

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CLOMAZONE EM ARROZ EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E
UHPLC-MS/MS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Franciele Silva dos Santos

Itaqui, RS, Brasil.

2013

FRANCIELE SILVA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CLOMAZONE EM ARROZ EMPREGANDO O MÉTODO QuÉChERS E
UHPLC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriane Lucas Azevedo

Itaqui, RS, Brasil.

2013

FRANCIELE SILVA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
CLOMAZONE EM ARROZ EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E
UHPLC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 11 de Maio de 2013, sala 202.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra^a. Miriane Lucas Azevedo
(Orientadora)
Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Unipampa

Prof. Dr. Osmar Damiana Prestes
Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof.Dr. Tiago André Kaminski
Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Unipampa

“... Dedico este trabalho a cinco pessoas muito importantes. A Deus, por todas as graças. A meus pais Leonel e Sonia, ao meu noivo Vinícius, os quais souberam compreender e entender minhas ausências e turbulências para realização desta conquista e que juntos são minha motivação de vida. A minha orientadora, por acreditar em mim...”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família, meus pais Leonel e Sonia, e meu noivo Vinícius, que me incentivaram desde o início nesta longa caminhada. Obrigada pela dedicação, pelo amor e carinho, e principalmente pela força que recebi durante todo o curso e durante a realização de meu trabalho.

Ao Professor Osmar Damian Prestes e a Professora Miriane Lucas Azevedo, pela orientação e aprendizado na construção deste trabalho, e principalmente pela confiança e amizade depositadas em mim.

Aos professores do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, que proporcionaram conhecimentos básicos e essenciais necessários para minha formação e certamente serão lembrados por toda a vida.

Aos funcionários e colegas, em especial à Paola, pelo companheirismo e amizade ao longo do tempo.

A todos os amigos e colegas que conquistei durante a graduação e que passaram a fazer parte da minha vida, em especial a Viviane e Raquel, companheiras desde o primeiro dia de aula.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o sucesso da minha formação acadêmica.

Deixo aqui, o meu MUITO OBRIGADO!

“Podemos acreditar que tudo que a vida nos oferecerá no futuro é repetir o que fizemos ontem e hoje. Mas, se prestarmos atenção, vamos nos dar conta de que nenhum dia é igual a outro. Cada manhã traz uma benção escondida; uma benção que só serve para esse dia e que não se pode guardar nem desaproveitar. Se não usamos este milagre hoje, ele vai se perder. Este milagre está nos detalhes do cotidiano; é preciso viver cada minuto porque ali encontramos a saída de nossas confusões, a alegria de nossos bons momentos, a pista correta para a decisão que tomaremos. Nunca podemos deixar que cada dia pareça igual ao anterior porque todos os dias são diferentes, porque estamos em constante processo de mudança.” Paulo Coelho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOMAZONE EM ARROZ EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

Acadêmica: Franciele Silva dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriane Lucas Azevedo

Local e data: Itaqui, 11 de Maio de 2013.

A agricultura moderna, que procura constante elevação de produtividade e maximização dos lucros, emprega uma carga expressiva de agroquímicos, dentre os quais os agrotóxicos, principalmente herbicidas, inseticidas e fungicidas, que podem originar poluição ambiental e desequilíbrio no meio ambiente. Neste trabalho, otimizou-se e validou-se a presença de herbicida clomazone em amostras de arroz provenientes da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul empregando o método QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS) com fonte de ionização por eletronebulização(+). Efetuou-se a extração dos resíduos de clomazone empregando o método QuEChERS modificado. Pesou-se 10 g de amostra em tudo de polipropileno (50 e 15 mL), após adicionou-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético. Após, agitou-se em vortex por 1 minuto, em seguida, adicionou-se 4 g sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio. Após, agitou-se em vortex por 1 minuto e centrifugou-se por 8 minutos a 10.000 rpm. Na etapa de *clean-up* dos extratos, transferiu-se 4 mL do sobrenadante para tubo de polipropileno contendo 100 mg de Sorvente-PSA (amina primária), 600 mg de sulfato de magnésio e 500 mg de carbono 18. Após, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se por 8 minutos a 10.000 rpm. Filtrou-se o sobrenadante em filtro de *nylon* 0,45 µm e injetou-se 10 µL no sistema UHPLC-MS/MS. Após a otimização dos parâmetros de extração e de quantificação, o método foi validado, avaliando-se curva analítica, linearidade, Limite de Detecção, Limite de quantificação, precisão e exatidão. O método apresentou bons resultados de linearidade, a curva analítica do clomazone apresentou coeficiente de determinação $r^2 = 0,998$. O método apresentou limite de quantificação de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de detecção do método $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para os três níveis de recuperação avaliados (10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) o método apresentou valores de recuperação entre 70-120% e coeficientes de variação $\leq 20\%$. Os resultados da avaliação da precisão intermediária também foram obtidos na faixa entre 79-95%. O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de clomazone em 8 amostras de arroz comerciais da Fronteira Oeste, observou-se que em 4 amostras não foram detectados resíduos, 3 amostras foram detectados abaixo do Limite de quantificação e apenas uma das amostras encontrou-se resíduos de clomazone ($2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$). O método desenvolvido permite avaliar os níveis de clomazone em concentrações adequadas ao Limite Máximo de Resíduo (LMR) com precisão, exatidão e eficiente.

Palavras-chave: Herbicidas, Cereais, Cromatografia.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF CLOMAZONE IN RICE USING THE METHOD AND QUECHERS UHPLC-MS/MS

Acadêmica: Franciele Silva dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriane Lucas Azevedo

Local e data: Itaquí, 11 de Maio de 2013.

Modern agriculture, which seeks constantly increasing productivity and maximizing profits, employs a significant load of chemicals, among them pesticides, particularly herbicides, insecticides and fungicides, which may cause environmental pollution and imbalance in the environment. In this work, optimized and validated the presence of clomazone in rice samples from the Western Border of Rio Grande do Sul employing the modified QuEChERS method and Efficiency Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in series (UHPLC-MS / MS) with electrospray ionization source (+). Performed the extraction of residues of clomazone employing the modified QuEChERS method. Was weighed into a 10 g sample of polypropylene at all (50 and 15 mL) was added after 10 mL of acetonitrile containing 1% (v / v) acetic acid. After, stirred by vortexing for 1 minute, then added with 4 g magnesium sulfate and 1.7 g of anhydrous sodium acetate. After, stirred by vortexing for 1 minute and centrifuged for 8 minutes at 10,000 rpm. In step clean-up of the extracts was transferred to 4 mL of the supernatant polypropylene tube containing 100 milligrams of Sorbent-PSA (primary amine), 600 mg of magnesium sulfate and 500 mg of carbon 18. After, stirred for 1 minute and centrifuged for 8 minutes at 10,000 rpm. The supernatant was filtered on nylon filter 0.45 m and 10 L was injected into the system UHPLC-MS/MS. After optimization of the extraction and quantification, the method was validated by evaluating the analytical curve, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. The method showed good linearity of the calibration curve of clomazone showed coefficient of determination $r^2 = 0.998$. The method presented limit of quantitation of 1 mg kg⁻¹ and method detection limit of 0.3 mg kg⁻¹. For the three levels of recovery evaluated (10, 20 and 50 mg kg⁻¹) showed the method recovery values between 70-120% and coefficients of variation $\leq 20\%$. The evaluation results were also obtained intermediate precision in the range of 79-95%. The method was applied for the determination of residues of clomazone 8 samples of commercial rice Westermarck was observed in 4 samples that were not detected residues were detected three samples below the limit of quantitation and only one of the samples found if waste clomazone (2.5 mg kg⁻¹). The developed method enables the assessment of clomazone in adequate concentrations to a maximum residue level (MRL) with precision, accuracy and efficient.

Keywords: Herbicides, Cereals, Chromatography.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Ranking de algumas agroindústrias de arroz do Rio Grande do Sul. ...23

QUADRO 2. Classificação das formulações segundo a toxicidade.....27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por herbicidas	30
Figura 2. Potencial de biomagnificação de herbicidas através do consumo de pescado contaminado pelo homem.....	31
Figura 3. Fórmula molecular do Clomazone.....	33
Figura 4. Fluxograma do Método QuEChERS acetato para determinação de Clomazone	51
Figura 5. Cromatograma no modo MRM obtido para uma solução analítica na matriz contendo 5 µg L ⁻¹ do agrotóxico clomazone, contendo as transições empregadas para a quantificação e confirmação. (UFSM-Santa Maria, 2013).....	55
Figura 6. Gráfico dos Resultados obtidos para as curvas analíticas dos herbicidas no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS - SANTA MARIA/ RS, 2013	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente Linear da fase móvel.....	53
Tabela 2. As condições utilizadas na técnica UHPLC-MS/MS	53
Tabela 3. Níveis de Concentrações e recuperação das amostras de Arroz.....	58
Tabela 4. Limites de Quantificação (LOQ _m) e Limite de Detecção (LOD _m)	59
Tabela 5. Avaliação da Precisão Intermediária e repetividade em amostras de arroz	60
Tabela 6. Análise de amostras de arroz comerciais de diferentes marcas e envasadas, empregando o método QuEChERS e UHPLC-MS/MS	61

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN- Acetonitrila

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC- Association of Official Analytical Chemists

CLUE- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CH₃OH/H₂O- Metanol e água

DAD- Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês Diode Array Detection

DCE- Detector Seletivo de Captura de Elétrons

DDT- 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

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

FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations

GC- Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

GC- MS Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

Hec- Hectares

HPLC-DAD- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado ao detector diodos.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

IRGA- Instituto Riograndense do Arroz

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

Kg- Kilograma

LC- Cromatografia Líquida, do inglês Liquid Chromatography

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

LMR- Limite Máximo de Resíduos

LOD- Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection

LOQ- Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification

Min- Minutos

MgSO₄- Sulfato de Magnésio

MRM- Monitoramento de reações múltiplas, do inglês Multiple Reactions Monitoring

MS- Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry

m/z- razão massa por carga

p.a.- grau pró-análise

PARA- Programa de Análise de Resíduos de Alimentos

POP_s- Poluentes Orgânicos Persistentes

pH- Potencial hidrogeniônico

PSA- Amina primária secundária, do inglês Primary Secondary Amine

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

r- coeficiente de correlação

r²- coeficiente de determinação

rpm- rotações por minuto

RSD- Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation

RSD_{PI}- Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

SLURRY- Amostragem de suspensão (sólido/líquido)

t- Toneladas

$t_{1/2}$ - tempo de meia-vida

UHPLC-MS/MS- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.

UHPLC-ESI-MS/MS- Cromatógrafo de ultra-alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo e interface por eletronebulização

UV- Ultravioleta

v/v- Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Cultura do Arroz	21
2.1.1 Produção de Arroz na Fronteira Oeste	22
2.1.2 Composição e Características Nutricionais do Arroz	23
2.1.3 Uso dos agrotóxicos em Arroz	24
2.2. Agrotóxicos	25
2.2.1 Os Herbicidas como contaminantes das águas e solos	27
2.2.2 Herbicidas na cultura do arroz	32
2.2.3 Herbicida escolhido para o estudo	32
2.2.4 CLOMAZONE	33
3. PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS	34
3.1 Método QuEChERS modificado, para determinação de resíduos de agrotóxicos	35
4. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS	37
4.1 Técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS	38
4.1.1 Introdução da Amostra	41
4.1.2 Ionização por Eletrospray (ESI)	41
4.1.3 Analisador	41

4.2 Efeito matriz em LC-MS/MS	42
5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	42
5.1 Curva analítica e linearidade	43
5.2. Sensibilidade	45
5.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	45
5.4 Exatidão (recuperação)	46
5.5 Precisão, Repetitividade e Precisão Intermediária	46
5.6 Reprodutibilidade	47
5.7 Robustez	47
6. MATERIAL E MÉTODOS	48
6.1 Obtenção das amostras	48
6.2 Instrumentação	48
6.3 Materiais	49
6.4 Solventes, reagentes e gases	50
6.5 Preparo da solução padrão do herbicidas	50
6.6 Preparo das soluções da análise	51
6.7 Fortificação das amostras	52
6.8 Quantificação dos herbicidas	52
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
7.1 Otimização do sistema Cromatográfico UHPLC- MS/MS para determinação de multirresíduo de agrotóxicos em arroz da Fronteira Oeste	52
7.1.1 Técnicas de amostragem por Slurry (SUSPENSÃO), para determinação de resíduos de agrotóxicos	55

7.2 Curva Analítica e Linearidade	56
7.3 Validação: Extração, Recuperação	57
7.4 Limite de Quantificação (LOQ_m) e Limite de Detecção (LOD_m)	58
7.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	59
7.6 Robustez	60
8. APLICAÇÃO DO MÉTODO	60
8.1 Análises de amostras reais	60
9. CONCLUSÃO	62
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa quase 10% do solo agricultável do mundo. O arroz é um dos cereais mais produzidos no planeta, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Este grão é reconhecido por suas propriedades nutricionais, sua contribuição em minerais na dieta é bastante variável e diretamente relacionada ao processo de beneficiamento do grão. Estas propriedades sofrem influências do genótipo, do ambiente e das práticas agrícolas (DENARDIN et al., 2004).

No Rio Grande do Sul (RS) e em Santa Catarina (SC), o arroz irrigado é uma das principais atividades agrícolas e econômicas. A área plantada nos dois estados é de aproximadamente 1,2 milhões de hectares. A Fronteira Oeste do RS apresenta condições favoráveis de produção devido ao tipo de solo, a fertilidade natural e com excelente resposta ao uso de fertilizantes químicos. Além disso, esta região possui baixa capacidade de infiltração d'água, o que é favorável para a garantia do manejo. (BRUM et al., 2008). As formas de grãos de arroz mais consumidas são o polido (branco), o parbolizado e o integral.

Os principais agrotóxicos utilizados na cultura do arroz são os herbicidas, inseticidas e fungicidas. Segundo a Lei 7802/89, no seu artigo 2º, inciso I, são considerados agrotóxicos e afins todos os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos usados na área agrícola, na proteção florestal, em outros ecossistemas e em áreas urbanas com o objetivo de combater pragas ou doenças causadas pela ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2003).

Segundo Conway (2003), quanto à classificação, os agrotóxicos podem ser diferenciados de acordo com a sua ação específica em: pesticidas (combatem pragas em geral), fungicidas (agem sobre fungos), herbicidas (impedem o crescimento de ervas daninhas), rodenticidas (combatem ratos e roedores em geral), acaricidas (para o extermínio de ácaros), molusquicidas (agem sobre moluscos, principalmente utilizado no combate contra o caramujo da esquistossomose), algicidas (eliminação de algas), entre outros. O clomazone ou [2-[metil (2-clorofenil)]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona] é um dos principais herbicidas empregados no cultivo do arroz. (ZANELLA et al., 2008).

Nos últimos anos, o esforço para aumentar a produção de alimentos esteve associado ao desenvolvimento e utilização de agrotóxicos. Por outro lado, estes compostos devem ser utilizados respeitando as Boas Práticas Agrícolas. Desta forma, evita-se a presença de resíduos destes compostos nos alimentos e no meio ambiente.

Neste contexto, a Química Analítica desenvolve papel importante, pois é a ciência que pesquisa e desenvolve novas técnicas capazes de identificar e quantificar a presença destes compostos em amostras ambientais e de alimentos (CIOLA, 1998).

A análise de resíduos de agrotóxicos consiste em cinco etapas básicas: extração do(s) analito(s) da amostra, remoção dos co-extrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s) de interesse. Atualmente, existem diversos métodos empregados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, dentre estes se destaca o método QuEChERS (Beyer, A.; Biziuk, M., 2007).

De acordo com o exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença do herbicida clomazone em amostras de arroz comerciais provenientes da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, empregando o método QuEChERS e Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos 50 anos, o uso de herbicidas acrescentou a produção e a qualidade de alimentos, relevadas pelo crescimento populacional. Estima-se que menos de 0,1% dos herbicidas aplicados em culturas verdadeiramente consigam o alvo almejado, o restante segue livremente para o solo, águas e ar (RIBEIRO et al., 2007).

A moderna agricultura que procura constante elevação de produtividade e maximização dos lucros emprega uma carga expressiva de agroquímicos, dentre os quais se deparamos os agrotóxicos, principalmente herbicidas, inseticidas e fungicidas, que podem originar poluição ambiental e desequilíbrio do meio ambiente (GRÜTZMACHER et al., 2008).

O emprego de agrotóxicos no plantio de culturas alimentares é fato indiscutível na agricultura convencional. O uso de fungicidas, inseticidas, herbicidas, nematocidas e outros devem ser analisados como parte de um conjunto de medidas de controle, e não a única forma existente no controle de insetos ou doenças nas plantações.

A utilização de agrotóxicos nos Estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, e Tocantins corresponde a 70% do total utilizado no País (SOUZA, 2006).

Várias são as culturas que necessitam de agrotóxicos, permitindo, de certa forma, a contaminação do meio ambiente. Como exemplo, têm-se as culturas do fumo e arroz, que podem trazer problemas de contaminação ambiental quando do uso indiscriminado de agrotóxicos (GRÜTZMACHER et al., 2008).

O mercado consumidor de produtos in natura ou processados, exige requerimentos fitossanitários rigorosos, que reflete em visão diferenciada da produção de arroz, priorizando a segurança do alimento e do meio ambiente. Nesse enfoque, a qualidade do grão é de vital importância para a conquista de novos nichos de mercado, principalmente quando considerada em relação ao Limite Máximo de Resíduos - LMR aceito pelos países importadores e recomendado pelo Codex Alimentarius (FAO, 2013).

Há estudos que avaliam a distribuição de herbicidas (clomazone, tebuconazole e entre outros) recomendada para arroz irrigado em diferentes frações

resultantes do processamento de arroz. Assim, um método empregando QuEChERS e HPLC-DAD foi validado para a extração e quantificação, a fim de determinar várias classes de herbicidas em grãos de arroz e farelo de arroz (DORS et al., 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica aplicada a análises de rotina em muitas áreas diferentes, incluindo alimentos. A utilização de diferentes tipos de detectores ajuda na identificação e quantificação desses componentes.

2.1 Cultura do Arroz

O arroz (*Oryza Sativa*, L.) pertence à família *Gramineae* e subfamília *Pooideae*, é proveniente do Sudoeste da Ásia, que envolve a região leste da Índia, Indochina e Sul da China, dentre os cereais cultivados, é o que mais se sobressai, por ser alimento básico da maioria da população (BARRIGOSI et al., 2004).

O arroz chegou ao Brasil no século XVI e desenvolveu-se no Rio Grande do Sul a partir de 1930. Em sua cadeia produtiva, teve um contínuo avanço tecnológico, tornando-se importante estratégica, tanto pela sua representatividade econômica quanto pela sua relevância junto à segurança alimentar do país e, em especial, para as regiões de cultivo orizícola sul-rio-grandense (BRUM et al., 2008).

Modernamente, o arroz encontra-se disseminado no mundo todo, sendo cultivado em todos os continentes, em cerca de 120 países e seu consumo pela população mundial é um hábito inquestionável. O Brasil figura entre os dez maiores produtores e consumidores de arroz no mundo (VIEIRA E OLIVEIRA, 2013).

Segundo a FAO (2004) já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são: origem genética, dimensões (curto, médio e longo) e teor de amilose (baixo, médio ou alto), que está relacionado com suas características de cozimento (arroz solto ou arroz grudento) (GONÇALVES, 2007).

O arroz é um cereal consumido principalmente como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas. (GONÇALVES, 2007).

Existem três tipos fundamentais de ecossistemas de arroz: terras altas, várzeas úmidas e irrigadas por inundação. Entre eles, o sistema de plantação de arroz

irrigado por inundação (regiões de baixios) é o mais significativo, representando 80% do arroz produzido no mundo, responsável por quase 93% da produção total (BARRIGOSSI et al.,2004).

O plantio de arroz pode ser realizado no sistema irrigado, cujas plantações concentram-se em sua grande maioria no Sul do País, ou no sistema de terras altas ou de sequeiro, que prevalece no cerrado brasileiro (GONÇALVES, 2007).

2.1.1 Produção de Arroz na Fronteira Oeste

A região da Fronteira Oeste é bem servida de mananciais, arroios e rios, formados por três sub-bacias hidrográficas que formam a bacia hidrográfica do rio Uruguai, além do lençol artesiano ter boa capacidade de uso e baixa profundidade. No entanto, sua utilização na lavoura tem sofrido restrição ambiental e seu uso necessita de avaliação para detectar o impacto ambiental esperado. A topografia na área agricultável é levemente ondulada e plana, ideal para o cultivo de arroz (BRUM et al., 2008).

Ressalta-se ainda que a Fronteira Oeste possui uma tradicional história na sua formação agrária, voltada à pecuária de corte, e que ao longo das últimas décadas foi cedendo espaço para as lavouras de arroz, em razão de que estas remuneram melhor o proprietário, mesmo quando arrendadas, em comparação a atividade pecuária (BRUM et al.,2008).

A região da Fronteira Oeste é a maior produtora de arroz do Estado do Rio Grande do Sul e apresenta uma das maiores produtividades médias, com 7.353 quilos/hectare (BRUM et al.,2008).

Por sua vez, estudos realizados pelo IRGA, e apresentados no Congresso Brasileiro de Economia Agrícola, indicam que, para cada 30 hectares cultivados com arroz, um posto de trabalho é gerado. Assim, tal realidade comprova que ainda a atividade orizícola representa a principal matriz de desenvolvimento da Região Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul (IRGA, 2013).

A cadeia produtiva do arroz regional vai além da propriedade rural, tendo agroindústrias processadoras do cereal consolidadas. Neste sentido, a Camil Alimentos S/A, com sede em Itaqui, industrializaram 11,3% de toda a produção estadual, e detém o maior complexo agroindustrial do país (BRUM et al.,2008).

No quadro 1 mostra o ranking de algumas agroindústrias arroseiras no Estado do Rio Grande do Sul, destacando-se, em negrito, as principais empresas existentes na Fronteira Oeste.

Quadro 1. Ranking de algumas agroindústrias de arroz do Rio Grande do Sul

<i>Ordem</i>	Municípios	Empresas	Total em sacas/50kg	% do RS
1	Itaqui	Camil Alimentos S/A	7.770.497	11,3
2	Pelotas	Josapar S/A	4.198.809	6,1
3	São Borja	Pirahy Alimentos	3.787.007	5,5
4	Pelotas	Coop. Extremo Sul	2.934.728	44,3
5	São Gabriel	Urbano Agroind.	2.632.133	3,8
6	Alegrete	CAAL-Cooperativa	6 2.180.624	3,2

Fonte: IRGA, 2004.

O ranking demonstra o grau de concentração da agroindústria arroseira, bem como, a presença na região da Fronteira Oeste de três grandes empresas de beneficiamento de arroz. Nesta lógica, verifica-se que os municípios que mais industrializam são Itaqui e São Borja. Para tanto, os mesmos importam arroz de outras áreas de produção.

2.1.2 Composição e Características Nutricionais do Arroz

O grão de arroz é composto basicamente das seguintes partes: casca, farelo e grão. A casca vai para geração de energia. O farelo é uma das partes mais nutritivas do grão. Ele é constituído pelo germe e pela camada de aleurona. E o grão é composto majoritariamente, pelo endosperma amiláceo (AMARANTE, 2013).

O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. No Brasil, o consumo per capita é de 108g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (KENNEDY et al.,2002). Portanto, devido à importância do arroz na dieta de grande parte da população, sua qualidade nutricional afeta diretamente a saúde humana.

Diversos componentes do arroz presentes no farelo e/ou no endosperma têm sido relacionados a efeitos no organismo. Pesquisadores relatam efeitos benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (MILLER-IHLI,1992). Esses efeitos estão relacionados à presença dos compostos no grão, sendo, portanto afetados por diferentes fatores, principalmente pela característica genotípica e pelo processamento.

2.1.3 Uso dos agrotóxicos em Arroz

A legislação brasileira define agrotóxicos e afins, como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Considerando que, no manejo fitossanitário das lavouras de arroz, atualmente preconiza-se a utilização de agrotóxicos, a avaliação da seletividade a agentes de controle biológico precisa ser considerada, mesmo porque o uso abusivo do controle químico pode acarretar na perda da eficiência sobre o alvo de controle, afetando agentes de controle biológico presentes no ambiente (LOUREIRO et al., 2002).

O sistema atual de produção de arroz irrigado demanda uma ampla utilização de agrotóxicos, sendo recomendados para a cultura 29 herbicidas, 12 inseticidas e 8 fungicidas.

No Brasil, o total de ingredientes ativos de agrotóxicos comercializados para uso no cultivo do arroz irrigado por inundação, passou de 4.597 toneladas, em 1997, para 3.146 toneladas em 2002, representando uma redução de 31,6%. Desse total, 93,2% correspondeu a venda de herbicidas, 3,8% de fungicidas e 3% de inseticidas. Para o arroz de terras altas, o total comercializado passou de 307 toneladas para

612 toneladas, no mesmo período, um acréscimo de 99,4%. Desse total, 78,9% correspondeu a venda de herbicidas, 16,4% de fungicidas e 4,8% de inseticidas (BARRIGOSI et al.,2004).

2.2 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos começaram a ser utilizados no Brasil na década de 1940, inicialmente para controlar doenças endêmicas, tal como a doença de Chagas, Malária e Febre Amarela. O uso de compostos organoclorados, entre eles o DDT, começa a ocorrer também neste mesmo período visando o combate a doenças e pragas nas atividades agrícolas e pecuárias (ALVES FILHO, 2002).

A partir da década de 1970, ocorreu a política de estímulo do crédito agrícola no Brasil, financiando agricultores e condicionando o empréstimo ao uso de insumos, entre eles os agrotóxicos muitas vezes desnecessários a plantação. Começam a aparecer os primeiros casos de contaminação ambiental e problemas de saúde associados ao uso excessivo e desordenado dos agrotóxicos, principalmente intoxicações de trabalhadores rurais, contaminações de solos e águas, além da constatação de resíduos químicos em alimentos cultivados com estes compostos (LIMA, 2008).

No final dos anos 1980, devido a essas informações, vários estudos com relação ao uso dos pesticidas em geral foram feitos no Brasil, visando às adequações necessárias para enfrentar corretamente o problema das pragas (ALVES FILHO, 2002)

Com relação ao quadro de vendas de agrotóxicos no Brasil, as indústrias de agrotóxicos em 2009 negociaram 1,06 milhões de toneladas de herbicidas sendo que em 2008 foram comercializadas 986,5 mil toneladas, comprovando que a utilização de defensivos agrícolas no Brasil bateu recorde no ano de 2009. O aumento de produtos utilizados foi de 7,6% (SINDAG, 2010).

Atualmente, de acordo com dados da Anvisa, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e tem o maior mercado destes produtos em âmbito mundial, com 107 empresas autorizadas para registro de seus compostos químicos, respondendo por 16% do mercado mundial. A importação de agrotóxicos em nosso País cresceu 236% entre 2000 e 2007 (ANVISA, 2013).

O faturamento anual com a venda de agrotóxicos no Brasil chega a US\$ 5 bilhões e representa 84% do mercado da América Latina (ANVISA, 2013).

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, herbicidas e até biocidas são denominações dadas às substâncias sintéticas ou naturais, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo às pragas. No sentido mais amplo, tudo aquilo que ataca lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem. Adotando-se essa definição, arrolam-se entre as pragas, insetos, carrapatos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida animal ou vegetal danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e seus produtos e a outras matérias-primas alimentares. Por extensão, incluem-se nesta categoria os agentes desfolhantes, os dessecantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal (BARBOSA, 2004).

Agrotóxicos são poluentes particularmente importantes dentre os compostos orgânicos devido ao seu uso freqüente e muitas vezes descontrolado. A partir da segunda metade do século XX houve uma expansão do seu uso. De acordo com os dados do British, aproximadamente 860 substâncias ativas são comercializadas como agrotóxicos nos mais variados tipos de formulações. Estas substâncias são divididas em mais de 100 classes, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (TOMLIN, 2004).

No mundo, as perdas anuais devido à ação de pragas na agricultura chegam a 1 bilhão de toneladas, correspondendo a uma redução de 20 a 30% na produção. Os herbicidas, desde seu desenvolvimento, desempenharam um importante papel no crescimento da agricultura moderna. A utilização destes compostos químicos, que por um lado gera benefícios, por outro, é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos. Assim, a determinação de resíduos de herbicidas em alimentos e em amostras ambientais é importante devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação (GONÇALVES, 2007).

Com a vasta importância no sistema de plantação, os agrotóxicos têm sido alvo de ampla preocupação social, principalmente no que diz respeito ao seu potencial de risco ao ambiente.

No Brasil, os LMR são estipulados por cultura pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. O PARA foi iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar, evitando assim possíveis agravos à saúde da população (PARA, 2008).

A determinação de resíduos de herbicidas desempenha um papel importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção agrícola com as Boas Práticas Agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar (IVANOFF, J., 2002).

A legislação brasileira obriga às formulações de herbicidas a apresentarem no rótulo, a cor e à classe de sua toxicidade, conforme demonstrado no Quadro 2 para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002).

Quadro 2. Classificação das formulações segundo a toxicidade.

Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
Faixa Vermelha – extremamente	Faixa Amarela – altamente	Faixa Azul – mediantemente	Faixa Verde – pouco tóxico

Fonte: CIT, 2007.

2.2.1 Os Herbicidas como contaminantes das águas e solos

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pragas, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas, fazendo com que aumente a produção e o desenvolvimento de novos herbicidas (BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos, desde o seu desenvolvimento, desempenham um papel importante no crescimento da agricultura moderna. A utilização destes compostos químicos gera benefícios, mas também é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos (PRESTES et al., 2009).

O solo foi considerado durante muito tempo um sistema fechado, isolado e inerte, no qual era possível fazer depósito de resíduos sem que houvesse maiores problemas para os organismos que nele viviam. Verificou-se que, o solo faz parte de um sistema e está em constante renovação, embora esta renovação possa ser lenta (AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

Atualmente, em tempos de globalização, os cidadãos não compartilham dos mesmos direitos globais de igualdade de condições e acesso a bens e recursos, entretanto, a contaminação ambiental desconhece barreiras geográficas, atingindo mananciais e seres vivos, mesmo quando gerada a quilômetros de seu ponto de detecção (AMARANTE et al., 2006).

Deste modo, é preciso que se pense responsabilmente a questão da geração de poluentes, pois os mesmos, por suas mais diferentes características, podem permanecer no ambiente afetando muitas gerações ao longo do tempo. (BARRIGOSSI et al., 2008)

A aplicação indiscriminada de pesticidas conduz, geralmente, à graves problemas ambientais. Dependendo de sua composição e toxicidade, os pesticidas podem ser classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (BAIRD, 2002). São aplicados em grande quantidade, em áreas bastante extensas e também no emprego domissanitário, geralmente com grande persistência no meio ambiente (BIZIUK et al., 1996).

Dentre os pesticidas empregados na agricultura destacam-se os herbicidas, que correspondem à maior parcela comercializada mundialmente (UETA et al., 2001).

Os herbicidas são agentes biológicos ou substâncias químicas que agem matando ou suprimindo o desenvolvimento de espécies daninhas (ROMAN et al., 2007) e comprometem a produtividade de culturas de interesse comercial. O problema é que muitas destas moléculas têm grande probabilidade de contaminar os recursos hídricos, devido características como alto potencial de deslocamento no perfil do solo (lixiviação), elevada persistência no solo, baixa a moderada solubilidade em água e adsorção moderada à matéria orgânica presente nos colóides do solo (ALMEIDA et al., 2006).

Resíduos de pesticidas têm sido identificados em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas incluindo aquelas

mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e zonas polares (BAIRD, 2002; SPADOTTO et al.,2004).

Os efeitos para o meio ambiente ocasionados por um herbicida dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do herbicida no meio ambiente (SPADOTTO et al.,2004;ROCHA et al.,2004).

Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e/ou aviões, na forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir águas superficiais (MARTINS, 2010).

Depois da aplicação de um herbicida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de um herbicida no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), e por interações desses processos. A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por herbicidas. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de herbicidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, que podem afetar esses processos (SPADOTTO et al.,2002).

Quando aplicados diretamente no solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microrganismos. Entretanto, as moléculas com alta persistência (baixa taxa de degradação) podem permanecer no ambiente sem sofrer alteração. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo, desorvidas a partir dessas mesmas partículas, sofrer lixiviação (lavagem do solo pela água da chuva) e atingir os lençóis subterrâneos ou, ainda, serem levadas para águas superficiais. Nos ambientes aquáticos, os pesticidas podem sofrer adsorção (ligar-se ao sedimento por interações químicas e físicas) ou desorção das partículas de sedimento. No ar,por volatilização as moléculas na forma de gás ou de

vapor podem ser transportadas por muitos quilômetros, atingindo áreas muito distantes da região de aplicação (SANCHES, 2003).

Considerando os processos de transporte entre compartimentos ambientais, com os quais os pesticidas estão relacionados depois de aplicados em áreas agrícolas, a lixiviação e o escoamento superficial merecem destaque. O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais, com os pesticidas sendo levados adsorvidos às partículas do solo erodido ou em solução na água. A lixiviação dos pesticidas através do solo tende a resultar em contaminação das águas subterrâneas e neste caso, as substâncias químicas são carregadas juntamente com a água que alimenta os lençóis freáticos, subterrâneos e superficiais (SPADOTTO et al., 2004).

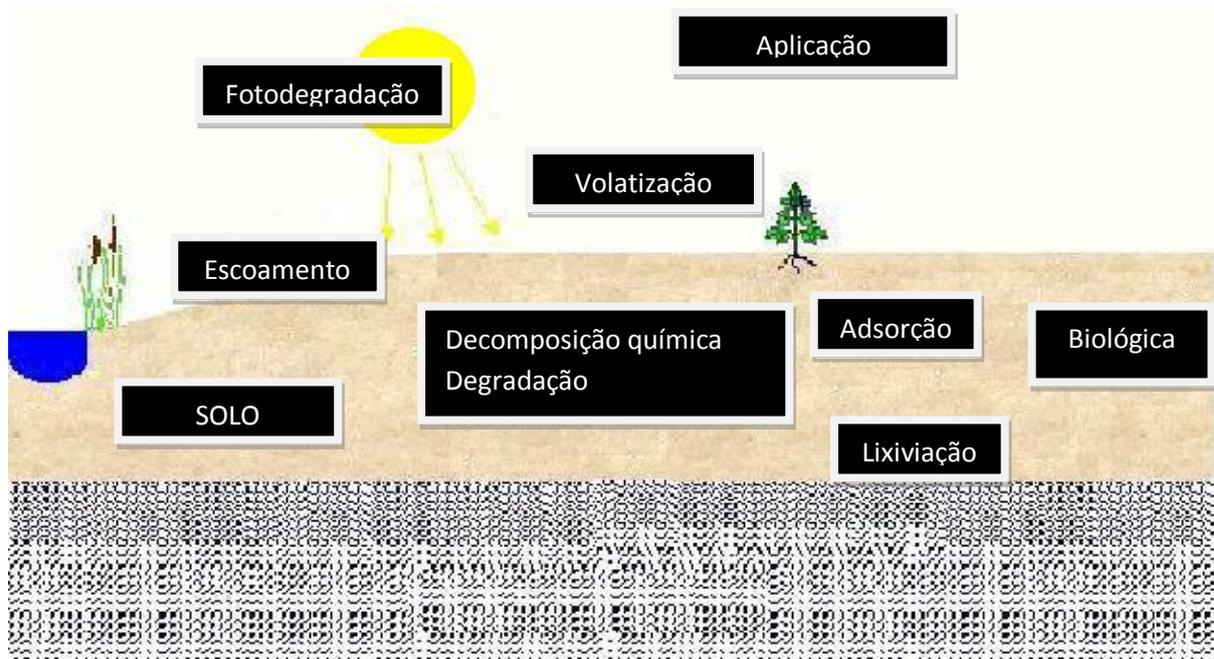


Figura 1. Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por herbicidas. Fonte: SPADOTTO, 2002.

Outra via de entrada dos herbicidas é a ingestão do alimento contaminado pelo homem. O xenobiótico, dependendo de sua concentração no ambiente, pode ser absorvido pelos peixes, através da exposição a sedimentos, água ou alimentos contaminados (transferência trófica) (Figura 2), depositando-se, preferencialmente, na camada de gordura. Este processo é conhecido como bioacumulação e é determinado também por processos biológicos (hábito alimentar e metabolismo da

espécie). Na medida em que o herbicida tem sua concentração aumentada nos tecidos dos organismos de nível trófico superior (por exemplo, da presa para o predador), o processo é conhecido como biomagnificação (FERNICOLA et al., 2003).

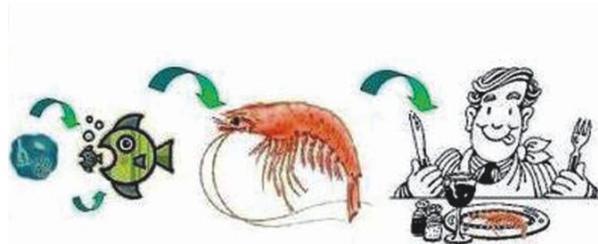


Figura 2. Potencial de biomagnificação de herbicidas através do consumo de pescado contaminado pelo homem.

Assim, a contaminação dos recursos hídricos e o consumo de peixes contaminados pelo homem têm despertado o interesse da comunidade científica e se caracterizado como mais um problema de saúde pública (MOURA et al., 2008).

Pensando nas consequências que os poluentes podem trazer em longo prazo, 90 países, dentre eles o Brasil, durante reunião do Programa das Nações Unidas para o Ambiente, ocorrida em maio de 2001 na Suécia, assinaram a Convenção de Estocolmo, um tratado global para proteger a saúde humana e o ambiente contra os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Os POPs são produtos químicos de alta persistência e ampla distribuição geográfica que se acumulam no tecido adiposo de organismos vivos. Segundo esta Convenção, os governos signatários se comprometem a tomar medidas para eliminar ou reduzir as emissões de POPs para o ambiente, atendendo a um apelo da comunidade internacional (MOURA et al., 2008).

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e os herbicidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Com o agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação à concentração inicial de pesticidas, como o leite, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais (GONÇALVES, 2007).

A exposição a herbicidas tem sido fonte de muitos problemas de saúde, agudos e crônicos, na população rural, principalmente nos países em desenvolvimento. Para se ter uma idéia dos efeitos sobre o homem, foi realizada

uma caracterização dos envenenamentos por exposição aguda a herbicidas agrícolas utilizados no estado de Mato Grosso do Sul, entre 1992 e 2002, verificando-se um total de 1.355 casos involuntários (acidental ou profissional) (MOURA et al., 2008).

2.2.2 Herbicidas na cultura do arroz

Existe no mercado um grande número de compostos para controle de plantas daninhas, insetos, fungos e outros organismos que prejudicam a produção das lavouras, além de uma demanda crescente de novos produtos para controlar esses organismos.

Na Região Sul do Brasil, a cultura do arroz irrigado sofre com a ação de pragas, como insetos, fungos, plantas daninhas entre outras que prejudicam a produtividade.

Alguns dos herbicidas mais recomendados e empregados na cultura do arroz no estado do Rio Grande do Sul, sendo clomazone, metsulfuron metílico, quincloraque e propanil segundo informações do Departamento de Fitotecnia da UFSM e do Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA, 2013).

Segundo conhecimentos de pesquisadores, os herbicidas mais usados nas plantações de arroz irrigado no RS são os seguintes, em ordem decrescente por maior frequência de uso: clomazone, quincloraque, propanil, glifosato, imazetapir, metsulfuron metílico, pirazossulfuron etílico, bispiribaque-sódico, cialofope-butílico e profoxidim, e os inseticidas carbofuran e fipronil.

2.2.3 Herbicida escolhido para o estudo

Dentre os principais herbicidas empregados em larga escala na agricultura brasileira, optou-se por desenvolver método para determinar resíduos de herbicida Clomazone em grãos de arroz. A escolha baseou-se, principalmente, no intenso emprego deste agrotóxico na região oeste do estado do Rio grande do Sul, grande produtora de arroz irrigado.

2.2.4 CLOMAZONE

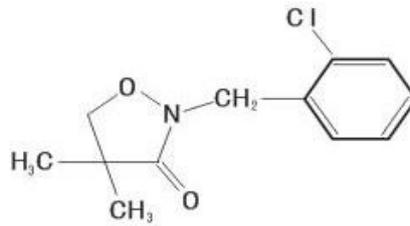


Figura 3. Fórmula molecular do Clomazone

Fonte: http://pt.made-in-china.com/co_fiona-fan/product_Clomazone-95TECH_hgsggug.html, 2013.

Grupo Químico: isoxazolidinona

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

Classe: Herbicida

Número no CAS: 81777-89-1

Massa molar: 239,7 g mol⁻¹

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

1º Nome comercial: Gamit® (GONÇALVEZ, 2007).

Segundo ALMEIDA et al. (2007), citado por SANCHOTENE,(2009),o herbicida clomazone é registrado no Brasil para as culturas do arroz, cana de açúcar, fumo, soja e do algodão, no controle pré-emergente de gramíneas e algumas espécies dicotiledôneas. Esse herbicida é comercializado nas formulações EC (concentrado emulsionável a 500 e 800 g L⁻¹) e CS (suspensão de encapsulado a 360 g L⁻¹).

Foi inicialmente usado na cultura do arroz no início da década de 90, como pré-emergente, ou em pós-emergência, em mistura com o herbicida propanil (SANCHOTENE, 2009).

Clomazone é geralmente utilizado no controle em culturas de soja, algodão, cana de açúcar, milho, fumo, e uma variedade de outros grãos vegetais. A meia vida de dissipação no campo, determinado por estudos em campo com diferentes tipos de solo, variou de 4 a 12 semanas. As propriedades físicas químicas do clomazone indicam que é um contaminante em potencial de águas subterrâneas e de aplicação pré-emergente (ZANELLA et al., 2002).

O herbicida clomazone é absorvido preferencialmente pelas raízes das plantas e translocado via xilema para as folhas, onde é metabolizado a 5-ceto clomazone, a sua forma ativa (SANCHOTENE, 2009).

Desta forma, nos últimos anos, muitas pesquisas têm comprovado a toxicidade dos pesticidas aos seres vivos. Muitos deles são classificados como mutagênicos, carcinogênicos, citotóxicos genotóxicos e imunotóxicos. Além disso, podem provocar disfunção endócrina em espécies de vertebrados, exemplo disso, são alguns pesticidas organofosforados que interferem na reprodução de aves, especialmente do sexo masculino (PETERS, 2011).

O herbicida clomazone, assim como os organofosforados e carbomatos, são capazes de alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima, encontrada em animais, é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina, regulando seus níveis no sistema nervoso central e, a inibição desta enzima pode levar a diversos efeitos comportamentais, tais como hiperatividade, tremores, convulsões e morte (PETERS, 2011).

3. PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Na análise de resíduos de agrotóxicos há a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra devido à complexidade das matrizes, as concentrações extremamente baixas dos analitos, bem como, da grande variedade de propriedades químicas destes. Devido a estes fatores, as interferências são problemas freqüentes que precisam ser considerados. Os principais objetivos do preparo da amostra são: promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises. Desta maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (PRESTES et al., 2009).

Um método de preparo de amostras deve, idealmente, ser de fácil manipulação, envolver poucas etapas e o mínimo de tempo possível; deve ser barato e permitir uma recuperação quantitativa, sem perdas nem destruição dos analitos; deve produzir um meio adequado ao método analítico a ser utilizado e, finalmente, deve gerar uma solução que contenha as substâncias de interesse,

numa concentração adequada à sensibilidade do sistema de detecção, sem que haja a necessidade de concentrá-la (SKOOG et al., 2008).

Os procedimentos de preparo de amostra, tais como extração, concentração e *clean-up*, influenciam potencialmente na confiabilidade e exatidão das análises (AHMED, 2001).

Entre os procedimentos de preparo de amostra que têm sido largamente empregados para determinação de herbicidas em matrizes complexas destaca-se o método de extração QuEChERS (MARTINS, 2010).

3.1 Método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de agrotóxicos.

Durante os anos 1990, devido às intensas pressões de ambientalistas e a fatores relacionados com a saúde humana, aconteceu um grande desenvolvimento de procedimentos alternativos de extração baseados na diminuição do volume de solvente (RODRIGUES et al., 2003.; GARRIDO-FRENICH et al., 2005).

Em 2003, Anastassiades et al., com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de herbicidas denominado QuEChERS, sendo que a pronúncia deve ser “*catchers*” (PRESTES et al., 2009), caracteriza-se por utilizar pouca quantidade de amostra e solvente na análise.

Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna.

De acordo com Hercegová (2007), (apud PRESTES et al., 2009), um método multirresíduo de preparo de amostra para a análise de agrotóxicos deve apresentar as seguintes propriedades: incluir o maior número de agrotóxicos possíveis, recuperações próximas a 100%, remover os possíveis compostos interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança, utiliza pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade.

Para garantir de maneira simples uma maior eficiência do procedimento de preparo de amostra, usualmente, é utilizada a menor quantidade possível de

amostra, desde que esta garanta representatividade estatística ao resultado final (PRESTES et al., 2009).

Segundo Čajka e Hajšlová (apud PRESTES et al., 2009), de maneira geral, amostras sólidas, como a maioria dos alimentos, requerem etapas mais complexas e demoradas durante seu preparo.

QuEChERS explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna e durante o seu desenvolvimento, é dada ênfase para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido ao simplificado número de etapas (PRESTES et al., 2009).

Desde o seu desenvolvimento, o método *QuEChERS* é utilizado na extração de resíduos de herbicidas. Além deste amplo campo de aplicação, tem sido usado na extração de outros tipos de analitos.

Pan et al. (2009) utilizaram o método *QuEChERS* para a extração do antibiótico cloroanfenicol em amostras de mel, antes da quantificação empregando LC-MS.

O método *QuEChERS* também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization* (European Union, 2008)

Além disso, durante a sessão do Comitê de Resíduos de herbicidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os Estados Unidos apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão (Codex Alimentarius, 2007).

A metodologia do *QuEChERS* representada, segue o trabalho descrito por Zanela et al., (2002) (apud PRESTES et al., 2009), Andrade et al (2011) e Borges et al., (2009). O método *QuEChERS* utiliza 10 g de amostra. O solvente de extração empregado é a acetonitrila e a relação entre o solvente e a amostra é de 1 g por 1 mL. A agitação é manual ou com o auxílio do vortex. São adicionados 1 g de cloreto de sódio (NaCl) e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄). Agita-se vigorosamente por 1 min. A seguir adiciona-se um padrão interno de trifenilfosfato. Agita-se por 1 min e centrifuga-se. A etapa de *clean-up* é feita através da extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE*), onde 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina-secundária (PSA) e 150 mg de MgSO₄. Novamente agita-se por 60 segundos e centrifuga-se. Após é realizada a análise cromatográfica.

O sorvente PSA tem um elevado efeito quelante devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, ocorre à retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz (PRESTES et al., 2009).

A técnica QuEChERS tem muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra para determinação de resíduos de herbicidas, entre elas altos percentuais de recuperação são obtidos para um amplo número de compostos de distintas polaridade e volatilidade, emprego de um pequeno volume de solventes, além de não usar solventes clorados; um único analista pode realizar o preparo da amostra; não solicita o emprego de muitos materiais e equipamentos, bem como ambiente físico durante o desempenho do método (PRESTES et al., 2009).

A principal desvantagem deste método está relacionada com a relação amostra/extrato final que é de 1 g por 1mL. Este valor é menor quando comparado com os obtidos com outros métodos que utilizam uma etapa de concentração apresentando relação amostra/extrato final de 2 a 5 g por 1mL(MARTINS, 2010).

Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos nas análises isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de Limites de Quantificação do método mais elevados, para o mesmo volume de injeção. Entretanto, considerando a alta sensibilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, principalmente com GC-MS/MS e LC-MS/MS, o método QuEChERS é adequado e constitui o estado da arte para a determinação resíduos de pesticidas em diferentes alimentos (PRESTES et al., 2011).

4. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS

As análises de resíduos de herbicidas em amostras ambientais e biológicas, desde meados de 1950, basearam-se, primeiramente, na determinação por meio da Cromatografia Gasosa (GC). A partir do início dos anos 1970, começou a ser publicado o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para determinação destes compostos nos diferentes tipos de amostras. A HPLC tem sido intensamente aplicada na pesquisa de resíduos em diferentes matrizes devido à

capacidade de detectar compostos termicamente instáveis e não voláteis, que não são identificados por Cromatografia Gasosa(MARTINS, 2010).

Devido ao grande poder de separação para análise de matrizes complexas, a LC-MS é considerada sensível e seletiva, permitindo a identificação segura em baixas concentrações para diferentes analitos (SILVA et al., 2010).

Contudo, o uso de partículas menores que 2 μ m se tornou plausível atualmente, com o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (QUEIROZ et al., 2012)

4.1 Técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS

A invenção desta técnica é, usualmente, atribuída ao botânico russo Mikhael Tswett, o qual, no início do século XX, separou pigmentos coloridos presentes em extratos de folhas verdes de plantas, utilizando um tubo preenchido com carbonato de cálcio. A cromatografia desenvolveu-se rapidamente na década de 1950 e, a partir da década 1960, passou a ser refinada e sofisticada com o desenvolvimento da cromatografia gasosa capilar por Golay, com a introdução de computadores para o monitoramento dos parâmetros experimentais e tratamento dos dados obtidos (CIOLA, 1998).

No final da década de 1960, e início da década de 1970, várias modificações foram introduzidas nesta área e o termo simples “cromatografia líquida moderna” foi cunhado por Snyder e Kirkland para refletir estas mudanças. De acordo com esses autores, as diferenças entre a cromatografia Líquida moderna e os procedimentos antigos incluem detalhes de equipamentos, matérias, técnica e teoria. Cujas vantagens incluem conveniência, precisão, velocidade e a habilidade de efetuar separações difíceis (CIOLA, 1998).

O espectrômetro de massa é um instrumento largamente utilizado na elucidação estrutural. O primeiro espectrômetro de massas foi desenvolvido por Thomson em 1912, porém somente nas décadas de 1950 e 1960, com o advento da computação, a técnica passou a ser aplicada por grupos de pesquisa fora das universidades, pois a análise e o processamento de dados tornaram-se possíveis. A técnica consiste em ionizar as moléculas, a fim de que as mesmas gerem

fragmentos definidos como íons, carregados positiva ou negativamente, que são detectados e quantificados (WENTZ, 2010).

Um espectrômetro de massas é dividido em três partes fundamentais: a fonte de íons, o analisador e o detector. A amostra é introduzida na fonte de ionização onde é ionizada íons, pois são mais fáceis de serem manipulados do que moléculas neutras. Esses íons direcionados para a cela de colisão onde são fragmentados e direcionados para analisador onde são separados de acordo com a razão m/z . Na sequência, os fragmentos gerados são enviados para o detector gerando assim o espectro de massas. (WENTZ, 2010).

O analisador e o detector são mantidos em alto vácuo, para garantir que os íons percorram o caminho até o detector sem a interferência de outras moléculas (WENTZ, 2010).

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

Métodos adequados para o preparo das amostras são imprescindíveis para aproximar-se a resultados analíticos confiáveis.

Embora os primeiros trabalhos sobre a influência da matriz nas análises de agrotóxicos por cromatografia tenham sido publicados a partir de 1981, considera-se que o efeito de matriz foi sistematicamente estudado pela primeira vez por Erney et al.(1993), na análise de organofosforados em leite e manteiga por CG.

Os baixos níveis de resíduos permitidos, impostos pelas agências regulamentadoras, requerem o desenvolvimento de métodos analíticos de alta sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de herbicidas (BALINOVA, 1996; KUSTER et al., 2006).

Várias técnicas têm sido usadas para determinação e quantificação dos resíduos em amostras ambientais. Dentre elas destacam-se a cromatografia gasosa (CG) acoplada a detector seletivo de captura de elétrons ou ao detector de massas no modo de seleção de íons e por fim a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de massas (MS) (WENTZ, 2010).

A Cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área

superficial, denominada fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária (CIOLA, 1998).

A cromatografia líquida tem sido usada para determinação de agrotóxicos acoplada a diversos detectores, entre eles podemos citar o DAD (CEREJEIRA et al., 2003; GATIDOU et al., 2005, D'A RCHIVIO et al., 2007) e o MS (MARÍN et al., 2006; SHOMAR et al., 2006; FERRER,2007; RODRIGUES et al., 2007), os quais auxiliam na identificação e quantificação dos compostos (BRAGA et al., 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) é a melhor escolha para substâncias que apresentam volatilidade baixa e/ou instabilidade térmica. A cromatografia líquida é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto que a espectrometria de massas em série permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou menores (LEHOTAY et al., 2010; SOLER & PICÓ, 2007).

Ainda, se as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas forem muito sensíveis e seletivas, deve ser realizada uma etapa de preparo da amostra.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas de diversas massas molares e em baixas concentrações. A grande sensibilidade da técnica faz com que seja rotineiramente usada na análise de substâncias de baixa concentração, como no caso de *doping*, controle de resíduos em alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre outras aplicações (RODRIGUES et al., 2011).

O potencial de aplicação da MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos.

A técnica UHPLC-MS/MS tem se tornado uma tendência mundial, haja vista que tem como vantagem principal o aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos, mesmo com vazões elevadas da fase móvel (FRENICH et al.,2008).

Como resultado, não somente há o aumento da eficiência, mas também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor detectabilidade. A combinação de UHPLC-MS/MS fornece vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise (QUEIROZ et al.,2012).

4.1.1 Introdução da Amostra

A amostra pode ser introduzida diretamente na fonte de ionização ou ocorrer de um sistema cromatográfico acoplado ao espectrômetro de massas, geralmente GC ou LC, que é capaz de separar os diferentes componentes da amostra o que gera uma sequência de análises (WENTZ, 2010).

4.1.2 Ionização por Eletrospray (ESI)

No sistema de ionização por electrospray, a amostra é introduzida na câmara de ionização por um capilar de aço inoxidável (75-150 m). Uma alta voltagem (3 ou 4 kV) é aplicada na ponta do capilar que situa-se dentro da fonte de íons, pela força de campo elétrico aplicado e com o auxílio do gás nebulizante, as gotas se dispersam na forma de um aerossol. Esse gás, usualmente nitrogênio, tem a função de arrastar o aerossol da ponta do capilar para a câmara de ionização(WENTZ, 2010).

As gotas carregadas eletricamente vão diminuindo de tamanho à medida que entram em contato com o gás de secagem, que consiste em um fluxo de nitrogênio aquecido. Então, íons livres de solvente podem se desprender das gotículas, alguns deles passam pelo cone de entrada do espectrômetro, situado numa região de médio vácuo, e depois por outro orifício que é mantido em alto vácuo. A voltagem das lentes são otimizadas para cada amostra (WENTZ, 2010).

A ESI é uma técnica muito sensível, porém a sensibilidade pode ser comprometida pela adição de compostos não voláteis e outros aditivos, que devem ser evitados ao máximo (WENTZ, 2010).

No modo de ionização positivo é adicionada uma pequena quantidade de ácido fórmico para auxiliar a protonação da amostra; enquanto que no modo negativo pode ser adicionada amônia ou uma amina volátil a fim de facilitar a desprotonação da amostra (WENTZ, 2010).

4.1.3 Analisador

A principal função do analisador de massas é separar, ou resolver os íons formados na fonte de ionização de acordo com a razão massa-carga. Os

analisadores mais conhecidos são o quadrupolo, de tempo de voo (do inglês time-of-flight) (TOF), de setor magnético (do inglês magnetic-sector) e os de armadilha de íons. Esses analisadores possuem diferentes recursos, incluindo a faixa de razão m/z, a precisão e a resolução (WENTZ, 2010).

4.2 Efeito Matriz em LC-MS/MS

Na análise por LC-MS a presença da matriz pode resultar em mudanças na eficiência de ionização, uma vez que pode ocorrer supressão ou aumento da ionização (PRESTES et al.,2009).

Esse fenômeno é conhecido como Efeito Matriz (ME, do inglês Matrix Effect) e foi descrito pela primeira vez em HPLC por TANG, KEBARLE, 1993. Os autores observaram a diminuição da resposta de uma base orgânica em uma determinada matriz, empregando ESI como fonte de ionização, com o aumento da concentração de outras bases orgânicas.

A intensidade do efeito matriz pode variar de uma amostra para outra, ou de acordo com a concentração do analito na matriz. Segundo HAJSLOVÁ et al.,(1998), o efeito matriz é maior em baixas concentrações de analitos, pois há um decréscimo na razão da concentração do analito/concentração da matriz. Componentes da matriz podem interferir na ionização dos compostos quando presentes na amostra em concentração superior a 10mol L^{-1} (TANG et al.,1993).

Em LC-MS/MS, o efeito matriz é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo tempo de retenção que o analito e por isso, competem com o analito durante o processo de ionização. O número de íons do analito pode ser diminuído pela interação com os íons da matriz, o que chamado de “íon Suppression”, ou aumentar (pela presença dos íons da matriz), resultando num efeito matriz negativo ou positivo, respectivamente(PIZZUTTI,2006).

5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Um laboratório deve produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, deve preocupar-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida a

respeito de sua exatidão e que possuam precisão adequada para a finalidade a que se destinam (SOARES, 2001).

Para que esta confiabilidade seja atingida, o primeiro passo está na validação do método analítico escolhido. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Vários autores definem validação de métodos e os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (RIBANI et al.,2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003).

O método validado determinou os seguintes parâmetros de validação: linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; seletividade; recuperação; repetitividade e precisão intermediária.

5.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais freqüentemente utilizada e corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI et al.,2004).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie(RIBANI et al.,2004).

Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. A curva analítica deve ser definida por no mínimo cinco pontos em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do RSD entre as injeções inferiores a 5% (RIBANI et al.,2004; BRASIL, 2003).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) (RIBANI et al., 2004;INMETRO,2003).

$$\text{Equação 1: } y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração do analito;

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

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

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito, ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003).

Segundo RIBANI et al. (2004), (apud CALDAS, 2009), o coeficiente de correlação (r) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois, quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

O método de superposição de matriz (“matrix matched”) consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões (RIBANI et al.,2004).

Sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra (RIBANI et al., 2004).

5.2. Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinada, simultaneamente, aos testes de linearidade (MARTINS, 2010).

A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2003). No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004).

5.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

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

O Limite de Detecção (LOD, do inglês Limit of Detection) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. (RIBANI et al., 2004). Na prática, o LOD é determinado pela menor concentração do analito que gera um sinal três vezes maior que o sinal do ruído.

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês Limit of Quantification) representa a menor concentração de uma substância que pode ser medida com confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). O LOQ também pode ser definido em relação ao ruído, sendo dez vezes maior que o sinal do ruído.

O LOD e o LOQ podem ser estimados por três diferentes maneiras: pelo método visual, método relação sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. O método mais utilizado em Cromatografia é o da relação sinal-ruído. O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos

analíticos que exibem linha de base. É determinada a razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado. O LOD e o LOQ são expressos como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão devem ser consideradas (RIBANI et al.,2004).

5.4 Exatidão (recuperação)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003; VALENTINI et al., 2007).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A recuperação é a medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. É o método mais utilizado para a validação de métodos cromatográficos(LANÇAS,2004).

As amostras “brancas e demais” são fortificadas pela adição dos analitos em diferentes concentrações, seguidas pela determinação da concentração do analito adicionado (MARTINS, 2010).

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANCO, 2003). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI et al.,2004).

5.5 Precisão, Repetitividade e Precisão Intermediária

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra, em amostras semelhantes ou em soluções padrões em solvente, nas mesmas condições definidas no método de ensaio. É normalmente determinada para circunstâncias

específicas de medição e as formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo que a precisão avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (INMETRO, 2007).

A precisão de um método analítico pode ser expressa com o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas (ANVISA, 2003).

A Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia do INMETRO (MARTINS, 2010).

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

5.6 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI et al 2004).

5.7 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta faces as pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (RIBANI et al., 2004).

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel (MARTINS, 2010).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na determinação de resíduos do herbicida clomazone em grãos de arroz, empregando o método QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS/MS).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Na etapa de validação foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, curva analítica e faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (em termos de repetibilidade e precisão intermediária).

6.1 Obtenções das amostras

Foi utilizado oito amostras de arroz polido comerciais embasados de marcas diferentes provenientes de zonas de cultivo da Fronteira Oeste do Rio grande do Sul.

6.2. Instrumentação

Foram utilizados os seguintes equipamentos no desenvolvimento deste trabalho:

- ⇒ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (AND, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);

- ⇒ Centrífuga Centribio, modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- ⇒ Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ⇒ Estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/1 (Tecnal, Brasil);
- ⇒ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, EUA);
- ⇒ Sistema UHPLC[™]-MS/MS: Cromatógrafo Líquido Waters Xevo[™] TQ (Irlanda), equipado com:
 - Detector espectrômetro de massas triplo quadrupolo, equipado com fonte de ionização Zspray[™] ESI (Irlanda), utilizando argônio como gás de colisão;
 - Bomba Binária (Binary Solvent Manager, Acquity[™] Ultra Performace LC, Singapore);
 - Amostrador automático: Sample Manager (Acquity[™] Ultra Performace LC, Singapore);
 - Coluna analítica: ACQUITY UHPLC[®] BEH C₁₈, (50 x 2,1 mm d.i) e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Milford, EUA);
 - Sistema de aquisição de dados: Software MassLynx (version 4.1);
 - Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Marca PeakScientificInstrumentsLtd, Escócia).

A balança utilizada para as pesagens dos padrões bem como as vidrarias usadas no preparo das soluções foram calibradas por empresas credenciadas junto ao Inmetro - Rede Brasileira de Calibração (RBC) e em conformidade com os requisitos da NBR ISO/IEC 17025.

6.3. Materiais

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados a seguir:

- ⇒ Filtros de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,2 µm de tamanho de poro (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ⇒ Frascos de vidro (*via*), capacidade de 4,0 e 2,0 mL;
- ⇒ Ponteiros com capacidade de 200 µL, 1 mL e 10 mL (Brand, Alemanha);

- ⇒ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ⇒ Vidrarias de laboratório em geral.

6.4 Solventes, reagentes e gases

Os solventes, reagentes e gases utilizados neste trabalho estão listados abaixo:

- ⇒ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA);
- ⇒ Acetona 99,5% ACS (Tedia, EUA);
- ⇒ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ⇒ Ácido acético glacial 96% (Merck, Brasil);
- ⇒ Ácido fórmico 98% (Sigma-Aldrich, Brasil);
- ⇒ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3[®];
- ⇒ Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- ⇒ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ⇒ Gás argônio usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS com 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- ⇒ Hexano-N ACS (Caledon, Canadá);
- ⇒ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ⇒ Padrão sólido do agrotóxico clomazone com 99% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- ⇒ Sorvente C₁₈ com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ⇒ Sorvente PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ⇒ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, EUA).

6.5 Preparo da solução padrão do herbicida

Solução intermediária de 1analito foi preparada em metanol na concentração de 1 µg mL⁻¹, a partir de solução estoque de 10 µg mL⁻¹ do analito. As soluções usadas para a construção das curvas analíticas foram obtidas em concentrações entre 0,050 a 0,010 µg mL⁻¹ em metanol/água com 1% ácido acético (1% v/v), após

diluições adequadas da solução intermediária de $1\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções de trabalho foram preparadas no dia.

6.6 Preparo da solução da análise

As amostras de arroz polido foram preparadas através do método slurry, onde 40 g da amostra e 40 g de água foram pesadas e trituradas em ultraturrax. Após a trituração, os herbicidas foram extraídos utilizando-se o método QuEChERS modificado acetato, presente na figura 4. Pesou-se 10 g da amostra em cada tubo contendo 13 tubos de centrifuga de polipropileno (50 e 15mL) e após a adicionou-se 10 mL de acetonitrila, em seguida agitou-se os tubos em um vortex (1400 rpm) por 1 minuto. Após, adicionou-se 4,0 g sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio, agitou-se por 1 minuto, em seguida, centrifugou-se por 8 min a 10.000 rpm, a 10 °C. Na Etapa de *Clean-up* dos extratos, transferiu-se 4mL do sobrenadante para tubo de polipropileno contendo 100 mg de Sorvente-PSA, 600 mg de sulfato de magnésio e 500 mg de C18. Após, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se por 8 min a 10.000 rpm. Filtrou-se o sobrenadante em filtro de nylon 0,45 μm e foi postou no vial e injetou-se 10 μL no sistema UHPLC-MS/MS.

O método QuEChERS acetato usado nesse trabalho, esta descrito no Figura 4

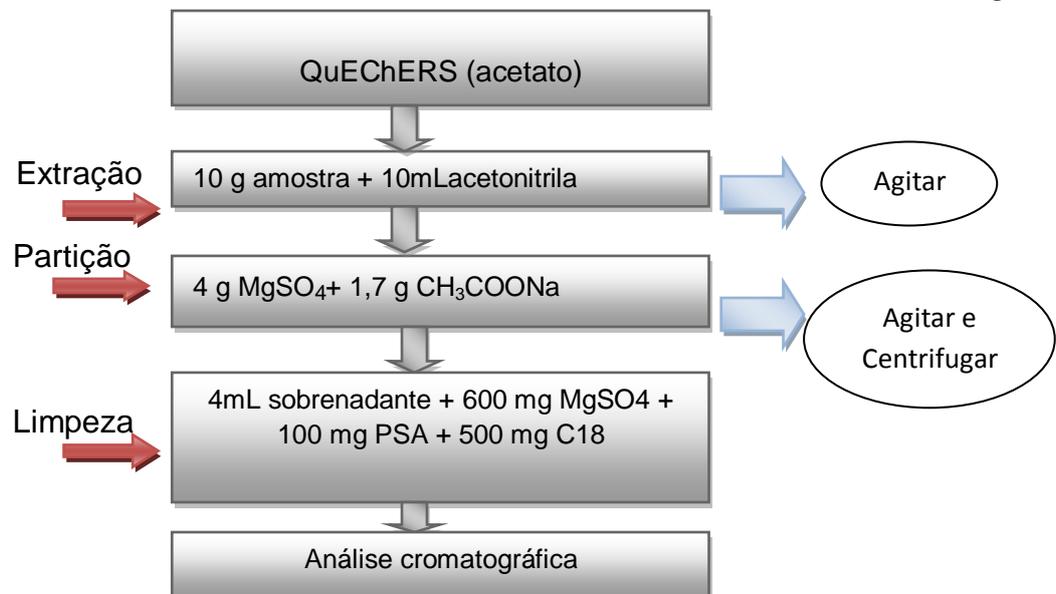


Figura 4. Fluxograma do Método QuEChERS acetato para determinação de Clomazone.

6.7 Fortificações das amostras

As amostras foram fortificadas três vezes em três concentrações 0,010; 0,020; 0,050. mg Kg⁻¹ para estudo de exatidão e precisão do método. As concentrações foram selecionadas de forma a atender o menor LMR (0, 010 mg kg⁻¹) estabelecido para herbicidas não registrados e/ou proibidos. Devido à alta sensibilidade do equipamento, foi possível realizar um nível abaixo (0, 005 mg kg⁻¹). As fortificações foram realizadas com adição de volumes adequados de uma solução intermediária de concentração 1,000 µg mL⁻¹, preparada em metanol e acetona e deixadas em repouso por 30 minutos antes das análises.

6.8 Quantificação dos herbicidas

Para quantificação do herbicida no UHPLC-MS/MS, tanto nos estudos de recuperação quanto nas análises de amostras comerciais, foram construídas curvas analíticas na matriz com seis níveis de concentração: 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20 µg mL⁻¹, que foram injetados em duplicata (n=2). O padrão do herbicida foi adicionados aos extratos secos da matriz branco e o volume completado para 4mL com metanol/água com 1% ácido acético (1% v/v). O uso de curva na matriz foi selecionado para evitar efeitos matriz que causam enriquecimento ou supressão do sinal obtido pelo espectrômetro de massas.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC MS/MS para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em arroz da Froenteira Oeste

Foram utilizados dois solventes para Fase Móvel (FM); Solvente (A) Solução aquosa 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% ácido fórmico e 5 mm de formiato de amônio; e Solvente (B) metanol com 0,1% ácido fórmico e 5 mm de formiato de amônio, as condições utilizadas na técnica UHPLC-MS/MS são mostradas na tabela 2.

A escolha por dois aditivos na fase móvel visto que os mesmos geraram melhores intensidades e respostas reprodutíveis. Para os analitos em estudo quando de utilização de ácido fórmico no modo de ionização positivo há formação de íons $[M + H]^+$ e, no caso do formiato de amônio ocorre a formação de adutos de amônio $[M + NH_4]^+$ os quais impedem a formação de adutos de sódio com os agrotóxicos, os quais podem ser formados espontaneamente, por alguns analitos quando se utiliza a ionização por ESI. Empregou-se gradiente linear (Tabela 1) com vazão de $0,225 \text{ mL min}^{-1}$, com volume de injeção $10 \mu\text{L}$ e tempo de corrida total 10 minutos.

Tabela 1. Gradiente Linear da fase móvel.

Tempo (min)	Vazão (mL min^{-1})	%A	%B
Inicial	0,225	95	5
0,25	0,225	95	5
7,75	0,225	0	100
8,50	0,225	0	100
8,51	0,225	95	5
10,0	0,225	95	5

Fonte: UFSM-Santa Maria/ RS, 2013.

Tabela 2. As condições utilizadas na técnica UHPLC-MS/MS.

Parâmetro	Valores
Coluna	Coluna C_{18} , 150 mm x 4,6 mm x $5\mu\text{m}$
Temperatura da fonte	150°C
Volume de injeção	$10\mu\text{L}$
Vazão	$0,225 \text{ mL min}^{-1}$
Fase Móvel	Fase Móvel (FM); A – Solvente (A) Solução aquosa 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% ácido fórmico

	e 5 mm de formiato de amônio Solvente (B) metanol com 0,1% ácido fórmico e 5 mm de formiato de amônio.
Íons Monitorados	240; 125; 89
Modo de Ionização	ESI, positivo
Capilar	2,0 kV
Temperatura dessolvatação	500°C

Fonte: UFSM-Santa Maria/ RS, 2013.

Nessa etapa os parâmetros da fonte de ionização não são otimizados, tem-se apenas a identificação do analito pelo seu espectro de massas. As energias de entrada e de colisão dos dois íons foram medidas e armazenadas no banco de dados do equipamento.

Na otimização da fonte, o equipamento se ajusta às condições de contorno e programa os diferentes valores dos parâmetros a serem avaliados.

Para o espectrômetro de massas, a partir da realização das infusões foi determinado que as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados seriam utilizando a fonte de ionização por ESI com *electrospray* no modo positivo com temperatura da fonte em 150°C. A temperatura do gás de dessolvatação foi de 500°C, as vazões do gás nitrogênio para dessolvatação da amostra e para o cone-da amostra, respectivamente 500 e 50 Lh⁻¹, estes valores ficaram dentro da faixa de trabalho indicada pelo fabricante (QUEIROZ et al., 2012).

Segundo COLLINS et al., 2006 & CALDAS, 2009 (apud MARTINS, 2010) a coluna analítica composta por C₁₈ como fase estacionária e a fase móvel constituída por solventes mais polares demonstram a aplicação de um método de cromatografia em fase reversa, na qual analitos de polaridade intermediária são analisados.

A separação na cromatografia líquida foi realizada de acordo com condições já estabelecidas na literatura, no que diz respeito à fase móvel e coluna analítica (Tabela 2).

As condições de operação do espectrômetro de massas (voltagens do cone e de colisão) foram otimizadas em modo MRM, através da infusão de cada solução contendo 1 mg mL⁻¹ do herbicida em metanol/ água com 0,1% ácido fórmico (50%,

v/v), sob uma vazão de $0,225 \text{ mL min}^{-1}$. As análises quantitativa e confirmatória foram realizadas em modo MRM, através do monitoramento de duas transições de m/z para o íon precursor, sendo que a que gerou sinal mais intenso foi utilizada para quantificação e a menos intensa para confirmação. O critério de confirmação atende o recomendado pela Comunidade Europeia que é de quatro pontos de identificação, correspondentes à seleção de um íon precursor e dois íons produtos (duas transições de m/z), além do tempo de retenção na coluna (SANCO, 2009).

Após a otimização do modo MRM via infusão, foram otimizadas as condições cromatográficas.

Duas transições características foram selecionadas para o agrotóxico clomazone, como apresentado na Figura 5, vantagem fornecida por um analisador de massas em série, LC-MS/MS. A transição mais intensa (mais estável) foi utilizada para a quantificação do clomazone e a segunda transição mais intensa para a confirmação.

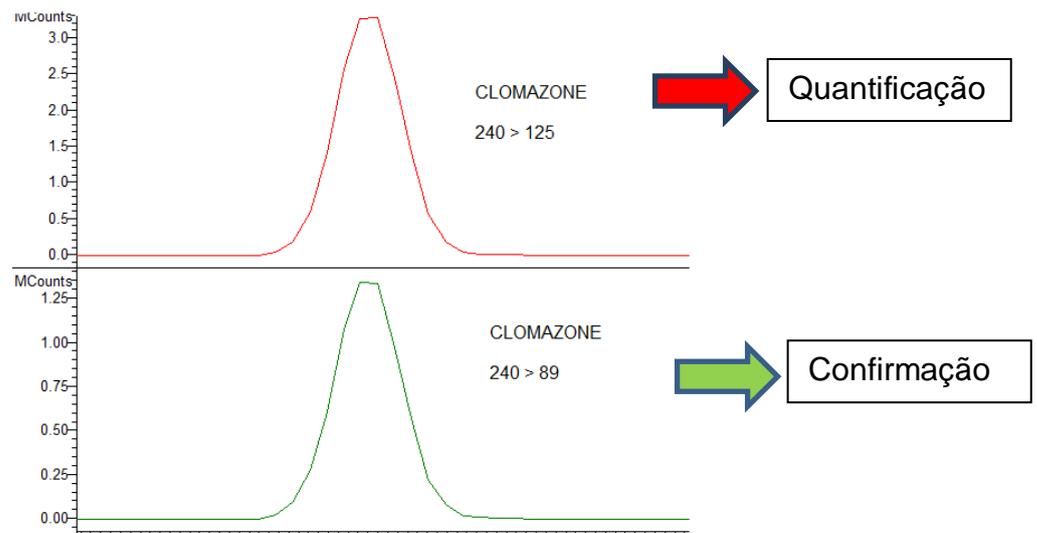


Figura 5. Cromatograma no modo MRM obtido para uma solução analítica na matriz contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ do agrotóxico clomazone, contendo as transições empregadas para a quantificação e confirmação. (UFSM-Santa Maria, 2013).

7.1.1 Técnicas de amostragem por SLURRY (suspensão), para determinação de resíduos de agrotóxicos.

A amostragem de suspensões foi proposta por Brady *et al* (apud MAGALHÃES & ARRUDA, (1998), em 1974 combinando as vantagens da

amostragem sólida e líquida. Suas principais características incluem a simplificação do pré-tratamento da amostra, bem como evita/minimiza a contaminação, diminuindo consideravelmente a perda de analitos voláteis, além de diminuir custos e o uso de reagentes freqüentemente perigosos.

Foi usado esse procedimento de amostragem nas amostras de arroz, para que a amostra e os reagentes tivessem maior interação e resultar em resultados mais confiáveis, onde pesou-se 40g de arroz e 40 g de água e triturou-se.

Este procedimento também permite que sejam usados padrões aquosos para a construção da curva analítica segundo Arruda; et al, e/ou métodos de adição de analito (MILLER-IHLI, 1992; LANGMYR, 1979).

O tamanho de partícula e a falta de homogeneidade da amostra são fatores que podem afetar a precisão e a exatidão das análises, quando a amostragem de suspensão é utilizada. O tamanho de partícula é um fator crítico no preparo das suspensões e, portanto, os erros de quantificação podem ser minimizados quando se trabalha com pequenos tamanhos de partícula (MAJIDI & HOLCOMBE,1990; MILLER-IHLI,1994).

Uma maneira conveniente de se contornar o problema da homogeneidade é preparar uma suspensão da amostra sólida finamente dividida em meio líquido. É interessante frisar, entretanto, que para o preparo da suspensão, todo cuidado deve ser tomado na moagem e peneiramento do material, devido a que nessas etapas podem ocorrer problemas de contaminação das amostras. Igual problema pode ser encontrado ao se adicionar agentes estabilizantes nas suspensões (ARRUDA et al.,1995).

A quantidade de material sólido que é pesado depende da concentração do analito e do volume final da diluição da suspensão. Para amostras difíceis de homogeneizar, consegue-se melhorar a precisão quando se aumenta a massa da amostra. Logo após o preparo da suspensão, a amostra sólida deve estar distribuída igualmente no volume do líquido (ARRUDA, 1998).

7.2 Curva analítica e linearidade

No Figura 6, tem-se a curva analítica do clomazone, nos níveis de concentração, preparados na mistura solvente. O coeficiente de determinação foi $r^2=$

0,998, que é considerado um ótimo índice, pois demonstra a alta linearidade da curva, que é um dos objetivos da validação. Devido à facilidade de modelagem do sistema e dos cálculos estatísticos da validação. Na construção da curva não houve a preocupação de forçar a passagem da reta pela origem, com o argumento de que não existe um sistema perfeito.

Pois a inclusão do ponto (0,0) significa que com zero de analito o sinal é zero, mas essa não a realidade do equipamento, que possui um ruído que não pode ser desconsiderado, logo são estabelecidos valores que traduzem a sensibilidade da técnica de análise proposta.

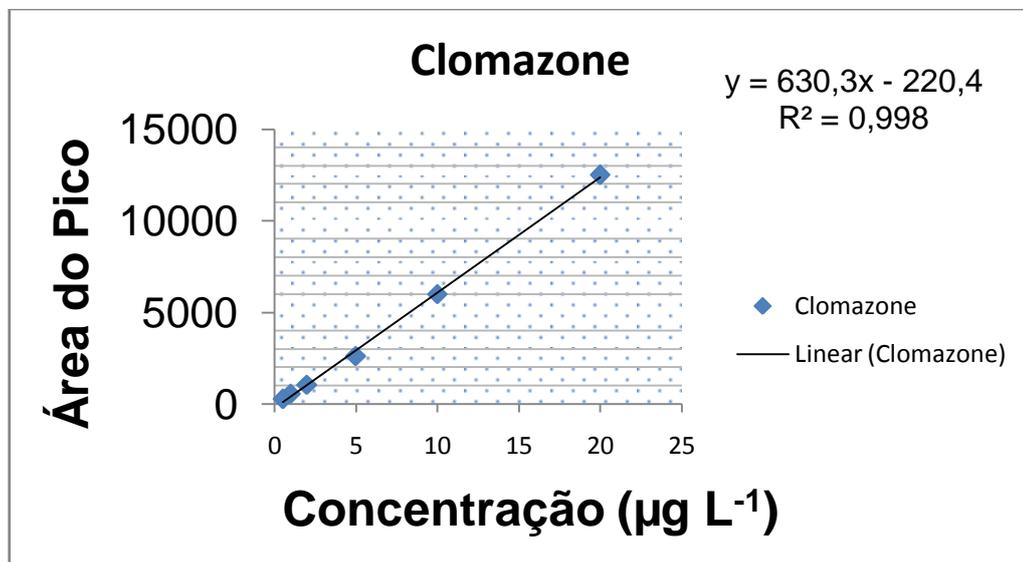


Figura 6. Gráfico dos Resultados obtidos para as curvas analíticas dos herbicidas no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS. (UFSM-Santa Maria/RS, 2013).

Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram maiores ou iguais a 0,99 e os CV (%) foram menores do que 20% em todos os casos. O gráfico da função da calibração deve ser confeccionado e inspecionado visualmente, evitando-se a confiança cega nos coeficientes de correlação (ANVISA, 2013).

Além disso, para assegurar que a calibração é adequada à região de interesse, para a detecção destes resíduos foram construídos os gráficos de resíduos e observou-se que não havia tendências.

7.3. Validação: Extração e Recuperação

A avaliação da eficiência da etapa de extração foi realizada fortificando-se amostras de arroz, em três níveis de concentração com relação à massa, ou seja, 10; 20; 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Os dados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Níveis de Concentração e recuperação das amostras de arroz.

Concentração ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
10 *	79 (± 10)
20 *	95 (± 15)
50 *	90 (± 5)

Legenda: * três diferentes fortificações $\mu\text{g Kg}^{-1}$. #Recuperação da herbicida padrão de 70, 90 e 95 % e a precisão com Coeficiente de variação de 5, 10 e 15% RSD $\leq 20\%$).

As recuperações são determinadas substituindo a área do pico (y) e a concentração real como variável. O resultado foi substituído numa equação de porcentagem onde a concentração esperada foi atribuída como 100%, sendo a recuperação o valor resultante dessa equação.

Para os três níveis de recuperação avaliados (10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) o método apresentou valores de recuperação entre 79-95% e coeficientes de variação (RSD $\leq 20\%$).

Os conjuntos de amostras fortificadas utilizadas para determinar a recuperação apresentaram bons resultados, pois as concentrações encontradas ficaram na curva analítica construída usando o padrão na mistura de solvente (metanol:água). Obtiveram-se os resultados desejados, ou seja, linearidade da curva analítica, controle da recuperação e dos demais parâmetros de validação.

7.4 Limite de quantificação (LOQ), Limite de Detecção (LOD)

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação para as amostras de arroz estão na Tabela 4.

Tabela 4. Limites de LOD_me LOQ_m em arroz.

Limite de Quantificação	Limite de Detecção
1 µg kg ⁻¹	0,3 µg kg ⁻¹

O valor expresso na Tabela 4 do limite de quantificação (LOQ) do método, foi de 1 mg kg⁻¹. Por definição, o LOQ é o nível mais baixo no qual tenha sido demonstrado que o critério para exatidão e precisão foi atingido (SANCO, 2009).

As amostras foram fortificadas nos níveis de 0,010 e 0,020 e 0,050 mg kg⁻¹. A Comunidade Europeia estabelece um nível de 0,010 mg kg⁻¹ para herbicidas não autorizados ou proibidos e para comida de bebês (WANG &LEUNG,2009). Além disso, os baixos níveis de fortificação demonstram à alta detectabilidade do instrumento UHPLC-MS/ MS utilizado.

O método QuEChERS modificado otimizado nesse trabalho alcançou baixo limite de detecção (LOD_m= 0,3 µg kg⁻¹) e baixos limites de quantificação (LOQ_m = 1 µg kg⁻¹) (MARTINS,2010).

Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios de acordo com o método apresentado e validado, considerando a complexidade da matriz analisada.

7.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A avaliação da precisão intermediária foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos da repetitividade.

A precisão do método foi obtida através de estudo de repetitividade e precisão intermediária. As recuperações dos herbicidas foram testadas em triplicatas, em três níveis de fortificação No documento do SANCO da Comunidade Europeia são estabelecidas as faixas de recuperação (70-120%) bem como os coeficientes de variação (≤ 20%) aceitáveis e neste trabalho foram utilizadas estes critérios de aceitação (SANCO, 2009).

Os valores mais detalhados de RSD_{pi} estão apresentados juntamente aos resultados de recuperação na Tabela 5.Os valores para o estudo da repetitividade

dos herbicidas em amostras de arroz ficaram entre 70; 85 e 95% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,0 e 17%.

Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (HUBER,2001). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

Tabela 5. Avaliação da Precisão Intermediária e repetividade em amostras de arroz

Concentrações ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperação(%)
10*	70 # ± 17
20*	85 # ± 13
50*	95 # ± 2

Legenda: * três diferentes fortificações $\mu\text{g Kg}^{-1}$. # Repetividade da herbicida padrão de 70, 85 e 95 % e a precisão intermediária, com Coeficiente de variação de 2, 13 e 17%

7.6 Robustez

O método validado mostrou ser robusto, uma vez que, pequenas alterações nas condições de extração (tempo de agitação, temperatura, entre outras) e cromatográficas (composição da fase móvel, temperatura da coluna, entre outras) não causaram diferenças significativas nos resultados.

8. APLICAÇÃO DO MÉTODO

8.1. Análise de amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de clomazone em oito amostras de arroz comerciais de diferentes marcas, envasadas e provenientes de zona de cultivo da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. Conforme os dados apresentados na Tabela 6, observa-se que em quatro amostras não foram detectados resíduos de clomazone. Por outro lado, em três amostras foram detectados resíduos em níveis de concentração abaixo do LOQ ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em

apenas uma das amostras encontrou-se resíduos de clomazone ($2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$), porém em concentração muito menor do que o Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 6 Análise de amostras de arroz comerciais de diferentes marcas e envasadas, empregando o método QuEChERS e UHPLC-MS/MS

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Clomazane ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	2,5	<LOQ	n.d.	n.d.

Fonte: UFSM/SANTA MARIA-RS.

9. CONCLUSÃO

Neste estudo foi utilizado o procedimento do método QuEChERS no preparo das amostras, o qual permitiu a extração de multirresíduo do herbicida na matriz de arroz posterior confirmação e quantificação por UHPLC-MS/MS. O método apresentou bons resultados de linearidade para o composto e permitiu a determinação de limite de quantificação abaixo dos LMRs com precisão e exatidão dentro da faixa aceitável para o herbicida. O método validado mostrou ser rápido e eficiente e confiável e pode ser utilizado no monitoramento de resíduos de herbicida na matriz selecionada.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Trends**. v. 20, p. 649-661, 2001.

ALMEIDA, S.D.B. et al. **Sorção de Triazinas em Solos Tropicais**. I. Pré-seleção para recomendação de uso na região de Ubatuba, São Paulo, Brasil. *In: IV Congresso Ibero americano de Física Y Química Ambiental, 2006*, Cáceres. **MEDIO AMBIENTE EN IBEROAMERICA - Visión desde la Física y La Química en los albores del siglo XXI**, 2006. v. 2. p. 17-24.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188 p.

AMARANTE Jr.; VIEIRA, E.M. & COELHO, R.S. (Org.) **Poluentes Orgânicos**. volume 1. São Carlos: Rima, 2006. 160p.

AMARANTE, J.O. **GRÃOS DE ARROZ**. Acesso dia 14 de maio de 2013.

Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; **J. AOACInt**. 2003, pg83- 412.

ANDRADE, G. et al. Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid phase extraction gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Braz. Chem. Soc.** 22, 9, 1701-1708, 2011.

ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monografias/index.htm>>. Acesso em: 18 fevereiro de 2013.

ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução- RE n 0 899, de 29 de maio de 2003. Guiapara. Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 6 março de 2013.

ARRUDA, M. et al. **Quím. Anal.** 1995, 14, 17.

AZEVEDO, A. C.; DALMOLIN, R. S. D. **SOLOS E AMBIENTE: UMA INTRODUÇÃO**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2006, 100 p.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BALINOVA, A. Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water. **Journal of Chromatography A**. v. 728, p. 319-324, 1996.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p.15-34.

BARRIGOSI, J. et al. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo.** Santo Antônio de Goiás, GO. Embrapa, Dezembro, 2004. Pg 1-8.

Beyer, A.; Biziuk, M.; **Food Chem.** 2007, *108*, 2008

BIZIUK, M. et al. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BORGES, J. H. et al. Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). **Food Chemistry**, p. 313-319, 2009.

BRADY, D. V. et al. **At. Absorpt. Newsl.** 1974, *13*, 118.

BRAGA, J. W. B. et al. Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods.

Journal of Chromatography A, v. 1148, p. 200–210, 2007.

BRASIL Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que 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 20 de março de 2013.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário oficial da União Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de julho de 1989. P. 11459.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 23 janeiro de 2013.

BRUM, A.L.; et al. **As estratégias de competitividade das cooperativas orizícolas da fronteira oeste do rio grande do sul.** Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio grande do Sul – UNIJUI. 06 de Agosto de 2008; p 1-19.

CALDAS, S.S. Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Águas subterrâneas. 2009. 120p. **Dissertação (Mestrado em Química)**. FURG, Rio Grande, RS.

CEREJEIRA, M.; et al. Pesticides in Portuguese surface and groundwaters. **Water Research**, v. 37, p. 1055-1063, 2003.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC.** São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

Codex Committee on Pesticide Residues, Codex Document CX/PR 07/39/06: **Proposed draft revision of the list of methods for pesticide residue analysis at step 3.** *Codex Alimentarius*, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CONWAY, G. **Produção de alimentos no século XXI biotecnologia e meio ambiente.** São Paulo: Estação Liberdade, 2003. 375, p.9.

D'ARCHIVIO, A. A.; et al. **Comparison of different sorbents for multiresidue solid- phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high performance liquid chromatography.** *Talanta* v.71, p. 25-30, 2007.

DENARDIN, C.C.; et al. **Composição mineral de cultivares de arroz integral, parboilizado e branco.** *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 125-130, 2004.

DORS, G.C.; et al. Distribution of Pesticide Residues in Rice Grain and in its Coproducts. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 22, No. 10, 1921-1930, 2011.

Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; **J. Chromatogr.-A.**1993, 638, 57.

EURACHEM, G. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** LGC (Teddington) Ltd, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>>. Acesso em 2 março de 2013.

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.

FAO.FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS.**Produção mundial de grãos e arroz** (Dezembro de 2004). Disponível em http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/j3877e/3877e05.htm> Acesso em 12 de março de 2013.

FAO. Dados agrícolas de FAOSTAT nutriciónCodexAlimentarius: **Resíduos de plaguicidas em los alimentos limites máximos de resíduos.** Disponível em [www..url:http://apps.fao.org](http://apps.fao.org). Acesso em: 26 de janeiro de 2013.

FERNICOLA, N.A.G.G.; et al. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. (Org.). **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia.** São Carlos, 2003, v. 1, p. 221-42.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 24 – 37, 2007.

FRENICH, A.G., et al. ***Anal. Bioanal.Chem.*** 2008, pg390-947.

GATIDOU, G., et al. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. ***AnalyticaChimica Acta***, v. 528, p. 89-99, 2005.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado.** 2007.148p. Tese (Doutorado em Química)—UFSM, Santa Maria, RS.

GRÜTZMACHER, D. D.; et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. ***R. Bras. Eng. Agrícola. Ambiental.*** v. 12, n.6, p.632–637, 2008.

HAJSLOVÁ, J.; et al. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. ***Journal of Chromatography A***, v. 800, p. 283-295, 1998.

HERCEGOVÁ, A., et al ***J. Chromatogr., A.*** 2007, 1153, 54.

HUBER, L. **Validation of analytical methods: review and strategy.** 2001. Disponível em <<http://www.labcompliance.com>>. Acesso em: 22 fevereiro de. 2013.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). **DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Brasília, 2003. 35 p.

IRGA (INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ). Disponível em <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em 20 fevereiro de 2013.

IRGA. Projeto 10/RS. **Manual de Procedimentos.** Porto Alegre: 2004.

IVANOFF, J.P.P. **Avaliação da potencialidade de utilização do método quechers na análise multirresíduo de agrotóxicos em Hortigranjeiros.** Trabalho de conclusão de curso do Curso de Química Industrial, grau de Químico Industrial. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Porto Alegre, 2011; pg 1-38.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B.; NGUYEN, V.N. Nutritional contribution of rice: impact of biotechnology and biodiversity in rice-consuming countries. ***Int. Rice Commission New slett.***v.51, 2002.

KUSTER, M., et al. Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, ***Mass Spectrometry Reviews.*** v. 25, p. 900-916, 2006.

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

LANGMYR, F. J. ***Analyst.*** 1979, 104, 993.

LEHOTAY, S. J., et al. **J. AOACInt.**2010, 93, 355.

LEHRFELD, J. HPLC separation and MILLER, J.B. et al. Rice: a high or low glycemic index food. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1034-1036, 1992.

LIMA, P. J. P. de. **Possíveis doenças físicas e mentais relacionadas ao manuseio de agrotóxicos em atividades rurais, na região de Atibaia, SP/Brasil.** 2008. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2008.

LOUREIRO, E. de.S.; et al. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p.263-269, 2002.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. **Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras.** UNICAMP - CP 6154 - 13.083-970 - Campinas – SP QUÍMICA NOVA, 21(4) (1998), pg 1-8.

MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J. A. **Spectrochim.Acta.**1990, 45B, 753.

MAJORS, R. E. **New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation.**In: LCGC. Europa, 2001. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com>>. Acesso em 05 março 2013.

MARÍN, J. M.; et al. Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **JournalofChromatography A.** v. 1133, p. 204-214, 2006.

MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando quechers modificado e lc-ms/ms.** Tese de mestrado (Mestre em Química), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria - RS, Brasil. 2010, pg 1-149.

MILLER-IHLI, N. J. **J. Anal. At.Spectrom.** 1994, pg9-1129.

MILLER-IHLI, N. J. **J. Anal.Chem.**1992, pg64- 964.

MOURA, M. A. DE. M.; et al. **IMPACTO DE HERBICIDAS SOBRE OS RECURSOS HÍDRICOS.** Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária. Junho de 2008. Pg 1-10.
Pan, C.; et al. **Acta Chromatogr.** 2006, 17, 320.

PARA- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008, Brasília, 15 de abril de 2009.

PETERS, L.P. **Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidanteBacteriano.** Dissertação para obtenção do título de Mestre emCiências. Piracicaba,2011-Universidade de São Paulo, pg 1-126.

PIZZUTTI, I.R. **Validação de Métodos Multirresíduos de Extração e Desenvolvimento de Método de Purificação por GPC para Análise de Resíduos de Pesticidas em Soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS.** 2006. 297 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PRESTES, O. et al. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, 2011; 3(1):51-64 Instituto Internacional de Cromatografia DOI: 10.4322/sc.2011.004 ISSN 1984-4433.

PRESTES, O.D.; *et al.* **QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.** *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S.C.N., et al. **Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando quechers e uhplc-ms/ms.** Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000 Jaguariúna – SP, Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 1, 185-192, 2012.

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

ROCHA, J. C.; *et al.* **Introdução à Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2004, p. 44-47.

Rodriguez, R.; Mañes, J.; Picó, Y.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 452

RODRIGUES, A.M. et al. Determination of several pesticides in water by solid phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 267 – 278, 2007.

RODRIGUES, V.C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UHPLC-MS/MS).** São Paulo, 2011. pg 1-109.

ROMAN, E.E.; et al. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação.** Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 160 p.

Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. **Talanta** 2008, 76, 211.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 13, p. 53-58, 2003.

SANCHOTENE, D. M. **Tolerância do arroz irrigado ao herbicida clomazone pela ação de protetores de plântulas.** Santa Maria, 2009. 50 f.; il. Dissertação (mestrado de Química) – Universidade Federal de Santa Maria.

SANCO. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). Document nº SANCO/2007/3131. **Method validation and quality control procedures for**

pesticide residues analysis in food and feed. 3ª ed. Bruxelas, Bélgica. 31/01/2013.

SANCO/10684/2009. **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food And Feed**, implemented by. 01/03/2013

SHOMAR, B. H.; et al. Occurrence of pesticides in groundwater and topsoil of the gaza strip. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 171, p. 237-251, 2006.

SILVA, J. M.; et al. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em sedimentos por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector de captura de elétrons. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 591-597, 2010.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola); 2010. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/informativo/15/>> Acesso em 17 março 2013.

SKOOG, D. A.; et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008, 999 p.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 60, p. 79-84, 2001.

SOLER, C.; PICÓ, Y. **Trends Anal.Chem.** 2007, 26, 103.

SOUZA, M. V. de. Resíduos de Agrotóxicos Ditiocarbamatos e Organofosforados em Alimentos Consumidos no Restaurante Universitário UNB: Avaliação da Exposição Humana. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado), Brasília, 2006, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

SPADOTTO, C. A.; et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004; 29 p. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br>>. Acesso em 22 fevereiro 2010.

SPADOTTO, C.A. **Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002.

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.

TOMLIN, C. D. S. The pesticides manual. **The British Crop Protection Council**. versão eletrônica 3.0, 2004.

UETA, J et al. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores de atrazina provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani. **Revista Plantio Direto**. 2001. v. 24, p. 25-30.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**. v. 11, p. 26-31, 2007.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica do Arroz; In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura de Arroz no Brasil** Embrapa Arroz e Feijão: Goiás, 1999, 633 p.

VIEIRA, N.R. A.; OLIVEIRA, M.A.S. **A história do Arroz**. Embrapa. Disponível em http://www.agroplan-consultoria.com.br/historia_arroz/. Acesso 12 de abril de 2013.

WANG, I.; LEUNG, D.; *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 2162

WENTZ, G. N. **Validação do método analítico para determinação de cloranfenicol em matriz camarão segundo a norma da Comunidade Europeia EC 657/2002, por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)**. Porto Alegre, 2010, pg.1- 36. Trabalho de conclusão de curso (Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ZANELLA, R. et al. Monitoring of the Herbicide Clomazone in Environmental Water Samples by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. **Chromatographia**. v. 55, p. 573-577, 2002.

ZANELLA, R. et al. *J. Braz. Chem. Soc.* 2008, *19*, 5.