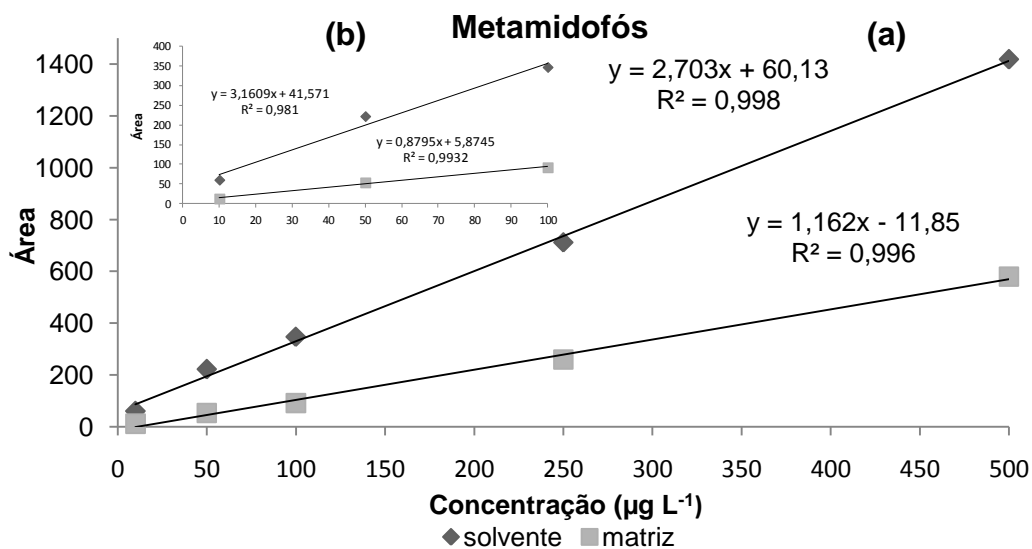


Figura 37 - Curvas no solvente e na matriz para metamidofós na faixa de 10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Metsulfurom-metilico não apresentou efeito matriz, a supressão foi menor que 1% em toda faixa de concentração (Figura 38).

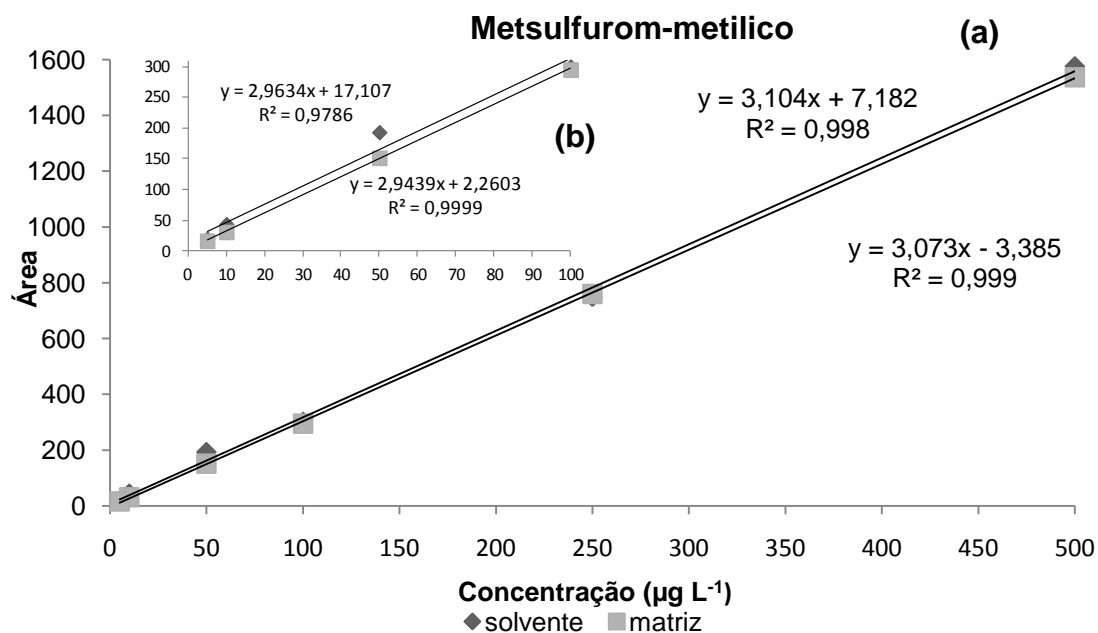


Figura 38 - Curvas no solvente e na matriz para metsulfurom-metilico na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Piraclostrobina apresentou baixo efeito matriz, supressão de 13% (1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 6% (1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 39).

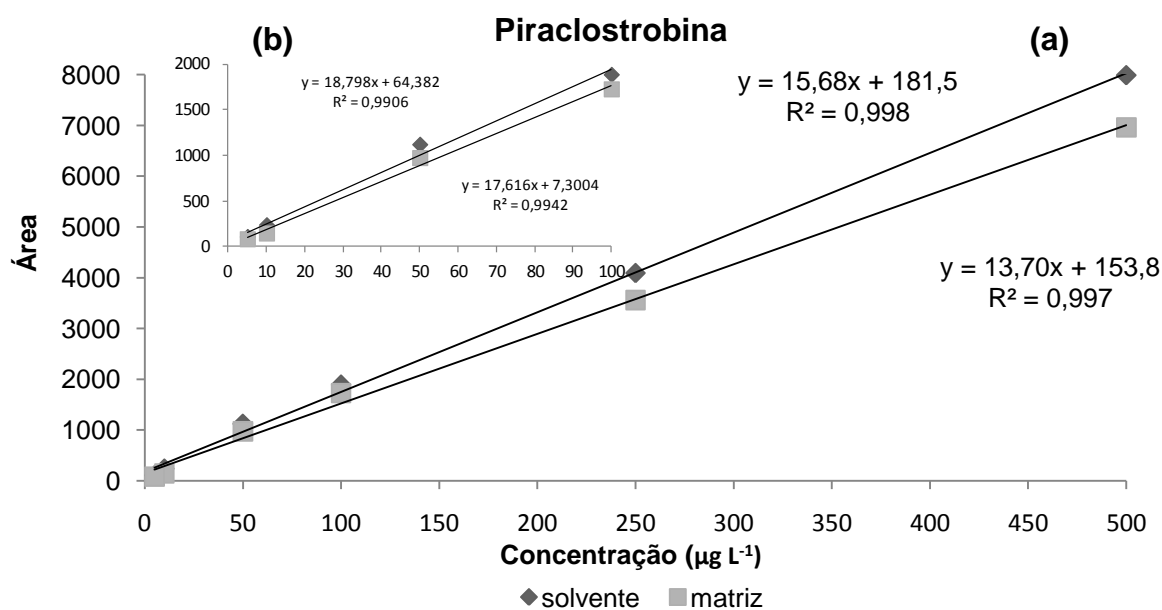


Figura 39 - Curvas no solvente e na matriz para piraclostrobina na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Pirazossulfurom apresentou enriquecimento de 23% e 36% nas faixas de 10-500 e 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 40).

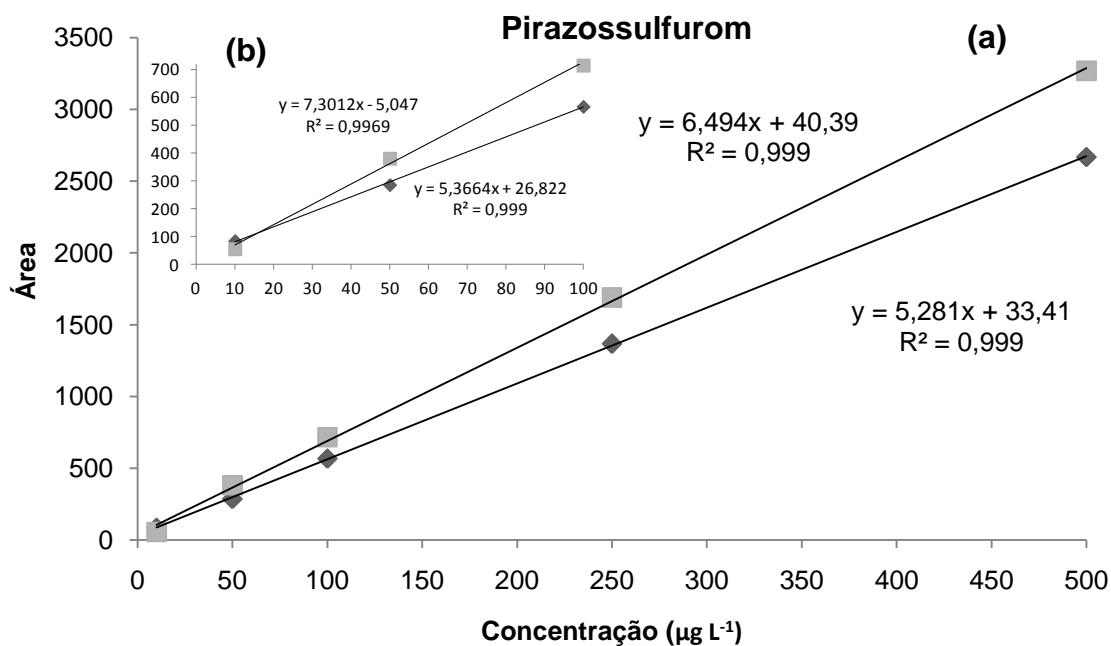


Figura 40 - Curvas no solvente e na matriz para pirazossulfurom na faixa de 10-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Como observado na Figura 41, pirimifós-metilico não apresentou efeito matriz. Tendo apenas 1% de supressão na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4% na faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

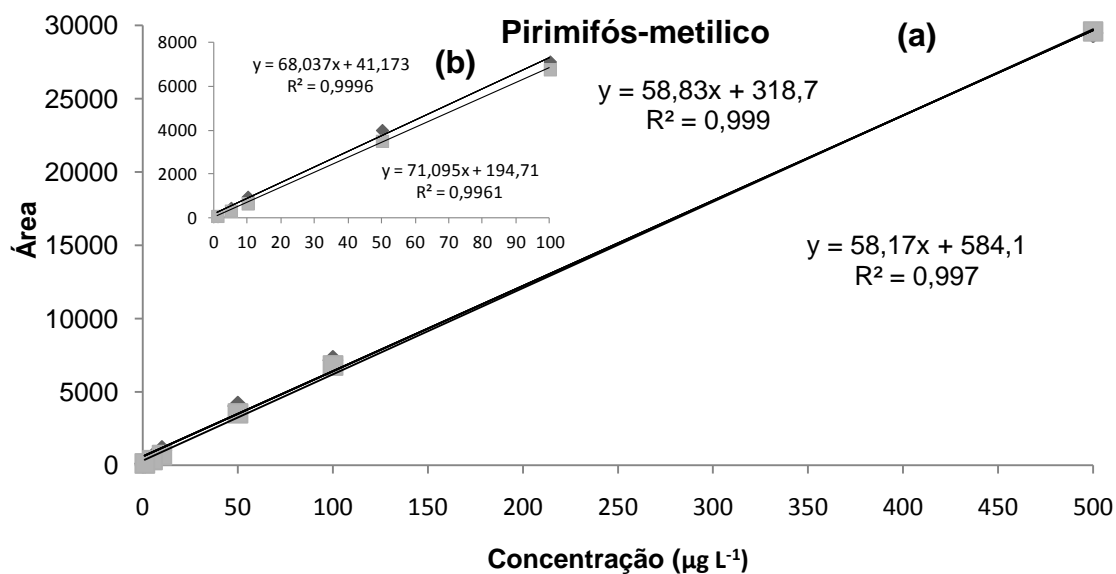


Figura 41 - Curvas no solvente e na matriz para pirimifós-metilico na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Propanil apresentou baixo efeito matriz, 5 e 3,5 % de supressão nas faixas de 5-500 e 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 42).

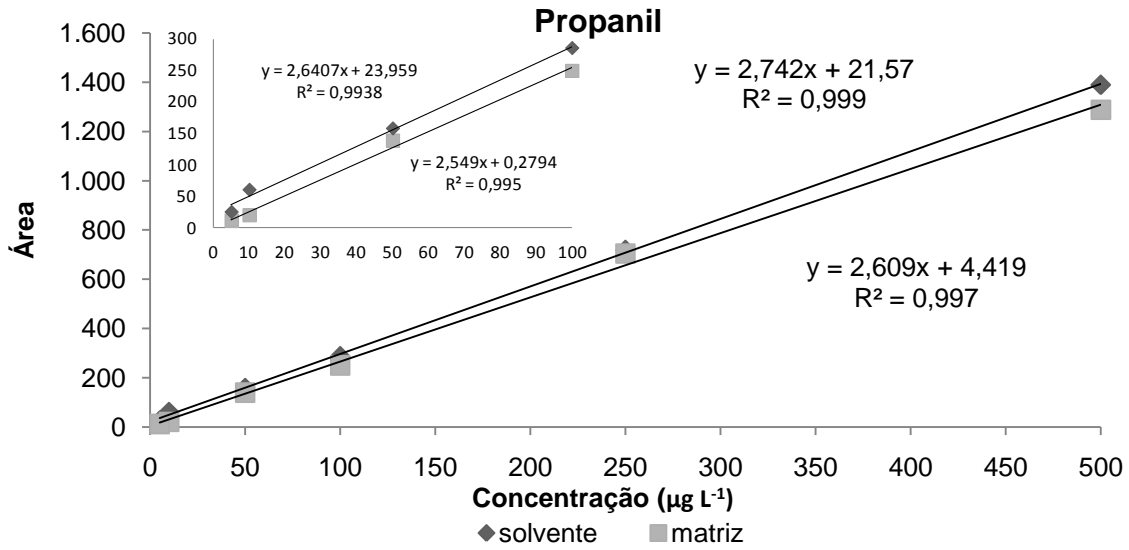


Figura 42 - Curvas no solvente e na matriz para propanil na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Propiconazol apresentou supressão de 7 e 14% nas faixas de 5-500 e 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 43).

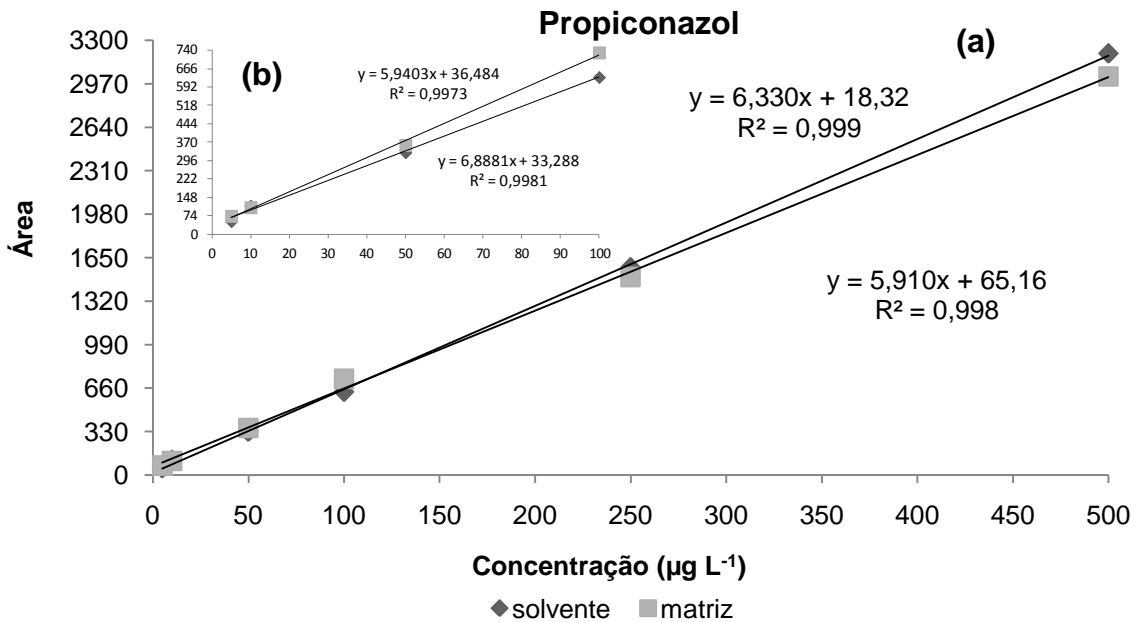


Figura 43 - Curvas no solvente e na matriz para propiconazol na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

O tebuconazol apresentou supressão de apenas 4% em toda faixa de concentração (Figura 44).

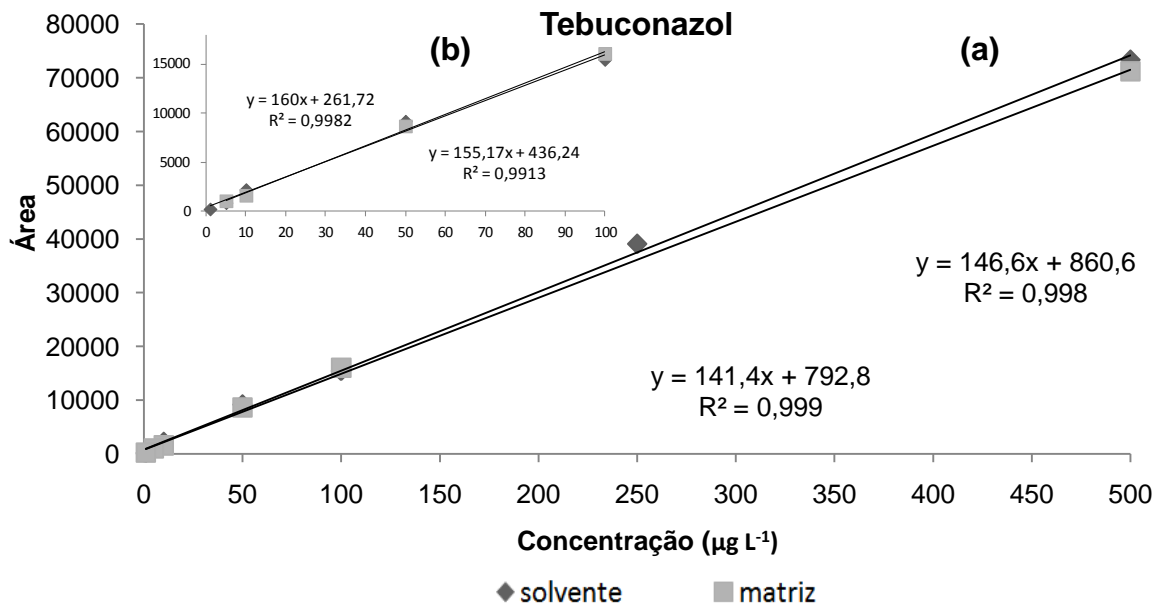


Figura 44 - Curvas no solvente e na matriz para tebuconazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Para o tetraconazol ocorreu supressão de 16% somente nas concentrações mais baixas na faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, no entanto considerando toda faixa de trabalho pode ser observada a sobreposição das curvas analíticas, mostrando que não há efeito matriz para esse composto (Figura 45).

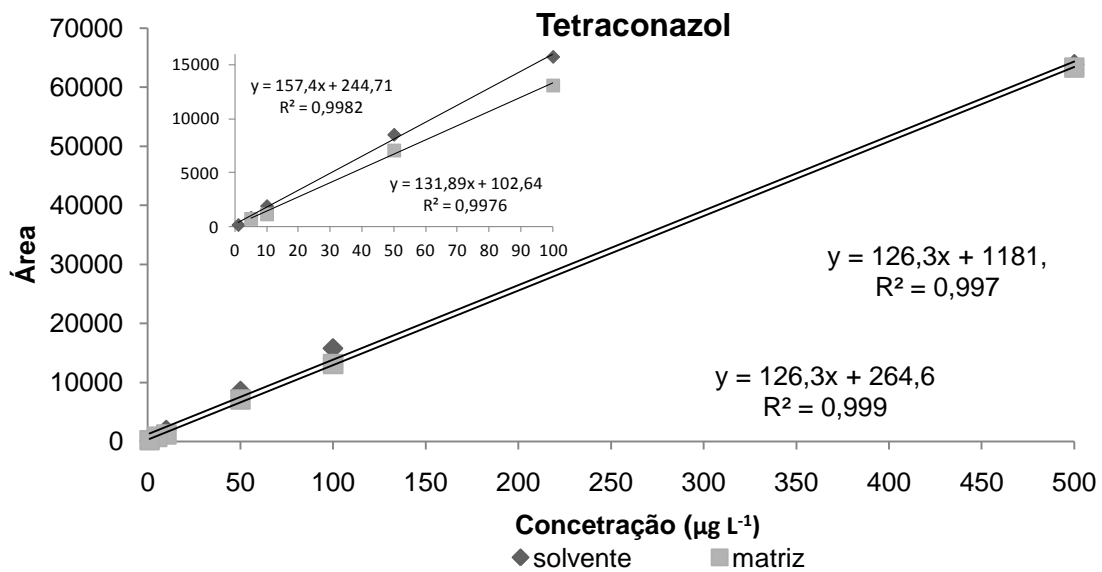


Figura 45 - Curvas no solvente e na matriz para tetraconazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Tiabendazol apresentou supressão de 23% e 50% nas faixas de 1-500 e 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 46). Krueve e colaboradores em 2008 encontraram supressão de 10% para tiabendazol em frutas e vegetais. Lehotay e colaboradores encontraram efeito de supressão de 10 a 50% para esse agrotóxico em diferentes frutas (Lehotay *et al.*, 2010a).

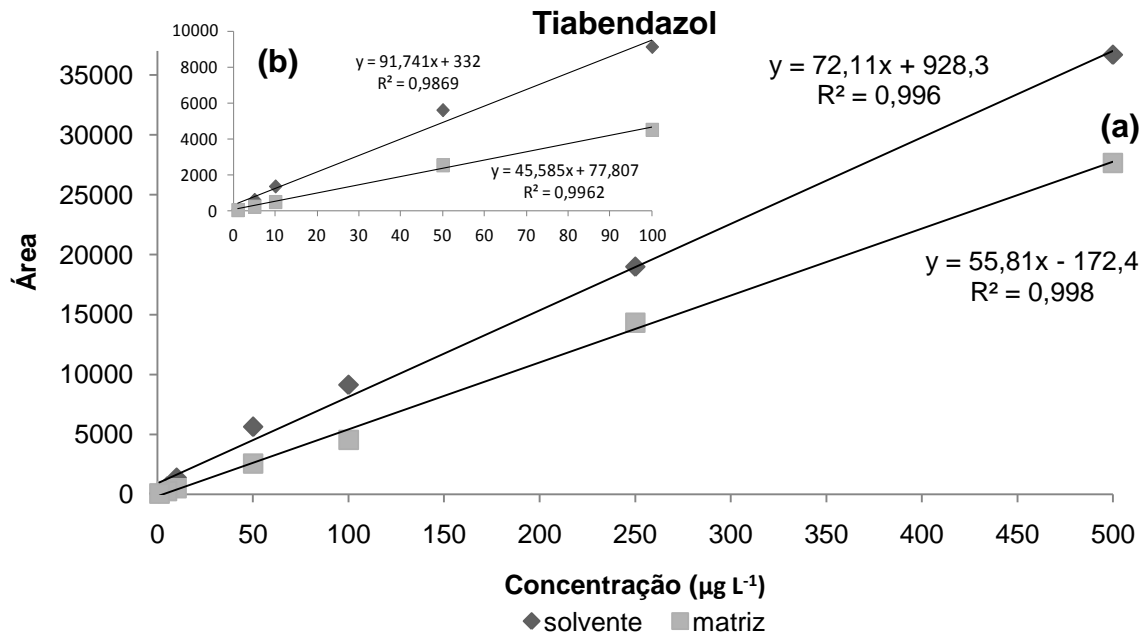


Figura 46- Curvas no solvente e na matriz para tiabendazol na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Tiametoxam também apresenta alto efeito de matriz 41% e 63% de supressão nas faixas de 5-500 e 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 47).

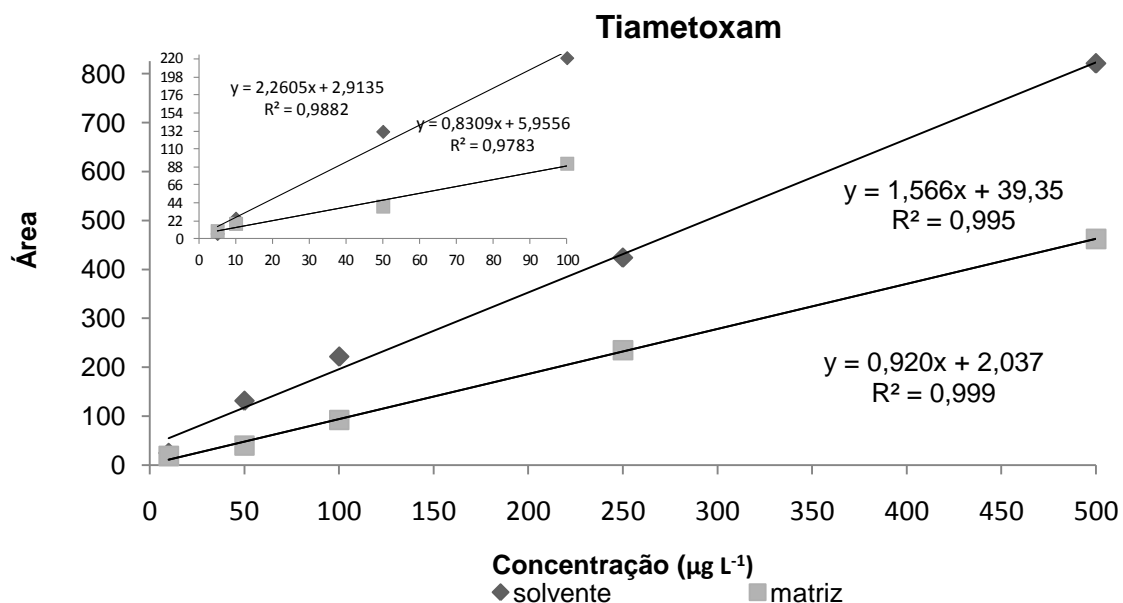


Figura 47 - Curvas no solvente e na matriz para tiametoxam na faixa de 5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Trifloxistrobina apresentou supressão de 17% e 32% nas faixas de 1-500 e 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 48).

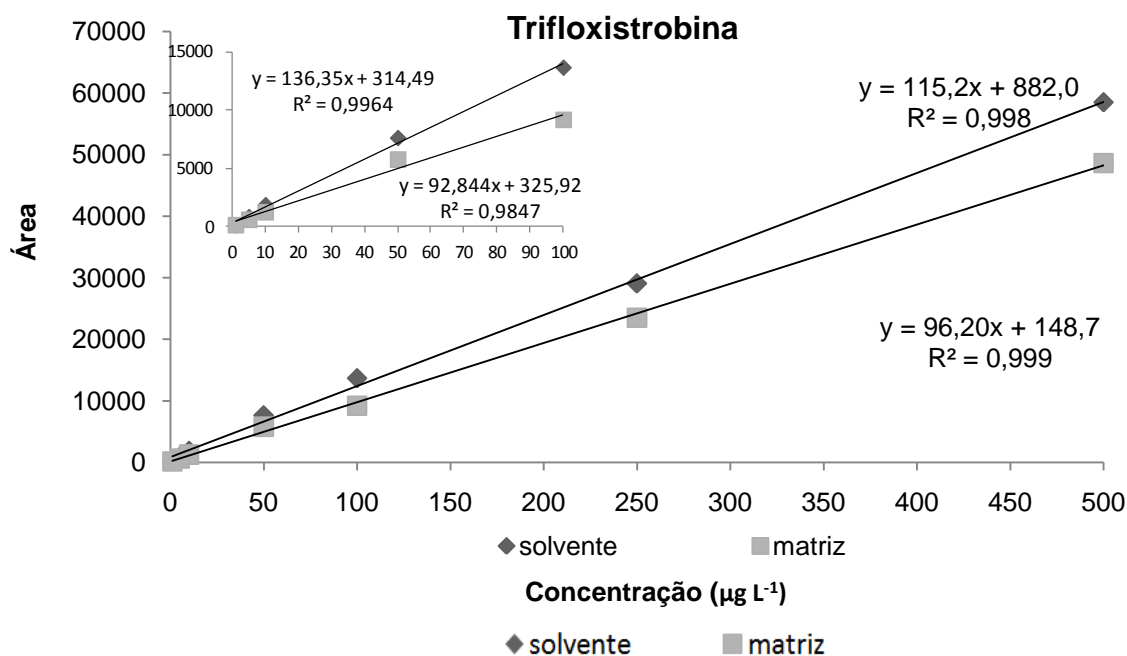


Figura 48 - Curvas no solvente e na matriz para trifloxistrobina na faixa de 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e um destaque para a faixa de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b)

Tabela 15 – Efeito matriz calculado através dos coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz

Analito	Coeficientes angulares			Analito	Coeficientes angulares		
	solvente	extrato	% EM		solvente	extrato	% EM
2,4 D	18,12	21,01	16	Malationa	70,363	63,738	-9
3,4 DCA	0,97	1,57	61	Metamidofos	2,703	1,163	-57
Azoxistrobina	14,27	13,21	-7	Metsulfurom	3,104	3,074	-1
Bentazona	19,70	22,21	13	Piraclostrobina	15,688	13,702	-13
Bispiribaque	1,66	1,83	11	Pirazossulfurom	5,281	6,494	23
Carbendazim	6,68	5,01	-25	Pirimifos	58,830	58,179	-1
Clomazona	190,41	155,97	-18	Propanil	2,742	2,609	-5
Difenoconazol	45,16	43,37	-4	Propiconazol	6,331	5,910	-7
Epoxiconazol	108,21	105,49	-3	Tebuconazol	146,610	141,410	-4
Fipronil	18,93	17,12	-10	Tetraconazol	126,340	126,330	0
Imazapique	1,77	1,48	-16	Tiabendazol	72,490	55,818	-23
Imazetapir	2,24	2,14	-4	Tiametoxam	1,567	0,921	-41
Imidacloprido	3,39	2,01	-41	Trifloxistrobina	115,290	96,205	-17

Para maioria dos analitos (81%) ocorreu supressão como pode ser observado na Figura 46. Somente 5 dos 26 analitos apresentaram enriquecimento, sendo a maioria desses os que foram analisados no modo de ionização negativo, semelhante ao comportamento observado por Kittlaus e colaboradores em 2012. Os resultados obtidos corroboram também com os encontrados na maioria das determinações utilizando LC-ESI-MS/MS, como em Krueve e colaboradores em 2008, onde cerca de 80% de supressão foi determinado para os agrotóxicos analisados em diferentes frutas e vegetais. Pareja e colaboradores encontram 90% dos analitos com supressão na análise por LC-ESI-MS/MS e QuEChERS em arroz (PAREJO *et al*, 2011b).

A maioria dos analitos (70%) apresentaram efeito matriz baixo (menor que 20%). Mesmo assim para maior confiabilidade dos resultados e para compensar o efeito de matriz foi realizada a calibração externa com o extrato branco da matriz correspondente (superposição da matriz) de acordo com o recomendado em SANCO, 2012.

Pode se observar também a importância do cálculo do efeito matriz através da curva de calibração, pois como pode ser observado, o efeito matriz pode apresentar diferença quando calculado em concentrações altas e do que quando calculado em concentrações baixas; e o uso da calculo utilizando a inclinação da curva ajuda a minimizar essas diferenças e dar um valor médio de efeito para todas as faixas de concentração.

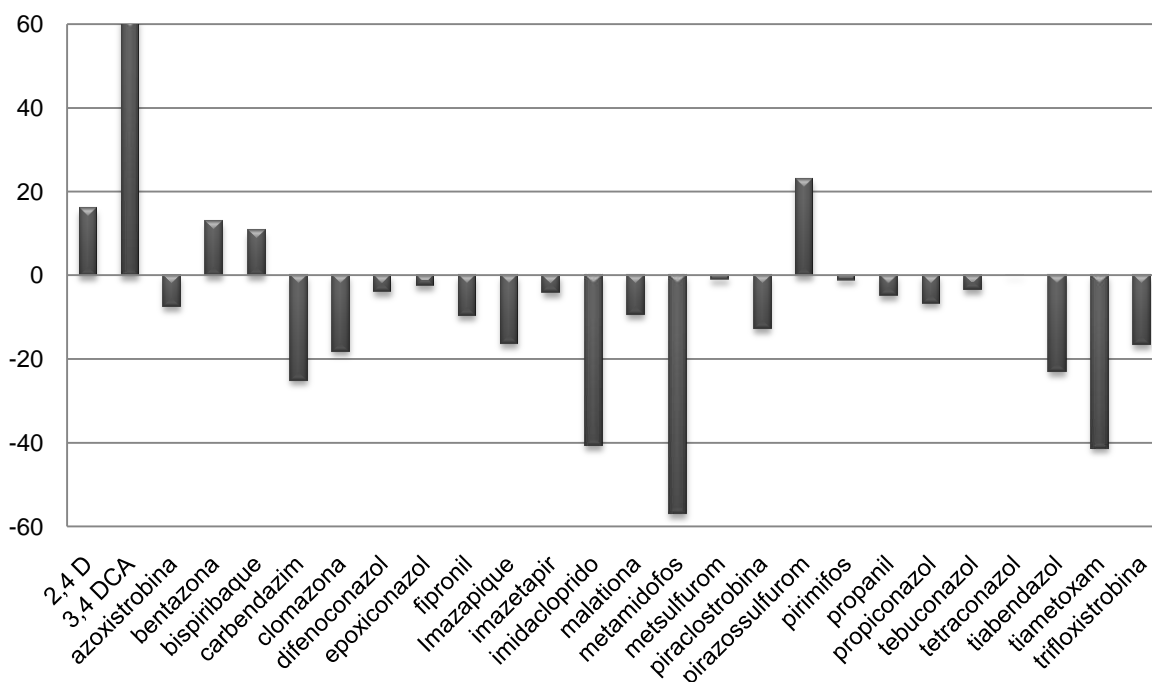


Figura 49 - Efeito matriz para cada um dos analitos analisados, calculado através dos coeficientes angulares das curvas de calibração.

4.6. Robustez do método quanto a matriz

A Tabela 17 mostra os valores de recuperação e desvio padrão relativo para os quatro tipos de arroz. O resultado demonstra que o método pode ser aplicado para determinação de agrotóxicos em outros tipos de arroz, além do arroz branco o qual foi usado para toda validação do método.

Tabela 16 - Robustez do método utilizando arroz vermelho, integral, cateto e branco num nível de fortificação de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (n= 9)

Analitos	Tipos de Arroz							
	Vermelho		Integral		Cateto		Branco	
	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD
2,4 D	54	5	50	3	48	2	82	8
3,4 DCA	84	14	108	11	109	15	103	17
Azoxistrobina	84	6	94	12	104	5	122	5
Bentazone	77	7	84	7	81	9	108	8
Bispiribaque	109	4	107	5	81	10	91	9
Carbendazim	76	7	75	15	98	10	78	14
Clomazone	94	2	77	2	108	1	112	5
Difenoconazol	101	12	99	13	116	11	123	7
Epoxiconazole	84	6	97	7	104	11	119	9
Fipronil	75	12	120	11	105	12	102	3
Imazapique	38	11	52	9	47	4	51	22
Imazetapir	54	9	73	7	64	4	81	19
Imidacloprido	69	15	94	8	89	8	120	20
Malationa	93	12	95	15	90	15	115	12
Metamidofos	83	11	83	13	88	12	55	5
Metsulfurom	73	4	84	9	84	10	84	3
Piraclostrobina	78	13	104	12	111	11	103	9
Pirazossulfurom	86	13	97	12	90	10	94	4
Pirimifos-metílico	85	13	96	14	97	8	112	12
Propanil	86	11	95	18	94	8	90	9
Propiconazol	70	5	101	10	98	13	116	11
Tebuconazole	73	5	105	8	99	8	127	8
Tetraconazole	83	8	93	7	91	5	117	7
Tiabendazol	77	9	88	6	99	6	94	8
Tiametoxam	112	16	96	21	116	10	98	13
Trifloxistrobin	81	10	93	10	111	9	103	7

CONCLUSÃO

A maioria dos analitos obteve valores de recuperação dentro da faixa de 70 a 120%, e desvio padrão relativo menor que 20% em todos os tipos de arroz testados. Desta forma, é possível concluir que o método é robusto quanto a matriz e assim pode ser aplicado para diferentes tipos de arroz.

Os limites de quantificação do método foram menores que os limites máximos de resíduos permitidos no arroz definidos pela legislação brasileira, ANVISA e do CODEX *alimentarius*.

A avaliação de diferentes materiais sorventes permitiu indicar alternativas mais econômicas para etapa de limpeza no método QuEChERS. A quitosana, nunca antes utilizada para esse fim, não apresentou diferença significativa de outros sorventes tradicionalmente utilizados como PSA e C18.

A avaliação do efeito matriz nos testes realizados em relação à etapa de limpeza demonstraram a importância dessa etapa, pois sem essa etapa, observou-se a possibilidade de aumento do número de interferentes, podendo interferir nos resultados. No entanto, além de comprovar a eficiência de outros sorventes na limpeza, foram otimizadas quantidades menores de C18 sendo reduzido de 600 mg, como empregado em outros trabalhos, para 150 mg; o que proporcionou uma redução de 75% na quantidade de sorvente. A avaliação do efeito matriz nas diferentes quantidades de C18 possibilitou avaliar e determinar a eficiência da etapa de limpeza com menores quantidades do sorvente.

O efeito matriz foi compensado por calibração externa através da superposição da matriz. No entanto, a maioria dos compostos apresentou efeito matriz baixo ou médio.

O método otimizado neste trabalho empregando QuEChERS modificado e seguido da determinação por LC-MS/MS para avaliar 25 agrotóxicos e 1 produto de degradação, o 3,4 DCA em grãos de arroz demonstrou ser rápido, preciso e exato. Sendo assim, o método proposto pode ser usado como rotina no laboratório para determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz.

DESTINAÇÃO DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos do método QuEChERS modificado e os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição. Além disso, estão sendo desenvolvidos e otimizados no LACOM trabalhos com o objetivo de degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimização e validação completa do método QuEChERS utilizando quitosana na etapa de limpeza no arroz e em outras matrizes;
- Ampliar o escopo de agrotóxicos analisados no método;
- Determinar resíduos de agrotóxicos em diversos tipos de arroz comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, A.; RODRIÁGUEZ, M.; BROTONS, M.; BOULAUD, M; VALVERDE A. Evaluation of supercritical fluid extraction/aminopropyl solid-phase “in-line” cleanup for analysis of pesticide residues in rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p.9374-9382, 2005.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS. **Mass Spectrometry Reviews**, v.25, p.838-865, 2006.

AMATO, G.W., WAGECK, G., CARVALHO, J.LV., Silveira-Filho, S. **Arroz parboilizado: tecnologia limpa, produto nobre**. Porto Alegre, RS: Editora. Ricardo Lenz. 2002. 160 p.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. **Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Germany: Wiley-VCH, 2007. 439 p.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"*. ANVISA, Brasília, DF, 29 mai. 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: dez. 2011.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **"Estudo traça perfil do mercado de agrotóxicos no Brasil."** ANVISA, Brasília, DF, 25 mar. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: jan. 2012.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. ANVISA, Brasília, DF. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: fev. 2012.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. ANVISA**, Brasília, DF, 15 de abr. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf> Acesso em: mar. 2012.

AGOSTINETTO, D.; FLECK, N.G; RIZZARDI, M.A; MEROTTO JR, A.; VIDAL, A. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, p.341-349, 2001

AOAC. **Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate**. AOAC International, 2007.

ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 276 p.

- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215p.
- BARKER, S.A.; LONG, A.R.; SHORT, C.R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, p. 353-361, 1989.
- BARKER, S.A. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD). **Journal of Chromatography A**, v. 885, p.115–127, 2000.
- BARRIADA-PEREIRA, M.; GONZÁLEZ-CASTRO, M.J.; MUNIATEGUI-LORENZO,S.; LOPEZ-MAHIA, S.P.; PRADA-RODRIGUEZ. D.; FERNANDEZ, E. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, v. 71, p.1345–1351, 2007.
- BONFIGLIO, R.; KING, R.; OLAH, T.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v.13, p. 1175-1185, 1999.
- BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: Recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry **Analytical Bioanalytical Chemistry**. v. 384, p. 85-99, 2006.
- BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 21 set. 2010.
- BRUTTI, M.; BLASCO, C.; PICO, Y. Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, p.1–10, 2010.
- CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, p. 229-248, Apr., 2000.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ; J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 1-17, 2005.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J.C; MARTINS, L.R.R; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CEN (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION), **CEN/TC 275 15662:2008**: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method, European Union, 2008.

COUTINHO, C.F.B.; GALLI, A.; MAZO, L.H.; MACHADO, S.A.S. Carbendazim e meio ambiente: degradação e toxicidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 63-70, 2006.

CHEN, L.; CHEN, Z.; ZHU, L.; CHEN, F.; WANG, L.; ZHANG, H. The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, p. 239–246, 2007.

CHO, S.K.; EL-ATY, A.M.A.; JEON, H.R. Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 727-735, 2008.

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

CHU, X. G.; HU, X. Z.; YAO, H. Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. **Journal of Chromatography A**, v.1063, p. 201–210, 2005.

CHUANG, J. C.; *et al.* Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 444, p. 87–95, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS- Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>.> Acesso em: jan. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS, METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2010. 218. p.

CONCENÇO G.; LOPES, N. F.; ANDRES, A.; MORAES, D. M.; SANTOS, M. Q.; RIEFFEL FILHO, J.A.; VILELLA. J. V. Controle de plantas daninhas em arroz irrigado em função de doses de herbicidas pré-emergentes em início da irrigação. **Planta Daninha**. Viçosa, MG, v. 24, p. 303-309, 2006.

CUNHA, S.C.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA; K.; FERNANDES J.O.; Beatriz M.; OLIVEIRA, P.P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 620-632, 2007.

CVUA (CHEMISCHEN UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSÄMTER). Disponível em: <<http://www.quechers.com>>. Acesso em: out. 2011.

DOLE, M.; MACK, L.L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R.C.; FERGUNSON, L.D.; ALICE, M.B. "Molecular beams of macroions". **Journal of Chemical Physics**, v.49, p. 2240-2250, 1968.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. V.; E PINTO, L. A. A. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova**, v. 34, p.1193-1199, 2011.

DÓREA, H. S.; SOBRINHO, L.L. Analysis of Pesticide Residues in Rice Using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 690-694, 2004.

DORS, G.C. Arroz parboilizado: situação micotoxicológica e suas relações com as condições de parboilização. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). FURG, Rio Grande-RS, 2006.

DORS, G.C; PRIMEL, E.G.; FAGUNDES, C.A.A; MARIOT, C.H.P.; BADIALE-FURLONG, E. Distribution of pesticide residues in rice grain and in its coproducts. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 1921-1930, 2011.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EMBRAPA. Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO). **Descrição morfológica, agrônômica, fenológica e culinária de alguns tipos especiais de arroz (*Oryza sativa* L.)**, p. 28, 2007. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644). <www.embrapa.br>. Acesso em: fev. 2012.

EMBRAPA. Embrapa Arroz e Feijão. **Cultivo de arroz irrigado no Brasil**. Documentos Técnicos 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: jan. 2012.

EUROPEAN UNION (EU) Pesticide EU-MRL Regulation (EC) n^o 396/2005. Atualizado em 05/10/2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm> Acesso em mar. 2012.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: out. 2011.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. f. 79. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues, Elsevier: Amsterdam, 2005. 403 p.

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

FOOTPRINT. Pesticides Properties Database. Disponível em <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>>. Acesso em: março 2012.

GANZLER, K. SALGO, A. VALKO, K . Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 371, p. 299-306, 1986.

GARCÍA-VALCÁRCEL, A.I.; TADEO, J. L. A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. **Analytica Chimica Acta**, v.641, p. 117-123, 2009.

GARRIDO-FRENICH, A.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L.; LÓPEZ-LÓPEZ, T.; CÓRTEZ-AGUADO, S.; MARTÍNEZ-SALVADOR, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1048, p. 199-206, 2004.

GEORGAKOPOULOS, P.; ZACHARI, R.; MATARAGAS, M.; ATHANASOPOULOS, P.; DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. Optimization of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology, **Food Chemistry**, v.128, p. 536-542, 2011.

GIVENS, M.L.; LU, C.; BARTELL, S.M.; PEARSON, M.A. Estimating dietary consumption patterns among children:Acomparison between cross-sectional and longitudinal study designs. **Environmental Research**. v. 103, p. 325–330, 2007.

GHOSH, C.; CHANDRAKANT, P. S.; CHAKRABORTY, B.S. Influence of ionization source design on matrix effects during lc–esims/ms analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 893, p.193– 200, 2012.

GONÇALVES, F.F. Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado. 2007. f. 148. Tese (Doutorado em Química). UFSM, Santa Maria-RS, 2007.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008. 855p.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analyses of pesticides residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

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

HOWSAM, M.; GRIMALT, J.O.; GUINO, E.; NAVARRO, M.; MARTI-RAGUE, J.; PEINADO, M.A.; CAPELL, G.; MORENO, V. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 1460–1466, 2004.

INSTITUTO RIOGRANDENSE DE ARROZ – IRGA. Disponível em <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: jan. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE- Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspf>>. Acesso em: mar. 2012.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, DF, 2011. 20 p.

IRIBARNE, J.V.; THOMSON, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **Journal of Chemical Physics**, v. 64, p. 2287-2295, 1976.

JARDIM, I.C.S.F.; *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, p. 996-1012, 2009.

KAIHARA, A.; YOSHII, K.; TSUMURA, Y.; ISHIMITSU, S.; TONOGAI, Y. Multi-residue analysis of 18 pesticides in fresh fruits vegetables and rice by supercritical fluid extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Health Science**, v.48, p. 173-178, 2002.

KEIKOTHAILE, B.M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT, W. Review: Effects of processing on pesticides residues in fruits and vegetable: a meta-analysis approach. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1-6, 2010.

KITTLAUS, S.; SCHIMANKE, J.; KEMPE, G.; SPEER, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8399-8410, 2012.

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

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K.J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 5950-5958, 2010.

KONG, S.; LEE, I. Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. **Food Chemistry**, v.120, p.278-281, 2010.

KRUVE, A., KÜNNAPAS, A.; HERODES; K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta*, v. 651, p. 75–80, 2009.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, 6. ed., São Carlos: Editora RiMa, 2004. 62 p.

LEE, H. *et al.* Multiresidue analysis of 47 pesticides in cooked wheat flour and polish rice by LC-MS/MS. **Biomedical Chromatography**. v. 23, p. 434-442, 2009.

LEHOTAY, S.J.; HIEMSTRA, M.; BODEGRAVEN, P.; KOK, A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 595-613, 2005a.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A.R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p.615, 2005b.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S.J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630, 2005c.

LEHOTAY, S.J.; in MARTINEZ VIDAL, J.L.; GARRIDO FRENICH, A. (Eds.), *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series 19*, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2006, 239 p.

LEHOTAY, S. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.90, p. 485-520, 2007.

LEHOTAY, S.J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N.; Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal Chromatography A**, v.1217, p. 2548-2560, 2010a.

LEHOTAY, S.J., in: ZWEIGENBAUM, J. (Ed.), *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series*, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 239 p. 2010b.

LIBIN, L.; HASHI Y.; YAPING, Q.; HAIXIA, Z.; JINMING, L. Rapid Analysis of Multiresidual Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography-mass Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v.34, p.783 - 786, 2006.

LIU, S.; ZHENG, Z.; WEI, F.; REN, Y.; GUI, W.; WU, H.; ZHU, G. Development of automated online gel permeation chromatography–gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.3271-3278, 2010.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 58, p. 1020-1026, 1975.

MAJORS, R.E. The QuEChERS Revolution (2010). Disponível em <[http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/GC/The-QuEChERS Revolution/ArticleStandard/Article/detail/704028](http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/GC/The-QuEChERS-Revolution/ArticleStandard/Article/detail/704028)>. Acesso em: dez. 2011.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4018-4040, 2010.

MAYER-HELM, B. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 8953–8959, 2009.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1040, p. 259, 2004.

MAŠTOVSKÁ, K.; DORWEILER, K.J.; LEHOTAY, S.J.; WEGSCHEID, J.S.; SZPYLKA, K.A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5959 - 5972, 2010.

MATUSZEWSKI, B. K. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytica Chemistry**, vol. 75, p. 3019-3030, 2003.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v.830, p. 293–300, 2006.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v.1152, p. 234 – 246, 2007.

MILLS, P.A; ONLEY, J.H.; GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC Intenational**, v. 46, p.186-191, 1963.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em: Mar. 2012

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **AGROFIT-Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: Nov. 2011.

MOU, R.X.; CHEN, M.X.; ZHI, J.L. Simultaneous determination of 15 phenylurea herbicides in rice and corn using HPLC with fluorescence detection combined with UV decomposition and post-column derivatization. **Journal Chromatography B**, v. 875, p. 437 - 443, 2008.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 683 - 703, 2005.

NGUYEN, D.; LEE, B.S.; LEE, B.R.; LEE, D.M.; LEE, G-H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.21, p.3115 - 3122, 2007.

NGUYEN, T. D., LEE, M.H., LEE, G. H. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection **Microchemical Journal**, v. 95, p.113-119, 2010

OTAKE, T.; AOYAGI, Y.; YARITA, T. Multiresidue analysis and monitoring of pesticides in rice by pressurized liquid extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.44, p. 423-427, 2009.

PANG, G.F.; FAN, C.L.; LIU, Y. M.; CAO, Y.Z.; ZHANG, J.J.; FU, B.L.; LI, X.M.; LI, Z. Y.; WU, Y.P. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 777-810, 2006.

PAREJA, L., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., CESIO, V. AND HEINZEN H. Analytical methods for pesticide residues in rice. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 270-291, 2011a.

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

PASCHOAL J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190 - 1198, 2008.

PAYÁ P.; ANASTASSIADES, M.; MACK D.; SIGALOVA I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p.1697 - 1714, 2007.

PENGYAN, L.; QINGXUE, L.; YUSONG, M.; JINWEI, L.; XUAN, J. **Chinese Journal of Chromatography** v. 24, p. 228-234, 2006.

PEIXOTO, S. **Validação e aplicação de método empregando QuEChERS modificado e GC-ECD na determinação de resíduos de pesticida em grão e casca de arroz.** 2010. f.123. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. **Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview.** **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PIZZUTTI, I.R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O.D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya 128 grain, without clean-up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v.1142, p. 123 - 136, 2007.

PRESTES, O.D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM).** 2007. f.108. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS, 2007.

PRESTES, O.D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS** 2011. f.130. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS, 2011.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

RAVETON, M. *et al.* Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 4151-4157, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.C.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S.R. *et al.* Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection **Journal of chromatography A**, v.48, p.153-159, 2004.

REYNOLDS, S.L. Sample handling and clean-up procedures I. in: FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues.** In. *Comprehensive analytical chemistry*. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

RODRIGUES, S.; *et al.* A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid

chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 82-89, 2010.

RODRIGUES, S.A. **Otimização e Validação de Métodos Empregando MSPD, QuChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em cebola**. 2010. f.119. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - FURG, Rio Grande, RS, 2010.

REZIC, I.; *et al.* Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.12, p. 477-481, 2005.

SAMPAIO, M.R.F. **Otimização e validação de métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar**. 2011. f.121. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS. 2011.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 4ª Edição, Documento N° SANCO/12495/2011, 01 de Fevereiro 2012, Bruxelas, Bélgica. 2012.

SATPATHY,G.; TYAGI, Y.K.; KUMAR, R. A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)–retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS) **Food Chemistry**, v. 127, p. 1300-1308, 2011.

SHORT, P.; COLBORN, T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: A focus on herbicides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 240-275, 1999.

SKOOG, D. A. & Leary, J. J. **Principels of Instrumental Analysis**. 4.ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1992. 423 p.

STORHERR, R.W.; OTT, P.; WATTS, R.R. A general method for organophosphorus pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC**, v. 54, p. 513, 1971.

STHAN, H.J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v.892, p.347 - 377, 2000.

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

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004, 400 p

TANG, L.; KEBARLE, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 3654–3668, 1993.

TSAI, W-H.; CHUANG, H-Y.; CHEN, H-H.; HUANG, J-J.; CHEN, H-C.; CHENG, S-H.; HUANG, T-C. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 56–62, 2009.

TSOCHATZIS, E.D.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; KARPOUZAS, D.G.; TZIMOU-TSITOURIDOU, R. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.397, p. 2181-2190, 2010.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E.G. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, p.1893-1900, 2011.

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

VALVERDE, A.; AGUILERA, A.; RODRIGUEZ, M.; BROTONS, M. Evaluation of a multiresidue method for pesticides in cereals using supercritical fluid extraction and gas chromatographic detection. **Journal Environmental Science Health B**, v. 44, p. 204 - 213, 2009.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227 - 236, 2001.

WANG, Y.; *et al.* Determination of triazines in honey by dispersive liquid–liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4241-4246, 2010.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M., CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.703-717, 2004.

WALTER, M. **Composição química e propriedades antioxidantes de grãos de arroz com pericarpo marrom claro vermelho e preto**. 2009. f.119. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

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

YADAV, M.; TRIVEDI, V.; UPADHYAY, V.; SHAH, G.; BAXI, G. A.; GOSWAMI, S.; SHRIVASTAV, P.S. Comparison of extraction procedures for assessment of matrix effect for selective and reliable determination of atazanavir in human plasma by LC–ESI-MS/MS **Journal of Chromatography B**, v. 885, p.138– 149, 2012.

ZHANG, W.G; CHU, X.G.; CAI, H.X.; AN, J.; LI, C-J. Simultaneous determination of 109 pesticides in unpolished rice by a combination of gel permeation chromatography and Florisil column purification, and gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, p. 609–617, 2006.

ZHAO; X.; *et al.* An application of new microwave absorption tube in non-polar solvent microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from fresh vegetable samples. **Journal of Chromatography A**, v.1229, p. 6-12, 2012.

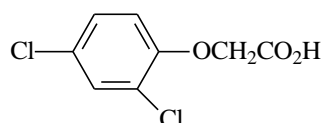
ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J. GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v.937, p. 73-86, 2001.

ANEXO I - Principais características e propriedades dos agrotóxicos em estudo

A seguir são apresentados os agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz, abordados nesse trabalho, e algumas propriedades obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003); FOOTPRINT (2011) e ANVISA (2012).

1. 2,4-D

Fórmula estrutural:



Grupo químico: ácido fenoxiacético

Nome químico (IUPAC): ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Classe: herbicida

Fórmula molecular: $C_8H_6Cl_2O_3$

Número no CAS: 94-75-7

Massa molar: $221,04 \text{ g mol}^{-1}$

Coefficiente de partição octanol-água (Kow): log P 2,6

Pressão de Vapor: $2 \cdot 10^{-2} \text{ mPa}$

Constante de Henry (K_H): $1 \cdot 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$

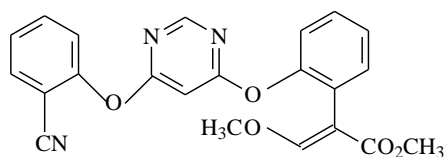
Classe toxicológica: I, extremamente tóxico

Nome comerciais: Aminol[®], DMA 806 BR[®], 2,4-D Isamina[®], Esteron 400 BR[®]

O 2,4-D foi o primeiro herbicida seletivo a ser desenvolvido. Durante a guerra do Vietnã, juntamente com o 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e com o pentaclorofenol ficou conhecido como agente laranja, sendo um agente desfoliante usado pela força aérea americana. Após a segunda guerra mundial, em 1947, ele se tornou o herbicida mais usado no mundo, substituindo a capina mecânica (FARIA, 2004).

2. Azoxistrobina

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: estrobilurina

Nome químico (IUPAC): (E)-2-{2[6-(cianofenoxi)pirimidina-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo

Classe: fungicida

Fórmula molecular: $C_{22}H_{17}N_3O_5$

Número no CAS: 131860-33-8

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 2,5 (20 °C)

Pressão de vapor = $1,1 \cdot 10^{-7}$ mPa (20 °C)

Classe Toxicológica: III, mediamente tóxico

Nomes comerciais: Amistar WG[®], Vantigo[®]

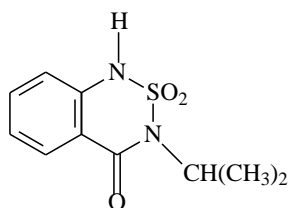
Os fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurina são um exemplo bem sucedido do uso de produtos naturais como modelo para desenvolvimento de novos agrotóxicos. Em 1978 foi descoberta essa nova classe de compostos, que atuam inibindo a respiração mitocondrial dos fungos e apresentam baixa toxicidade aguda para mamíferos em geral (BARBOSA, 2004).

No início da década de 1980 estes compostos despertaram grande interesse por parte das indústrias produtoras de agrotóxicos, devido a um extenso número de relatos do desenvolvimento de resistência de fungos a fungicidas que haviam sido introduzidos recentemente no mercado, como carboxidiimidazóis e triazóis (BARBOSA, 2004). Este fungicida é ativo contra um grande número de espécies de fungos fitopatogênicos de importância comercial.

É indicado para aplicação foliar nas culturas de arroz, alface, algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata, beterraba, café, cebola, cenoura, cevada, citros, couve-flor, crisântemo, feijão, figo, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêsego, pimentão, soja, tomate, trigo e uva. Para tratamento de doenças como míldio e mancha-púrpura (MAPA, 2012).

3. Bentazona

Fórmula estrutural:



Grupo químico: Benzotiadiazinona

Classe: Herbicida

Nome químico (IUPAC): 3-isopropil-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide

Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$

Número no CAS: 25057-89-0

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 0,35

Pressão de vapor: 0,17 mPa (20 °C)

pKa: 3,3

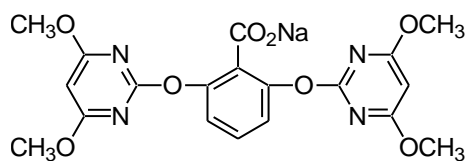
Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

Nome comercial: Basagran

Bentazone é aplicado no período de pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de amendoim, arroz, feijão, milho, soja e trigo. Esse herbicida tem ação seletiva e degrada rapidamente no solo (ANVISA, 2012).

4. Bispiribaque-sódico

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: ácido pirimidiniloxibenzóico

Nome químico (IUPAC): 2,6-bis(4,6-dimetoxipirimidin-2-loxi)benzoato de sódio

Classe: herbicida

Fórmula molecular: $C_{19}H_{17}N_4NaO_8$

Número no CAS: 125401-92-5

pKa: 3,05

Pressão de vapor: $5 \cdot 10^{-6}$ mPa (25 °C)

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): $\log P -1,03$ (23 °C)

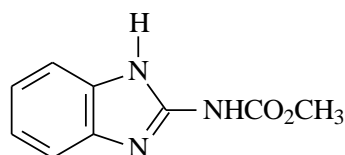
Classe toxicológica: III, mediamente tóxico

Nome comercial Nominee®

O herbicida bispiribaque-sódico é registrado no Brasil para a cultura do arroz irrigado. É indicado para o controle em pós-emergência de gramíneas, ciperáceas e algumas dicotiledôneas. É seletivo, de absorção foliar, de translocação sistêmica e atua por inibir a enzima acetolactato sintetase (ALS), chave no processo de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (SAMPAIO, 2010).

5. Carbendazim

Fórmula estrutural:



Nome químico(IUPAC): metil benzimidazol-2-ilcarbamate

Nº no CAS: 10605-21-7

Fórmula molecular: $C_9H_9N_3O_2$

Grupo químico: Benzimidazol

Classe: Fungicida

Pressão de vapor: 0,09 mPa (25 °C)

Constante de partição octanol-água (Kow) : $\log P 1,38$

pKa: 4,2

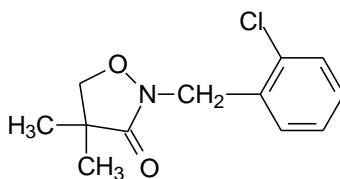
Classificação toxicológica: Classe III, extremamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, feijão, maçã, soja e trigo. No arroz é aplicado nas sementes, assim como no algodão, feijão, milho e soja.

Carbendazim constitui o ingrediente ativo mais utilizado do grupo dos fungicidas benzimidazóis contra grande variedade de doenças, como as causadas pelos fungos *Ascomycetos* spp., *Basidiomycetos* e *Deuteromycetos* spp. em culturas de frutas e vegetais (COUTINHO *et al.*, 2006).

6. Clomazona

Fórmula Estrutural:



Grupo Químico: isoxazolidinona

Nome químico (IUPAC): 2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona

Classe: Herbicida

Fórmula Molecular: $C_{12}H_{14}ClNO_2$

Número no CAS: 81777-89-1

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 2,5

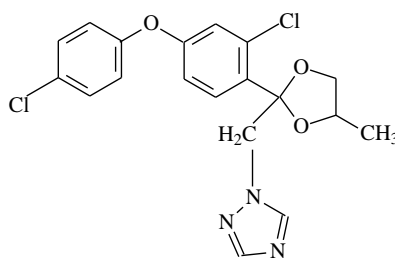
Pressão de Vapor: 19,2 mPa (25 °C)

Nomes comerciais: Gamit[®], Commence[®]

Clomazona é um dos herbicidas mais utilizados na cultura do arroz irrigado no estado do RS. De aplicação pré-emergente, o herbicida também é utilizado no Brasil para culturas de soja, cana-de-açúcar, fumo e algodão.

7 Difenoconazol

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): Éter 3-cloro-4-[(2RS,4RS;2RS,4SR)-4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil-4-clorofenílico

Classe: fungicida

Fórmula molecular: $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$

pKa: 2

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 1,1

Pressão de vapor: $3 \cdot 10^{-5}$ mPa (25 °C)

Número no CAS: 131860-33-8

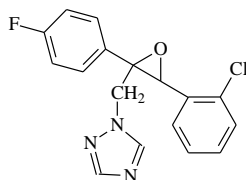
Classe toxicológica: I, altamente tóxico

Nomes comerciais: Score[®], Flare[®]

Difenoconazol é um fungicida sistêmico com ação protetora e curativa. O composto é indicado para aplicação foliar nas culturas de abacate, abobrinha, álamo, alface, alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, café, cebola, cenoura, citros, coco, couve-flor, ervilha, feijão, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, morango, pepino, pimentão, rosa, soja, tomate, uva e café. Ainda, para aplicação em sementes de algodão, amendoim, cevada, feijão, soja e trigo. Para tratamento de doenças como o oídio, a pinta-preta e a ferrugem (ANVISA, 2012; MAPA, 2012).

8 Epoxiconazol

Fórmula Estrutural



Grupo químico: Triazol

Nome químico (IUPAC): (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1H-1,2,4-triazole

Fórmula Molecular: C₁₇H₁₃ClFN₃O

Classe: Fungicida

Número no CAS: 135319-73-2

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 3,44 (pH 7)

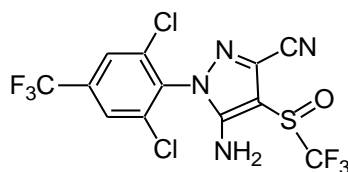
Pressão de vapor: 0,01 mPa (20 °C)

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

O fungicida epoxiconazol é empregado através de aplicação foliar, sendo utilizado além da cultura do arroz nas culturas de algodão, amendoim, aveia, banana, café, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, soja e trigo (ANVISA, 2012).

9 Fipronil

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: pirazóis

Nome químico (IUPAC): 5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfonilpirazole-3-carbonitrila

Classe: inseticida, também formicida e cupinicida

Fórmula molecular: $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$

Número no CAS: 120068-37-3

Classe toxicológica: II, altamente tóxico

Coefficiente de partição octanol-água (K_{ow}) $\log P = 4,0$

Pressão de vapor: $4 \cdot 10^{-4}$ mPa

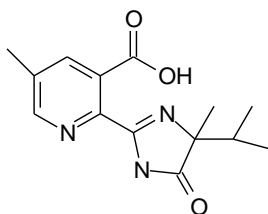
Constante de Henry (K_H): $4 \cdot 10^{-5}$

Nomes comerciais: Klap[®], Regent[®], Standak[®]

O pesticida fipronil é um inseticida de contato, descoberto e desenvolvido por Rhône-Poulenc entre 1985 e 1987 e colocado no mercado em 1993. É aplicado no solo em culturas de batata, cana-de-açúcar e milho, em folhas nas culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, em sementes de arroz, cevada, soja e feijão e na água para irrigação de arroz. Fipronil é altamente efetivo, de amplo espectro com recomendações de uso agrícola, saneante, não agrícola e preservante de madeira, no controle de pulgas e carrapatos em animais e domesticamente contra baratas e formigas. Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo das pestes. Ele é efetivo contra insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides, carbamatos e ciclodienos (RAVETON *et al.*, 2006). É principalmente usado contra os insetos do solo e no cultivo de arroz irrigado é aplicado para controle da bicheira-da-raiz (ANVISA, 2012).

10 Imazapique

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: imidazolinona

Nome químico (IUPAC): (RS)-5-metil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1H-imidazol-2-il) ácido nicotínico

Classe: herbicida

Fórmula molecular: C₁₄H₁₇N₃O₃

Número no CAS: 81334-60-3

pKa: 2

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 0,39

Pressão de vapor: <0,01 mPa (60 °C)

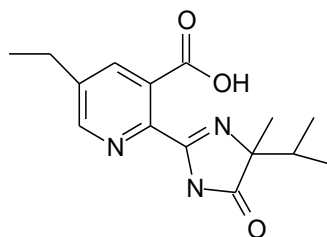
Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Nomes comerciais: Plateau[®], Only[®]

É um herbicida seletivo para controle em pré e pós emergência de algumas plantas daninhas. Age inibindo a produção de aminoácidos de cadeia ramificada que são responsáveis pela síntese de proteínas e o crescimento da célula. É relativamente atóxico para mamíferos, pássaros e anfíbios. Tem um tempo de meia vida no solo de até 120 dias, e é rapidamente degradado pela luz solar em solução aquosa. Não é registrado para uso em sistemas aquáticos, quando aplicado individualmente. É mais indicado o uso para as culturas de cana-de-açúcar e algodão. A aplicação em ambiente aquático é para a cultura de arroz irrigado no sistema Clearfield[®], sistema que utiliza sementes geneticamente modificadas tolerante ao herbicida Only[®] (combinação dos princípios ativos imazapique e imazetapir). Assim o Only ataca somente o arroz vermelho, deixando a cultura livre deste ataque (GONÇALVES, 2007).

11 Imazetapir

Fórmula Estrutural:



Grupo químico: imidazolinona

Nome químico (IUPAC): (RS)-5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1H-imidazol-2-il) ácido nicotínico

Classe: herbicida

Fórmula molecular: C₁₅H₁₉N₃O₃

Número no CAS: 81335-77-5

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) log P = 1,0

Pressão de vapor: 1 10⁻² mPa

Constante de Henry (K_H): 2,7 10⁻⁶

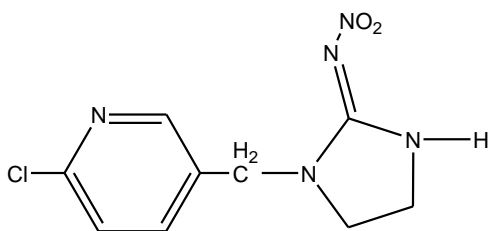
pKa: 2,1

Nomes comerciais: Pivot[®], Vezir[®], Only[®]

O herbicida imazetapir é registrado no Brasil para o controle em pós-emergência precoce de mono e dicotiledôneas na cultura da soja e em pré e pós-emergência das plantas infestantes na cultura do arroz. Os produtos Pivot[®] e Vezir[®] são indicados como herbicidas para uso na cultura da soja. O produto comercial Only[®], composto de uma mistura dos herbicidas imazetapir (75%) e imazapique (25%) é indicado para uso em pré e pós-emergência no cultivo de arroz irrigado, principalmente para controle do arroz vermelho. Essa mistura é apenas aplicada no sistema Clearfield[®], que utiliza cultivares de arroz tolerantes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, de tal forma que o herbicida inibe o crescimento das plantas daninhas e não destrói as plantas de arroz (GONÇALVES, 2007).

12 Imidacloprido

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidina-2-ilideneamina

Nº no CAS: 138261-41-3

Fórmula molecular: C₉H₁₀ClN₅O₂

Grupo químico: Neonicotinóide

Classe: Inseticida

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 0,5

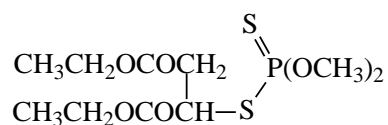
Pressão de vapor: 4 10⁻⁷ mPa (20 °C)

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

O inseticida imidacloprido pode ser aplicado de diversas formas, no solo, foliar, no tronco, isto depende do tipo de cultura. No caso do arroz é aplicado na semente. (ANVISA, 2012)

13. Malationa

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): diethyl (dimethoxythiophosphorylthio) succinate

Fórmula Molecular: C₁₀H₁₉O₆PS₂

Nº CAS: 121-75-5

Grupo químico: Organofosforado

Classe: Inseticida e acaricida

Pressão de vapor: 5,3 mPa

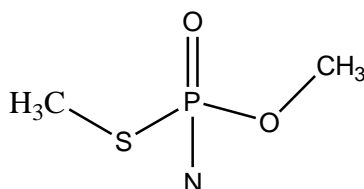
Constante de partição octanol-água (Kow): log P 2,75

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

Malationa é aplicado em diversas culturas na forma foliar. No entanto em arroz, feijão, milho, sorgo e trigo é aplicado durante o armazenamento.

14 Metamidofós

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): 0,S-dimetil fosforamidotoato

Fórmula molecular: C₂H₈NO₂PS

Nº CAS: 10265-92-6

Grupo químico: Organofosforado

Classe: Inseticida e acaricida

Pressão de vapor: 4,7 mPa (25 °C)

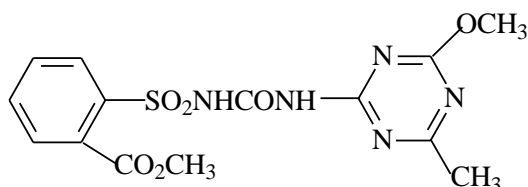
Constante de partição octanol-água (Kow): log P 0,8 (20 °C)

Classificação toxicológica: Classe I, extramente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate e trigo. Esse princípio ativo não é recomendado para a cultura de arroz, mas segundo relato PARA em 2008, esse composto foi encontrado em grãos de arroz devido a falta de Boas Práticas Agrícolas (ANVISA, 2009)

15 Metsulfurom-metílico

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): metil 2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilcarbamoilsulfamoil)benzoate

Classe: herbicida

Nº CAS: 74223-64-6

Fórmula Molecular: C₁₄H₁₅N₅O₆S

Pressão de vapor: $3,3 \cdot 10^{-7}$ mPa

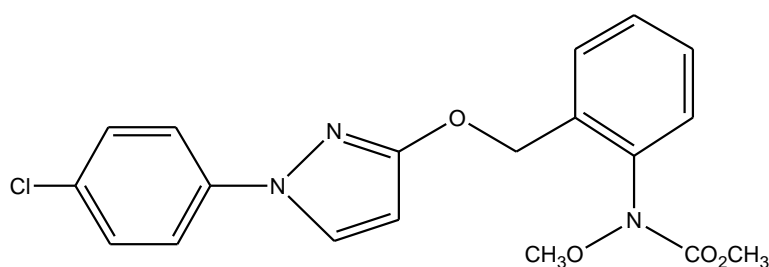
Constante de partição octanol-água (Kow): log P 0,018

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, cevada, pastagens e trigo. Aplicação em pré-emergência das plantas infestantes na cultura de cana-de-açúcar.

16 Piraclostrobina

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): metil *N*-{2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-iloximetil]fenil}(*N*metoxi) carbamato

Fórmula molecular: $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$

Nº CAS: 175013-18-0

Grupo químico: Estrobilurina

Classe: Fungicida

Pressão de vapor: $2,6 \cdot 10^{-5}$ mPa

Constante de partição octanol-água (Kow): log P 4

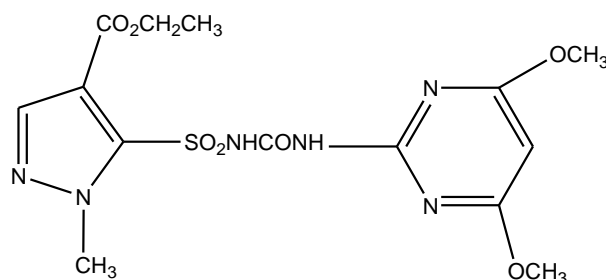
pKa: 3,8

Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, crisântemo, feijão, maçã, mamão, manga, melão, melancia, milho, pepino, pimentão, rosa, soja, tomate, trigo e uva. Aplicação em sementes de soja. Assim como metamidofós a piraclostrobina também não é recomendada para o arroz, mas tem sido utilizada pelos produtores.

17 Pirazossulfurom etílico

Fórmula Estrutura:



Grupo químico: sulfoniluréias

Nome químico (IUPAC): 5-(4,6-dimetoxipirimidin-2-ilcarbamoilsulfamoil)-1-metilpirazol-4-carboxilato

Classe: herbicida

Fórmula molecular: $C_{14}H_{18}N_6O_7S$

Número no CAS: 93697-74-6

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico.

pKa: 3,7

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P 3,16

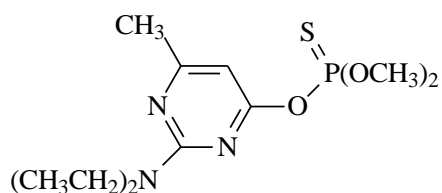
Pressão de vapor: $4 \cdot 10^{-5}$ mPa

Nome comercial: Sirius[®]

O pirazossulfurom-etílico é um herbicida sistêmico, seletivo, indicado apenas para aplicação em pré ou pós-emergência na cultura de arroz irrigado, destinado principalmente ao controle de ciperáceas. É absorvido principalmente pelo sistema radicular e também atua por inibir a catálise da chave enzimática ALS na biossíntese de aminoácidos. Herbicidas da classe das sulfoniluréias têm sido estimados serem 100 vezes mais tóxicos para as plantas que qualquer outro herbicida em uso antes de 1982 (SHORT e COLBORN, 1999). No entanto, a enzima ALS sobre a qual eles atuam não está presente nos animais. Por isso, são considerados de baixa toxicidade para mamíferos, pássaros, peixes, anfíbios e outros animais.

18 Pirimifós-metílico

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il O,O-dimetil fosforotioato

Nº CAS: 29232-93-7

Fórmula molecular: C₁₁H₂₀N₃O₃PS

Grupo químico: Organofosforado

Classe: Inseticida e acaricida

Pressão de vapor: 2 mPa

Constante de partição octanol-água (Kow): log P 4,2 (20 °C)

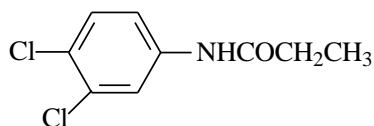
pKa: 4,3

Classificação toxicológica: Classe III

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de alface, citros, couve, feijão, feijão-vagem. Aplicação em arroz, cevada, milho e trigo durante armazenamento (ANVISA, 2012).

19 Propanil

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): 3',4'-dicloropropionanilida

Fórmula molecular: C₉H₉Cl₂NO

Nº CAS: 709-98-8

Grupo químico: Anilida

Classe: Herbicida

Pressão de vapor: 0,02 mPa

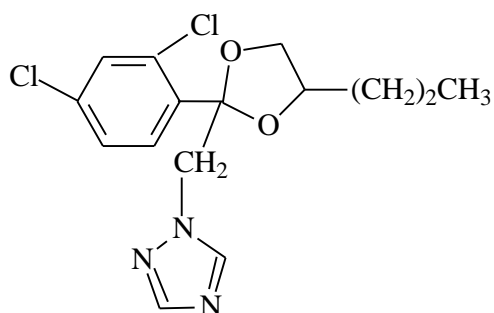
Constante de partição octanol-água (Kow): logP 3,3

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes na cultura de arroz.

20 Propiconazol

Fórmula estrutural:



Nome químico (IUPAC): (RS)-1-[2-(2,4-dichlorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol

Fórmula molecular: $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$

Nº CAS: 60207-90-1

Grupo químico: Triazol

Classe: Fungicida

Pressão de vapor: $5,6 \cdot 10^{-2}$ mPa

Constante de partição octanol-água (Kow): log P 3,8

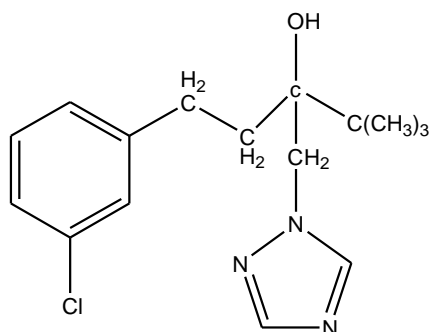
pKa: 1,09

Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, café, cevada, feijão, gladiolo, milho, seringueira, soja, tomate e trigo.

Aplicação foliar em mudas de café.

21 Tebuconazol



Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-3-pentanol

Classe: fungicida

Fórmula molecular: C₁₆H₂₂ClN₃O

Número no CAS: 107534-96-3

Pressão de vapor: 1,7 10⁻³ mPa (20 °C)

Constante de Henry (KH): 1 10⁻⁵ Pa m³ mol⁻¹

Coefficiente de partição octanol-água (Kow): log P 3,7 (20 °C)

Classe toxicológica: IV, pouco tóxico.

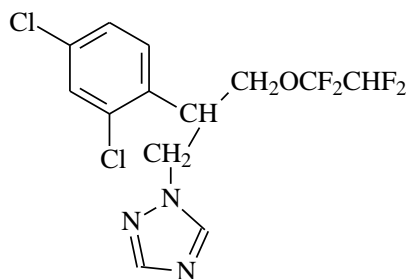
Nomes comerciais: Folicur PM[®], Alterne[®], Elite[®]

O composto tebuconazol, pertencente ao grupo dos triazóis, é um fungicida sistêmico, com ação protetora, curativa e erradicante. É rapidamente absorvido pela planta, sendo empregado principalmente para combater doenças como a ferrugem-do-álamo, a mancha-foliar e a antacnose (TOMLIN, 2003).

O fungicida é indicado para aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, álamo, alho, amendoim, aveia, banana, batata, beterraba, cacau, café, cebola, cenoura, cevada, citros, cravo, crisântemo, feijão, figo, gladiolo, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêsego, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo, uva e arroz. (ANVISA, 2012; MAPA, 2012).

22 Tetraconazol

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): (RS)-2-(2,4-diclorofenil)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-il)propil 1,1,2,2-tetrafluoroetileter

Fórmula molecular: C₁₃H₁₁Cl₂F₄N₃O

Nº no CAS: 112281-77-3

Grupo químico: Triazol

Classe: Fungicida

Pressão de vapor: 0,18 mPa

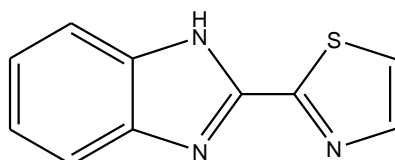
Constante de partição octanol-água (Kow): log P 3,56

Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de arroz, abóbora, algodão, banana, batata, café, cenoura, crisântemo, feijão, maçã, manga, melancia, melão, milho, pepino, soja, tomate, trigo e uva.

23 Tiabendazol

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): 2-(tiazol-4-il)benzimidazol

Fórmula molecular: C₁₀H₇N₃S

Nº CAS: 148-79-8

Grupo químico: Benzimidazol

Classe: Fungicida

Classificação toxicológica: Classe IV, pouco tóxico

Pressão de vapor: 4,6 10⁻⁴ mPa (25 °C)

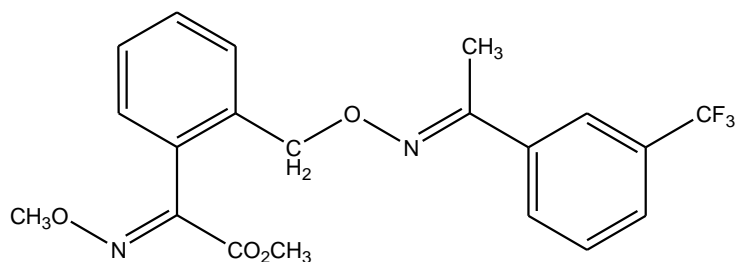
Constante de Henry (KH): 2.7 10⁻⁸ Pa m³ mol⁻¹

Coefficiente de partição octanol-água (Kow): log P 2.39 (pH 7)

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de abacate, abacaxi, banana, citros, coco, ervilha, feijão-vagem, maçã, mamão, manga, maracujá, melão, pimentão e pêra. Aplicação em sementes de arroz, batata (tubérculos), feijão, girassol, milho, soja e sorgo. Aplicação pós-colheita em abacate, banana, citros, mamão, manga e melão.

24 Trifloxistrobina

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): éter metílico do ácido (E, E)-metoximino-{2-[1-(trifluorometilfenil)-etidileno-amino-oximetil]-fenil}-acético

Fórmula bruta: $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$

Nº CAS: 141517-21-7

Grupo químico: Estrobilurina

Classe: Fungicida

Pressão de vapor: $3,4 \cdot 10^{-3}$ mPa

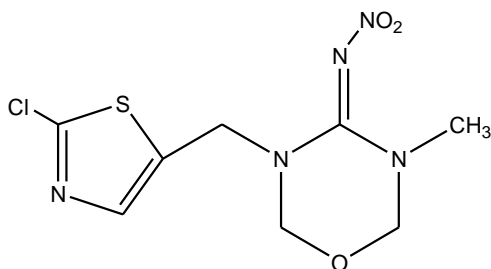
Constante de partição octanol-água (Kow): log P 4,5

Classificação toxicológica: Classe II, altamente tóxico

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de arroz, algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata, café, caqui, cebola, cenoura, cevada, citros, feijão, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, soja, tomate e trigo.

25 Tiametoxam

Fórmula Estrutural:



Nome químico (IUPAC): 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)amina

Fórmula molecular: $C_8H_{10}ClN_5O_3S$

Grupo químico: neonicotinóide

Classe: Inseticida

Nº. CAS: 153719-23-4

Classificação toxicológica: Classe III, mediamente tóxico

Pressão de vapor: $6,6 \cdot 10^{-6}$ mPa (25 °C)

Constante de Henry (KH): $4,70 \cdot 10^{-10}$ Pa $m^3 \text{ mol}^{-1}$

Coeficiente de partição octanol-água (Kow): log P -0.13 (25 °C)

Modalidade de emprego: aplicação no solo nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva. Aplicação no arroz se dá na forma foliar e em sementes (TOMLIN, 2003).