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

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM SOLO DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisele Lutz Martins

Santa Maria - RS, Brasil
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM SOLO DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

por

Gisele Lutz Martins

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2010

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM SOLO DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

elaborada por

Gisele Lutz Martins

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

Comissão Examinadora

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

_____
Prof. Luis Antonio de Avila, Ph.D. (UFPEL)

_____
Prof. Dr. Roger Wagner (UFSM)

Santa Maria, 15 de dezembro de 2010

Dedico este trabalho à minha família,
especialmente à minha mãe e minhas irmãs,
que sempre estiveram ao meu lado
dando apoio em todos os momentos,
principalmente nos mais difíceis.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação neste trabalho, pelo aprendizado, e oportunidade de fazer parte do LARP. Obrigada também pela compreensão com relação ao meu ingresso na vida profissional.

À Profª. Drª. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação, participação e sugestões no exame de qualificação e pelos ensinamentos enquanto professora. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, dando-me a oportunidade de fazer parte do LARP.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Luis Antonio de Avila e Prof. Dr. Roger Wagner, pela participação na defesa da dissertação e pelas excelentes contribuições, sugestões e questionamentos para melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva pela sua participação e sugestões no exame de qualificação.

À todos os meus amigos, que sempre me proporcionaram momentos de descontração e torcem por mim. Em especial, à minha amiga, Danieli Daiani, que compartilhou comigo muitas angústias, aflições, dúvidas, alegrias e realizações. Obrigada pela amizade, carinho e apoio. Muito sucesso para nós!

Agradeço principalmente à Caroline e Osmar, por todo saber compartilhado, pelo apoio, pela paciência e por toda ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada! Desejo que recebam tudo em dobro e que Deus ilumine sempre o caminho de vocês.

À Débora, pela amizade e disposição em ajudar sempre. Agradeço também, à Juliana, Daniela e Fábio pela ajuda “prática” na etapa final deste trabalho.

Aos demais colegas do LARP, Guilherme, Mateus, Janice, Michele e Sandra, agradeço pelo apoio na realização deste trabalho, pelo convívio e momentos de descontração durante o tempo em que permaneci no LARP.

À secretária do LARP, Márcia Botega pelos seus muitos préstimos e sua boa vontade em resolver todos os probleminhas.

Ao Grupo de Pesquisa em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Várzeas da UFSM, que conduziu os experimentos e forneceu as amostras necessárias para a execução deste trabalho e, principalmente à Kelen, pela sua disponibilidade em sanar as dúvidas sobre o experimento.

Aos meus pais Geslaine e Valdir, e minhas irmãs Gislene e Elaine que se preocupam e torcem por mim sempre. Obrigada pela força, incentivo, compreensão e carinho. Agradeço em especial à minha mãe, por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis.

À todos os demais familiares e amigos que de alguma forma torceram por mim e me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

À UFSM pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

À todos os professores do Departamento de Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Deus, pela proteção e por me conceder mais essa vitória.

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM SOLO DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

AUTORA: GISELE LUTZ MARTINS
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de dezembro de 2010

O uso de pesticidas e seus resíduos tornaram-se um problema devido à possível contaminação do solo, podendo impactar o meio ambiente e causar danos à saúde pública. Neste trabalho, otimizou-se e validou-se um método analítico para a determinação de resíduos de tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado utilizando o método de extração QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), com fonte de ionização por Eletronebulização no modo ESI (+/-). O método QuEChERS modificado desenvolvido consistiu em uma etapa de extração inicial utilizando 5,0 g de solo no qual foi adicionado 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0 e 10 mL de acetonitrila, seguida por uma etapa de partição após a adição de uma mistura de sais anidros (4,0 g de sulfato de magnésio e 3,0 g de cloreto de sódio). Após, foi realizada uma etapa de ajuste em pH 3,0, através da adição de 390 µL de solução aquosa de HCl 6 mol L^{-1}, seguido de centrifugação a 3900 rpm por 10 min. Na sequência, foi realizada a etapa de *clean-up* com 250 mg de sulfato de magnésio em 2 mL de extrato, seguido de análise por LC-MS/MS. Após otimização dos parâmetros de extração e de quantificação, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, LOD, LOQ, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,2 e 20,0 µg L^{-1} para propiconazol e entre 1,0 e 100,0 µg L^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99. Os valores de LOQ para o método foram 0,4 µg kg^{-1} para propiconazol e 2,0 µg kg^{-1} para os demais pesticidas. O método apresentou boa precisão, com valores de RSD < 20%, e boa exatidão, com recuperações entre 70 e 120% para a grande maioria dos compostos analisados. Com relação ao Efeito Matriz avaliado para todos os compostos, este foi compensado através da utilização de curvas analíticas preparadas no extrato da matriz para a quantificação. O método otimizado apresentou como vantagens principais: rapidez, simplicidade, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos, além da simplificação de etapas lentas e trabalhosas geralmente empregadas em métodos tradicionais de extração de pesticidas em solo. O método foi considerado adequado para a análise de resíduos de pesticidas em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado, visto que todos os parâmetros de validação atenderam os limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos. Após ser validado, o método foi aplicado para determinação de resíduos destes pesticidas em amostras de solo provenientes de um experimento realizado no Campus da UFSM, mostrando-se bastante eficiente.

Palavras-chave: resíduos de pesticidas; solo; QuEChERS modificado; LC-MS/MS.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN SOIL FROM RICE PADDY FIELD USING MODIFIED QuEChERS AND LC-MS/MS

AUTHOR: GISELE LUTZ MARTINS
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: December 15th, 2010, Santa Maria

The use of pesticides and their residues have become a problem due to possible contamination of soil, impacting on the environment and causing trouble to public health. In this research, an analytical method was optimized and validated to determine the residues of thiamethoxan, imazapic, imazethapyr, clomazone, propiconazole, fipronil and trifloxystrobin in soil from rice paddy field, applying a modified QuEChERS extraction method and Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) with Electrospray ionization source in ESI (+/-) mode. The modified QuEChERS method developed consisted of an initial extraction step using 5.0 g of soil into which 20 mL of saturated solution of calcium hydroxide pH 12.0 and 10 mL of acetonitrile were added, followed by a partition step after the addition of a mixture of anhydrous salts (4.0 g of magnesium sulfate and 3.0 g of sodium chloride). After this, a step for adjustment of the pH to 3.0 by adding 390 µL of 6 mol L^{-1} HCl, followed by centrifugation at 3900 rpm for 10 min. A clean-up step was then conducted with 250 mg of magnesium sulfate in 2 mL of extract, followed by LC-MS/MS analysis. After the optimization of the extraction and determination parameters the method was validated evaluating the analytical curve, linearity, LOD, LOQ, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. Calibration curves presented linearity between 0.2 and 20.0 µg L^{-1} for propiconazole and 1.0 and 100.0 µg L^{-1} for thiamethoxan, imazapic, imazethapyr, clomazone, fipronil and trifloxystrobin, with determination coefficients greater than 0.99. The values of the method LOQ were 0.4 µg kg^{-1} for propiconazole and 2.0 µg kg^{-1} for the others pesticides. The method showed good precision, with RSD values < 20%, and good accuracy, with recoveries between 70 and 120% for most compounds. Concerning the Matrix Effect for all compounds evaluated, this was compensated by using calibration curves prepared in the matrix extract for quantification. The optimized method showed as major advantages: speed, simplicity, low cost, low consumption of organic solvents, besides the simplification of slow and laborious steps usually employed in traditional methods for extraction of pesticides in soil. The method was considered suitable for analysis of pesticide residues in soil from rice paddy fields, since all the validation parameters were within the limits suggested for validation of chromatographic methods. After the validation, the method was applied for determination of residues of these pesticides in soil samples from an experiment carried out at the UFSM Campus, revealing great efficience.

Keywords: pesticide residues; soil; modified QuEChERS; LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Perfil do solo mostrando os horizontes característicos (Fonte: CETESB, 2010)..... 7

FIGURA 2 - Vendas de pesticidas no Brasil, no período de janeiro à julho de 2010 (milhões US$). Fonte: SINDAG, 2010..... 16

FIGURA 3 - Principais rotas de transporte e degradação de pesticidas no meio ambiente (Adaptado de JARDIM *et al*., 2009)..... 21

FIGURA 4 - Fórmula estrutural do clomazona..... 24

FIGURA 5 - Fórmula estrutural do fipronil..... 25

FIGURA 6 - Fórmula estrutural do imazapique..... 26

FIGURA 7 - Fórmula estrutural do imazetapir..... 27

FIGURA 8 - Fórmula estrutural do propiconazol..... 29

FIGURA 9 - Fórmula estrutural do tiametoxam..... 30

FIGURA 10 - Fórmula estrutural da trifloxistrobina..... 31

FIGURA 11 - Esquema representativo do método QuEChERS original..... 34

FIGURA 12 - Equilíbrio iônico do imazapique (Adaptado de SHANER & HORNFORD, 2005)..... 43

FIGURA 13 - Equilíbrio iônico do imazetapir (Adaptado de SHANER & HORNFORD, 2005)..... 43

FIGURA 14 - Componentes básicos de um sistema LC-MS/MS (Adaptado de KERNS *et al*., 1997)..... 49

FIGURA 15 - Sistema LC-MS/MS..... 62

FIGURA 16 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de pesticidas em solo..... 79

FIGURA 17 - Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e *clean-up* do método QuEChERS modificado..... 80

FIGURA 18 - Cromatograma total obtido no modo ESI (+/-) para uma solução analítica na matriz contendo 25 µg L^{-1} dos pesticidas em estudo..... 87
FIGURA 19 - Cromatogramas no modo MRM obtido para uma solução analítica na matriz contendo 25 µg L^{-1} de cada pesticida em estudo, contendo as transições empregadas para a quantificação..... 88
FIGURA 20 - Recuperações (%) dos pesticidas imazapique e imazetapir, obtidas a partir dos ensaios de extração 14 a 18..... 91
FIGURA 21 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando florisil, alumina neutra, básica e ácida em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*..... 95
FIGURA 22 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando diferentes quantidades de PSA em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*..... 96
FIGURA 23 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando diferentes quantidades de carvão ativado em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*..... 97
FIGURA 24 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando sulfato de magnésio em diferentes quantidades na etapa de *clean-up*.... 98
FIGURA 25 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de pesticidas em solo, utilizando o método QuEChERS modificado..... 100
FIGURA 26 - Cromatograma total de todos os íons monitorados obtido por LC-MS/MS (ESI +/-) para a solução analítica 25 µg L^{-1} preparada na matriz solo “branco” (A) e no nível de fortificação correspondente (50 µg kg^{-1}) (B)..... 106
FIGURA 27 - Curvas analíticas dos pesticidas em estudo preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz..... 108
FIGURA 28 - Cromatograma da amostra de solo A3, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1..... 112

FIGURA 29 - Cromatograma da amostra de solo A6, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1..... 112

FIGURA 30 - Cromatograma da amostra de solo A9, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1..... 113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tamanho e área superficial das partículas do solo..... 5

TABELA 2 - Classificação toxicológica dos pesticidas..... 14

TABELA 3 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para este estudo..... 24

TABELA 4 - Informações dos padrões analíticos sólidos fornecidos pela firma Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)..... 63

TABELA 5 - Gradientes testados para eluição dos compostos..... 66

TABELA 6 - Ensaios realizados para a otimização da etapa de extração..... 69

TABELA 7 - Sorventes e quantidades utilizados para a otimização do *clean-up* dispersivo..... 74

TABELA 8 - Pesticidas aplicados no experimento, produto formulado, identificação, tratamento e dose aplicada em amostras de solo..... 83

TABELA 9 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS..... 84

TABELA 10 - Pesticidas analisados por LC-MS/MS, modo de ionização ESI (+/-) e modo de aquisição MRM, íons precursores e íons produtos, e energia de colisão para as duas transições..... 86

TABELA 11 - Recuperações médias (%) obtidas nos ensaios de extração..... 90

TABELA 12 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetonitrila, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS..... 101

TABELA 13 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS..... 102

TABELA 14 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método..... 103
TABELA 15 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método..... 104
TABELA 16 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método..... 105
TABELA 17 - Valores de concentração, em µg kg^{-1}, dos pesticidas em estudo encontrados em amostras de solo..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µECD - micro Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *micro-Electron Capture Detection*

ACN - acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CL_{50} - Concentração Letal Média para 50% da população em estudo

C_{18} - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C_{18}, octadecilsilano

CTC - Capacidade de Troca de Cátions

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

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

d.i. - diâmetro interno

DL_{50} - dose letal média para 50% da população em estudo (via oral ou dérmica)

D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI - Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

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

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

eV - elétron-Volt

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

GARP - Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*

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

GC-µECD - Cromatografia Gasosa com Micro Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with micro-Electron Capture Detection*

GC-NPD - Cromatografia Gasosa com Detecção Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Gas Chromatography Nitrogen Phosphorus Detection*

h - horas

ha - hectare

HAc - ácido acético

HCOOH - ácido fórmico

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

ICH - Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *Internationa Conference on Harmonisation*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_H - Constante da lei de Henry

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

K_{oc} - Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

LARP - Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

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*

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

LMR - Limite Máximo de Resíduos

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

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

MAE - Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MASE - Extração com solvente assistida por microondas, do inglês *Microwave-Assisted Solvent Extraction*

ME - Efeito Matriz, do inglês *matrix effect*

MeOH - metanol

MO - Matéria Orgânica

MOS - Matéria Orgânica do Solo

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

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

m/z - razão massa-por-carga

NPD - Detecção por Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*

p.a. - grau pró-análise

pH - Potencial hidrogeniônico

pK_a - Potencial de dissociação ácida

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

PSE - Extração por Solvente Pressurizado, do inglês *Pressurized Solvent Extraction*

PV - Pressão de vapor

QqQ - triplo quadrupolo

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

r - coeficiente de correlação

r^2 - coeficiente de determinação

rpm - rotações por minuto

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

RSD_r - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

SCE - Extração em coluna de solo, do inglês *Soil Column Extraction*

SFE - Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

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

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

t_R - tempo de retenção

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

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

USE - Extração com solvente ultrassônica, do inglês *Ultrasound Solvent Extraction*

UV - Ultravioleta

v/v - Volume por volume

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Ensaios de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado..... 129

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3
2.1 Solo..... 3
2.1.1 Conceito e definição de solo..... 3
2.1.2 Constituição geral do solo..... 4
2.1.3 Características e propriedades do solo..... 8
2.1.4 Solos de várzea..... 10
2.2 Pesticidas..... 12
2.2.1 Definição..... 12
2.2.2 Classificação..... 13
2.2.3 Histórico e Consumo..... 15
2.2.4 Propriedades físico-químicas dos pesticidas..... 17
2.2.5 Impacto ambiental dos pesticidas..... 18
2.2.6 Rotas de degradação e dissipação de pesticidas no solo..... 20
2.2.7 Pesticidas selecionados para o estudo..... 23
2.2.7.1 Clomazona..... 24
2.2.7.2 Fipronil..... 25
2.2.7.3 Imazapique..... 26
2.2.7.4 Imazetapir..... 27
2.2.7.5 Propiconazol..... 29
2.2.7.6 Tiametoxam..... 30
2.2.7.7 Trifloxistrobina..... 31
2.3 Preparo de amostra para análise de resíduos de pesticidas..... 32
2.3.1 Método de extração QuEChERS..... 33
2.3.2 Métodos de extração para determinação de pesticidas em solo..... 37
2.3.2.1 Método de extração QuEChERS aplicado à amostras de solo..... 38

2.3.2.2 Preparo de amostra para extração de herbicidas imidazolinonas em solo..... 41
2.4 Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de pesticidas..... 48
2.4.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial..... 49
2.5 Efeito Matriz em LC-MS/MS..... 52
2.6 Validação de métodos cromatográficos de análise..... 54
2.6.1 Curva analítica e linearidade……..... 54
2.6.2 Sensibilidade..... 56
2.6.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)..... 56
2.6.4 Exatidão (Recuperação)..... 57
2.6.5 Precisão..... 58
2.6.5.1 Repetitividade..... 59
2.6.5.2 Precisão intermediária..... 59
2.6.5.3 Reprodutibilidade..... 60
2.6.6 Robustez..... 60
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 61
3.1 Instrumentação..... 61
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados..... 62
3.3 Padrões analíticos dos pesticidas estudados..... 63
3.4 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos compostos..... 65
3.4.1 Escolha da composição da fase móvel e da vazão..... 65
3.4.2 Acidificação da fase móvel..... 66
3.5 Condições de Análise por LC-MS/MS..... 67
3.5.1 Condições do sistema de detecção..... 67
3.6 Otimização do método QuEChERS modificado para extração dos pesticidas em amostras de solo..... 67
3.6.1 Otimização do método de extração..... 68
3.6.2 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo..... 73
3.6.3 Escolha das amostras para a etapa de validação..... 74

3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em solo empregando LC-MS/MS..... 75
3.7.1 Curva analítica e linearidade..... 76
3.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação..... 76
3.7.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão do método..... 77
3.7.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)..... 81
3.8 Avaliação do Efeito Matriz na resposta cromatográfica..... 81
3.9 Aplicação do método..... 82
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 84
4.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos compostos..... 84
4.2 Condições do sistema LC-MS/MS..... 85
4.3 Otimização do método de extração QuEChERS modificado..... 89
4.3.1 Avaliação dos ensaios de extração..... 89
4.4 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo..... 94
4.5 Método de extração otimizado..... 99
4.6 Validação do Método QuEChERS modificado..... 101
4.6.1 Curva analítica e linearidade..... 101
4.6.2 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método..... 102
4.6.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método..... 103
4.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)..... 107
4.7 Efeito Matriz em LC-MS/MS..... 107
4.8 Aplicação do método..... 109
5 CONCLUSÕES..... 115
TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS..... 117
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... 118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 119
APÊNDICE..... 129

1 INTRODUÇÃO

A agricultura moderna que busca constante elevação de produtividade e maximização dos lucros emprega uma carga expressiva de pesticidas, principalmente herbicidas, inseticidas e fungicidas, que podem causar poluição ambiental e desequilíbrio do ecossistema (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, observa-se maior preocupação quanto à contaminação do meio ambiente e a utilização racional dos solos e recursos hídricos. As práticas agrícolas, entretanto, são responsáveis por grande parte da degradação desses recursos. Além disso, a aplicação indiscriminada de pesticidas pelos agricultores pode resultar em graves problemas de contaminação do solo (SILVA *et al*., 2007).

O solo atua na manutenção dos processos vitais, sendo responsável pelo suporte físico e armazenagem dos nutrientes para as plantas. Os pesticidas são geralmente aplicados sobre plantas ou diretamente no solo. Mesmo quando aplicados sobre as plantas, cerca de 50% da dose total aplicada poderá ter como destino final o solo, o qual atua como o principal receptor e acumulador desses compostos. Ao entrarem em contato com o solo, os pesticidas estão sujeitos a processos físico-químicos que regulam seu destino no ambiente (FARIA, 2004).

Dessa forma, monitorar as possíveis contaminações oriundas do uso de pesticidas em amostras ambientais tornou-se um assunto de extrema relevância, devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente (PICÓ *et al*., 2007).

A complexidade das amostras a serem analisadas e a exigência em determinar níveis cada vez menores de concentração têm demandado o surgimento de novas técnicas de extração, novos equipamentos e novos métodos para análise de resíduos de pesticidas. Geralmente, as análises qualitativas e quantitativas incluem uma etapa preliminar de preparo da amostra, a qual é fundamental para garantir a eficiência do processo analítico, especialmente, quando o método é aplicado para determinação de resíduos em matrizes complexas.

O preparo de amostra a ser empregado em um método analítico é dependente das características da matriz, das propriedades do analito e do nível de concentração da substância a ser determinada. Entre os vários métodos para extração de pesticidas em matrizes complexas destaca-se o método QuEChERS (do

inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Este método foi introduzido em 2003 por ANASTASSIADES *et al*. com o objetivo de superar limitações práticas de outros métodos de extração multirresíduos já existentes (PRESTES *et al*., 2009).

Considerando a importância da utilização do solo para produção de alimentos, a importância do uso de pesticidas para o controle de pragas; e a conseqüente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) otimizar e validar um método de extração, utilizando o método QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS) para a determinação residual dos pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado e (ii) demonstrar a aplicabilidade do método empregando QuEChERS modificado para determinação de resíduos de pesticidas em amostras de solo. O enfoque deste trabalho é o preparo da amostra através da otimização do método QuEChERS modificado para extração de resíduos de pesticidas, incluindo herbicidas do grupo imidazolinonas, em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado.

Ressalta-se que este estudo torna-se relevante devido à complexidade da extração dos herbicidas do grupo imidazolinonas, já que os métodos de extração existentes até o momento consomem grande quantidade de solventes orgânicos, possuem várias etapas e são demorados, e também devido à inexistência de trabalhos científicos sobre a extração deste grupo de herbicidas em solos utilizando o método QuEChERS modificado. Além disso, este trabalho contribui para o desenvolvimento de um método validado empregando técnicas modernas de extração e determinação de resíduos de pesticidas por LC-MS/MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solo

2.1.1 Conceito e definição de solo

Desde a antiguidade, os povos preocupam-se com a capacidade dos solos em produzir alimentos, já que deles depende a nossa sobrevivência (MEURER, 2000). O solo, que é o principal meio de crescimento das plantas, é formado através do desgaste químico, físico e biológico das rochas (MANAHAN, 2001).

Tecnicamente, o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS – EMBRAPA) define solo como “uma coleção de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas, dinâmicos, formados por materiais minerais e orgânicos, que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta, contém matéria viva e podem ser vegetados na natureza, onde ocorrem. Ocasionalmente podem ter sido modificados por atividades humanas” (EMBRAPA, 2007; BARCELÓ, 2003).

A FAO (IUSS, 2006) ampliou o conceito e definiu o solo como qualquer material nos primeiros dois metros a partir da superfície terrestre que está em contato com a atmosfera, com exceção de organismos vivos, áreas de gelo contínuas, não cobertas por outro material, e corpos de água de profundidade superior a dois metros.

O solo é um corpo natural, complexo e dinâmico, formado na superfície da crosta terrestre em resultado da ação conjugada dos seus fatores de formação, e que constitui um meio natural, ou modificado pelo homem, para suporte e alimentação das plantas (RÉFFEGA, 1998). Formado por partículas minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos, o solo constitui a interface entre a geosfera, a atmosfera e a hidrosfera, alojando a maior parte da biosfera.

O solo atua na manutenção dos processos vitais, sendo responsável pelo suporte físico e armazenagem dos nutrientes para as plantas. Promove a retenção e o movimento da água, suportando as cadeias alimentares. É responsável, também, pela ciclagem dos nutrientes, atividade e diversidade microbiana, além da remediação e imobilização de poluentes (GRANATSTAIN & BEZDICEK, 1992).

As principais funções do solo são: sustentação da vida e do "habitat" para pessoas, animais, plantas e outros organismos; produção de alimentos; manutenção do ciclo da água e dos nutrientes; proteção da água subterrânea; conservação das reservas minerais e de matéria-primas; e meio para manutenção da atividade sócio-econômica (CETESB, 2010).

Devido à grande diversidade dos tipos de solos encontrados em climas tropicais como os existentes no Brasil, em uma mesma região pode ocorrer variação do pH, composição mineral, capacidade de troca catiônica, teor de matéria orgânica, dentre outros fatores, fazendo com que os solos sejam considerados matrizes extremamente complexas (HIGARASHI, 1999).

2.1.2 Constituição geral do solo

O solo é um sistema constituído por três fases: a fase sólida que se divide em matéria orgânica e, essencialmente, em matéria mineral, a fase líquida (solução do solo) e a fase gasosa (atmosfera do solo) (SANTOS, 2009).

A fase gasosa do solo, ou atmosfera do solo, é diferente da atmosfera terrestre. A atmosfera do solo possui maior concentração de gás carbônico (até 40% mais), devido à respiração dos microrganismos e das raízes, além de possuir menos oxigênio.

A fase líquida do solo é composta pela mistura de água, sais minerais e moléculas de baixo peso molecular como aminoácidos, peptídeos, açúcares e substâncias húmicas nela dissolvidas. A essa mistura dá-se o nome de solução do solo. É na solução do solo que também se encontram as moléculas dos pesticidas, as quais estão sujeitas a inúmeras reações, segundo as propriedades da solução, como potencial hidrogeniônico (pH), força iônica e potencial redox (Eh). Portanto, se as moléculas possuírem propriedades físico-químicas que possam ser alteradas pelo meio (solução do solo), como por exemplo, grupos ionizáveis, suas atividades sobre as plantas e seu destino no ambiente estarão na dependência das propriedades das soluções dos solos (OLIVEIRA, 2010).

A fase sólida é constituída pela matéria mineral e pela matéria orgânica. Na maioria dos solos, as partículas minerais (vindas diretamente das rochas) predominam sobre as partículas orgânicas (resultado da transformação de restos

vegetais e animais). A matéria mineral inclui fragmentos de rochas, minerais primários e minerais secundários, todos em formas e dimensões extremamente variáveis. O exame destes componentes dos solos mostra a ampla variação no tamanho (Tabela 1) e composição química das partículas.

Tabela 1 - Tamanho e área superficial das partículas do solo

Tipo de Partícula	Diâmetro (mm)	Área Superficial (cm^2/g)
Cascalho	> 2,0	11
Areia grossa	2 - 0,2	34
Areia fina	0,2 - 0,05	159
Silte	0,05 - 0,002	454
Argila	< 0,002	8×10^6

Fonte: Adaptado de RADOSEVICH (1997)

A fração cascalho, também chamada de fragmentos de rocha, são pedaços grosseiros de material de origem e aparecem como remanescentes da intemperização da rocha maciça na formação do solo. Nas frações grossa e intermediária (areia e silte) do solo, os minerais individuais que aparecem provém diretamente da rocha de origem, mantendo-se inalterados em sua composição, como por exemplo: quartzo, feldspatos, micas, piroxênios, anfibólitos, etc. Os componentes da fração argila dos solos são na sua quase totalidade minerais secundários. Minerais secundários são aqueles formados à temperatura ambiente, pela desintegração e alteração dos minerais primários através do intemperismo. A argila é considerada a mais importante fração granulométrica do solo, pois além das propriedades físicas, condiciona também as propriedades químicas do solo (OLIVEIRA, 2010).

A matéria orgânica do solo (MOS) engloba resíduos de plantas, animais e microrganismos em diversos estágios de decomposição, em íntima associação com os minerais do solo, sendo um componente essencial para a qualidade e produtividade dos solos agrícolas. Representa, também, a principal fonte do total de carbono terrestre, o qual tem um papel fundamental nas funções que a matéria orgânica exerce sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo

(FAVORETTO *et al*., 2008). Todas as evidências indicam que quanto maior a porcentagem de carbono orgânico (%C) maior será a persistência dos pesticidas no solo (KAH *et al.*, 2007).

As vantagens inerentes à presença da matéria orgânica no solo são muitas. A matéria orgânica tem um efeito direto e indireto na disponibilidade de nutrientes para o crescimento das plantas. Em solos ricos em matéria orgânica, devido a maior densidade populacional de microrganismos há maior mineralização de nutrientes, especialmente N, P e S. A presença de matéria orgânica aumenta a capacidade tamponante e a Capacidade de Troca de Cátions (CTC) do solo. Além disso, a matéria orgânica afeta a complexação de elementos tóxicos e micronutrientes, fundamentais em solos tropicais, na sua maioria altamente intemperizados e ácidos (OLIVEIRA, 2010).

Dentre os compostos orgânicos do solo destacam-se as substâncias húmicas, presentes em toda a crosta terrestre, assim como em ambientes aquáticos. As substâncias húmicas, ou húmus, são macromoléculas de caráter complexo, resultantes da degradação química e biológica de resíduos de animais e plantas, e da atividade sintética de microrganismos. Basicamente, podem ser divididas de acordo com a solubilidade em solução aquosa em ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina. As substâncias húmicas são propensas a formação de complexos com íons metálicos, óxidos hidratados, além de sofrerem interação com argilas minerais e herbicidas, entre outros compostos orgânicos (JAVARONI *et al*., 1999).

O solo não é constituído apenas pela camada superficial de alguns centímetros, mas também por outras camadas dispostas horizontalmente abaixo dessa, denominada horizontes. Esses se distinguem entre si pela manifestação diferenciada de algumas propriedades tais como textura, cor, espessura, presença ou não de carbonatos, pelos arranjos das partículas sólidas e poros, distribuição das raízes, entre outras. Essas propriedades caracterizam o solo e determinam seu valor agrícola (MEURER, 2000).

Um solo, após atingir sua maturidade, apresenta a partir da superfície, o perfil ilustrado na Figura 1. Observa-se que o perfil do solo é caracterizado por várias zonas designadas como horizontes O, A, E, B, C e R. As espessuras de cada horizonte são bastante variadas, apresentando desde centímetros até metros (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

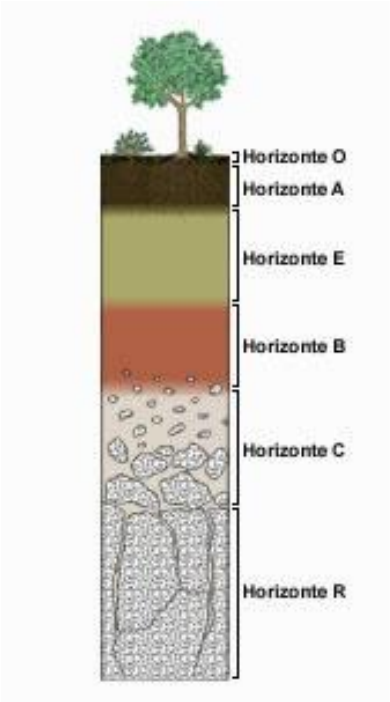


Figura 1 - Perfil do solo mostrando os horizontes característicos (Fonte: CETESB, 2010)

Os horizontes são designados por letras e apresentam as seguintes características (MEURER, 2000):

- Horizonte O: horizonte orgânico, com matéria orgânica (MO) fresca ou em decomposição.

- Horizonte A: há acúmulo de húmus (matéria orgânica) misturado com material mineral. É onde ocorre a decomposição de galhos, sementes, folhas, ossos e restos de animais. Geralmente apresenta coloração mais escura.

- Horizonte B: há acúmulo de argila, ferro, alumínio e pouca matéria orgânica.

- Horizonte C: ocorrência de pedras e cascalhos que fazem parte da rocha localizada abaixo do solo.

- Horizonte R: rocha que pode ser ou não a matriz a partir da qual o solo se formou.

Além disso, o conhecimento mais detalhado dos horizontes permite identificar, classificar e planejar o uso mais adequado do solo (MEURER, 2000).

2.1.3 Características e propriedades do solo

O solo é um meio complexo e heterogêneo, produto de alteração do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob a ação da vida, da atmosfera e das trocas de energia que aí se manifestam, e constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos, incluindo plantas, bactérias, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais (CETESB, 2010).

As condições climáticas são a principal influência das características de cada solo. No entanto, também existem outros fatores que influenciam fortemente o tipo de solo, como a rocha-mãe, o declive do terreno e os organismos do solo. As diferentes combinações entre esses fatores dão origem a diferentes tipos de solos com características e propriedades extremamente variadas (SANTOS, 2009).

- **Solo de textura arenosa**

O solo arenoso possui teor de areia superior a 70%, têm boa aeração e pouca umidade o que leva a plantas e microrganismos viverem com mais dificuldade. Também possui argila e outros componentes em menor percentagem, mas como tem boa aeração não retém água. Esse solo é permeável e os grãos de areia são maiores e tem mais espaço entre si, facilitando a passagem de água.

- **Solo de textura argilosa**

Os solos argilosos não são tão aerados, mas armazenam mais água. Possuem um teor de argila entre 35 e 60% e são menos permeáveis a água que fica armazenada por passar mais lentamente. A maior parte dos solos com texturas argilosas apresenta alto potencial para adsorver os pesticidas, uma vez que possuem grande área superficial. Além disso, solos argilosos lixiviam menos que solos arenosos, devido principalmente a características edáficas e maior capacidade de retenção de água.

- **Solo de textura média**

Os solos de textura média são solos que apresentam certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila e apresentam, normalmente, boa drenagem, boa capacidade de retenção de água e índice médio de erodibilidade. Portanto, não necessitam de cuidados especiais, adequando-se a todos os métodos de irrigação (SANTOS, 2009).

- **Solo de textura siltosa**

Os solos siltosos possuem grande quantidade de silte, e geralmente são muito erodíveis. São solos que apresentam predominantemente a fração silte, com menos de 15% de argila e menos de 35% de areia. O silte não se agrega como a argila e ao mesmo tempo suas partículas são muito pequenas e leves (SANTOS, 2009).

- **Solo humífero**

O solo humífero apresenta uma quantidade maior de húmus em relação aos outros. É um solo geralmente fértil, ou seja, um solo onde os vegetais encontram melhores condições para se desenvolverem. Possuem cerca de 10% de húmus em relação ao total de partículas sólidas. A presença de húmus dá uma coloração, em geral, escura, que contribui para sua capacidade de reter água e sais minerais e aumenta sua porosidade e aeração (SANTOS, 2009).

- **Solo calcário**

A quantidade de calcário nesse tipo de solo é maior que nos outros. Desse tipo de solo é retirado um pó branco ou amarelado, que pode ser utilizado na fertilização de solos destinados à agricultura e pecuária. Esse solo também fornece a matéria-prima para a fabricação de cal e do cimento.

As propriedades químicas dos solos (pH, teor de nutrientes, capacidade de troca iônica, condutividade elétrica e matéria orgânica) são, ao lado da atividade biológica, responsáveis pelos principais mecanismos de atenuação de poluentes nesse meio (KAH *et al.*, 2007). Entre estes, podem ser destacadas a adsorção, a fixação química, precipitação, oxidação e a neutralização que, invariavelmente ocorrem no solo e através do manejo de suas propriedades, podem ser incrementados.

Muitas das funções que o solo desempenha no ambiente não seriam possíveis sem suas propriedades químicas. A principal propriedade química do solo é a Capacidade de Troca de Cátions (CTC), que é a medida da quantidade de cargas elétricas no solo e que determina a capacidade que o solo tem de trocar cátions. Esta é uma propriedade importante do solo, pois funciona como um reservatório de nutrientes, evitando que os mesmos sejam lixiviados durante e após uma chuva. De modo grosseiro, podemos assumir que quanto mais argiloso o solo quanto maior o conteúdo de matéria orgânica e quanto maior o pH, maior será a CTC. No solo, há uma grande presença de cargas elétricas positivas e negativas,

originadas dos componentes do solo, tanto dos minerais quanto da matéria orgânica. A fração argila e outras frações como silte, por exemplo, em menor quantidade, podem apresentar essas duas cargas (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

Alguns dos solos apresentam o número de cargas negativas maiores que o número de cargas positivas e são conhecidos como solos eletronegativos. Essas cargas negativas, que se encontram na superfície dos minerais de argila e da matéria orgânica, são capazes de adsorver íons com cargas opostas: Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, H^{+}, etc. Desta maneira, se estabelece uma interação entre a fase sólida do solo e os cátions provenientes da solução do solo, que ficam aderidos às superfícies sólidas do solo.

2.1.4 Solos de várzea

Segundo KLAMT *et al*. (1985), os solos de várzea são aqueles encontrados nas planícies adjacentes aos rios e lagos onde se desenvolveram sobre sedimentos. Como estes sedimentos apresentam grande heterogeneidade quanto à composição granulométrica e mineralógica, os solos deles desenvolvidos apresentam grande variação de características de um local para outro, as quais se refletem na aptidão de uso dos mesmos.

Os solos cultivados com arroz irrigado na Região Subtropical do Brasil, especificamente nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) são encontrados, principalmente, nos ecossistemas de várzeas (solos de várzea) formados por planícies de rios, lagoas e lagunas, apresentando uma característica comum: a formação em condições variadas de deficiência de drenagem (hidromorfismo). O RS possui mais de 6 milhões de hectares de solos de várzea dos quais aproximadamente um milhão é cultivado anualmente com a cultura do arroz irrigado (EMBRAPA, 2007).

Os solos cultivados com arroz irrigado no RS e SC apresentam drenagem naturalmente deficiente, decorrente de densidade elevada, baixa porosidade total, alta relação micro/macroporos, presença de camada subsuperficial com baixa permeabilidade e do relevo plano a suave ondulado. Parte destas condições é

acentuada pelo preparo do solo realizado em condições de umidade excessiva (EMBRAPA, 2007).

De acordo com o levantamento “Fertilidade dos Solos Cultivados com Arroz Irrigado no Rio Grande do Sul” (ANGHINONI *et al*., 2004), há uma predominância absoluta (84,5%) de solos com pH < 5,5 nas regiões arrozeiras do RS, sendo que 47,5% desses solos apresentam teores baixos de cálcio trocável (< 2,0 $cmol_c$ L^{-1}), enquanto que os teores de magnésio trocável são altos em 45,9% das áreas. Segundo o mesmo levantamento, 96,5% dos solos das regiões arrozeiras do Estado apresentam teor de argila menor que 25%, indicando uma predominância de solos mais arenosos, sendo esse baixo teor de argila acompanhado por baixo teor de matéria orgânica, predominando em 77,5% das áreas cultivadas com arroz irrigado teores menores ou iguais a 2,5% de matéria orgânica. A maioria dos solos amostrados (54,6%) nas regiões arrozeiras apresentou teores de fósforo disponível acima do teor de suficiência (6,0 mg L^{-1}), enquanto que com relação ao potássio, aproximadamente metade dos solos amostrados (49,5%) é deficiente nesse nutriente.

As principais classes em que estão incluídos os solos cultivados com arroz na Região subtropical, de acordo com o novo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2007; RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006) são: Planossolos (antigos Planossolos e Solonetz Solodizado), Gleissolos (antigos Glei Húmico e Pouco Húmico, Hidromórficos Cinzentos e Solonchaks), Chernossolos (antigos Brunizém), Plintossolos, Vertissolos, Neossolos Flúvicos e Neossolos Quartzarênicos Hidromórficos (antigos Solos Aluviais e Areias Quartzosas Hidromórficas, respectivamente), Organossolos (antigos Solos Orgânicos) e Espodossolos (antigos Podzóis). Nos patamares mais elevados das áreas de várzea, podem ocorrer solos não-hidromórficos de drenagem imperfeita/moderada até boa, incluídos nas classes Argissolos, Alissolos e Luvissolos, desmembradas dos antigos Podzólicos, além de Chernossolos, Cambissolos e Neossolos Quartzarênicos Órticos (Areias Quartzosas).

2.2 Pesticidas

2.2.1 Definição

Os termos agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e até biocidas são denominações dadas às substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas ao controle de pragas e doenças de plantas.

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, define pesticidas e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

De acordo com o *Codex Alimentarius,* pesticida é definido como sendo “toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal” (FAO, 2005).

Para BAIRD (2002), pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira (por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo). Segundo ROCHA (2009), pesticidas são todas as substâncias de origem natural ou sintética utilizada no controle e/ou eliminação/diminuição de pragas (insetos, ervas daninhas, etc.), as quais causam prejuízos na produção de alimentos ou transferem enfermidades aos seres humanos e a outros organismos.

Neste estudo, adotou-se a denominação “pesticida” seguindo a tendência internacional empregada em publicações da área.

2.2.2 Classificação

Os pesticidas podem ser classificados de diferentes maneiras, podendo ser de acordo com o emprego (inseticida, fungicida, herbicidas, entre outros), modo de ação (sistêmicos ou de contato), estrutura química (piretróides, organofosforados, organoclorados, entre outros), persistência e toxicidade.

A principal classificação é quanto ao seu emprego: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), rodenticidas (combatem os roedores), bactericidas (combatem as bactérias) entre outros (BAIRD, 2002).

Quanto ao modo de ação, destacam-se os pesticidas de contato e os sistêmicos. Os pesticidas de contato ou não sistêmicos, também chamados de protetores, são aplicados externamente, antes ou depois da colheita, e saem com uma boa lavagem. Estes pesticidas não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente, não são translocados ou transportados dentro do sistema vascular das plantas. Os primeiros inseticidas, herbicidas e fungicidas pertenciam a esse grupo, e tiveram como desvantagem o fato de serem susceptíveis aos efeitos do clima (vento, chuva, sol), deixando a planta desprotegida contra o ataque de pragas. Os sistêmicos são aplicados durante a germinação, entram para o sistema vascular da planta e contaminam a polpa do alimento. O caráter sistêmico foi introduzido nos agrotóxicos que vieram após 1940. Estes penetram na cutícula da planta sendo transportados pelo seu sistema vascular. São pouco afetados pelo clima e conferem imunidade em todo o crescimento da nova planta (SILVA & FAY, 2004).

Do ponto de vista da composição química, os pesticidas possuem uma enorme diversidade estrutural, mas muitos apresentam alguma característica em comum, sendo assim, classificados dentro de um mesmo grupo. Os grupos mais conhecidos são representados pelos organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Estes nomes estão relacionados com as características estruturais dos compostos, ou seja, com a natureza dos elementos químicos presentes em sua composição, além da maneira como tais elementos estão ligados entre si (BARBOSA, 2004).

Os pesticidas também podem ser classificados de acordo com a persistência. Essa classificação se dá em função do tempo de meia vida dos compostos. O tempo de meia vida é o tempo necessário, após a aplicação, para que a sua eficácia seja reduzida à metade. Aqueles com tempos de meia vida de até 90 dias, são classificados como de persistência curta; de 91 a 180 dias, persistência média; tempos maiores que 180 dias, persistência longa (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005).

A classificação quanto à toxicidade é fundamental para o conhecimento da toxicidade aguda ou crônica dos pesticidas, os quais, por sua própria natureza, são compostos potencialmente perigosos para a saúde humana. Entretanto, esse perigo varia muito de um composto para outro, assim como os efeitos que eles, ou qualquer substância química, podem causar em organismos vivos, incluindo o homem (BARBOSA, 2004).

Uma medida freqüentemente empregada para avaliar a toxicidade aguda dos pesticidas e outras substâncias químicas é a Dose Letal 50% (DL_{50}). A DL_{50} representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas (BARBOSA, 2004). A legislação brasileira obriga às formulações de pesticidas a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade, conforme demonstrado na Tabela 2 para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002).

Tabela 2 - Classificação toxicológica dos pesticidas

Classe I	Rótulo Vermelho – Extremamente tóxico	*DL_{50} = 0-50 mg kg^{-1}
Classe II	Rótulo Amarelo – Altamente tóxico	*DL_{50} = 50-500 mg kg^{-1}
Classe III	Rótulo Azul – Medianamente tóxico	*DL_{50} = 500-5000 mg kg^{-1}
Classe IV	Rótulo Verde – Pouco tóxico	*DL_{50} > 5000 mg kg^{-1}

***DL_{50}** quantidade de uma determinada substância que é necessária ingerir ou administrar para provocar a morte a pelo menos 50% da população em estudo

Esta classificação garante a interpretação direta do grau de perigo dos pesticidas à saúde humana, facilitando ao agricultor e principalmente ao indivíduo, identificar a dimensão do risco na utilização destes produtos. É importante ressaltar que dentre as substâncias da Classe I encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (LEVIGARD, 2001).

O risco potencial que os pesticidas oferecem ao homem através da alimentação, devido a uma exposição crônica diária, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMR) que consiste na concentração máxima de pesticidas legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg^{-1}) (ANVISA, 2006). Os LMR's são estabelecidos para diferentes combinações de cultura e pesticida. Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de pesticidas, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental (STEPAN *et al*., 2005).

2.2.3 Histórico e Consumo

Há mais de 2 mil anos os agricultores utilizavam substâncias para prevenir os danos causados por pragas. A qualidade da produção agrícola sempre foi e ainda é intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e plantas daninhas. Desta forma, torna-se necessária a utilização de agrotóxicos ou pesticidas de diversas classes químicas.

Um dos primeiros recursos utilizados foi o enxofre. No século XV, outras substâncias tóxicas, como arsênio, mercúrio e chumbo, foram incorporados no combate às pragas. Já no século XVII, o sulfato de nicotina, extraído das folhas de tabaco, também passou a ser adotado como arma contra insetos (JONATAN, 1989; ANVISA, 2006).

No Brasil, a introdução de pesticidas organossintéticos teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO *et al.*, 2004). Em 1998, o consumo no Brasil foi cerca de 307 mil toneladas de produtos comerciais, formulados com cerca de 250 ingredientes ativos. No período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78% enquanto que o aumento no consumo de pesticidas foi de 700%, no mesmo período (SPADOTTO *et al.*, 2004).

A utilização de defensivos agrícolas vem crescendo a cada ano. A demanda das principais culturas chegou a 160 mil toneladas em 2003, o que colocou o Brasil em oitavo lugar no mundo, com um crescimento médio de 11,4% ao ano, em comparação com um aumento de 1 a 2% ao ano nos países desenvolvidos. Em

2007, o Brasil ficou em segundo lugar, atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2008, o Brasil assumiu a liderança mundial no consumo de pesticidas. Só o mercado de pesticidas movimentou mais de US$ 7 bilhões. As vendas de pesticidas acumuladas até o mês de fevereiro de 2009 totalizaram R$ 1,403 bilhão, com redução de 13% em comparação ao mesmo período de 2008 (SINDAG, 2010).

No Sul e no Sudeste, as lavouras que se destacam no consumo de pesticidas são a soja, cana-de-açúcar, milho, café, citros, arroz irrigado e algodão. Nessas lavouras, o volume aplicado por hectare é relativamente baixo, mas o consumo global é extremamente elevado. Há também o grupo das culturas menos expressivas em área plantada, mas que empregam doses altíssimas de pesticidas por hectare, como o fumo, batata, tomate, uva, morango e outras espécies de frutas e hortaliças (BRASIL, 2000). A categoria de pesticida mais utilizada no Brasil são os herbicidas seguidos pelos inseticidas e fungicidas (SINDAG, 2010). Na Figura 2, é apresentado o total de vendas de pesticidas no Brasil, no período de janeiro a julho de 2010 (milhões US$).

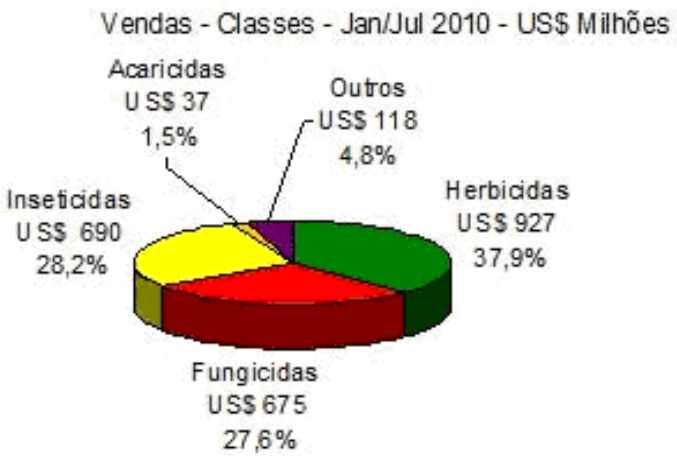


Figura 2 - Vendas de pesticidas no Brasil, no período de janeiro a julho de 2010 (milhões US$). Fonte: SINDAG, 2010

2.2.4 Propriedades físico-químicas dos pesticidas

A principal estratégia no combate e prevenção de pragas agrícolas tem sido o intenso uso de pesticidas. Segundo PRIMEL *et al*. (2005), as propriedades físico-químicas dos pesticidas são importantes parâmetros que podem ser avaliados para estabelecer um conhecimento prévio sobre o seu potencial de risco como contaminante no meio ambiente.

As principais propriedades físico-químicas dos pesticidas relacionadas com o seu comportamento são as seguintes: solubilidade em água (S), coeficiente de adsorção (K_D e K_{oc}), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), constante de equilíbrio de ionização ácida (pK_a), constante da lei de Henry (K_H), reatividade ou meia-vida ($t_{1/2}$) no solo e na água (CABRERA *et al*., 2008).

A estrutura molecular de cada pesticida determina, pelo menos parcialmente, o grau com que ele irá interagir no ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios também torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo tornando o mais estável ambientalmente (SILVA & FAY, 2004).

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atuam no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do pesticida em ser carreado superficialmente no solo atingindo águas superficiais. No entanto este não é o único parâmetro para prever a percolação, devendo ser analisado em conjunto com outras propriedades (SILVA & FAY, 2004).

O pK_a indica o valor do pH em que as moléculas se encontram 50% associadas e 50% dissociadas a um próton (H^+). Os valores do produto da constante de dissociação (pK_a) tem efeito sobre a solubilidade do pesticida, e através do pK_a do pesticida e do pH do solo, é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um pesticida ácido, e a mesma relação pode ser obtida usando pK_b para pesticidas alcalinos (BARCELÓ & HENNION, 2003).

Com o coeficiente de adsorção (K_{oc}) é possível prever a tendência do pesticida a ficar adsorvido na matéria orgânica no solo. Moléculas altamente

solúveis tendem apresentar valores de K_{oc} relativamente baixos (menores que 150 cm^3 g^{-1}), podendo ser mais rapidamente biodegradáveis no solo e na água (BARCELÓ & HENNION, 2003).

A constante da Lei de Henry (K_H), também chamada de coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (PV) mostra a tendência do pesticida a volatilizar ou permanecer na fase aquosa. Para algumas moléculas, dependendo do valor da pressão de vapor e/ou valor da solubilidade em água, o K_H dificilmente pode ser medido (SILVA & FAY, 2004).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando a tendência a bioconcentração destes compostos, sendo um fator importante na avaliação de riscos, pois em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação dos pesticidas que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ & HENNION, 2003).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos (SILVA & FAY, 2004). É útil para a comparação da persistência relativa de diferentes pesticidas no ambiente e é importante para o entendimento do potencial de impacto no solo e na água (CABRERA *et al*., 2008).

2.2.5 Impacto ambiental dos pesticidas

Os efeitos ocasionados por um pesticida para o meio ambiente dependem intrinsicamente 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 pesticida no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Os pesticidas podem alcançar os corpos de água diretamente em aplicações para controle de plantas aquáticas e mosquitos, ou indiretamente pela drenagem de terras agrícolas, permeação através do solo, em resíduos de produção de pesticidas

e resíduos municipais (fungicidas e bactericidas) (BIZIUK *et al.*, 1996). Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e aviões, na forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir as águas superficiais.

O aumento de eficácia dos compostos é de grande importância, pois a quantidade de produtos químicos lançados no meio ambiente pode ser reduzida. O que não significa, necessariamente, que o impacto ambiental seja menor, pois se deve levar em conta também a ecotoxicidade destes compostos e o seu impacto em organismos não-alvo.

No entanto, o uso indiscriminado dos pesticidas tem feito com que sejam detectados resíduos destes no meio ambiente, 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). Estima-se que aproximadamente 700 mil toneladas de pesticidas sejam lançadas, anualmente, no meio ambiente (BARBOSA, 2004).

Depois da aplicação de um pesticida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino dos pesticidas no meio ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações destes processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental dos pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar estes processos (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Quando aplicados diretamente no solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microorganismos. 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, dessorvidas 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 dessorção das partículas de sedimento. No ar, 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 carreadas juntamente com a água que alimenta os lençóis freáticos, subterrâneos e superficiais (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Alguns pesticidas dissipam-se rapidamente no solo e esse processo é denominado mineralização, pois resulta da transformação do produto em composto mais simples, como H_2O, CO_2 e NH_3. Embora parte desse processo seja ocasionada por reações químicas, como a hidrólise e a fotólise, o catabolismo microbiológico e o metabolismo são, geralmente, os principais meios de mineralização. Os microorganismos do solo utilizam o pesticida como fonte de carbono e outros nutrientes. Algumas moléculas são moderadamente persistentes e seus resíduos podem permanecer no solo durante um ano inteiro, outras podem persistir por mais tempo (SPADOTTO *et al.*, 2004).

2.2.6 Rotas de degradação e dissipação de pesticidas no solo

O solo é um sistema aberto e dinâmico no qual os seus constituintes podem, constantemente, movimentar-se ou sofrer transformação física, química e biológica. Nos últimos anos, observa-se maior preocupação quanto à contaminação do ambiente e a utilização racional dos solos e recursos hídricos. As práticas agrícolas, entretanto, são responsáveis por grande parte da degradação desses recursos. Outro fator relevante é que 60 a 70% do total dos pesticidas aplicados nos campos agrícolas não atingem a superfície alvo de interesse e acabam alcançando direta ou indiretamente o solo, o qual atua como o principal receptor e acumulador desses compostos (SILVA *et al.*, 2007).

Ao atingirem o solo, inicia-se o processo de redistribuição e degradação dos pesticidas aplicados, o qual pode ser extremamente curto, como o que ocorre para algumas moléculas simples e não-persistentes, ou perdurar por meses ou anos para compostos altamente persistentes (SILVA *et al*., 2007).

Na Figura 3 são apresentados, esquematicamente, os principais processos que atuam na movimentação e na degradação de pesticidas na natureza, ilustrando os meios mais prováveis onde esses compostos podem ser encontrados.

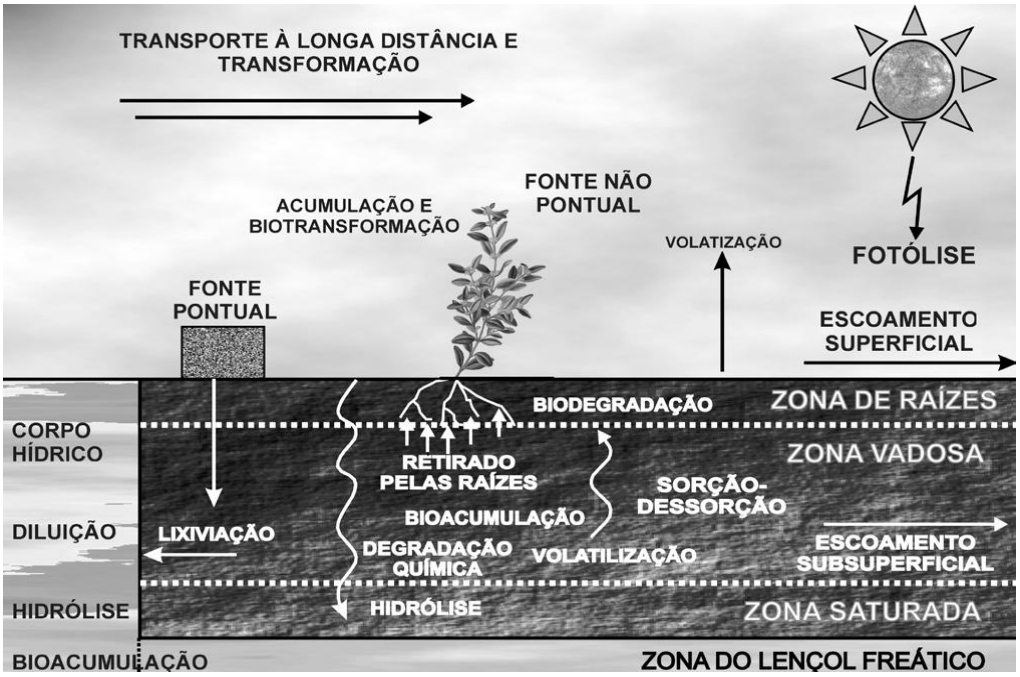


Figura 3 - Principais rotas de transporte e degradação de pesticidas no meio ambiente (Adaptado de JARDIM *et al*., 2009)

Segundo MULLER *et al.* (2007), as principais rotas de degradação e/ou dissipação dos pesticidas no solo são:

Degradação microbiológica: A degradação microbiológica é talvez o método singular mais importante de remoção de pesticidas do solo, pois a presença de certos grupos polarizados nas moléculas dos pesticidas proporciona pontos de ataque ao organismo, tais como OH, NHR, COOR e NR (SANTOS, 2009). Os maiores grupos de microrganismos do solo são os actinomicetes, fungos e bactérias. A característica mais importante dos sistemas de degradação por microrganismos é serem redutivos.

Degradação pela luz solar: A radiação solar na faixa do ultravioleta (290-450 nm) contém energia suficiente para causar transformações químicas dos pesticidas, as quais podem levar à sua inativação. Um dos fatores mais importantes que afetam a degradação dos pesticidas pela luz solar é a presença de fotossensibilizadores. Quatro tipos básicos de reações fotoquímicas podem ocorrer quando pesticidas aromáticos são expostos à radiação ultravioleta. São elas: substituição no anel, hidrólise (em solução aquosa), oxidação e polimerização. A reação de substituição mais comum no anel para clorados aromáticos é a troca do cloro do anel por um grupo hidroxila (GONÇALVES, 2007).

Lixiviação: o movimento dos pesticidas através do solo, causado pela água, pode ser dividido em dois componentes distintos: movimento lateral dos pesticidas na superfície do solo e movimento de penetração dos pesticidas com a água drenada. A tendência dos pesticidas à lixiviação dos solos é diretamente relacionada com seu potencial de adsorção, pois moléculas que têm forte interação dificilmente se submetem ao sentido descendente do perfil. A movimentação da água poderá favorecer a lixiviação, que se realiza com maior rapidez em solo arenoso com quantidade reduzida de argila e matéria orgânica (SANTOS, 2009).

Sorção e Dessorção de pesticidas no solo: Grande parte dos processos e reações que ditam o destino de pesticidas no ambiente, como lixiviação, retenção e degradação, inicia-se na solução do solo. Dentre as reações que determinam esta disponibilidade, a dessorção é de fundamental importância. A sorção avalia o efeito das interações entre os pesticidas, o solo e água, e a mobilidade ou imobilidade do pesticida nesta fase sólida do solo (ZHU & SELIM, 2000; BARIZON *et al.*, 2005; MULLER *et al.*, 2007). As taxas de degradação, volatilização, hidrólise e fotólise são diretamente dependentes dos processos de sorção e finalmente determinam a concentração do pesticida na solução do solo. A sorção é considerada como sendo um dos principais processos que afetam a interação que ocorre entre o pesticida e a fase sólida do solo. Os principais constituintes que representam a fase sólida no solo são: argila, minerais, matéria orgânica, óxidos e hidróxidos de alumínio e de ferro e sílica (GONÇALVES, 2007).

Volatilização: é o processo pelo qual o pesticida presente na solução do solo passa para a forma de vapor, podendo se perder para a atmosfera por evaporação (SILVA *et al*., 2007). Quanto menor a volatilidade, e quanto menor pressão de vapor, menor será a evaporação dos pesticidas e menores as perdas. Evidências mostram

que, mesmo pesticidas considerados não-voláteis, quando expostos à atmosfera por longos períodos de tempo, podem volatilizar. A volatilidade dos pesticidas no solo é muito variável, assim como sua tendência à perda para a atmosfera, em alguns casos o pesticida é selecionado por sua pressão de vapor muito elevada que permite sua penetração nos poros do solo, para atingir os organismos (SANTOS, 2009).

O entendimento dos processos do comportamento e destino de pesticidas no ambiente é essencial para direcionar planos de monitoramento dos riscos ambientais. A variedade de pesticidas usados representa muitas classes de substâncias químicas orgânicas e os tipos de interação desses compostos com diferentes componentes do ambiente são enormes (SPADOTTO *et al*., 2004).

2.2.7 Pesticidas selecionados para o estudo

Dentre os principais pesticidas empregados em larga escala na orizicultura brasileira, optou-se por desenvolver um método para determinar resíduos de clomazona, fipronil, imazapique, imazetapir, propiconazol, tiametoxam e trifloxistrobina em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado. A escolha baseou-se, principalmente, no intenso emprego destes na região central do estado do RS, grande produtora de arroz irrigado.

As características dos compostos abaixo foram obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003) e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010). A Tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para este estudo.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para este estudo

Pesticida	pK_a	log K_{ow}	Solubilidade em água (mg L^{-1})	Pressão de Vapor (mPa)
Clomazona	-	2,5	1100	19,2 (25 ºC)
Fipronil	-	4,0	1,9 (pH 5) 2,4 (pH 9)	3,7 x 10^{-4} (25 ºC)
Imazapique	2,0 e 3,6	0,393	2150	<1 x 10^{-2} (60 ºC)
Imazetapir	2,1 e 3,9	1,04 (pH 5) 1,49 (pH 7) 1,20 (pH 9)	1400	<0,013 (60 ºC)
Propiconazol	1,09	3,72 (pH 6,6)	100	5,6 x 10^{-2} (25 ºC)
Tiametoxam	-	- 0,13	4100	6,6 x 10^{-6} (25 ºC)
Trifloxistrobina	-	4,5	0,61	3,4 x 10^{-3} (25 ºC)

Onde: pK_a = constante de ionização ácida, K_{ow} = coeficiente de partição octanol-água

Fonte: TOMLIN, 2003

2.2.7.1 Clomazona

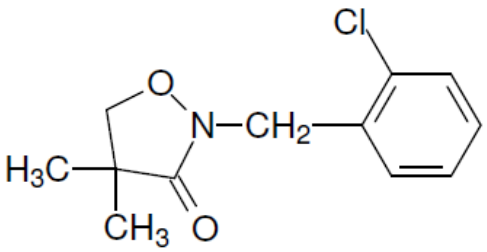


Figura 4 - Fórmula estrutural do clomazona

- ✓ Classe: herbicida
- ✓ Grupo químico: isoxazolidinona
- ✓ Nome químico (IUPAC): 2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-on
- ✓ Número no CAS: 81777-89-1

- ✓ Fórmula molecular: $C_{12}H_{14}ClNO_2$
- ✓ Massa molar: 239,7 g mol^{-1}
- ✓ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Gamit®, Commence®

O clomazona é um herbicida pré-emergente, não-iônico e altamente solúvel em água. Sua atividade é influenciada pelas características do solo, incluindo quantidade de matéria orgânica e argila. O herbicida clomazona, da família das isoxazolidinonas, é um dos herbicidas mais utilizados na cultura do arroz irrigado no estado do RS. No Brasil, também é utilizado para culturas de soja, cana-de-açúcar e fumo.

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 físico-químicas do clomazona o indicam como um contaminante em potencial de águas subterrâneas (ZANELLA *et al*., 2002).

2.2.7.2 Fipronil

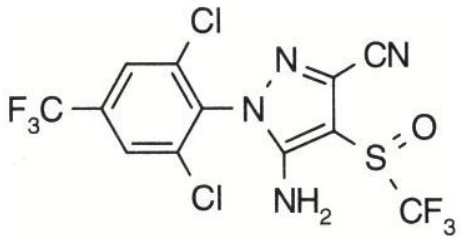


Figura 5 - Fórmula estrutural do fipronil

- ✓ Classe: inseticida, formicida e cupinicida
- ✓ Grupo químico: pirazol
- ✓ Nome químico (IUPAC): 5-amino-1-(2,6-dicloro-α,α,α-trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazole-3-carbonitrila
- ✓ Número no CAS: 120068-37-3
- ✓ Fórmula molecular: $C_{12}H_4C_{l2}F_6N_4OS$
- ✓ Massa molar: 437,2 g mol^{-1}
- ✓ Classe toxicológica: II, altamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Klap®, Regent®, Standak®

O pesticida fipronil é um inseticida de contato, descoberto e desenvolvido por Rhône-Poulenc entre 1985 e 1987 e colocado no mercado em 1993. É aplicado no solo em culturas de batata, cana-de-açúcar e milho, em folhas nas culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, em sementes de arroz, cevada, soja e feijão e na água para irrigação de arroz. Fipronil é altamente efetivo, de amplo espectro com recomendações de uso agrícola, saneante, não agrícola e preservante de madeira, no controle de pulgas e carrapatos em animais e domesticamente contra baratas e formigas. Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo das pestes (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2009). Ele é efetivo contra insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides, carbamatos e ciclodienos (RAVETON *et al.*, 2006). É principalmente usado contra os insetos do solo e no cultivo de arroz irrigado é aplicado para controle da bicheira-da-raiz (ANVISA, 2006).

O fipronil sofre lenta degradação em água e sedimentos em condições anaeróbias, com tempo de meia-vida variando entre 116 e 130 dias. É estável à hidrólise em pH moderadamente ácido a neutro. Em condições aeróbicas degrada-se lentamente mediante oxidação, redução e hidrólise. Quando exposto a luz, o composto sofre fotodegradação e sua meia-vida é de 3,6 h em água e 34 dias em solo argiloso.

2.2.7.3 Imazapique

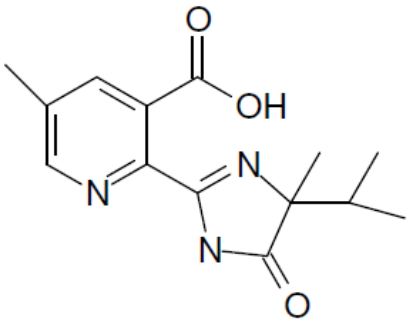


Figura 6 - Fórmula estrutural do imazapique

- ✓ Classe: herbicida
- ✓ Grupo químico: imidazolinona

- ✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-5-metil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1H-imidazol-2-il) ácido nicotínico
- ✓ Número no CAS: 81334-60-3
- ✓ Fórmula molecular: $C_{14}H_{17}N_3O_3$
- ✓ Massa molar: 275,3 g mol^{-1}
- ✓ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Plateau®, Only®

É um herbicida seletivo para controle em pré e pós-emergência de algumas plantas daninhas. Age inibindo a produção de aminoácidos de cadeia ramificada que são responsáveis pela síntese de proteínas e o crescimento da célula. É relativamente atóxico para mamíferos, pássaros e anfíbios. Tem um tempo de meia vida no solo de até 120 dias, e é rapidamente degradado pela luz solar em solução aquosa. Não é registrado para uso em sistemas aquáticos, quando aplicado individualmente. É mais indicado o uso para as culturas de cana-de-açúcar e algodão. A aplicação em ambiente aquático é para a cultura de arroz irrigado no sistema Clearfield®, quando aplicado na formulação Only® (GONÇALVES, 2007).

2.2.7.4 Imazetapir

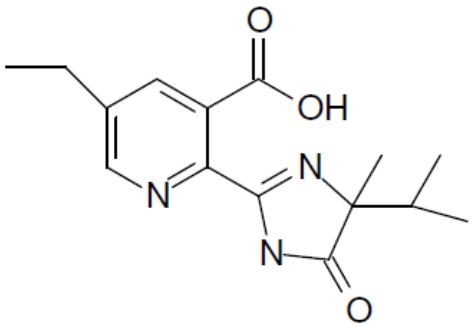


Figura 7 - Fórmula estrutural do imazetapir

- ✓ Classe: herbicida
- ✓ Grupo químico: imidazolinona
- ✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1H-imidazol-2-il) ácido nicotínico
- ✓ Número no CAS: 81335-77-5

- ✓ Fórmula molecular: $C_{15}H_{19}N_3O_3$
- ✓ Massa molar: 289,3 g mol^{-1}
- ✓ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Pivot®, Vezir®, Only®

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

O imazetapir apresenta a característica de ser persistente no solo, sendo muito solúvel em água, e susceptível à lixiviação (BATTAGLIN *et al*., 2000).

As imidazolinonas são uma classe de pesticida relativamente nova, o primeiro apareceu no mercado em 1981, e o mais recente em 1988 (WARE, 1994). Apesar disso, o imazetapir esteve na 7ª posição dos herbicidas mais usados nos EUA, nos anos 90 (SHORT & COLBORN, 1999). Eles possuem atividade foliar e no solo. Os primeiros sintomas da atividade herbicida se manifestam na interrupção do crescimento, que ocorre dentro de 48 h após a aplicação.

Herbicidas dessa classe são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. A persistência destes compostos no solo é afetada por fatores como umidade, pH, matéria orgânica e tipo de solo. Estes fatores determinam a disponibilidade do herbicida na solução do solo e então sua degradação, principalmente devido à atividade microbiana e também devido à hidrólise e decomposição (ALISTER & KOGAN, 2005). Esta alta persistência no solo pode levar a interferência destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

2.2.7.5 Propiconazol

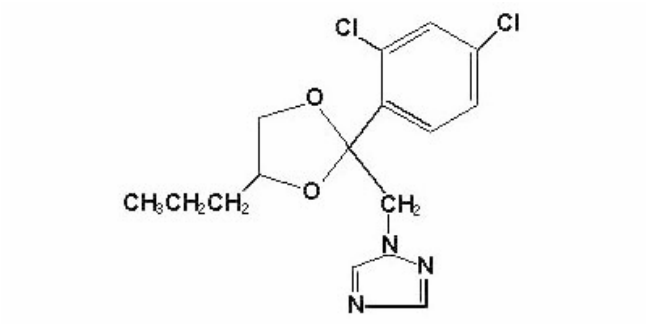


Figura 8 - Fórmula estrutural do propiconazol

- ✓ Classe: fungicida
- ✓ Grupo químico: triazol
- ✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4- triazol
- ✓ Número no CAS: 60207-90-1
- ✓ Fórmula molecular: $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$
- ✓ Massa molar: 342,2 g mol^{-1}
- ✓ Classificação toxicológica: II, altamente tóxico

Os compostos do grupo azol, classificados em triazóis ou imidazóis, são vastamente utilizados como fungicidas na agricultura, biocidas em vários produtos, e agentes antifúngicos em fármacos humanos e veterinários. Alguns azóis são também prescritos para terapia do câncer (KAHLE *et al*., 2008). Os azóis, também são considerados como um novo grupo de agentes ativos endócrinos que perturbam a biossíntese de esteróides em humanos (TRÖSKEN *et al*., 2005).

A atividade antifúngica é baseada na inibição da biossíntese de esteróis. Como conseqüência do seu uso comum, quantidades substanciais de azóis podem atingir o meio ambiente. Fungicidas azóis utilizados na agricultura são moderadamente lipofílicos e bastante persistentes com tempo de meia vida de semanas a meses. Eles podem atingir o ambiente aquático principalmente por escoamento superficial e deriva na hora da aplicação (KAHLE *et al*., 2008).

O composto propiconazol é um fungicida sistêmico da família dos triazóis, o qual possui aplicação foliar nas culturas de arroz, amendoim, aveia, banana, café, cevada, feijão, milho, seringueira, soja, tomate e trigo (ANVISA, 2010).

2.2.7.6 Tiametoxam

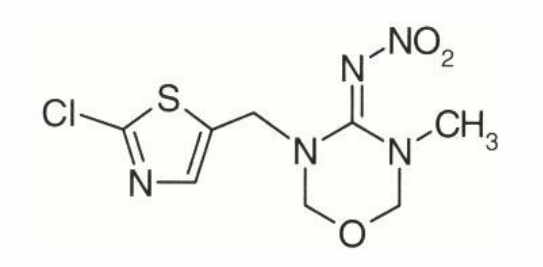


Figura 9 - Fórmula estrutural do tiametoxam

- ✓ Classe: inseticida
- ✓ Grupo químico: neonicotinóide
- ✓ Nome químico (IUPAC): 3-(2-cloro-tiazol-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno (nitro) amina
- ✓ Número no CAS: 153719-23-4
- ✓ Fórmula molecular: $C_8H_{10}ClN_5O_3S$
- ✓ Massa molar: 291,7 g mol^{-1}
- ✓ Classificação toxicológica: III, medianamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Actara®, Cruiser®

O tiametoxam, um inseticida pertencente à classe dos neonicotinóides, foi recentemente registrado no Brasil para o controle de pragas em várias culturas, como arroz, batata, cana-de-açúcar, fumo, trigo e soja. O produto é comercializado como Actara®, empregado para aplicação no solo e pulverização foliar, e como Cruiser®, para tratamento de sementes. Trata-se de um composto altamente tóxico a insetos e pouco tóxico a mamíferos, apresentando DL_{50} para ratos (dose letal a 50% dos indivíduos tratados) em torno de 1500 mg kg^{-1} de peso corporal. Entretanto, quando em contato constante, mesmo em pequenas doses, esse inseticida tem grande potencial carcinogênico, sendo seu limite aceitável para impacto na água do solo de 0,94 µg L^{-1} (OLIVEIRA, 2009).

Devido as suas propriedades físico-químicas, o tiametoxam apresenta baixa sorção aos colóides do solo, estando mais relacionado com o teor de matéria orgânica do solo, apresentando dessa forma alto potencial de lixiviação em condições de campo (OLIVEIRA, 2009).

2.2.7.7 Trifloxistrobina

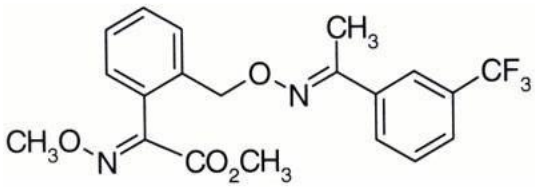


Figura 10 - Fórmula estrutural da trifloxistrobina

- ✓ Classe: fungicida
- ✓ Grupo químico: estrobilurina
- ✓ Nome químico (IUPAC): éter metílico do ácido (E,E)- metoxiimino- {2-{1-(3-trifluorometilfenil)- etilideno-amino-oximetil}-fenil}-acético
- ✓ Número no CAS: 141517-21-7
- ✓ Fórmula molecular: $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$
- ✓ Massa molar: 408,4 g mol^{-1}
- ✓ Classificação toxicológica: II, altamente tóxico
- ✓ Nome comercial: Flint®

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

No início da década de 1980 estes compostos despertaram grande interesse por parte das indústrias produtoras de pesticidas, devido a um extenso número de relatos do desenvolvimento de resistência de fungos a fungicidas que haviam sido

introduzidos recentemente no mercado, como carboxidiimidas e triazóis (BARBOSA, 2004).

Os pesticidas do grupo das estrobilurinas são uma nova classe dos fungicidas incluídos dentro do grupo dos Inibidores da quinona. Eles possuem um novo modo de ação e são muito seguros do ponto de vista ambiental. Entre os compostos pertencentes à classe estrobilurinas está a trifloxistrobina.

A trifloxistrobina é um fungicida de largo espectro, mesostêmico, com aplicação foliar nas culturas de arroz, algodão, amendoim, café, feijão, milho, soja e trigo (ANVISA, 2010). Possui atividade preventiva e curativa ou erradicante; sendo redistribuído por circulação de vapor superficial e também possui atividade translaminar.

2.3 Preparo de amostra para análise de resíduos de pesticidas

Na análise de resíduos de pesticidas há a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra devido à complexidade das matrizes, as concentrações extremamente baixas dos analitos, bem como a 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, portanto, 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). Embora muitas das técnicas instrumentais cromatográficas tenham

evoluído e a automação ser atualmente bastante utilizada, o preparo da amostra é ainda considerado lento, laborioso e eventualmente um entrave no processo laboratorial (MAJORS, 2001).

A etapa de preparo de amostra é responsável por mais de 80% do tempo de consumo das análises e o sucesso das mesmas é determinado pela qualidade no preparo das amostras, principalmente de matrizes complexas, por isso, a melhoria neste procedimento é considerada urgente (HYÖTYLÄINEN, 2007).

Nos últimos anos, muitas inovações nos processos analíticos para a determinação de resíduos de pesticidas, têm sido desenvolvidas (PICÓ *et al*., 2007). As novas tendências em preparo de amostras são o desenvolvimento de métodos os quais aumentem a precisão, a reprodutibilidade e a relação custo-benefício (HYÖTYLÄINEN, 2007). Entre os procedimentos de preparo de amostra que têm sido largamente empregados para determinação de pesticidas em matrizes complexas destaca-se o método de extração QuEChERS.

2.3.1 Método de extração QuEChERS

O método de extração QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi introduzido em 2003 por ANASTASSIADES *et al*. com a finalidade principal de superar limitações práticas de outros métodos de extração multirresíduos já existentes. O método QuEChERS tem as vantagens principais de ser um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, as quais são destacadas no próprio nome QuEChERS. Este método foi desenvolvido para amostras que possuem em sua composição mais de 75% de água (DIÉZ *et al*., 2006).

Durante o desenvolvimento deste método buscou-se a obtenção de um método simples, rápido, de baixo custo e com um número mínimo de etapas analíticas, utilizando pequenas quantidades de reagentes, e logicamente, com resultados satisfatórios de precisão e exatidão. O método desenvolvido tem a possibilidade de ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação de etapas lentas e trabalhosas (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

O método é baseado em uma extração com acetonitrila, seguido de partição líquido-líquido (adição de $MgSO_4$ e NaCl) e posterior etapa de *clean-up* com SPE

dispersiva (ANASTASSIADES *et al.,* 2003; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.,* 2008). A Figura 11, apresenta um esquema representativo do método QuEChERS original.

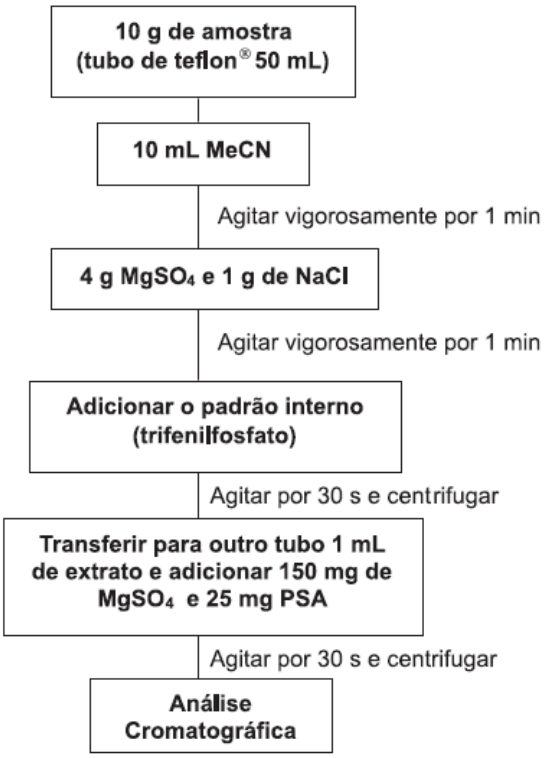


Figura 11 - Esquema representativo do método QuEChERS original. Fonte: PRESTES *et al.,* 2009

O emprego de acetonitrila como solvente de extração no método QuEChERS proporciona uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra quando se trabalha, como por exemplo, com cereais, gorduras e pigmentos; também, a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e, a compatibilidade do extrato final com a Cromatografia Líquida e com a Cromatografia Gasosa. Além disso, a acidificação da acetonitrila permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade (PRESTES *et al.*, 2009).

A adição de sais na etapa de partição promove o efeito "*salting out*" proporcionando melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Na extração com

acetonitrila a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES *et al*., 2009).

O sulfato de magnésio anidro foi escolhido para ser utilizado no método QuEChERS por ser um agente secante muito mais eficiente quando comparado a outros sais, sendo sua hidratação um processo extremamente exotérmico, tendo como resultado um aquecimento do tubo utilizado entre 40 e 45 ºC durante as etapas de extração/partição. Este aquecimento não é suficiente para volatilizar ou degradar os pesticidas, mas é favorável para extração de alguns pesticidas e ajuda a confirmar que a água está sendo removida da solução (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

A etapa de *clean-up* é fundamental na análise de resíduos de pesticidas, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. Sendo assim, um novo método de *clean-up* foi desenvolvido juntamente com o método QuEChERS, o qual foi chamado de extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*). Neste método, uma alíquota de 1 mL do extrato é colocada em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA, do inglês *Primary Secundary Amine*) e 150 mg de sulfato de magnésio. Os sólidos são então separados por centrifugação ou filtração e uma alíquota do extrato final é levada para análise (ANASTASSIADES *et al*., 2003). Algumas vezes, na etapa de *clean-up* do método QuEChERS é conveniente utilizar uma combinação de sorventes, como por exemplo, octadecilsilano (C_{18}) e PSA, dependendo do tipo de matriz utilizada e das propriedades químicas dos pesticidas (LEHOTAY *et al*., 2005).

A D-SPE é baseada na extração em fase sólida (SPE), mas o sorvente PSA é adicionado diretamente ao extrato, sem necessidade de condicionamento em cartuchos. Devido ao uso de pequenas quantidades de sorvente e por não necessitar o uso de cartuchos, a D-SPE é uma técnica que economiza tempo, dinheiro, trabalho e também quantidade de solvente, quando comparada à técnica de SPE. Não há a necessidade de nenhuma etapa de condicionamento de cartuchos, uma mínima atenção do analista é necessária e também não há problemas de secagem do adsorvente (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

Entre as principais vantagens do método QuEChERS com relação aos métodos tradicionais de preparo de amostra estão: os altos valores de recuperações

(maiores que 85%) para uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridade e volatilidade; elevado grau de exatidão e precisão dos resultados; preparo de um grande número de amostra em um tempo reduzido, cerca de 8 amostras em aproximadamente 30 min; redução no volume de solventes orgânicos; e simplicidade de execução (LEHOTAY *et al.,* 2005).

A principal desvantagem do método QuEChERS é que a relação amostra:extrato final, de 1 g mL^{-1}, é mais baixa do que 2-5 g mL^{-1} obtida pela maioria dos métodos tradicionais de extração (LEHOTAY *et al*., 2005). Portanto, se a matriz não for uma fonte limitante de ruído nas análises, isto pode conduzir a uma redução da sensibilidade analítica.

Ensaios de proficiência empregando o método QuEChERS mostram que este método é robusto, sendo o método transferido com sucesso entre os laboratórios participantes. Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007, como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (PRESTES *et al.,* 2009).

O método QuEChERS também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization*. Além disso, durante a 39ª Sessão do Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os Estados Unidos apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão do *Codex Alimentarius* (PRESTES *et al.,* 2009).

O método QuEChERS e suas versões modificadas têm sido amplamente utilizado para a extração de diferentes tipos de pesticidas, sobretudo, em frutas e vegetais. Em menor extensão, tem sido igualmente utilizado para extração de pesticidas em outros tipos de gêneros alimentícios, como por exemplo, arroz, comida para bebês, azeitonas, leite, ervas e mel. Embora este método forneça bons resultados para a extração de pesticidas não polares, de média polaridade e polares em alimentos não gordurosos, é igualmente interessante aplicar este método para análise de pesticidas em outras matrizes não gordurosas, tais como solos, em que pesticidas tendem a ocorrer freqüentemente (RAMOS *et al.*, 2010).

2.3.2 Métodos de extração para determinação de pesticidas em solo

A extração e *clean-up* são pontos essenciais na análise de compostos orgânicos provenientes de matrizes sólidas. Pesticidas são normalmente recuperados de matrizes complexas (ambientais e biológicas) por extração exaustiva com uma variedade de solventes orgânicos, como por exemplo: hexano, éter de petróleo, acetona, acetonitrila, metanol e suas combinações (GONÇALVES, 2007).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a extração de pesticidas do solo. Porém os métodos utilizados tradicionalmente são Extração por Soxhlet, Ultra-som e Agitação Mecânica, seguidos de uma etapa de *clean-up*, consistindo na maioria dos casos, por procedimentos de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) (RAMOS *et al.*, 2010). Recentemente, técnicas como Extração por Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), Extração por Solvente Pressurizado (PSE, do inglês *Pressurized Solvent Extraction*) e Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*) foram aplicadas, apesar do custo considerável. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens, porém a escolha se faz principalmente em função do custo, facilidade na operação, consumo de material e tempo (CAVALCANTE, 2008).

Métodos clássicos para a determinação de pesticidas em solos são procedimentos que exigem muitos passos, normalmente, baseados na extração exaustiva da matriz, com etapas posteriores de *clean-up* para a remoção dos materiais co-extraídos, antes da análise instrumental. Esses métodos possuem etapas tediosas, que consomem tempo e exigem uma grande quantidade de amostra, e solventes orgânicos de alta qualidade, além de muita manipulação dos extratos.

Dessa forma, foram desenvolvidas nos últimos anos técnicas de preparo de amostra baseadas na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração dos compostos da matriz do solo. Entre os procedimentos de preparo de amostra que vem sendo empregados atualmente para a determinação de pesticidas em solo destaca-se o método de extração QuEChERS.

2.3.2.1 Método de extração QuEChERS aplicado à amostras de solo

Baseado em dados da literatura, até a atualidade, o método QuEChERS foi aplicado à extração de pesticidas em solos somente em oito ocasiões, utilizando-se na maioria dos casos, a Detecção por Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), exceto em três casos, em que foram utilizados Detecção por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detection*), Nitrogênio e Fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen and Phosphorus Detection*) e Micro Detecção por Captura de Elétrons (µECD, do inglês *micro-Electron Capture Detection*) (RAMOS *et al.*, 2010).

LESUEUR *et al.* (2008) desenvolveram um método QuEChERS modificado para determinação de 24 pesticidas em amostras de solo, seguido de quantificação por GC-MS e LC-MS/MS. O método QuEChERS para extração dos pesticidas no solo consistiu em 10 g de amostra e 20 mL de acetonitrila, seguido pela adição de 4,0 g de $MgSO_4$, 1,0 g de NaCl, 1,0 g de citrato de sódio dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado. A etapa de *clean-up* foi realizada com 150 mg de PSA e 950 mg de $MgSO_4$, seguido de filtração e análise por GC-MS e LC-MS/MS. Trifenilfosfato foi usado como padrão interno e fortificado antes da extração para alcançar uma concentração de 0,5 µg mL^{-1} no extrato final. Os pesticidas analisados apresentaram recuperação média de 72,7%, com RSD na faixa de 1,5 a 18,3%. As faixas de LOD e LOQ ficaram entre 0,02 e 88 µg kg^{-1} e entre 0,08 e 292,0 µg kg^{-1}, respectivamente.

DROZDZYNSKI *et al*. (2009) determinaram 3 inseticidas ecológicos (azadiractina, spinosad e rotenona) em amostras de solo, repolho e tomate empregando o método QuEChERS modificado, seguido de quantificação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (UPLC-MS/MS, do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). O método QuEChERS modificado para extração dos pesticidas no solo consistiu em 5 g de amostra, 5 mL de água, adição do padrão interno, 10 mL de acetonitrila acidificada, agitação por 5 min, adição de 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado, 1 g de citrato trissódico dihidratado, 4,0 g de $MgSO_4$, 1,0 g de NaCl, agitação por 1 min, e centrifugação. A etapa de *clean-up* foi realizada com 900 mg de $MgSO_4$, 150 mg de PSA e 150 mg de C_{18}, agitação com vortex por 1 min e centrifugação. O sobrenadante foi evaporado até secura e

redissolvido com 0,25 mL de acetato de amônio 0,1% em metanol, seguido pela adição de 0,25 mL de acetato de amônio 0,1% em água, agitação em vortex, filtração e injeção no sistema UPLC-MS/MS. Os valores de recuperação ficaram na faixa entre 67 e 108%, dependendo da matriz e do nível de fortificação, com desvio padrão menor que 12%. Os limites de quantificação foram ≤ 0,01 mg kg^{-1} em todos os casos, exceto para azadiractina. O método desenvolvido foi aplicado para análise de amostras reais provenientes do cultivo orgânico.

DONG *et al*. (2009) determinaram resíduos de metaflumizona em amostras de solo e repolho, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de quantificação por UPLC-MS/MS. O método QuEChERS para extração de resíduos de metaflumizona em solos consistiu em pesar 10 g de amostra, seguido da adição de 5 mL de água e 10 mL de acetonitrila, no qual realizou-se agitação por 30 min. Após, adicionou-se 4,0 g de $MgSO_4$ e 1,0 g de NaCl, seguido de agitação no vortex por 2 min e centrifugação. A etapa de *clean-up* foi realizada com 200 mg de $MgSO_4$ e 30 mg de PSA, seguido de agitação, centrifugação, filtração e análise por UPLC-MS/MS. Valores de recuperação satisfatórios, entre 77,6 e 87,9% foram obtidos para análise de metaflumizona em solos e repolho, com desvio padrão (RSD) de 3,5 e 7,9%. Os valores de LOD e LOQ do método foram de 0,001 mg kg^{-1} e 0,004 mg kg^{-1} respectivamente, para amostras de solo e repolho.

CHEN *et al*. (2010) desenvolveram um método QuEChERS modificado para a análise de procimidona em amostras de solo e alho-poró, para estudos de dissipação, seguido de quantificação por GC-MS. O método QuEChERS para extração do pesticida no solo consistiu em 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila e 3 mL de água, agitação em vortex por 1 min, adição de 2,0 g de cloreto de sódio (NaCl), agitação em vortex por 1 min, centrifugação, etapa de *clean-up* com 50 mg de PSA e 250 mg de $MgSO_4$, agitação em vortex por 1 min, centrifugação, filtração e análise por GC-MS. Valores satisfatórios de recuperação entre 74,9 e 100,8% foram obtidos, com desvio padrão (RSD) entre 1,3 e 8,5%. Os limites de detecção (LODs) ficaram na faixa de 20 e 175 ng g^{-1}. Resíduos de procimidona mostraram uma taxa de dissipação relativamente rápida, com tempos de meia-vida na faixa de 3,76-8,76 dias para amostras de solo e alho-poró.

RAMOS *et al.* (2010) desenvolveram um método QuEChERS modificado para determinação de 11 pesticidas em três tipos diferentes de solos (florestal, ornamental e agrícola), seguido de quantificação por Cromatografia Gasosa com

Detecção Nitrogênio e Fósforo (GC-NPD). O método QuEChERS modificado para extração dos pesticidas no solo consistiu em 10 g de amostra, adição do padrão interno, 20 mL de acetonitrila, agitação por 1 min, seguido pela adição de 4,0 g de $MgSO_4$, 1,0 g de NaCl, 1,0 g de citrato de sódio tribásico dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado, agitação por 10 s, ultra-som por 5 min e centrifugação. A etapa de *clean-up* foi realizada com 0,25 g de PSA e 1,5 g de $MgSO_4$, agitação, ultra-som por 1 min e centrifugação. O sobrenadante foi evaporado até secura e redissolvido com 1 mL de ciclohexano, seguido de filtração e análise por GC-NPD. Valores de recuperação aceitáveis, entre 45 e 96% foram obtidos para todos os pesticidas em solos, exceto para malation e malaoxon em solos florestais e ornamentais, os quais não foram extraídos quantitativamente. Os limites de detecção do método total ficaram na faixa de 0,48 a 7,78 ng g^{-1}.

RASHID *et al.* (2010) determinaram 19 pesticidas organoclorados em solos, utilizando o método QuEChERS modificado e *clean-up* baseado na partição líquido-líquido com n-hexano. Foram empregados 5 g de amostra, 10 mL de água, repouso por 30 min, 10 mL de acetonitrila acidificada, agitação com vortex por 30 s, seguido da adição de 4,0 g de $MgSO_4$ e 1,7 g de NaAc, agitação e centrifugação. Após, foi realizado *clean-up* através de partição líquido-líquido com n-hexano, seguido de análise por GC-MS/MS. Os pesticidas analisados apresentaram recuperação entre 70 e 100%, com RSD menor que 20%. O método alcançou baixos limites de detecção (LOD: 0,3 µg kg^{-1}) e baixos limites de quantificação (LOQ: 1,0 µg kg^{-1}). O método proposto foi comparado com um procedimento estabelecido de Extração Soxtec, apresentando resultados satisfatórios para ambos. No entanto, o método QuEChERS forneceu extratos mais limpos, resultando em menores limites de quantificação, além de ser mais rápido e seguro em relação ao procedimento de Extração Soxtec.

SHI *et al*. (2010) desenvolveram um método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de oxadiargil em amostras de solo, água, arroz e palha de arroz, seguido de quantificação por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD). Neste método, não se realizou a etapa de *clean-up* dispersivo. O método QuEChERS para extração de oxadiargil em solos consistiu em pesar 10 g de amostra, seguido da adição de 4,0 g de $MgSO_4$, 1,0 g de NaCl e 15 mL de acetonitrila, agitação por 1 min e centrifugação. Após, 5 mL do sobrenadante foi evaporado com nitrogênio até secura e redissolvido com acetato de etila, seguido de

injeção no cromatógrafo. Valores satisfatórios de recuperação entre 82,9 a 112% foram obtidos para oxadiargil em todas as amostras, com desvio padrão (RSD) menores que 6,2%, no nível de fortificação de 0,01 mg kg^{-1}. Os valores de LOD foram de 0,001 mg kg^{-1} para amostras de água e arroz, e de 0,005 mg kg^{-1} para amostras de solo e palha de arroz. Os valores de LOQ foram 0,01 mg kg^{-1} para amostras de solo, água, arroz e palha de arroz.

PINTO *et al*. (2010) desenvolveram uma versão simplificada do método QuEChERS para análise de três compostos clorados (hexaclorobenzeno, 1,2-diclorobenzeno e clorofórmio) em amostras de solos, seguido de quantificação por Cromatografia Gasosa com Micro Detecção por Captura de Elétrons (GC-µECD). Para avaliar o método proposto, três tipos diferentes de solos foram usados: solo de jardim, com alto conteúdo orgânico; um Vertisol, com alto conteúdo de argila; e um material de referência certificado (solo argiloso sedimentoso). O método QuEChERS proposto consistiu em pesar 2,5 g de amostra, adição de 1,5 mL de água ultrapura, agitação por 1 min em vortex, adição de 2,5 mL de acetato de etila, agitação por 1 min, adição de 1,0 g de sulfato de magnésio anidro, agitação por 1 min, seguido de centrifugação e análise por GC-µECD. Valores de recuperação entre 62 e 93% foram obtidos, com desvio padrão (RSD) entre 3,5 e 7,6%. A principal vantagem da versão simplificada deste método é a eliminação da etapa de *clean-up* dispersivo, além de ser um procedimento rápido, barato, e que minimiza os erros associados a essa etapa.

2.3.2.2 Preparo de amostra para extração de herbicidas imidazolinonas em solo

Os herbicidas do grupo das imidazolinonas controlam um amplo espectro de plantas daninhas, incluindo gramíneas, ciperáceas e latifoliadas. Esses herbicidas são amplamente utilizados no Estado do Rio Grande do Sul (RS), em uma mistura formulada com o nome comercial Only®, que é aplicado em cultivares tolerantes, constituindo a tecnologia chamada Clearfield®. No entanto, a alta persistência e solubilidade em água desses herbicidas fazem com que apresentem alto potencial de contaminar o ambiente e afetar cultivos subseqüentes (KRAEMER, 2008).

O conhecimento das características físico-químicas dos herbicidas imidazolinonas é muito importante para o desenvolvimento de métodos analíticos de

preparo de amostra que visam à determinação deste grupo de herbicidas em matrizes ambientais, como o solo. Em termos analíticos, as estruturas moleculares das imidazolinonas apresentam algumas características muito importantes, pois apresentam comportamento anfótero, possuindo um grupo carboxílico (ácido) e um grupo amino (básico) como grupos funcionais, comportando-se como ácidos ou bases fracas, respectivamente (KRAEMER, 2008).

A natureza anfótera (presença de grupos funcionais ácidos e básicos) de herbicidas imidazolinonas permite que estes herbicidas existam no estado catiônico, neutro e aniônico dependendo do pH do ambiente (RAMEZANI *et al*., 2009).

A constante de dissociação ácida (pK_a) para imazapique e imazetapir é de 3,6 e 3,9 no grupo carboxílico e de 2,0 e 2,1 no grupo amino, respectivamente. Para ácidos fracos, quando o pH da solução do solo é igual ao pK_a, as moléculas encontram-se 50% associadas ou neutras (COOH) e 50% dissociadas ou aniônicas (COO^-). Caso o pH seja maior que o pK_a, predominam as moléculas COO^-, e se o pH for inferior ao pK_a, predominam as moléculas COOH. Já para bases fracas, quando o pH da solução do solo for igual ao pK_a, 50% das moléculas estarão na forma catiônica e 50% delas sem carga (forma neutra). Quando o pH for menor que o pK_a, predominam moléculas positivas e quando for maior que o pK_a predominam moléculas neutras (KRAEMER, 2008).

Com valores de pH elevados, a sorção destes herbicidas no solo é reduzida, em decorrência do predomínio da forma COO^- das moléculas, as quais seriam repelidas pelas cargas negativas da matriz do solo, permanecendo mais biodisponíveis na solução do solo. Com pH baixo, o número de moléculas COOH ou protonadas (NH^+) aumenta. Quando a proporção de moléculas associadas (neutras) aumenta, o herbicida fica menos solúvel, aumentando as interações hidrofóbicas com a MO, ficando menos biodisponível, aumentando a persistência no solo (KRAEMER, 2008).

Os equilíbrios existentes para imazapique e imazetapir são mostrados nas Figuras 12 e 13.

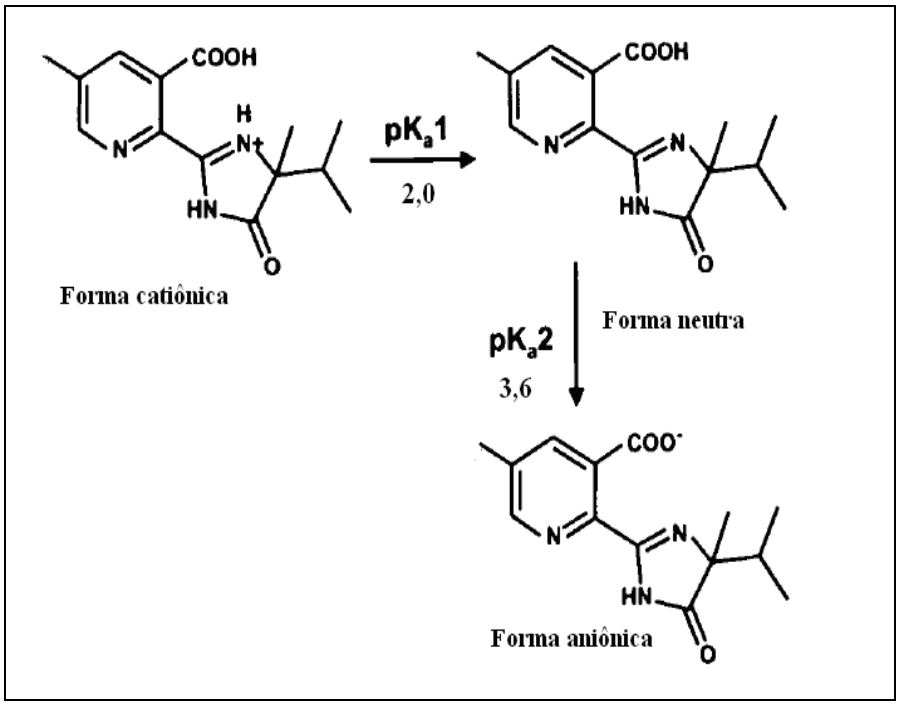


Figura 12 - Equilíbrio iônico do imazapique (Adaptado de SHANER & HORNFORD, 2005)

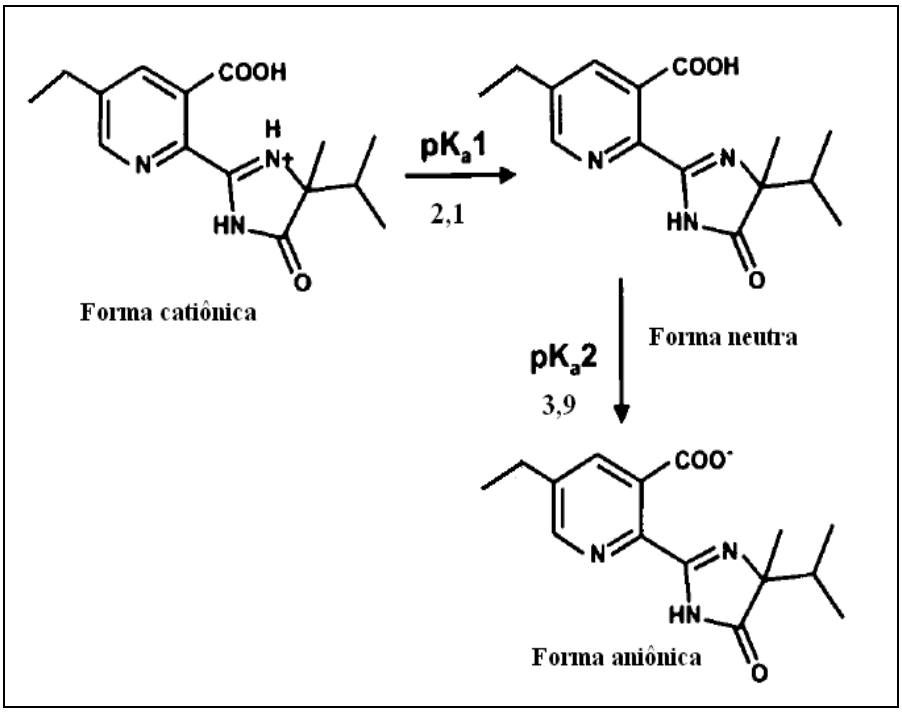


Figura 13 - Equilíbrio iônico do imazetapir (Adaptado de SHANER & HORNFORD, 2005)

A extração de herbicidas imidazolinonas em solos normalmente é difícil, devido à co-extração de muitas substâncias interferentes, à complexidade da matriz, às propriedades desses herbicidas e aos baixos limites de detecção requeridos (RAMEZANI *et al.*, 2009). Além disso, devido sua baixa dosagem de aplicação (100 a 200 g ha^{-1}), o monitoramento de resíduos de herbicidas imidazolinonas em solos necessita ser executado em níveis de µg kg^{-1}.

Os métodos clássicos para a extração de herbicidas imidazolinonas em solos são procedimentos que exigem muitos passos, possuem etapas tediosas, que consomem tempo e são caros (RAMEZANI *et al.*, 2009).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a extração e/ou concentração de herbicidas imidazolinonas presentes no solo. A seguir estão citados alguns dos trabalhos da literatura, dando ênfase ao preparo de amostra de herbicidas desse grupo em solo.

LAGANA *et al.* (1998) desenvolveram um método para quantificação simultânea dos herbicidas imidazolinonas (imazapir, *m*-imazametabenzo, *p*-imazametabenzo, *m,p*-imazametabenzometilico, imazetapir e imazaquim) em amostras de solo e água de rio. O objetivo foi comparar dois procedimentos de extração. As amostras de água foram pré-concentradas com SPE e foram quantificados por HPLC-UV com detecção em 240 nm. As recuperações ficaram acima de 89%. Os limites de detecção foram de 43 a 51 ng L^{-1}. O método envolveu análise confirmatória por LC-MS/MS. As amostras de solo foram extraídas utilizando extração em coluna de solo (SCE, do inglês *Soil Column Extraction*) combinada com SPE, seguidas de quantificação por LC-MS/MS no modo monitoramento do íon selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). O método de preparo de amostra consistiu em pesar 5,0 g de solo fortificado, seguido de transferência quantitativa para cartuchos Supelco (6,0 cm x 1,3 cm). Os herbicidas imidazolinonas foram extraídos da coluna de solo pela passagem de 25 mL de metanol/carbonato de amônio (0,1 mol L^{-1}, pH = 8,2, 50:50, v/v). O extrato foi coletado em frascos volumétricos e então diluído a 250 mL com água, seguido de purificação através da passagem por cartuchos Carbograph-1. A recuperação total de cada herbicida imidazolinona em amostras de solo variou de 87 a 95%. O limite de detecção foi de 0,1 a 0,05 ng g^{-1} em solo.

D' ASCENZO *et al*. (1998) desenvolveram um método para a determinação simultânea de resíduos dos herbicidas imidazolinonas (imazapir, imazaquim,

imazametabenzo e imazametabenzometilico) em solo. O princípio do método baseou-se na formação de um sobrenadante pela sonicação do solo com KCl 0,1 mol L^{-1}. Após a remoção das partículas do solo, os pesticidas foram determinados por Cromatografia Líquida em fase reversa acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), utilizando como fase móvel acetonitrila e água ambos acidificados com HCOOH 100 mmol L^{-1}. O procedimento de extração consistiu em adicionar 20 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,1 mol L^{-1} em amostras de solo e a mistura foi agitada por 10 min em um agitador mecânico. Subsequentemente, essa suspensão foi sonicada por 15 min e então centrifugada por 10 min. O procedimento inteiro foi repetido duas vezes na mesma amostra de solo. Por último, os extratos foram combinados e filtrados a vácuo, sendo que 20 µL do extrato final foram injetados no LC-MS. As recuperações dos herbicidas imidazolinonas variaram de 80 a 99%, com valores de RSD menores que 8%. Os limites de detecção do método foram menores que 14 ng g^{-1} em solos. No entanto, como o método de extração envolve dupla sonicação, centrifugação e separação, necessitando de maior tempo para extração, este não é apropriado para análise de rotina de um grande número de amostras.

LAGANA *et al*. (2000) desenvolveram um método multirresíduo para a quantificação e confirmação de 16 herbicidas aplicados em pós-emergência (três imidazolinonas, três éteres difenil, seis sulfoniluréias, dois ácidos ariloxifenoxipropiônico e dois sulfonanilidas triazolopirimidina) em amostras de solo. Os três herbicidas imidazolinonas avaliados foram imazapir, imazetapir e imazaquim. Os analitos foram extraídos através de extração em coluna de solo (SCE) e os extratos foram purificados por SPE usando cartuchos Carbograph-1. Para estabelecer as condições ideais de extração, uma série de variáveis que afetam o desempenho da SCE, como o uso de solvente extrator, temperatura, tamanho da amostra, volume de solvente extrator e vazão do solvente foram avaliados. Para a extração dos analitos foi utilizado solução de KH_2PO_4, 0,1 mol L^{-1}, pH = 8, à temperatura ambiente. O método de preparo de amostra consistiu em transferir 1,0 g de solo fortificado para tubos de filtração vazios (6,0 x 0,9 cm). Acima da camada de solo foi colocado areia do mar, pré-lavada com metanol, e abaixo da camada de solo foi colocado lã de vidro. A coluna de solo foi colocada acima de um cartucho Carbograph-1, usando um adaptador. Os herbicidas foram extraídos pela passagem de 25 mL de KH_2PO_4 0,1 mol L^{-1}, pH = 8, através da coluna de solo acoplada com o cartucho Carbograph-1. A coluna de solo foi desconectada e o cartucho Carbograph-

1 foi lavado com 7 mL de água. A fim de remover quantidades traços de água, adicionou-se 1 mL de metanol lentamente e secou-se por 1 minuto, e finalmente adicionou-se 8 mL de solução de diclorometano/metanol (80:20, v/v). O extrato final foi evaporado até a secura sob atmosfera de nitrogênio, redissolvido em água/acetonitrila (80:20, v/v) acidificado com 15 mmol L^{-1} de ácido fórmico, seguido de análise por LC-MS/MS, utilizando eluição por gradiente com fase móvel acetonitrila e água ambos acidificados com HCOOH 15 mmol L^{-1}. Para confirmação, os íons precursores e íons produtos foram monitorados através do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Foi realizada uma comparação entre métodos de extração, através da utilização de ultrasonicação clássica (USE) e extração com solventes assistida por microondas (MASE) em amostras de solo. As recuperações e precisões da SCE deram melhores resultados, em comparação com USE e MASE. Usando SCE, as recuperações médias dos herbicidas variaram entre 63 e 99%. O desvio padrão variou entre 3 e 8%. Baixos limites de detecção entre 0,13 ng g^{-1} e 1,36 ng g^{-1} foram obtidos.

MARCHESE *et al*. (2001) desenvolveram um método utilizando extração com líquido pressurizado (PLE) para determinação dos herbicidas imidazolinonas (imazapir, imazaquim, imazametabenzeno e imazametabenzometilico) em solo. A extração dos analitos da matriz do solo foi executada com um instrumento de extração com líquido pressurizado construído no laboratório. Quatro tipos diferentes de amostras de solo (argila, barro da argila, barro da argila arenosa e barro sedimentoso) foram fortificados com os compostos de interesse nos níveis de 10 e 50 ng g^{-1}. Para o procedimento de extração, misturou-se 3 g de solo com 2 g de areia, e a mistura foi colocada dentro de uma coluna de aço inoxidável de 25 cm x 4,6 mm d.i. A coluna contendo o solo foi colocada em um forno de GC e aquecida a 90 ºC por 5 min. Para a extração dos analitos foi utilizado 20 mL de solução aquosa de KCl 0,1 mol L^{-1}. O extrato obtido foi injetado diretamente em coluna de HPLC. A quantificação dos analitos foi realizada por LC-MS, utilizando eluição por gradiente com fase móvel acetonitrila e água ambos acidificados com HCOOH 100 mmol L^{-1}. As recuperações dos analitos foram maiores que 83% com RSD menores que 7%. O limite de detecção do método foi de 1,0 a 2,5 ng g^{-1} em solos.

GONÇALVES (2007) desenvolveu e validou um método para a determinação de resíduos de herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir, em água e solo do cultivo de arroz irrigado. Para extração dos herbicidas em amostras de solo foram

pesados 5 g de amostra em um tubo de extração, e em seguida adicionados 10 mL de acetonitrila. Aplicou-se banho de ultra-som por 30 min e centrifugou-se a 3600 rpm por 10 min. Após, o sobrenadante foi transferido quantitativamente para um tubo de vidro graduado, o volume foi completado até 10 mL com acetonitrila, e este volume foi evaporado sob corrente de N_2. A amostra foi redissolvida com 500 µL de fase móvel. Foram determinados por HPLC-DAD, utilizando-se fase móvel acetonitrila:água e fase estacionária C_{18}, para as amostras de solo foi feita a confirmação por LC-MS/MS, utilizando a ESI no modo positivo. Para o detector por MS, os valores de limite de quantificação foram de 25,0 ng kg^{-1}. As recuperações para as amostras de solo ficaram na faixa de 89,3 e 105,7%, com RSDs menores que 8,7%. Portanto a MS foi uma ferramenta analítica fundamental neste trabalho para confirmar as análises, já que este tipo de amostra gera um grande efeito de matriz.

RAMEZANI *et al*. (2009) desenvolveram um método de extração e *clean-up* para a determinação de imazapir, imazetapir e imazaquim em amostras de solo. Foram investigados vários solventes de extração e adsorventes para a extração em fase sólida (SPE) desses compostos. A extração de imazapir, imazetapir e imazaquim foi investigada através de procedimentos de extração com solventes, seguido de purificação através de SPE. A determinação e quantificação foram realizadas utilizando HPLC-UV, com detecção em 240 nm. O método de extração de herbicidas imidazolinonas em solos consistiu em pesar 10 g de solo, o qual foi fortificado na concentração de 1,0 µg g^{-1}, seguido de homogeneização através de agitação no vortex por 1 min, sendo mantidos a 4 ºC por uma semana, antes da extração. Após, foram adicionados 40 mL de NaOH 0,5 mol L^{-1}, seguido de agitação por 1 h. Em seguida, foi realizada centrifugação a 5860 rpm por 10 min, acidificação com HCl a pH 2,0 da solução do solo, e *clean-up* com cartuchos de SPE, seguido de análise por HPLC-UV. Na etapa de *clean-up* foram testados os seguintes cartuchos de extração em fase sólida: PPL; NH_2 + PPL; C_{18} + SCX. A avaliação de diferentes soluções aquosas (KCl 0,1 mol L^{-1}, NaOH 0,01 mol L^{-1}, NaOH 0,5 mol L^{-1} e NaOH:MeOH 0,5 mol L^{-1} (80:20, v/v)) para extração, mostrou que a recuperação de todos os três herbicidas foi superior a 70%. No entanto, os maiores valores de recuperação dos herbicidas foram obtidos com NaOH 0,5 mol L^{-1} como solução de extração. A maior dificuldade encontrada usando NaOH 0,5 mol L^{-1}, foi a co-extração de ácidos húmicos e fúlvicos do solo, que gerou um pico mal resolvido no início do

cromatograma. A avaliação de diferentes cartuchos de extração em fase sólida mostrou que o cartucho C_{18} + SCX permitiu a remoção de substâncias co-extraidas, resultando em altos níveis de recuperação (maior que 85,4%) dos herbicidas, com RSD menores que 8,2%. Os limites de detecção de imazapir, imazetapir e imazaquim foram 0,5 µg mL^{-1}.

Dessa forma, pode-se perceber através da revisão de trabalhos da literatura feita acima, que os métodos clássicos de extração de herbicidas imidazolinonas em solos são demorados, envolvendo várias etapas, o que faz aumentar a probabilidade de erros e consumir a maior parte do tempo da análise. Por isso, o desenvolvimento de métodos de extração de herbicidas imidazolinonas mais rápidos e eficazes, visando baixo custo e menor contaminação ambiental é, portanto, uma exigência necessária.

2.4 Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de pesticidas

As concentrações de pesticidas no meio ambiente são extremamente baixas, assim como os níveis máximos permitidos pelas agências regulamentadoras, o que demanda métodos analíticos de sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de pesticidas.

As análises de resíduos de pesticidas em amostras ambientais e biológicas, desde meados de 1950, basearam-se, primeiramente, na determinação por meio da Cromatografia Gasosa (GC) e a partir do início dos anos 70, 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. Devido ao grande poder de separação para análise de matrizes complexas, a LC-MS é considerada sensível e seletiva e permite identificação segura em baixas concentrações para diferentes analitos (SILVA *et al*., 2010).

No entanto, os fatores mais importantes na escolha da técnica para análise de resíduos de pesticidas são o comportamento do analito no sistema cromatográfico, a necessidade de derivatização do analito e o trabalho necessário para isso, a

disponibilidade da técnica no laboratório e o propósito geral da análise (LISKA & SLOBODNÍK, 1996).

2.4.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) é, sem dúvida, uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para a determinação de compostos orgânicos. Os compostos presentes em matrizes complexas, como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos podem ser determinados livres de interferentes e com limites de detecção muito baixos, atendendo às exigências da legislação vigente sem, muitas vezes, necessitar de procedimentos de concentração (ARDREY, 2003).

Além disso, a LC-MS/MS permite um aumento de seletividade e sensibilidade proporcionando o monitoramento de centenas de pesticidas em uma única análise. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, eles apresentam uma série de vantagens, entre elas alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez (PRESTES *et al.,* 2009). Outras vantagens dessa técnica são o fornecimento da massa molar, informação estrutural e análise quantitativa exata do analito (SKOOG *et al.,* 2008).

A Figura 14 apresenta os componentes básicos de um sistema LC-MS/MS.

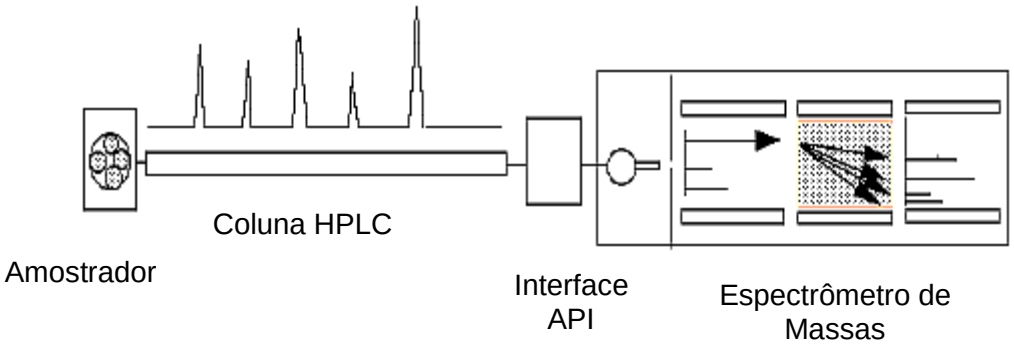


Figura 14 - Componentes básicos de um sistema LC-MS/MS (Adaptado de KERNS *et al*., 1997)

O acoplamento da Cromatografia Líquida com a Espectrometria de Massas foi um processo demorado, devido à incompatibilidade entre as vazões relativamente altas empregadas em HPLC que impossibilitava a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para o interior da fonte do espectrômetro, que opera em condições de alto vácuo (HARRIS, 2001; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Mas depois que as deficiências com as interfaces foram parcialmente superadas, a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) vem sendo cada vez mais utilizada (ALDER *et al.*, 2006).

A interface é um dispositivo colocado entre o LC e o MS com o objetivo de remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons. A principal interface utilizada na análise de pesticidas polares é baseada na Ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) e engloba a Ionização por Eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

A Ionização por Eletronebulização (ESI) é uma técnica apropriada para a determinação da massa molar e da estrutura. É preferencialmente aplicada para a análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo.

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da HPLC) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas ("*spray*") que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2) na região do "*spray*". À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre a chamada "explosão coulômbica" que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos os íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA *et al*., 2008).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução

(ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.,* 2008). O emprego de LC-MS utilizando ESI como fonte de ionização é ideal para análise de moléculas mais polares, de maior massa molecular. Ainda, LC-ESI-MS é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos, e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009).

A Espectrometria de Massas Sequencial mostra uma sensibilidade e uma seletividade superior em níveis de traços em matrizes complexas. Embora não seja uma técnica nova, sua aplicação em análises de rotina é limitada devido ao alto custo do instrumento e a necessidade de analistas treinados. Esta técnica promove uma eliminação de interferências de *background*, aumentando assim, a razão sinal/ruído e também a sensibilidade, simultaneamente a confirmação dos pesticidas é obtida com elevado grau de certeza, devido ao espectro de massas muito característico do íon produto. Este espectro é específico para cada composto e não possui influência dos íons interferentes da matriz, pois são excluídos durante a seleção do íon (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Os modos de operação são as maneiras como o espectrômetro de massas pode ser programado para a aquisição de dados. No modo *scan* o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z (VÉKEY, 2001). No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente (MS/MS). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). Através deste modo, é possível analisar multianalitos dentro de uma mesma análise, uma vez que, permite a identificação e separação de cada transição monitorada (DEMOLINER, 2008). O MRM aumenta a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhora a sensibilidade, diminuindo a resposta dos interferentes a tudo o que interfira na medida, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2001).

O LC-MS pode ser equipado com diversos analisadores, cada um com propriedades características para identificar, quantificar e resolver ambigüidades pela seleção de parâmetros adequados de ionização e aquisição (ROSEN, 2007). Existem diferentes sistemas empregados para separação de íons gerados durante o processo de ionização. Entre eles, destaca-se o sistema triplo quadrupolo (QqQ).

O espectrômetro de massas do tipo QqQ é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. No primeiro, o íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons. No segundo quadrupolo, este íon sofre nova fragmentação por colisão por íons de N_2 ou argônio. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos íons formados para enviar ao detector (HARRIS, 2001). As principais vantagens de empregar um QqQ para análise de pesticidas estão na alta sensibilidade e seletividade.

Não há dúvidas que instrumentos QqQ operando no modo MRM, proporcionarão melhor sensibilidade para os analitos. Devido a essas razões, e a simplicidade relativa das análises realizadas no modo MRM, essa tecnologia tem se tornado o método mais comum na determinação de resíduos de contaminantes em análises ambientais e de alimentos por LC-MS/MS. Análises por MRM introduzem alta especificidade, pois se baseiam na detecção do íon precursor e de um fragmento conhecido (ROSEN, 2007).

KUSTER *et al*. (2006) mostraram que aproximadamente 70% dos métodos revisados na literatura estão baseados nesta configuração. LC-MS/MS aliado a um analisador com triplo quadrupolo que opera no modo MRM por meio de interfaces de API.

2.5 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 e KEBARLE em 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 10^{-5} mol L^{-1} (TANG & KEBARLE, 1993).

Em LC-MS/MS, o efeito matriz é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo t_R que o analito e por 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 é chamado de "*ion suppression*", ou aumentar (pela presença dos íons da matriz), resultando num efeito matriz negativo ou positivo, respectivamente (PIZZUTTI, 2006).

O mecanismo exato da supressão iônica é desconhecido, porém é causado pela presença de substâncias não-voláteis ou pela competição entre um analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado. O efeito matriz também é dependente da natureza química do analito, pois a eficiência de ionização dos compostos polares é mais influenciada pela presença de coeluatos provenientes da matriz quando comparada com compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009).

Na literatura são encontradas diferentes formas para quantificar o ME sobre um determinado composto e diversas abordagens foram desenvolvidas para eliminar ou reduzir os efeitos matriz em LC-MS. Modificações na etapa de extração e emprego de uma separação cromatográfica adequada são alternativas para minimizar esse efeito (STÜBER & REEMTSMA, 2004; KRUVE *et al.,* 2008).

O efeito matriz nos resultados pode ser significativo e deve ser determinado cuidadosamente. A exata avaliação do efeito matriz pode evitar estimativas errôneas dos teores dos analitos, além de ser uma técnica mais confiável. Para redução do efeito matriz é recomendável o uso de curva de calibração preparada em extratos da matriz isenta de pesticidas (RIBANI *et al*., 2004), ou ainda submeter os extratos a novos processos de *clean-up*.

2.6 Validação de métodos cromatográficos de análise

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis com relação a uma amostra, este deve ser submetido a uma avaliação analítica denominada validação (RIBANI *et al*., 2004).

A validação de um método é uma exigência na prática das análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; ANVISA, 2003).

Os parâmetros geralmente investigados no processo de validação são: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al*., 2004; SANCO, 2007).

2.6.1 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).

Assim, é necessário o uso de um número suficiente de soluções analíticas para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. As diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonisation*) e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de

concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5% (BRITO *et al.,* 2003; RIBANI *et al.,* 2004).

A curva de calibração pode ser construída preparando-se as soluções analíticas dos pesticidas, em solvente ou no extrato da matriz. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a concentração do analito, sem considerar a interferência da matriz.

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, 2007).

$$y = ax + b \qquad (1)$$

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 refere-se à capacidade de uma metodologia analítica em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al*., 2004). Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de determinação (r^2) do gráfico analítico.

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, denominado r. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo o coeficiente de correlação de 1,0, 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 ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.,* 2004).

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). Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra (RIBANI *et al.,* 2004).

2.6.2 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva analítica, sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2007). No caso de uma reta, quanto maior for o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004).

2.6.3 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).

2.6.4 Exatidão (Recuperação)

A exatidão representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como valor verdadeiro (INMETRO, 2007). É normalmente expressa em termos de percentagem (EURACHEM, 1998).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al*., 2004).

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). Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Entretanto para compostos orgânicos, estes materiais certificados são pouco estáveis e a oferta é muito limitada. Nestes casos, a exatidão é avaliada, geralmente, por ensaios de recuperação.

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 “branco” são fortificadas pela adição dos analitos em diferentes concentrações, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. É

importante considerar como a eficiência do método varia em função das concentrações da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto é realizado através da adição de uma substância em pelo menos três diferentes concentrações, ou seja, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2007).

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (SANCO, 2007). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 15% (RIBANI *et al*., 2004).

2.6.5 Precisão

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 a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (INMETRO, 2007).

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

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al*., 2004).

2.6.5.1 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.

Para repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, enquanto que a ANVISA recomenda que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite do procedimento, ou seja, três diferentes concentrações e três replicatas cada um, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (RIBANI *et al*., 2004).

2.6.5.2 Precisão intermediária

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 (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, e diferentes dias de análise (INMETRO, 2007).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al*., 2004).

2.6.5.3 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). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2007).

2.6.6 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. 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 em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.,* 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação do Método QuEChERS modificado para a extração de resíduos de pesticidas em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado e quantificação por LC-MS/MS.

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

3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AND, modelo SV-200 (Japão);
- ✓ Banho de Ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Mörfelden-Walldorf, Alemanha);
- ✓ Centrífuga Thermo Fisher Scientific, modelo IEC CENTRA CL2 (Waltham, MA, EUA);
- ✓ Centrífuga 12 x 15 mL (Centribio, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ✓ pHmetro modelo pH 500 Series Cole Palmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills IIIinois, EUA);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

- ✓ Sistema LC-MS/MS Varian 320-MS (Figura 15), equipado com:

Figura 15 - Sistema LC-MS/MS

- ✓ Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação (Varian, EUA);
- ✓ Coluna analítica Pursuit XRs C_{18} (50 x 2,0 mm d.i.) e 5,0 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA);
- ✓ Detector MS, 320-MS TQ *Mass Spectrometer* com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletronebulização (Varian, EUA);
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *Software* MS *Workstation Version* 6.0 (Varian, EUA);
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio da marca Domnick Hunter LC/MS 12/2.

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Ácido fórmico 96% (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Ácido clorídrico p.a. (Isofar, Brasil);
- ✓ Água destilada e água deionizada;
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Alumina ácida, básica e neutra (granulometria 0,063-0,200 mm) (Merck, Brasil);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);

- ✓ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- ✓ Ar sintético 99,9% de pureza (White Martins, Brasil);
- ✓ Hidróxido de cálcio (Spectrum, Brasil);
- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (CAQ, Brasil);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- ✓ Carvão vegetal ativado p.a. (Labsynth, Brasil);
- ✓ C_{18} com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, EUA);
- ✓ Florisil 60-100 mesh (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ PSA com tamanho de partículas de 40 µm - Bondesil (Varian, EUA);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Vidraria comum de laboratório;
- ✓ Padrões sólidos dos pesticidas, conforme Tabela 4.

3.3 Padrões analíticos dos pesticidas estudados

A Tabela 4 apresenta o grau de pureza (%) e a classe dos padrões analíticos sólidos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 4 - Informações dos padrões analíticos sólidos fornecidos pela firma Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)

Pesticida	Grau de pureza (%)	Classe
Clomazona	94,5	Herbicida
Fipronil	96,5	Inseticida
Imazapique	98,5	Herbicida
Imazetapir	99,0	Herbicida
Propiconazol	96,7	Fungicida
Tiametoxam	98,0	Inseticida
Trifloxistrobina	99,0	Fungicida

Preparou-se individualmente, 10 mL da solução analítica estoque 1000 mg L^{-1} de cada pesticida considerando a pureza dos padrões sólidos, conforme recomendado na literatura (GARP, 1999). A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila grau HPLC e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 ºC.

Após, foram preparadas soluções analíticas individuais de cada pesticida em estudo, na concentração de 100 mg L^{-1}, em acetonitrila. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 10 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas, exceto para propiconazol, cuja concentração avaliada foi cinco vezes menor, correspondendo a 2,0 mg L^{-1} na mistura dos pesticidas a serem estudados. A partir da solução padrão 10 mg L^{-1}, preparou-se uma mistura na concentração 1,0 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas, exceto para propiconazol, cuja concentração foi 0,2 mg L^{-1} na mistura dos pesticidas a serem estudados. Devido à maior intensidade do sinal cromatográfico apresentado para o pesticida propiconazol no sistema LC-MS/MS, optou-se por utilizá-lo em concentração cinco vezes menor em relação aos outros compostos, na construção das curvas analíticas e nas fortificações do solo, com objetivo de gerar um cromatograma com respostas similares.

A partir da mistura intermediária 1,0 mg L^{-1}, foram preparadas as soluções analíticas de trabalho nas concentrações de 0,4; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg L^{-1} para propiconazol e nas concentrações de 2,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina, em acetonitrila e no extrato da matriz. Para injeção no sistema LC-MS/MS, foram realizadas diluições na proporção 1:1 (v/v) destas soluções em fase móvel (água ultrapura acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico), de modo que as concentrações finais das soluções de trabalho avaliadas foram 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 µg L^{-1} para propiconazol e 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg L^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina. As diluições das soluções analíticas em fase móvel acidificada têm como objetivo melhorar a eficiência de ionização dos compostos e assim, melhorar a assimetria dos picos cromatográficos. Estas soluções de trabalho foram utilizadas para o estudo da linearidade do método. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a -18 ºC.

3.4 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos compostos

Neste trabalho, a otimização do método QuEChERS modificado foi realizada empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD). No entanto, devido à presença de interferentes provenientes da matriz do solo que resultaram em valores de recuperação acima de 120% para alguns dos pesticidas estudados e também devido aos baixos limites de detecção requeridos para análise de herbicidas imidazolinonas em solo, optou-se por utilizar a técnica Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), para a etapa de validação, pois esta apresenta maior sensibilidade e seletividade em relação aos detectores convencionais.

Além disso, LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e o problema de co-eluição de substâncias encontradas, que ocorrem no HPLC-DAD em amostras de solo, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para análise e confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços.

A seguir, segue a otimização dos principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos pesticidas em estudo.

3.4.1 Escolha da composição da fase móvel e da vazão

A escolha da fase móvel foi realizada através de informações obtidas por meio de revisão bibliográfica sobre o assunto. Neste trabalho, a fase móvel empregada foi água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambas acidificadas com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico.

Para otimizar o tempo de análise e garantir a separação adequada dos pesticidas em estudo foi necessário empregar um gradiente de eluição. Conforme Tabela 5, foram feitos testes para a seleção do gradiente de eluição da fase móvel, visando uma eficiente eluição dos compostos em estudo, em um menor tempo possível de corrida cromatográfica.

Tabela 5 - Gradientes testados para eluição dos compostos

	Tempo (min)	% A	% B
Gradiente 1	0,00	60	40
	10,00	40	60
	15,00	20	80
	15,05	60	40
	20,00	60	40
Gradiente 2	0,00	70	30
	5,00	40	60
	15,00	20	80
	15,05	70	30
	20,00	70	30
Gradiente 3	0,00	60	40
	5,00	40	60
	12,00	20	80
	12,05	60	40
	15,00	60	40

% A: Água ultrapura acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico

% B: Acetonitrila acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico

Além dos gradientes de eluição, foram testados os seguintes volumes de injeção: 5,0; 10 e 20 µL.

A vazão da fase móvel foi selecionada de acordo com a separação e sensibilidade dos compostos, sendo testadas vazões de 0,2; 0,3 e 0,4 mL min^{-1}.

3.4.2 Acidificação da fase móvel

No sistema LC-MS/MS, é indicado o uso de ácidos orgânicos, mais voláteis, para evitar que ocorra cristalização na interface do sistema. Além disso, a fase móvel acidificada influencia na fragmentação dos compostos a serem determinados melhorando a eficiência da ionização (KUSTER *et al*., 2006).

Em Cromatografia Líquida em Fase Reversa, a fase estacionária mais utilizada é do tipo C_{18}, e devido às características polares da maioria dos pesticidas analisados por esta técnica, faz-se necessário o ajuste do pH do eluente para ocorrer uma melhor interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Quando o analito com características ácidas se ioniza, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Assim, para garantir uma maior interação destes compostos com a fase estacionária é necessária a acidificação da fase móvel. Neste trabalho, tanto a fase aquosa quanto a fase orgânica foram acidificadas com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico.

3.5 Condições de Análise por LC-MS/MS

3.5.1 Condições do sistema de detecção

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram feitas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica 1,0 mg L^{-1} de cada pesticida individualmente. A partir das infusões foi escolhido o modo de ionização da fonte (eletronebulização positivo e/ou eletronebulização negativo), voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação e pressão do gás de secagem.

Após a escolha destas condições foram selecionados os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos compostos estudados.

3.6 Otimização do método QuEChERS modificado para extração dos pesticidas em amostras de solo

Devido à complexidade da matriz solo e aos baixos níveis de concentração em que os pesticidas são encontrados, o preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis.

Neste trabalho foram realizadas modificações no método QuEChERS original proposto por ANASTASSIADES *et al*. (2003). Para isto, foram realizados vários

testes para obter melhor extração dos compostos em estudo, das amostras de solo proveniente de lavoura de arroz irrigado.

3.6.1 Otimização do método de extração

O método de extração foi inicialmente otimizado para a extração dos pesticidas imazapique, imazetapir, clomazona e fipronil em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado, seguido de determinação por HPLC-DAD. Sendo assim, os ensaios 1 a 13, descritos na Tabela 6, foram otimizados para extração desses pesticidas da matriz do solo. Observou-se que, para a grande maioria desses ensaios realizados, os valores de recuperação para os herbicidas imazapique e imazetapir ficavam abaixo de 70%, enquanto que os pesticidas clomazona e fipronil apresentavam valores de recuperação satisfatórios. Dessa forma, pode-se constatar que o ponto crítico do método de extração otimizado foi com relação à extração dos herbicidas imidazolinonas (imazapique e imazetapir) do solo, devido suas propriedades físico-químicas peculiares (caráter anfótero e baixos valores de pK_a). Sendo assim, os ensaios 14 a 18, descritos na Tabela 6, foram otimizados somente para a extração dos pesticidas imazapique e imazetapir da matriz do solo.

Também é necessário ressaltar, que os níveis de concentração das fortificações utilizadas (2,0 ou 5,0 mg kg^{-1}) para otimização do método de extração, foram relativamente altos, devido a utilização do sistema cromatográfico HPLC-DAD.

A Tabela 6 apresenta os ensaios realizados para a otimização da etapa de extração.

Tabela 6 - Ensaios realizados para a otimização da etapa de extração

Ensaio*	Nível de fortificação	Extração	*Clean-up*
1	2,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL ACN → agitação manual 1 min → 2,0 g $MgSO_4$ + 0,5 g NaCl + 0,5 g citrato de sódio → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 475 mg $MgSO_4$ + 75 mg PSA → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
2	2,0 mg kg^{-1}	2,5 g solo + 5 mL ACN 1% (v/v) ácido acético → agitação manual 1 min → 1,5 g $MgSO_4$ + 0,8 g acetato de sódio → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 300 mg $MgSO_4$ + 250 mg PSA → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
3	2,0 mg kg^{-1}	2,5 g solo + 5 mL ACN 1% (v/v) ácido acético → agitação manual 1 min → 1,5 g $MgSO_4$ + 0,8 g acetato de sódio → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 300 mg $MgSO_4$ + 200 mg C_{18} + 50 mg PSA → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
4	2,0 mg kg^{-1}	2,5 g solo + 5 mL ACN 1% (v/v) ácido acético → agitação manual 1 min → 1,5 g $MgSO_4$ + 0,8 g acetato de sódio → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 300 mg $MgSO_4$ + 250 mg C_{18} → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
5	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 5 mL água ultrapura pH 9,0 → agitação manual 1 min → 10 mL ACN → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → transferência sobrenadante para tubo de 50 mL + 3,0 g $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → adição de 3 gotas HCl (1:5, v/v) → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção

Tabela 6 - Continuação

Ensaio*	Nível de fortificação	Extração	*Clean-up*
6	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL água ultrapura pH 9,0 → agitação manual 1 min → 10 mL ACN → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → transferência sobrenadante para tubo de 50 mL + 3,0 g $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → adição de 8 gotas HCl (1:5, v/v) → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 50 mg PSA → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
7	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL água ultrapura pH 9,0 → agitação manual 1 min → 10 mL ACN → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → transferência sobrenadante para tubo de 50 mL + 6,0 g $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → adição de 8 gotas HCl (1:5, v/v) → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
8	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL água ultrapura pH 12,0 → agitação manual 1 min → 10 mL ACN → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → transferência sobrenadante para outro tubo de 50 mL + 4,0 g $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → adição de 10 gotas HCl (1:5, v/v) → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
9	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL água ultrapura pH 12,0 → agitação manual 1 min → 10 mL ACN → agitação manual 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → adição de 9 gotas HCl (1:5, v/v) → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção

Tabela 6 - Continuação

Ensaio*	Nível de fortificação	Extração	*Clean-up*
10	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação 10 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
11	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → banho ultra-som 10 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
12	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação vortex 1 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 2,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
13	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação vortex 1 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
14	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + tempo fortificação (24 h) → 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação vortex 1 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 184 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 30 s → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção

Tabela 6 - Continuação

Ensaio*	Nível de fortificação	Extração	*Clean-up*
15	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + tempo fortificação (24 h) → 10 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação 1 h → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 184 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 30 s → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
16	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + tempo fortificação (24 h) → 20 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação vortex 1 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 30 s → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
17	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + tempo fortificação (24 h) → 20 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação 30 min → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 30 s → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção
18	5,0 mg kg^{-1}	5,0 g solo + tempo fortificação (24 h) → 20 mL solução saturada hidróxido de cálcio pH 12,0 → agitação 1 h → 10 mL ACN → agitação vortex 1 min → 4,0 g $MgSO_4$ + 3,0 g NaCl → agitação vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L^{-1} → agitação manual 30 s → centrifugação 3900 rpm por 10 min	2 mL extrato + 250 mg $MgSO_4$ → agitação vortex 1 min → centrifugação 3900 rpm por 10 min → injeção

* Os ensaios 1 a 13 foram otimizados para os pesticidas imazapique, imazetapir, clomazona e fipronil

* Os ensaios 14 a 18 foram otimizados somente para os pesticidas imazapique e imazetapir

3.6.2 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo

Os extratos orgânicos obtidos após etapa de extração de amostras de solo foram submetidos a uma etapa de *clean-up* para melhorar a qualidade dos mesmos com vista à análise cromatográfica.

O ensaio de extração 16, otimizado para os pesticidas imazapique e imazetapir, apresentou valores de recuperação satisfatórios para esses compostos. No entanto, devido a necessidade de analisar um maior número de compostos neste trabalho, este método de extração foi avaliado incluindo também os pesticidas tiametoxam, propiconazol, trifloxistrobina, clomazona e fipronil. Observou-se que os valores de recuperação para alguns desses pesticidas (tiametoxam e propiconazol), ficaram acima de 120%, possivelmente devido à presença de interferentes provenientes da matriz do solo. Sendo assim, constatou-se a necessidade de otimização da etapa de *clean-up* dispersivo, através da utilização de outros sorventes, tais como: amina primária secundária (PSA), alumina neutra, ácida e básica, florisil, carvão vegetal ativado e sulfato de magnésio.

A avaliação do *clean-up* foi realizada transferindo-se diretamente 2 mL do extrato líquido “branco”, obtido através do ensaio de extração 16, para um tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), seguido de fortificação na concentração de 2,0 mg kg^{-1} com os pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina. Após, realizou-se a adição dos sorventes que foram testados, sendo realizada uma agitação em vortex por 1 min, seguido de centrifugação a 3900 rpm por 10 min, com posterior análise por HPLC-DAD.

Os sorventes testados bem como suas respectivas quantidades estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Sorventes e quantidades utilizados para a otimização do *clean-up* dispersivo

Ensaio de *clean-up*	Sorvente	Quantidade
Ensaio 16.1	$MgSO_4$/Alumina neutra	250 mg/25 mg
Ensaio 16.2	$MgSO_4$/Alumina ácida	250 mg/25 mg
Ensaio 16.3	$MgSO_4$/Alumina básica	250 mg/25 mg
Ensaio 16.4	$MgSO_4$/ Florisil	250 mg/25 mg
Ensaio 16.5	$MgSO_4$/Carvão ativado	250 mg/50 mg
Ensaio 16.6	$MgSO_4$/Carvão ativado	250 mg/10 mg
Ensaio 16.7	$MgSO_4$/Carvão ativado	250 mg/5 mg
Ensaio 16.8	$MgSO_4$/Carvão ativado	250 mg/2 mg
Ensaio 16.9	$MgSO_4$/PSA	250 mg/40 mg
Ensaio 16.10	$MgSO_4$/PSA	250 mg/25 mg
Ensaio 16.11	$MgSO_4$/PSA	250 mg/10 mg
Ensaio 16.12	$MgSO_4$/PSA	250 mg/5 mg
Ensaio 16.13	$MgSO_4$	250 mg
Ensaio 16.14	$MgSO_4$	500 mg

Deste modo, foi possível avaliar o sorvente mais eficiente e se não estão ocorrendo perdas dos analitos de interesse.

3.6.3 Escolha das amostras para a etapa de validação

As amostras utilizadas para etapa de validação foram solos de várzea, obtidas de um experimento conduzido no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram coletados solos que não foram submetidos a nenhum tratamento com pesticidas.

O solo utilizado nos estudos é classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico Arênico, pertencente à unidade de mapeamento Vacacaí (EMBRAPA, 1999). Apresenta relevo plano a suavemente ondulado, substrato de sedimentos

aluviais recentes. Em geral, essa unidade de mapeamento apresenta textura média (15 a 25% de argila), com baixos a médios teores de matéria orgânica, pobres em nutrientes e mal drenados, bastante influenciados pela presença de água, condicionada pelo relevo (MARCHEZAN *et al.*, 2006).

As propriedades físico-químicas deste solo são: $pH_{água}$ (1:1) = 4,8; P = 6,0 mg L^{-1}; K = 120 mg L^{-1}; argila = 26%; M.O. = 2,3%; Ca = 5,0 $cmol_c$ L^{-1}; Mg = 2,0 $cmol_c$ L^{-1}; Al = 1,7 $cmol_c$ L^{-1} e índice SMP 5,1 (KRAEMER, 2008).

As amostras de solo foram coletadas, secas em temperatura ambiente e passadas em peneira de malha de 2 mm. Após, foram acondicionadas em frascos de plástico e armazenadas a temperatura ambiente até a etapa de extração para o processo de validação.

Estas amostras, denominadas “amostras branco” não devem apresentar nenhum resíduo de qualquer pesticida em estudo, para assim serem utilizadas para as fortificações, na qual avalia-se a recuperação (exatidão) e precisão do método de extração.

Sendo assim, para etapa de validação, preliminarmente, as amostras foram submetidas ao processo de extração e *clean-up* e os extratos foram injetados no sistema LC-MS/MS para obter-se a confirmação da ausência dos pesticidas em estudo.

3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de pesticidas em solo empregando LC-MS/MS

Após serem definidas as melhores condições de separação cromatográfica para o método de extração, a etapa seguinte foi a validação do método analítico.

Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho, e algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.

3.7.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foram avaliadas a partir das soluções analíticas contendo todos os pesticidas em estudo, preparadas conforme descrito no item 3.3, no solvente acetonitrila e no extrato do solo, nas concentrações de 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 µg L^{-1} para propiconazol e nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg L^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina.

As curvas analíticas no solvente foram injetadas uma vez e as curvas no extrato da matriz (solo) foram injetadas três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* (*Workstation Version* 6.0) do equipamento. A partir desses dados foi avaliado o coeficiente de determinação (r^2), obtendo assim a linearidade das curvas analíticas.

3.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O LOD do instrumento (LOD_i) e o LOQ do instrumento (LOQ_i) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas em acetonitrila, seguida de diluição 1:1 (v/v) destas soluções em fase móvel (água ultrapura acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico).

Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram expressos em µg L^{-1}. Já os limites de detecção e quantificação do método, LOD_m e LOQ_m respectivamente, foram obtidos multiplicando-se o valor de LOD_i e LOQ_i pelo fator obtido pelo método de extração (fator = 2), obtendo-se os valores de LOD_m e LOQ_m em µg kg^{-1}.

3.7.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão do método

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas seis fortificações das amostras “branco” em três níveis diferentes de concentração, totalizando 18 análises. A recuperação dos compostos foi avaliada nas concentrações de 2; 10 e 20 µg kg^{-1} para propiconazol e nas concentrações de 10; 50 e 100 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina.

A exatidão, expressa em percentagem de recuperação, foi calculada conforme a Equação 2 (INMETRO, 2007):

$$\mathrm{R}\ (\%) = \frac{\mathrm{C}_1 - C_2}{\mathrm{C}_3} \times 100 \qquad (2)$$

onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado 6 vezes, para cada um dos níveis de fortificação e para isso, utilizaram-se amostras “branco”, isto é, livre da presença dos pesticidas em estudo, sendo que cada nível de fortificação foi injetado uma vez, obtendo-se um n= 6 (6 extrações x 1 injeção).

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, pesou-se 5,0 ± 0,1 g de solo homogêneo diretamente em tubos de polipropileno, com tampa rosqueada (capacidade 50 mL). Logo após, efetuou-se a fortificação em 3 níveis, utilizando-se micropipetadores automáticos, nas concentrações de 4; 20 e 40 µg kg^{-1} para propiconazol e nas concentrações de 20; 100 e 200 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina. Os volumes das soluções analíticas, contendo todos os pesticidas analisados por LC-MS/MS, adicionadas a cada nível de fortificação, estão demonstrados no Apêndice A. Para injeção no sistema LC-MS/MS, foram realizadas diluições dos extratos finais na proporção 1:1 (v/v) em fase móvel (água ultrapura

acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico), de modo que os níveis de concentrações finais esperados foram 2, 10 e 20 µg kg^{-1} para propiconazol e 10; 50 e 100 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina.

Após fortificação, os solos foram homogeneizados através de agitação em vortex por 1 min e mantidos à 4 ºC por 24 h antes da extração. Segundo PINTO *et al*. (2010), faz-se necessário certo tempo de contato entre a amostra e os analitos para que ocorra a evaporação do solvente e a maior interação entre os compostos e a matriz.

Adicionou-se, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0, em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação em vortex por 1 min. Em seguida, adicionou-se 10 mL de acetonitrila em cada tubo, e após fechá-los, agitou-se em vortex por 1 min.

Logo após, acrescentou-se 4,0 e 3,0 g, respectivamente, de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Repetiram-se as agitações em vortex por 1 min, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos. Após, procedeu-se o ajuste do pH em 3,0, através da adição de 390 µL de solução aquosa de ácido clorídrico 6 mol L^{-1}, seguido de agitação manual por 30 s e posterior etapa de centrifugação a 3900 rpm, durante 10 min.

Posteriormente, para a etapa de *clean-up* dispersivo, transferiu-se diretamente 2 mL de extrato líquido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), já contendo 250 mg de sulfato de magnésio anidro, sendo novamente agitados em vortex por 1 min, e também centrifugados como citado anteriormente.

Após, em *vial* com capacidade para 2 mL, realizou-se uma diluição na proporção 1:1 (v/v) do extrato final em fase móvel, no qual foram adicionados 0,5 mL do extrato obtido após o *clean-up* dispersivo e 0,5 mL de fase móvel, seguido de análise por LC-MS/MS.

As Figuras 16 e 17 destacam as etapas efetuadas durante o procedimento de extração e *clean-up*.

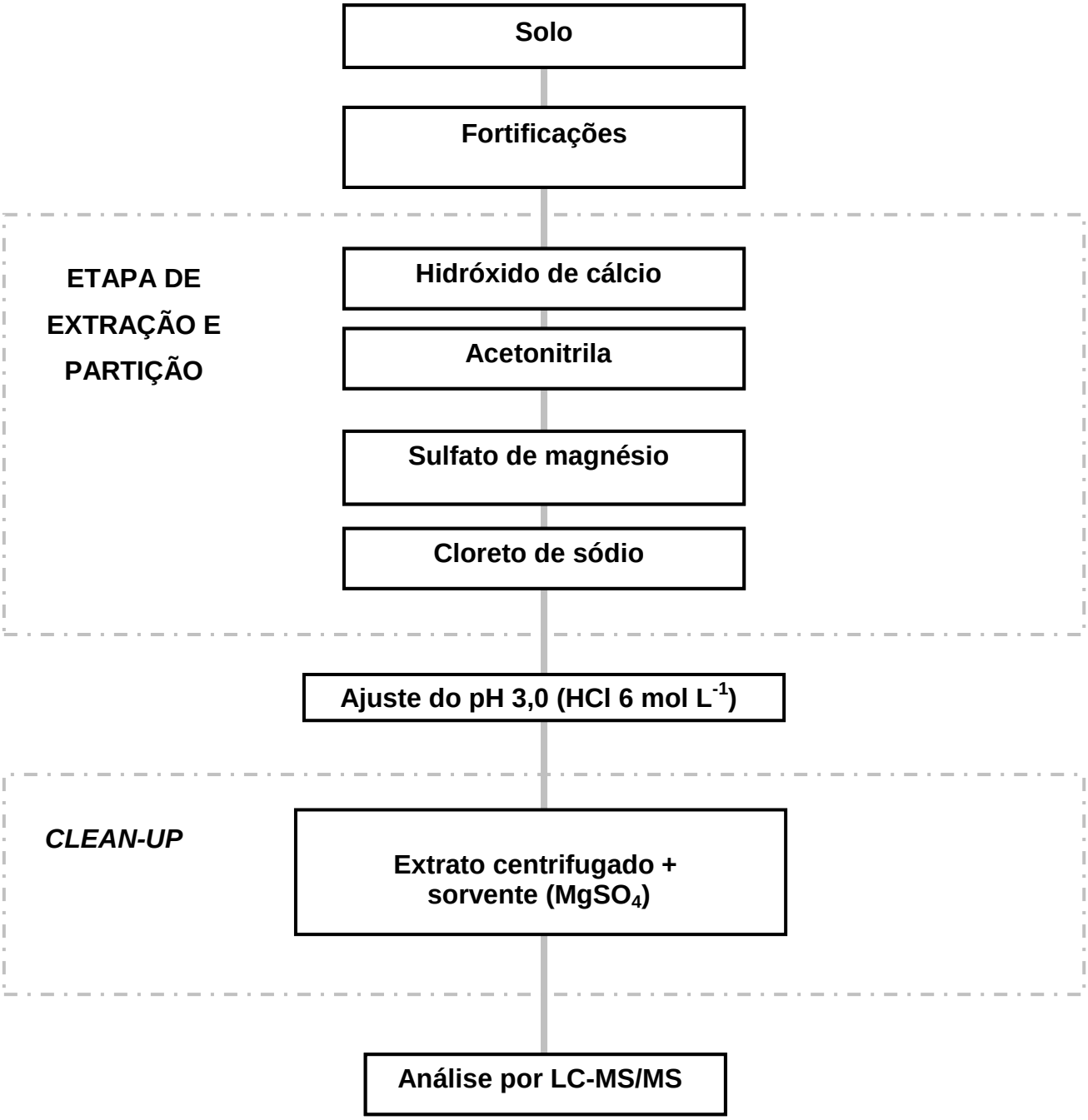
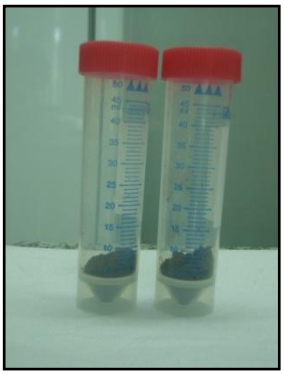
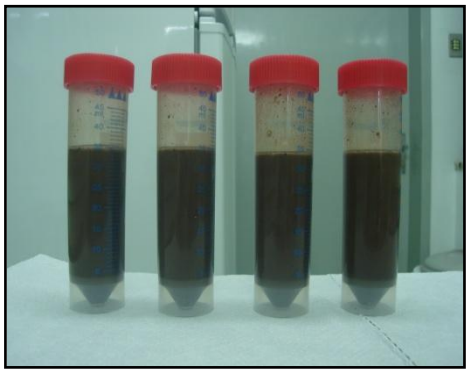


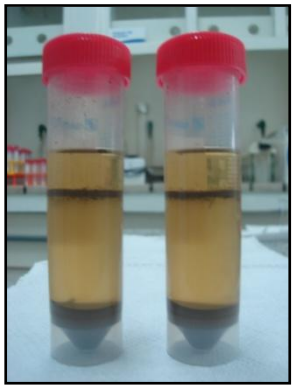
Figura 16 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de pesticidas em solo



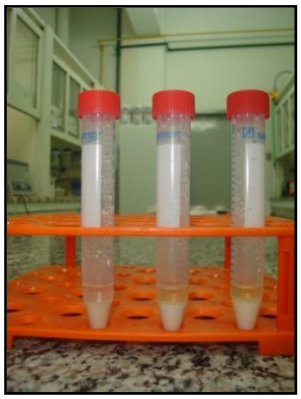
a)



b)

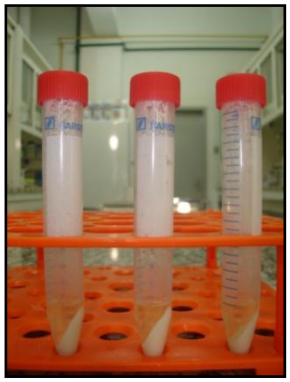


c)



d)

e)



f)

Figura 17 - Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e *clean-up* do método QuEChERS modificado: a) tubos para extração com amostra de solo, b) frascos contendo a amostra, os solventes e os sais para a etapa de partição, c) extrato após centrifugação, d) frascos para etapa de *clean-up* antes da centrifugação, e) centrífuga e f) extrato do *clean-up* após a centrifugação

3.7.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão pode ser avaliada através de um valor numérico (RSD) que é calculado através da Equação 3 (RIBANI *et al.*, 2004; GARP, 1999).

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

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se três injeções de cada concentração das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz, no sistema LC-MS/MS.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r), foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído seis vezes e cada extrato injetado uma vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada utilizando-se dias diferentes daqueles do estudo da repetitividade.

3.8 Avaliação do Efeito Matriz na resposta cromatográfica

Quando a espectrometria de massas for empregada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz, uma vez que a matriz pode causar uma supressão da eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método (ROGATSKI & STEIN, 2005).

Para desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração mesmo para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma larga faixa de concentração do

analito na matriz. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro (acetonitrila) e a outra em extratos da matriz (solo).

Para a avaliação da existência de efeito matriz nos extratos do solo nas análises por LC-MS/MS, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato de solo “branco”. O cálculo foi efetuado através da Equação 4:

$$Efeito\ Matriz\,(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \qquad (4)$$

onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada pesticida, preparadas na matriz (solo);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada pesticida, preparadas em solvente (acetonitrila);

Dessa maneira, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLÍKOVÁ *et al*., 2001). Neste caso, recomenda-se a construção das curvas analíticas em extrato da matriz para minimizar o efeito matriz.

3.9 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em 9 amostras de solo de várzea provenientes do cultivo do arroz irrigado. O experimento foi conduzido na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria pelo Grupo de Pesquisas em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Várzeas.

O solo utilizado nesse experimento é classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico Arênico com classe textural franco siltosa, com as seguintes características: $pH_{água}$ (1:1) = 6,2; teor de argila = 20%; teor de matéria orgânica =

3,2%; P = 16,2 mg L^{-1}; K = 180 mg L^{-1}; Ca = 5,5 $cmol_c$ L^{-1}; Mg = 3,2 $cmol_c$ L^{-1} e índice SMP = 6,6. Saturação por Bases = 80% e CTC/pH 7 = 11,4 $cmol_c$ L^{-1} .

O experimento foi conduzido com a aplicação do produto comercial Only®, constituído de uma mistura dos herbicidas imazetapir e imazapique (75 + 25 g L^{-1}, respectivamente). Herbicidas deste grupo químico são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. Esta alta persistência no solo pode levar a interferência destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

Na Tabela 8 estão descritos os pesticidas aplicados no experimento, bem como o produto formulado, identificação, tratamento e dose aplicada em amostras de solo.

Tabela 8 - Pesticidas aplicados no experimento, produto formulado, identificação, tratamento e dose aplicada em amostras de solo

Amostras de solo				
Pesticidas aplicados	Produto formulado (Marca Comercial)	Identificação das amostras	Tratamento	Dose aplicada (mL ha^{-1})
Imazetapir + Imazapique	Only®	A1 A2 A3	T1	500
		A4 A5 A6	T2	1000
		A7 A8 A9	T3	4000

As amostras de solo foram coletadas, acondicionadas separadamente em sacos de papel e armazenadas a temperatura ambiente, logo após foram recebidas no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da UFSM, para posterior realização das análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos compostos

A Tabela 9 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina.

Tabela 9 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS

Parâmetros	Condições utilizadas
Coluna analítica	Pursuit XRs C_{18} (50 x 2,0 mm d.i., 5,0 µm)
Fase móvel	Água ultrapura e acetonitrila, ambas acidificadas com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico
Gradiente de eluição	60% A e 40% B de 0 a 5 min; sendo mudado para 40% A e 60% B de 5 a 12 min; mudando para 20% A e 80% B de 12 a 12,05 min; e voltando à proporção inicial 60% A e 40% B de 12,05 a 15 minutos
Vazão	0,2 mL min^{-1}
Volume de injeção	10 µL
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS

% A: Água ultrapura acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico

% B: Acetonitrila acidificada com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico

A coluna analítica composta por C_{18} 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 (COLLINS *et al*., 2006; CALDAS, 2009).

Dentre os gradientes de eluição de fase móvel apresentados no item 3.4.1, o que forneceu melhor separação dos pesticidas em estudo, em um menor tempo de corrida cromatográfica foi o gradiente 3, que consiste em: 60% A e 40% B de 0 a 5

min; sendo mudado para 40% A e 60% B de 5 a 12 min; mudando para 20% A e 80% B de 12 a 12,05 min; e voltando à proporção inicial 60% A e 40% B de 12,05 a 15 min, resultando em um tempo total de análise de 15 min.

Entre as vazões de fase móvel e os volumes de injeção testados, a vazão de 0,2 mL min^{-1} e o volume de 10 µL foram os selecionados para este trabalho.

Ao empregar MS/MS é possível detectar individualmente os compostos, que não foram separados pela técnica cromatográfica utilizada, através do modo de aquisição MRM, se possuirem diferentes massas molares e gerarem diferentes espectros de massas. Assim, LC-MS/MS possibilita a obtenção de uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas (CHIARADIA *et al.,* 2008). Entretanto, a separação cromatográfica é importante para assegurar a eficiência da ionização dos compostos, aumentando a sensibilidade dos fragmentos selecionados, além das condições otimizadas para a fragmentação dos compostos que devem se apresentar adequadas a vazão de fase móvel empregada.

4.2 Condições do sistema LC-MS/MS

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 à pressão atmosférica (API) com eletronebulização no modo positivo (ESI+) para os pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, trifloxistrobina e eletronebulização no modo negativo (ESI-) para fipronil. A análise dos compostos foi realizada numa mesma corrida, sendo a interface por eletronebulização programada para mudar o modo de ionização, entre positivo e negativo, durante a corrida cromatográfica. A temperatura da fonte foi 50 ºC, a temperatura do gás de dessolvatação (N_2) foi 250 ºC, a pressão do gás de dessolvatação foi 40 psi, a pressão do gás de secagem (N_2) foi 20 psi e a voltagem da agulha foi 5000 V.

A fonte de ionização à pressão atmosférica (API) foi empregada com interface por eletronebulização (ESI), devido à moderada polaridade da maioria dos analitos.

ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH (ARDREY, 2003; CALDAS, 2009). Na ESI ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, a transformação destes em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A Tabela 10 apresenta os pesticidas analisados por LC-MS/MS, usando modo de ionização ESI+ e ESI-, modo de aquisição MRM, os íons precursores e íons produtos, energia de colisão para as duas transições monitoradas e tempo de retenção dos compostos estudados.

Tabela 10 - Pesticidas analisados por LC-MS/MS, modo de ionização ESI (+/-) e modo de aquisição MRM, íons precursores e íons produtos, e energia de colisão para as duas transições monitoradas

Pesticida	t_R (min)	1ª Transição (quantificação)			2ª Transição (confirmação)		
		Íon Precursor *(m/z)*	Íon Produto *(m/z)*	Energia Colisão (eV)	Íon Precursor *(m/z)*	Íon Produto *(m/z)*	Energia Colisão (eV)
Tiametoxam	1,0	292	181	20,5	292	210,9	11,5
Imazapique	1,2	276	231	18	276	234	16,5
Imazetapir	1,6	290	245	19	290	248	17
Clomazona	4,4	240	125	18	240	88,8	39,5
Propiconazol	6,9	342	158,9	25,5	342	69	14
Fipronil	7,8	435	329,7	15,5	435	249,6	26,5
Trifloxistrobina	9,8	409	186	15	409	205,9	11,5

Scan Time: 1,0 s

Para cada composto foram selecionadas duas transições características, como apresentado na Tabela 10, vantagem fornecida por um analisador de massas sequencial, LC-MS/MS. A transição mais intensa (mais estável) foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos. A Figura 18 apresenta um cromatograma total obtido no modo ESI (+/-) para uma solução analítica na matriz contendo os pesticidas, empregando-se

as condições selecionadas para o LC-MS/MS. A Figura 19 apresenta um cromatograma no modo MRM, onde foram monitorados apenas os íons utilizados para a quantificação dos compostos em estudo nas condições selecionadas para o sistema LC-MS/MS.

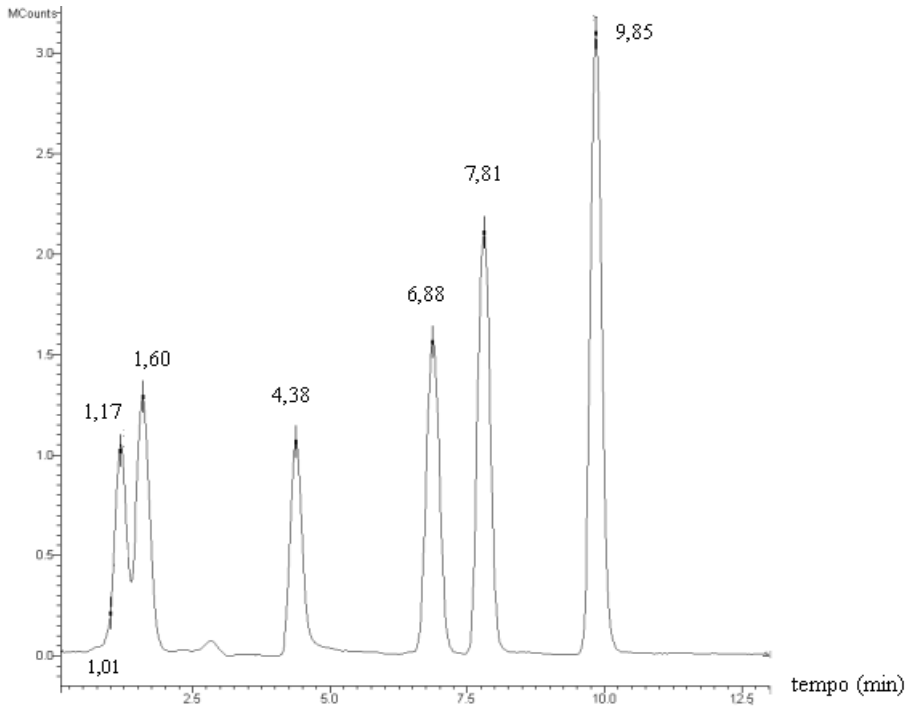


Figura 18 - Cromatograma total obtido no modo ESI (+/-) para uma solução analítica na matriz contendo 25 µg L^{-1} dos pesticidas em estudo (tiametoxam, t_R = 1,0 min; imazapique, t_R = 1,2 min; imazetapir, t_R = 1,6 min; clomazona, t_R = 4,4 min; propiconazol, t_R = 6,9 min; fipronil, t_R = 7,8 min; trifloxistrobina, t_R = 9,8 min)

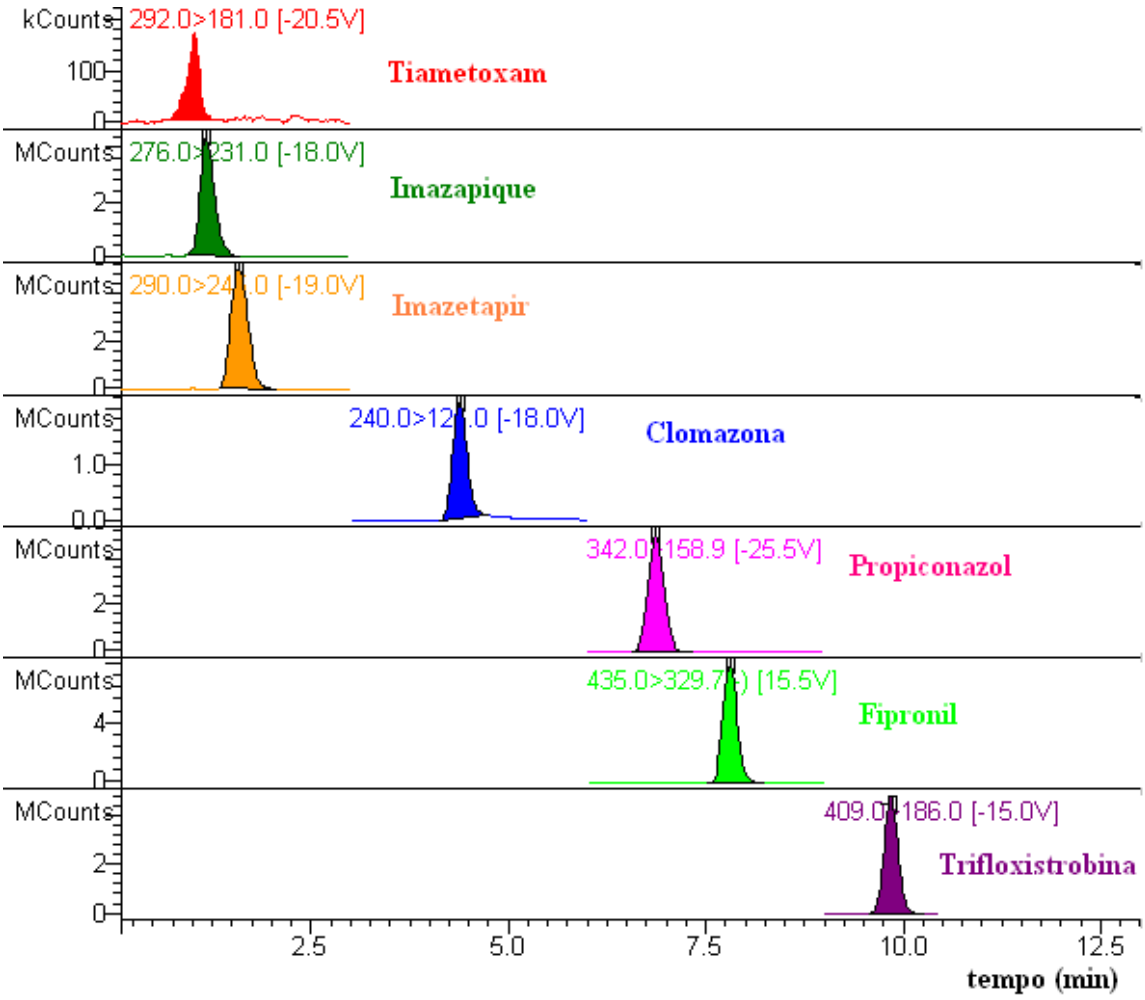


Figura 19 - Cromatogramas no modo MRM obtido para uma solução analítica na matriz contendo 25 µg L^{-1} de cada pesticida em estudo, contendo as transições empregadas para a quantificação

Visualizando o cromatograma total obtido no modo ESI (+/-) (Figura 18) e o cromatograma de MRM (Figura 19), observa-se que os compostos tiametoxam e imazapique co-eluíram, pois apresentaram tempo de retenção muito semelhante, eluindo em 1,0 e 1,2 min, respectivamente. Portanto, não houve separação adequada, mas, como o detector empregado é um espectrômetro de massas, e este detecta pela massa do composto, tem-se a grande vantagem de não necessitar uma perfeita separação cromatográfica de cada analito contido na solução (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Além disso, foram usadas duas transições para as análises de cada composto, o que torna a técnica altamente seletiva.

A detecção de pesticidas e/ou demais analitos em misturas ou em amostras mais complexas, pode ser um problema para a LC, quando a resolução dos

cromatogramas não está adequada, com detectores tradicionais, como por exemplo, detector UV ou até mesmo detector DAD, os quais não são específicos suficientes quando as diferenças espectrais são pequenas, prejudicando a quantificação. Entretanto, o emprego de LC-MS/MS pode contornar estes problemas de separação cromatográfica, pois o detector de massas sequencial operando no modo MRM é altamente seletivo para os analitos da mistura (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.,* 2004). Esta seletividade pode ser observada neste estudo, como está representado na Figura 19, na qual se observa que os compostos tiametoxam e imazapique foram identificados mesmo com tempos de retenção muito próximos.

4.3 Otimização do método de extração QuEChERS modificado

4.3.1 Avaliação dos ensaios de extração

Para avaliar os dezoito ensaios de extração realizados neste estudo, utilizou-se uma amostra ¨branco¨ de solo, fortificada nas concentrações 2,0 ou 5,0 mg kg^{-1}. Os resultados dos dezoito ensaios de extração descritos no item 3.6.1, estão apresentados na Tabela 11.

A partir destes testes preliminares, foi possível avaliar quais dos métodos de extração apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo.

Os ensaios de extração do 1 a 13 foram otimizados para extração dos pesticidas imazapique, imazetapir, clomazona e fipronil em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado, seguido de determinação por HPLC-DAD. De maneira geral, observa-se na Tabela 11, que para a grande maioria desses ensaios realizados, os herbicidas do grupo imidazolinonas, imazapique e imazetapir, apresentaram baixos valores de recuperação (< 70%), o que demonstra a grande dificuldade encontrada na otimização do método QuEChERS modificado para extração desses compostos em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado. Já os pesticidas clomazona e fipronil apresentaram valores de recuperação satisfatórios para a grande maioria dos ensaios realizados, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de resíduos de pesticidas, os quais devem estar entre 70 e 120% (SANCO, 2007).

Tabela 11 - Recuperações médias (%) obtidas nos ensaios de extração

	Pesticidas			
Ensaio	**Imazapique**	**Imazetapir**	**Clomazona**	**Fipronil**
Ensaio 1	0	0	81,3	93,8
Ensaio 2	0	0	101,6	94,9
Ensaio 3	1,5	10,3	93,8	91,4
Ensaio 4	9,7	14,5	94,8	91,6
Ensaio 5	35,9	42,1	88,9	95,2
Ensaio 6	22,8	29,6	92,4	105,6
Ensaio 7	36,7	42,7	87,3	92,7
Ensaio 8	53,4	50,8	85,6	94,9
Ensaio 9	79,9	59,9	87,9	83,9
Ensaio 10	78,3	69,5	80,2	87,9
Ensaio 11	67,1	60,5	73,9	75,7
Ensaio 12	78,2	73,1	109,3	99,4
Ensaio 13	80,8	74,8	105,3	96,5
Ensaio 14	84,1	71,3	-	-
Ensaio 15	89,1	76,0	-	-
Ensaio 16	**87,6**	**88,7**	-	-
Ensaio 17	85,8	84,8	-	-
Ensaio 18	95,0	84,8	-	-

Dessa forma, pode-se constatar que o ponto crítico do método de extração otimizado foi com relação à extração dos herbicidas imidazolinonas, imazapique e imazetapir, devido suas propriedades físico-químicas peculiares (caráter anfótero e baixos valores de pK_a). Sendo assim, foram realizados mais cinco ensaios de extração, (ensaios 14 a 18), os quais foram otimizados somente para a extração desses compostos da matriz do solo.

A Figura 20 apresenta os valores de recuperação (%) dos pesticidas imazapique e imazetapir obtidos a partir dos ensaios de extração 14 a 18.

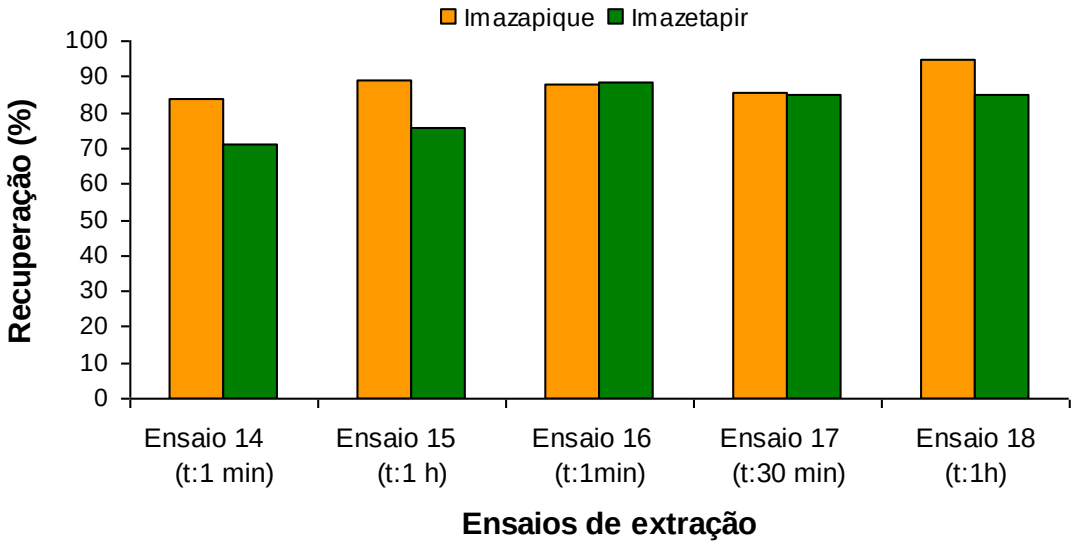


Figura 20 - Recuperações (%) dos pesticidas imazapique e imazetapir, obtidas a partir dos ensaios de extração 14 a 18

De acordo com o item 3.6.1, os ensaios de extração 14 e 15 foram realizados de maneira semelhante, sendo que a única diferença entre eles consiste no tempo de agitação entre o solo e a solução de extração alcalina, de 1 min e 1 h, respectivamente. Já os ensaios 16, 17 e 18 também foram realizados de maneira semelhante, sendo que a única alteração entre eles foi com relação aos tempos de agitação entre o solo e a solução de extração alcalina, de 1 min, 30 min e 1 h, respectivamente.

Analisando a Tabela 11 e a Figura 20, observa-se que os ensaios de extração 14 a 18 apresentaram valores de recuperação satisfatórios para os pesticidas imazapique e imazetapir. No entanto, o ensaio de extração 16, quando comparado com os demais ensaios, foi o que apresentou melhores condições de extração, pois resultou em valores de recuperação satisfatórios para os pesticidas imazapique e imazetapir, com proporcionalidade entre estes valores, além de utilizar um menor tempo de agitação entre o solo e a solução de extração alcalina.

Deste modo, o método de extração escolhido neste estudo foi o ensaio 16 que emprega 5,0 g de solo, 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0 e 10 mL de acetonitrila como solventes de extração, 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 3,0 g de cloreto de sódio para etapa de partição, seguido de etapa de ajuste do pH em 3,0, através da adição de 390 µL de solução aquosa de HCl 6 mol L^{-1}.

Segundo PRESTES *et al.* (2009), 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. Conforme item 3.6.1, no qual são apresentados os ensaios de extração realizados, foram testadas diferentes quantidades de solo, a fim de minimizar o volume de solvente para extração e gerar o menor volume de resíduos. A massa escolhida para realização dos experimentos foi de 5,0 g, pois apresentou melhores resultados de recuperação, comparada à massa de 2,5 g de solo.

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de pesticidas com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental (PRESTES *et al.*, 2009). Dessa forma, os solventes e os volumes de solventes escolhidos para extração dos pesticidas neste estudo foram: 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0 e 10 mL de acetonitrila pura, pois apresentaram resultados satisfatórios de recuperação em comparação aos outros solventes estudados.

A utilização de soluções aquosas alcalinas, como solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0, é apropriada para extração de herbicidas imidazolinonas, pois minimiza o uso de solventes orgânicos, além da simplicidade de preparo (RAMEZANI *et al*., 2009). Além disso, os herbicidas do grupo imidazolinonas apresentam valores de pK_a na faixa de 2,0 a 3,9, então o uso de uma solução para extração com pH alcalino faz-se necessário, pois proporciona o aumento da solubilidade devido a desprotonação dos herbicidas (RAMEZANI *et al*., 2009). Em relação ao volume utilizado da solução de extração alcalina, estudo recente realizado por RAMEZANI *et al*. (2009) demonstrou que a proporção solo: solução de extração alcalina (1:4, m/v) resultou em melhores porcentagens de extração desses herbicidas. Assim, no método de extração QuEChERS modificado otimizado neste trabalho utilizou-se 5,0 g de solo e 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0, pois esta proporção solo:solução de extração alcalina (1:4, m/v) resultou em valores satisfatórios de recuperação para os herbicidas imidazolinonas, bem como para os demais pesticidas estudados.

A acetonitrila, também foi utilizada como solvente de extração, pois proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades. Além disso, a acetonitrila não é classificada como um agente carcinogênico e não é persistente no meio ambiente, e sua baixa volatilidade reduz a exposição do analista (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

Conforme item 3.6.1, no qual são apresentados os ensaios de extração realizados, foram testadas diferentes quantidades de $MgSO_4$ e NaCl na etapa de partição, sendo que a quantidade escolhida foi de 4,0 g de $MgSO_4$ e 3,0 g de NaCl, pois apresentaram melhores resultados de recuperação para os pesticidas estudados, comparada as outras quantidades avaliadas.

A adição de sais é utilizada para promover o efeito "*salting out*" em vários métodos multirresíduos, incrementando o nível de recuperação para analitos mais polares. A adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES *et al*., 2009).

A adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio promove uma partição líquido-líquido, facilitando a remoção de componentes polares da matriz. Além disso, o sulfato de magnésio anidro é um agente secante muito eficiente, sendo sua hidratação um processo exotérmico, tendo como resultado um aquecimento do tubo utilizado entre 40 e 45 ºC durante as etapas de extração/partição. Este aquecimento é favorável para extração dos pesticidas e ajuda a confirmar que a água está sendo removida da solução (ANASTASSIADES *et al*., 2003).

Após etapa de adição de sais ($MgSO_4$ e NaCl), fez-se necessário a acidificação do extrato em pH 3,0, pois esse valor de pH encontra-se entre os valores de pKa dos herbicidas imidazolinonas (imazapique e imazetapir), os quais estarão na forma neutra e solubilizados na fase orgânica, sendo, portanto recuperados na etapa de partição.

Segundo TOMLIN (2003), o pKa_1 do herbicida imazapique é igual a 2,0 e seu pKa_2 é igual a 3,6, já o herbicida imazetapir possui pKa_1 igual a 2,1 e pKa_2 igual a 3,9. Quando o pH da solução do solo estiver acima do pKa_2 desses herbicidas, os mesmos estarão na forma ionizada (aniônica) e portanto, solubilizados na fase aquosa. No entanto, quando o pH da solução do solo estiver entre os valores de pKa_1 e pKa_2, esses herbicidas estarão, predominantemente, na forma neutra e portanto, solubilizados na fase orgânica.

Logo após, foi realizada centrifugação para a separação física das fases e *clean-up* dispersivo com $MgSO_4$ para remoção da água residual e precipitação de co-extrativos polares da matriz, seguido de análise por HPLC-DAD.

Devido à necessidade de analisar um maior número de pesticidas neste trabalho, o ensaio de extração 16 foi avaliado incluindo também, os pesticidas clomazona, fipronil, propiconazol, tiametoxam e trifloxistrobina, seguido de determinação por HPLC-DAD. Observou-se que os valores de recuperação para alguns desses pesticidas (tiametoxam e propiconazol), ficaram acima de 120%, possivelmente devido à presença de interferentes provenientes da matriz do solo. Sendo assim, constatou-se a necessidade de otimização da etapa de *clean-up* dispersivo, através da utilização de outros sorventes, a fim de reduzir ou eliminar co-extrativos da matriz do solo.

Dessa forma, após otimização do método QuEChERS modificado, realizou-se a etapa de validação do método, utilizando o sistema cromatográfico LC-MS/MS.

4.4 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo

Vários estudos sugerem uma etapa de *clean-up* dos extratos para reduzir ou eliminar co-extrativos das amostras antes da análise cromatográfica (HAJSLOVÁ *et al.,* 1998). No entanto, a etapa de *clean-up* pode resultar na perda parcial de pesticidas além de aumentar o tempo e o custo das análises (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Na etapa de otimização do *clean-up* dispersivo, a qual foi realizada para os sete pesticidas em estudo, através da utilização do ensaio de extração 16, foram testados os sorventes: alumina neutra, ácida e básica; florisil; amina primária secundária (PSA); e carvão vegetal ativado, em combinação com sulfato de magnésio; e também sulfato de magnésio, o qual foi utilizado separadamente.

A Figura 21 mostra a influência dos sorventes florisil, alumina neutra, básica e ácida, em combinação com sulfato de magnésio (250 mg), na taxa de recuperação dos pesticidas estudados.

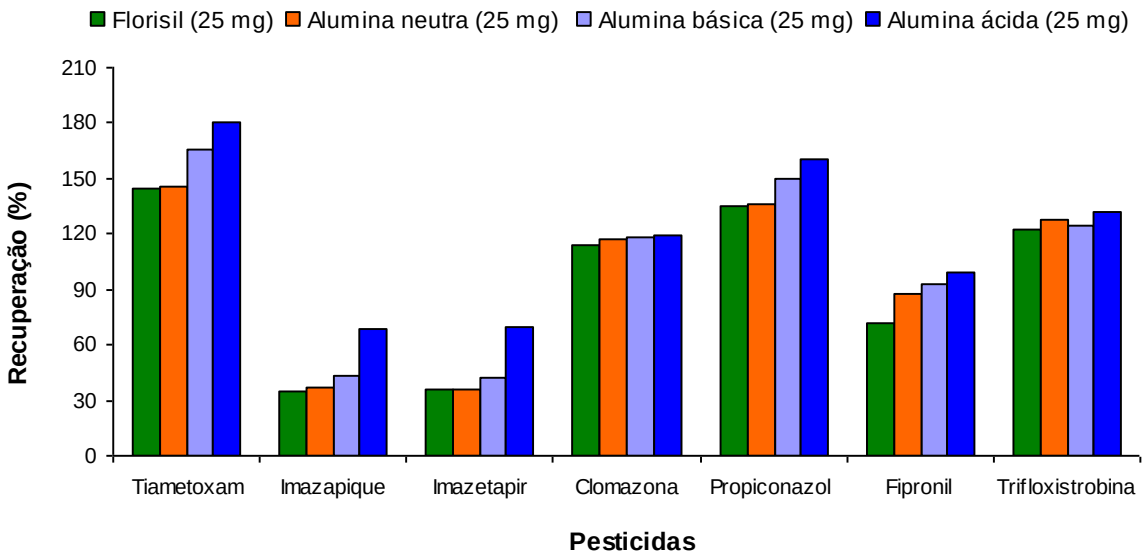


Figura 21 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando florisil, alumina neutra, básica e ácida em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*

Florisil, alumina neutra, básica e ácida são sorventes polares, utilizados principalmente para remover interferências polares do extrato, durante etapa de *clean-up*. Dessa forma, observa-se na Figura 21, que florisil, alumina neutra, básica e ácida, em combinação com sulfato de magnésio (250 mg), não proporcionaram resultados satisfatórios, pois diminuíram a taxa de recuperação dos pesticidas imazapique e imazetapir, devido à adsorção. Obtiveram-se valores de recuperação satisfatórios para os pesticidas clomazona e fipronil, no entanto os pesticidas tiametoxam, propiconazol e trifloxistrobina apresentaram valores de recuperação acima de 120%, devido possivelmente à presença de interferentes provenientes da matriz que co-eluíram no tempo de retenção desses compostos, dificultando a quantificação no sistema HPLC-DAD.

PSA é um adsorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade de remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros co-extratos da matriz que formam pontes de hidrogênio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. As taxas de recuperação dos pesticidas obtidos pelo método QuEChERS modificado, utilizando diferentes quantidades de PSA em combinação com sulfato de magnésio (250 mg), estão mostradas na Figura 22.

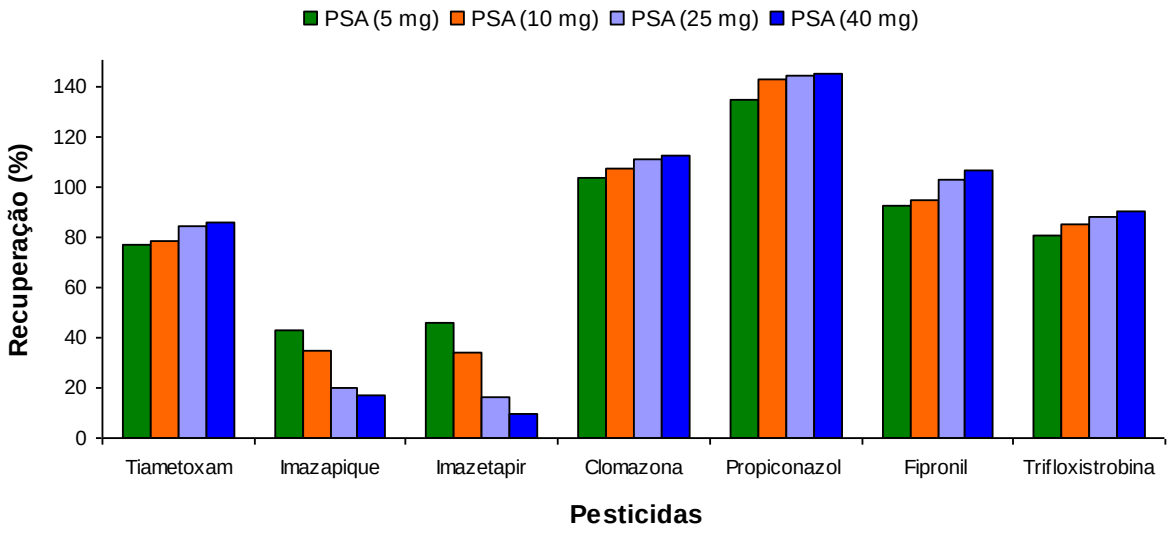


Figura 22 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando diferentes quantidades de PSA em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*

Embora a utilização de PSA resulte em extratos incolores, podemos observar na Figura 22, que aumentando a quantidade de PSA utilizado na etapa de *clean-up,* os valores de recuperação diminuem para imazapique e imazetapir. A explicação que justifica esse fato é que PSA quando utilizado como sorvente, pode reter pesticidas contendo grupos de ácido carboxílico em sua estrutura, reduzindo o potencial de recuperação destes compostos (LEHOTAY, 2007). No entanto, obtiveram-se valores de recuperação satisfatórios para os outros pesticidas em estudo, exceto para propiconazol, que apresentou recuperação acima de 120%, devido possivelmente à presença de interferentes provenientes da matriz.

A etapa de *clean-up* com carvão ativado é muito útil na remoção de pigmentos da matriz. Entretanto, a utilização do carvão ativado pode levar a perdas de certos compostos como os pesticidas de baixa polaridade e pesticidas com estrutura planar durante o *clean-up* dispersivo em fase sólida (DIÉZ *et al.,* 2006).

A Figura 23 mostra a influência de diferentes quantidades de carvão ativado em combinação com sulfato de magnésio (250 mg), utilizando o método QuEChERS modificado, na taxa de recuperação dos pesticidas em estudo.

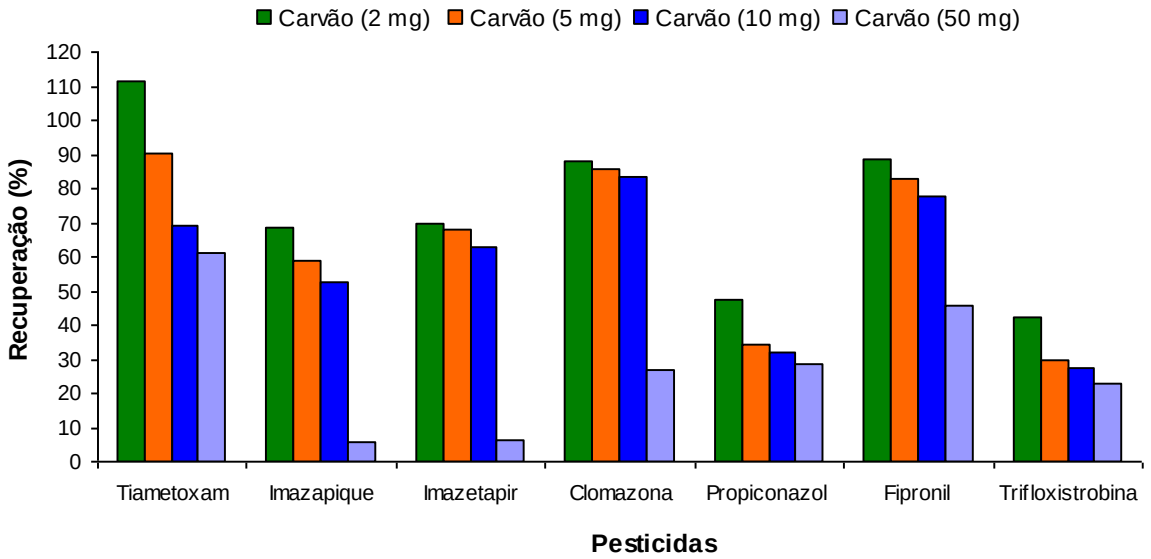


Figura 23 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando diferentes quantidades de carvão ativado em combinação com sulfato de magnésio, na etapa de *clean-up*

Embora a utilização de carvão ativado resulte em extratos incolores, observa-se na Figura 23, que o aumento da quantidade de carvão ativado combinado com sulfato de magnésio, diminuiu as taxas de recuperação, principalmente para os pesticidas propiconazol e trifloxistrobina. Quantidades iguais ou superiores a 50 mg de carvão ativado, tornam a técnica inviável devido à adsorção acentuada de todos os pesticidas, reduzindo as taxas de recuperação para valores abaixo de 70%.

Dessa maneira, neste trabalho, foi selecionado o ensaio 16.13 (item 3.6.2) para a etapa de *clean-up* dispersivo, que utiliza como sorvente somente $MgSO_4$ (250 mg). Embora este sorvente resulte em extratos de coloração amarelada, este apresenta resultados de recuperação satisfatórios para a maioria dos pesticidas estudados, principalmente para imazapique e imazetapir. As taxas de recuperação dos pesticidas, utilizando diferentes quantidades de $MgSO_4$ para a etapa de *clean-up*, estão mostradas na Figura 24.

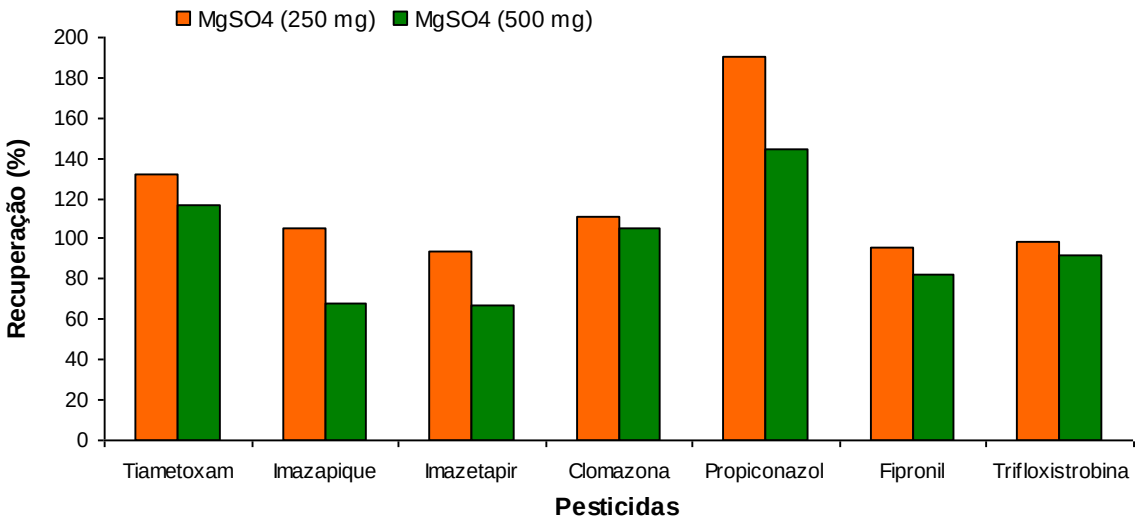


Figura 24 - Recuperações (%) dos pesticidas utilizando sulfato de magnésio em diferentes quantidades na etapa de *clean-up*

Observa-se na Figura 24, que a utilização de sulfato de magnésio (250 mg) apresentou resultados de recuperação satisfatórios para a maioria dos pesticidas estudados, exceto para tiametoxam e propiconazol que apresentaram valores de recuperação acima de 120%, devido possivelmente a presença de interferentes provenientes da matriz que co-eluíram no tempo de retenção desses compostos. No entanto, como a etapa de validação do método de extração otimizado foi realizada utilizando o sistema cromatográfico LC-MS/MS, a presença desses interferentes da matriz torna-se irrelevante, devido ao monitoramento do íon selecionado.

A utilização de sulfato de magnésio como sorvente para *clean-up* apresenta como vantagem a remoção da água residual do extrato final, antes da injeção no sistema cromatográfico. Segundo PRESTES *et al*. (2009), esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares da matriz.

Em relação à quantidade de sorvente utilizado, a que apresentou melhor relação custo/benefício foi a de 250 mg, embora a quantidade de 500 mg também tenha apresentado bons resultados para a maioria dos pesticidas estudados, mas deve-se considerar também o custo do material. Além disso, a quantidade de 250 mg de sulfato de magnésio proporcionou maiores valores de recuperação para os pesticidas imazapique e imazetapir, em comparação com a quantidade de 500 mg.

Por estes motivos, o sorvente sulfato de magnésio (250 mg) foi selecionado para a etapa de *clean-up* dispersivo neste trabalho, dispensando assim, a necessidade de utilização de sorventes caros.

Portanto, o estudo do *clean-up* dos extratos é relevante no sentido de preservar o sistema cromatográfico e diminuir o efeito matriz provocado pelos constituintes da amostra e os seus produtos de degradação.

4.5 Método de extração otimizado

A partir dos testes previamente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método proposto e para a determinação da concentração residual dos pesticidas nas amostras de solo.

O procedimento de extração otimizado está descrito no item 3.7.3. O método envolve uma etapa de extração com solução saturada de hidróxido de cálcio pH 12,0 e acetonitrila, uma etapa de partição com os sais sulfato de magnésio e cloreto de sódio, uma etapa de ajuste do pH em 3,0 com solução aquosa de HCl 6 mol L^{-1} e uma etapa de *clean-up* dispersivo com sulfato de magnésio.

Para a etapa de validação do método QuEChERS modificado utilizado neste trabalho, foram necessárias amostras “branco” e as fortificações foram avaliadas em três níveis, 2, 10 e 20 µg kg^{-1} para propiconazol e nos níveis de 10, 50 e 100 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina.

A Figura 25 demonstra todas as etapas do método de extração otimizado (QuEChERS modificado).

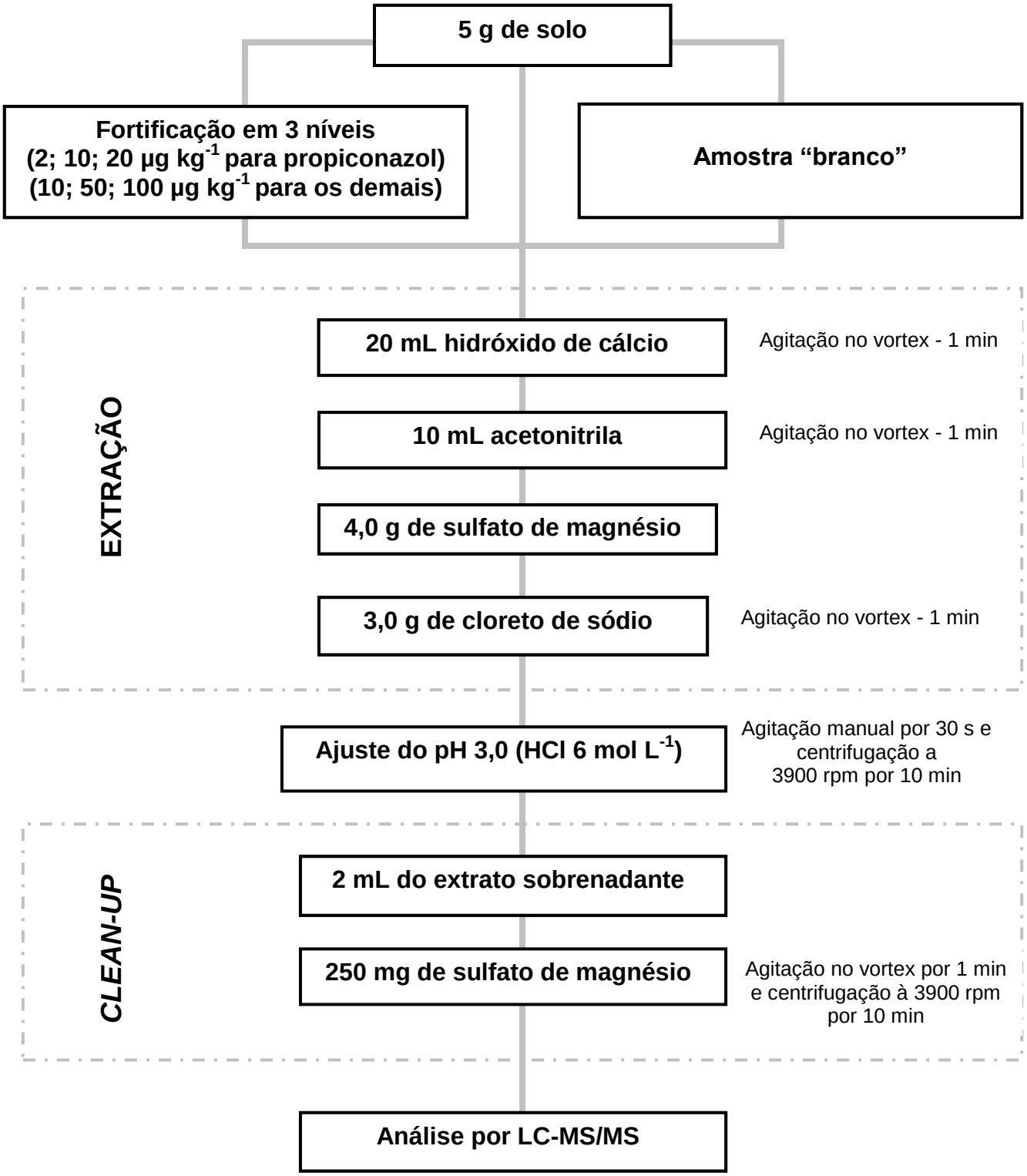


Figura 25 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de pesticidas em solo, utilizando o método QuEChERS modificado

4.6 Validação do Método QuEChERS modificado

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato do solo (Método QuEChERS modificado), assim foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ (instrumento e método), da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar os resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada. Sendo assim, foi realizada a validação do método QuEChERS modificado para a análise dos pesticidas, segundo os parâmetros descritos a seguir.

4.6.1 Curva analítica e linearidade

As Tabelas 12 e 13 apresentam as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz, coeficiente de determinação (r^2) e intervalo linear para os pesticidas estudados.

Tabela 12 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas em acetonitrila, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS

Pesticida	Equação da reta (y = ax + b)	r^2	Intervalo linear (µg L^{-1})
Tiametoxam	$y = 1.10^8x - 4.10^8$	0,9927	1,0 - 100,0
Imazapique	$y = 1.10^9x - 2.10^9$	0,9989	1,0 - 100,0
Imazetapir	$y = 2.10^9x - 2.10^9$	0,9989	1,0 - 100,0
Clomazona	$y = 6.10^8x - 1.10^9$	0,9986	1,0 - 100,0
Propiconazol	$y = 1.10^{10}x - 8.10^8$	0,9998	0,2 - 20,0
Fipronil	$y = 2.10^9x + 1.10^9$	0,9998	1,0 - 100,0
Trifloxistrobina	$y = 2.10^9x - 3.10^9$	0,9986	1,0 - 100,0

Tabela 13 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS

Pesticida	Equação da reta (y = ax + b)	r^2	Intervalo linear (µg L^{-1})
Tiametoxam	$y = 9.10^7x - 1.10^8$	0,9967	1,0 - 100,0
Imazapique	$y = 1.10^9x + 1.10^9$	0,9985	1,0 - 100,0
Imazetapir	$y = 2.10^9x + 1.10^9$	0,9997	1,0 - 100,0
Clomazona	$y = 5.10^8x - 3.10^8$	0,9999	1,0 - 100,0
Propiconazol	$y = 1.10^{10}x + 4.10^8$	1,0000	0,2 - 20,0
Fipronil	$y = 2.10^9x + 2.10^9$	0,9999	1,0 - 100,0
Trifloxistrobina	$y = 2.10^9x - 6.10^8$	0,9998	1,0 - 100,0

Observando-se os coeficientes angulares (a) das equações das retas em solvente e no extrato da matriz, pode-se perceber que o propiconazol apresenta maior sensibilidade dentre os pesticidas analisados por LC-MS/MS.

A partir dos resultados das equações das retas obtidas, pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação (r^2) foram todos maiores que 0,9927 para as curvas analíticas preparadas em solvente (acetonitrila) e maiores que 0,9967 para as curvas preparadas no extrato da matriz, o que é satisfatório segundo a literatura (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

4.6.2 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído como apresentados no item 3.7.2. Na Tabela 14 estão listados os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para os pesticidas estudados. As soluções analíticas utilizadas para este fim foram preparadas no extrato da matriz.

Tabela 14 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método

Pesticida	Limites do instrumento ($\mu g\ L^{-1}$)		Limites do método* ($\mu g\ kg^{-1}$)	
	LOD_i	LOQ_i	LOD_m	LOQ_m
Tiametoxam	0,3	1,0	0,6	2,0
Imazapique	0,3	1,0	0,6	2,0
Imazetapir	0,3	1,0	0,6	2,0
Clomazona	0,3	1,0	0,6	2,0
Propiconazol	0,06	0,2	0,12	0,4
Fipronil	0,3	1,0	0,6	2,0
Trifloxistrobina	0,3	1,0	0,6	2,0

* Fator do método = 2

O método QuEChERS modificado otimizado nesse trabalho alcançou baixos limites de detecção (LOD_m= 0,12 a 0,6 µg kg^{-1}) e baixos limites de quantificação (LOQ_m= 0,4 a 2,0 µg kg^{-1}). O fungicida propiconazol apresentou uma sensibilidade cinco vezes maior que os demais pesticidas em estudo.

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. Além disso, na legislação brasileira não foram encontrados valores de limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para nenhum destes compostos em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado.

4.6.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

As Tabelas 15 e 16 apresentam os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os pesticidas em estudo em amostras de solo, utilizando-se o procedimento descrito no item 3.7.3.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas nos extratos da matriz, de acordo com o método de extração utilizado.

A recuperação depende da matriz da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito (GONÇALVES, 2007). Neste trabalho, seguiu-se a

recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.,* 2004; SANCO, 2007).

Dessa maneira, todos os resultados obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros cromatográficos sugeridos, exceto para imazetapir no primeiro nível de fortificação (10 µg kg^{-1}), que apresentou valores de recuperação acima de 120%, para o estudo da precisão intermediária.

Tabela 15 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método

Pesticida	Nível de fortificação* (µg kg^{-1})	Recuperação (%)	RSD_r (%)
Tiametoxam	10	78,0	14,2
	50	72,5	16,3
	100	84,2	3,5
Imazapique	10	84,4	7,3
	50	79,1	7,7
	100	84,6	9,4
Imazetapir	10	103,9	6,3
	50	102,0	10,2
	100	98,2	2,0
Clomazona	10	112,2	5,6
	50	110,8	3,4
	100	112,8	1,1
Propiconazol	2	113,8	3,4
	10	113,6	1,2
	20	111,1	1,6
Fipronil	10	111,5	4,1
	50	105,9	2,1
	100	101,5	1,8
Trifloxistrobina	10	96,6	5,4
	50	93,9	1,0
	100	93,3	2,0

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

Tabela 16 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método

Pesticida	Nível de fortificação* (µg kg^{-1})	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
Tiametoxam	10	109,3	18,2
	50	74,7	8,3
	100	86,2	5,7
Imazapique	10	101,1	13,7
	50	91,2	8,6
	100	99,7	5,9
Imazetapir	10	123,2	5,9
	50	108,7	5,2
	100	106,2	1,6
Clomazona	10	108,7	4,2
	50	119,9	6,8
	100	119,2	1,8
Propiconazol	2	116,8	3,4
	10	101,1	5,0
	20	100,0	2,9
Fipronil	10	116,8	2,7
	50	116,2	3,7
	100	109,7	2,1
Trifloxistrobina	10	76,8	4,4
	50	96,0	11,2
	100	103,5	4,9

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

A Figura 26 apresenta os cromatogramas obtidos para uma solução padrão de concentração 25 µg L^{-1} preparada no extrato da matriz solo, e a fortificação equivalente, de concentração 50 µg kg^{-1}.

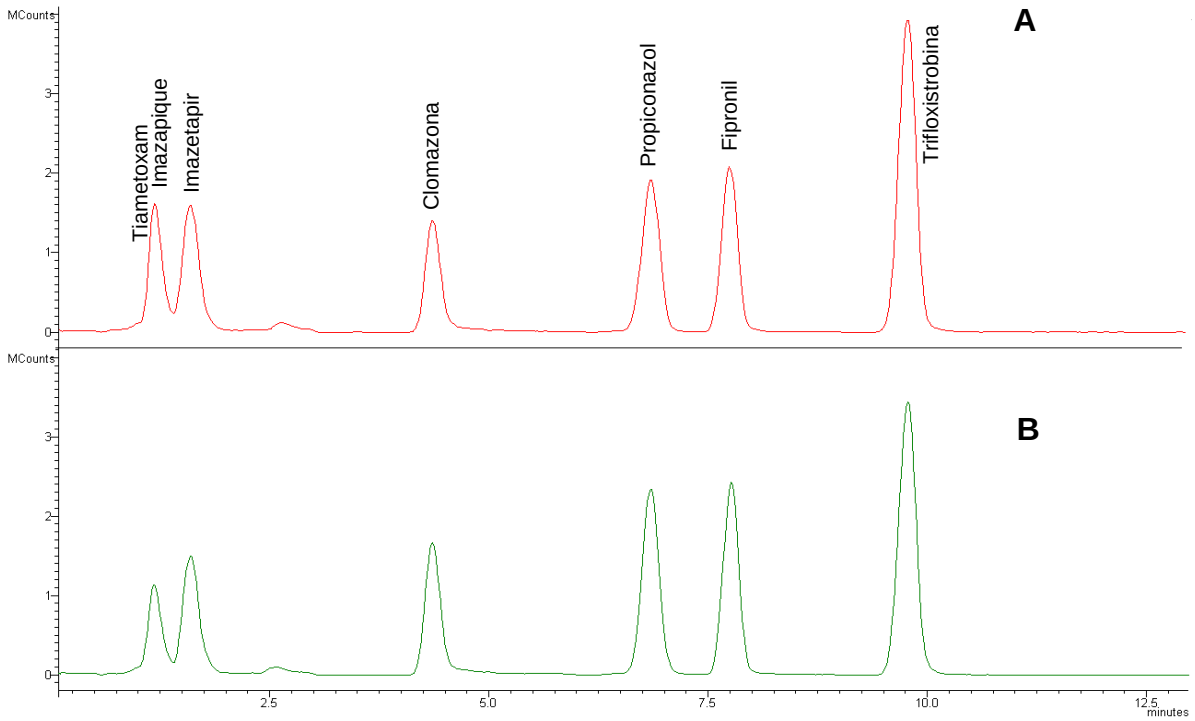


Figura 26 - Cromatograma total de todos os íons monitorados obtido por LC-MS/MS (ESI +/-) para a solução analítica 25 µg L^{-1} preparada na matriz solo "branco" (A) e no nível de fortificação correspondente (50 µg kg^{-1}) (B)

Verifica-se que os sinais são proporcionais, ou seja, que o sinal da fortificação equivale ao sinal do nível correspondente na curva analítica, corroborando com os resultados de recuperação já apresentados nas Tabelas 15 e 16. No cromatograma total há a sobreposição dos sinais de tiametoxam e imazapique, entretanto a confirmação e a quantificação são efetuadas no modo MRM, monitorando as transições de cada composto conforme destacado na Tabela 10 e na Figura 19, permitindo obter a resposta de cada pesticida sem a interferência do outro. Como era de se esperar, não há a ocorrência de interferentes nos cromatogramas obtidos desta forma pelo sistema cromatográfico LC-MS/MS.

4.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão do instrumento foi avaliada a partir de injeções sucessivas dos níveis de concentração utilizados na elaboração das curvas analíticas dos pesticidas (n=3). A repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{pi}) para o instrumento, ficaram entre 0,3 e 10,9% e 0,0 e 14,4%, respectivamente. A avaliação da precisão intermediária foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos da repetitividade.

A precisão do método empregando QuEChERS modificado foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA. Os valores mais detalhados de RSD_r e RSD_{pi} estão apresentados juntamente aos resultados de recuperação nas Tabelas 15 e 16. Os valores para o estudo da repetitividade dos pesticidas em amostras de solo ficaram entre 1,0 e 16,3% e para a precisão intermediária ficaram entre 1,6 e 18,2%.

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). Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar RSD ≤ 20% (RIBANI *et al*., 2004; SANCO, 2007). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

4.7 Efeito Matriz em LC-MS/MS

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

A Figura 27 apresenta as curvas analíticas para os pesticidas analisados tanto em solvente quanto no extrato da matriz obtidas utilizando o método QuEChERS modificado, onde se pode verificar a existência ou não de efeito matriz.

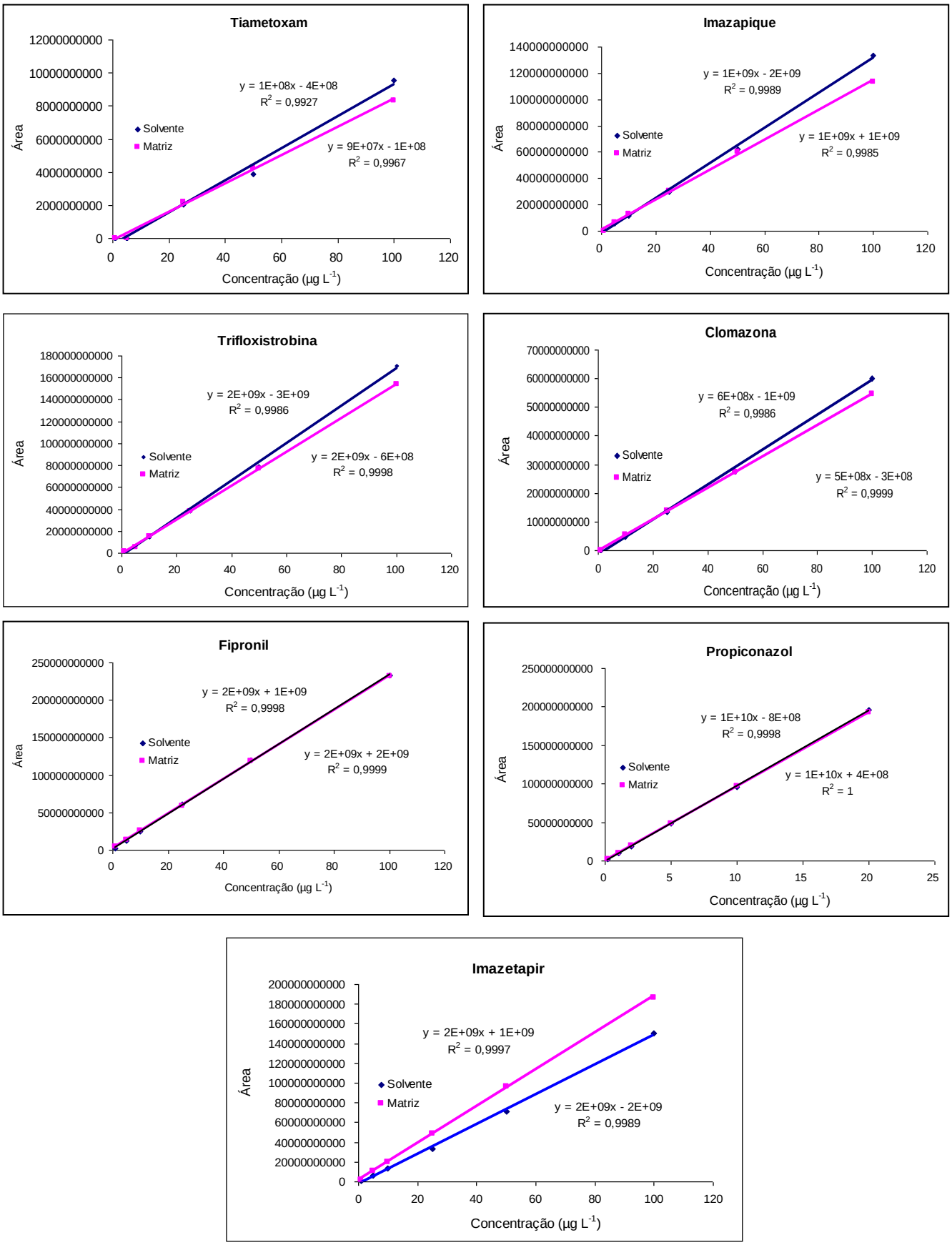


Figura 27 - Curvas analíticas dos pesticidas em estudo preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz

Conforme apresentado na Figura 27, para os pesticidas tiametoxam (ME = -11,7%) e imazapique (ME = -14,9%), os padrões preparados no solvente acetonitrila apresentaram uma resposta maior quando comparado ao padrão preparado em extrato da matriz, apresentando efeito matriz “negativo”, ou seja, a resposta do detector é menor quando são injetados na presença de componentes da matriz.

Para os pesticidas trifloxistrobina (ME = -9,5%) e clomazona (ME = -9,6%), o efeito matriz não foi significativo, uma vez que, uma variação menor que 10% não é considerada uma influência do efeito matriz.

Já para os pesticidas fipronil e propiconazol, o efeito matriz é desprezível, pois as inclinações das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz são correspondentes, sugerindo assim que esses compostos não apresentaram efeito matriz, ou seja, a presença de componentes da matriz não interferiu significativamente em sua análise cromatográfica.

No entanto, para o pesticida imazetapir (ME = 23,5%), o padrão preparado em acetonitrila apresentou uma resposta menor quando comparado ao padrão preparado em extrato da matriz, pois o aumento do coeficiente angular foi mais expressivo. Dessa maneira, imazetapir apresenta um efeito matriz “positivo”, ou seja, esse analito apresenta valores maiores de área quando injetado na presença de componentes da matriz, em comparação ao padrão preparado em acetonitrila.

Dessa maneira, com a constatação da presença do efeito matriz nas curvas analíticas de alguns dos pesticidas estudados, pode-se dizer que, para a quantificação de resíduos de pesticidas em extratos de solo, analisados por LC-MS/MS, as soluções analíticas devem ser preparadas nos extratos da matriz.

4.8 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em 9 amostras de solo provenientes de um experimento conduzido na várzea experimental do Campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo Grupo de Pesquisa em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Várzeas.

As amostras de solo foram preparadas conforme o método validado (itens 3.7.3 e 4.5) e os resultados das concentrações dos pesticidas em estudo encontrados nas amostras estão demonstrados na Tabela 17.

Nas Figuras 28 a 30, estão apresentados alguns cromatogramas obtidos por LC-MS/MS, nas condições cromatográficas descritas no item 4.1, das amostras de solo contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir e fipronil.

Tabela 17 - Valores de concentração, em µg kg^{-1}, dos pesticidas em estudo encontrados em amostras de solo

		Concentrações dos pesticidas (µg kg^{-1})						
Amostras	Tratamento	Tiametoxam	Imazapique	Imazetapir	Clomazona	Propiconazol	Fipronil	Trifloxistrobina
A1		398,2	11,8	31,9	<LOQ	n.d.	132,2	<LOQ
A2	T1	153,6	14,8	39,6	3,8	n.d.	75,5	<LOQ
A3		129,1	14,1	37,6	<LOQ	n.d.	48,3	n.d.
A4		212,2	24,3	64,4	n.d.	n.d.	120,0	n.d.
A5	T2	316,6	23,7	63,8	<LOQ	n.d.	15,6	n.d.
A6		111,7	26,5	71,0	n.d.	n.d.	70,8	n.d.
A7		508,0	101,9	267,0	<LOQ	n.d.	123,2	n.d.
A8	T3	309,2	97,6	265,7	<LOQ	n.d.	18,2	n.d.
A9		150,4	101,4	293,5	n.d.	n.d.	75,8	n.d.

n.d.= não detectado

T1 = aplicação de 500 mL ha^{-1} do produto comercial Only®

T2 = aplicação de 1000 mL ha^{-1} do produto comercial Only®

T3 = aplicação de 4000 mL ha^{-1} do produto comercial Only®

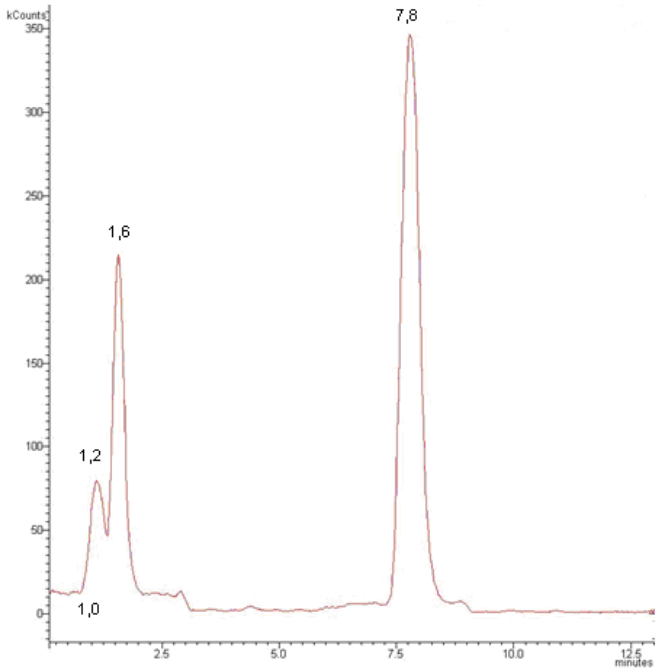


Figura 28 - Cromatograma da amostra de solo A3, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

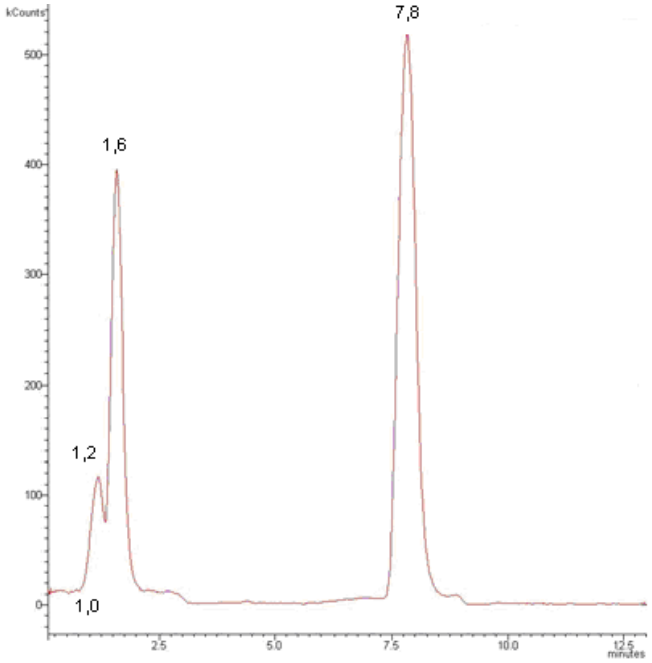


Figura 29 - Cromatograma da amostra de solo A6, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

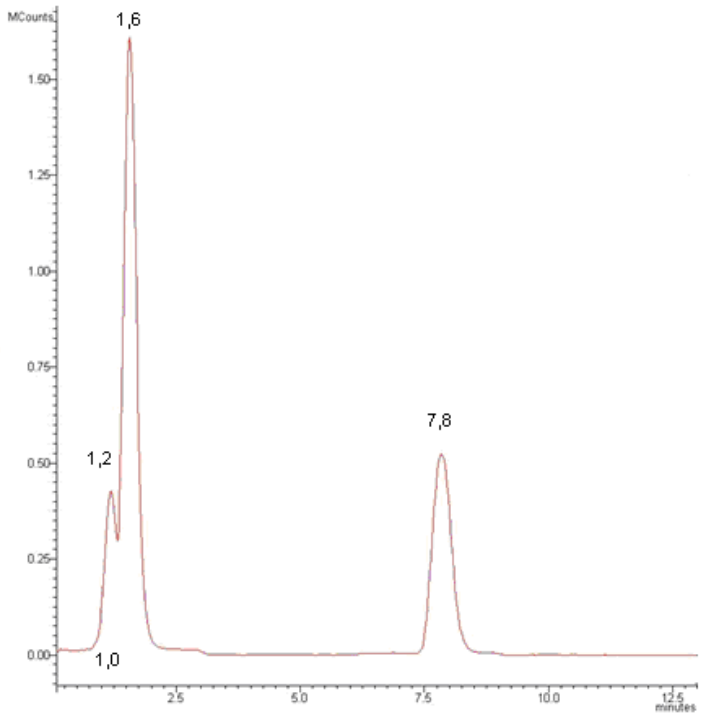


Figura 30 - Cromatograma da amostra de solo A9, contendo resíduos dos pesticidas tiametoxam (t_r= 1,0 min), imazapique (t_r= 1,2 min), imazetapir (t_r= 1,6 min) e fipronil (t_r= 7,8 min), obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

De acordo com a Tabela 17, as amostras de solo de lavoura de arroz irrigado receberam três tratamentos diferentes do produto comercial Only® (imazetapir + imazapique) nas seguintes dosagens: T1 (amostras A1 a A3), 500 mL ha^{-1}; T2 (amostras A4 a A6), 1000 mL ha^{-1}; T3 (amostras A7 a A9), 4000 mL ha^{-1}.

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 17, podemos perceber a proporcionalidade dos valores de concentração (em µg kg^{-1}) encontrados para os pesticidas imazapique e imazetapir, pois as amostras correspondentes ao tratamento T3, que receberam a maior dosagem do produto comercial Only®, apresentaram maiores valores de concentração para os pesticidas imazapique e imazetapir que as amostras dos tratamentos T1 e T2.

Além disso, observa-se que além dos pesticidas imazapique e imazetapir encontrados em todas as amostras analisadas, foram detectados também resíduos dos pesticidas tiametoxam e fipronil que frequentemente são utilizados no cultivo de arroz irrigado. Nota-se, que o inseticida tiametoxam apresentou maiores valores de concentração (em µg kg^{-1}) em relação aos outros pesticidas encontrados nas

amostras de solo. A amostra A2 apresentou também resíduos do pesticida clomazona. A presença desses resíduos de pesticidas nas amostras de solo analisadas pode ser explicada possivelmente pelo fato que esses pesticidas são provenientes de cultivos anteriores realizados na área de coleta deste solo. Observa-se, também, que para a grande maioria das amostras analisadas não foram encontrados resíduos dos pesticidas propiconazol e trifloxistrobina.

É importante ressaltar que não existe legislação brasileira que defina limites máximos de resíduos para pesticidas em solo (AMARANTE *et al*., 2002), tornando-se inviável a comparação da concentração destes resíduos de pesticidas encontrados no solo em relação aos limites permitidos. Apesar disso, a presença de resíduos de pesticidas em solos deve ser estudada, devido ao risco que eles oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação.

Dessa forma, através dos resultados obtidos nas análises de amostras reais, confirma-se a eficiência e a aplicabilidade do método otimizado neste trabalho, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS, para a determinação de resíduos dos pesticidas em estudo.

5 CONCLUSÕES

O método de extração QuEChERS modificado otimizado neste trabalho, apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos e com baixa exposição ao analista.

O pequeno consumo de reagentes e a menor geração de resíduos tornam o método QuEChERS modificado vantajoso em comparação com os métodos de extração convencionais, atendendo portanto aos princípios da química verde, podendo o mesmo ser utilizado como um protocolo para investigar a presença de resíduos de tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado.

Além disso, o procedimento de preparo de amostra otimizado neste trabalho contribui de forma expressiva no sentido do desenvolvimento de um método analítico empregando técnicas modernas de extração. Não há, até o momento, trabalhos científicos publicados sobre a extração de herbicidas do grupo imidazolinonas em solos utilizando o método QuEChERS.

O método proposto, utilizando QuEChERS para a extração de resíduos de pesticidas em solo e determinação por LC-MS/MS, demonstrou ser eficiente, apresentando resultados de recuperação satisfatórios, entre 70 e 120%, para a grande maioria dos compostos, com valores de RSD < 20%. Dessa maneira, o método validado está de acordo com os valores sugeridos na literatura para a análise de resíduos de pesticidas por métodos cromatográficos (SANCO, 2007).

A determinação dos pesticidas em estudo por LC-MS/MS foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise menor que 15 min.

Entretanto, os componentes da matriz afetaram a eficiência da ionização de alguns analitos por LC-MS/MS, evidenciando a importância de estudar o efeito matriz na determinação de pesticidas em matrizes ambientais. Neste estudo, a

influência do efeito matriz para os compostos tiametoxam, imazapique e imazetapir, confirmou a necessidade de utilização de curvas analíticas preparadas na matriz e não em solvente para a quantificação, evitando-se assim, resultados errôneos.

As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,2 e 20,0 µg L^{-1} para propiconazol e entre 1,0 e 100,0 µg L^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina, com valores de coeficientes de determinação maiores que 0,99. Os valores de limite de quantificação do método de 0,4 µg kg^{-1} para propiconazol e de 2,0 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina, permitem que sejam determinados resíduos destes pesticidas em amostras de solo com grande confiabilidade.

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos pesticidas tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, propiconazol, fipronil e trifloxistrobina em amostras de solo provenientes de um experimento realizado no Campus da UFSM, mostrando-se bastante eficiente.

Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise de resíduos de pesticidas em solo proveniente de lavoura de arroz irrigado, podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises de resíduos de pesticidas, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades laboratoriais normalmente geram consideráveis quantidades de resíduos líquidos e sólidos proveniente dos ensaios analíticos, que devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, os resíduos líquidos foram recolhidos, colocados em recipientes separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados para o Almoxarifado, responsável pelo tratamento final dos resíduos gerados, no Departamento de Química da UFSM.

Já os resíduos sólidos, foram colocados em sacos plásticos de cor preta, devidamente rotulados. e encaminhados ao Almoxafirado do Departamento de Química da UFSM.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação, no solo, de outros pesticidas também utilizados na lavoura arrozeira;

- Estudo a campo e no laboratório, da estabilidade dos pesticidas estudados em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, amostras de grão de arroz e em amostras de solo, com o objetivo de traçar o perfil de persistência destes pesticidas no sistema de produção de arroz irrigado.

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.

ALDER, L. *et al*. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Review**, v. 25, p. 838-865, 2006.

ALISTER, C.; KOGAN, M. Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone-resistant maize and their carryover effect on rotational crops. **Crop Protection**, v. 24, p. 375-379, 2005.

AMARANTE J. O. *et al*. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrila extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. **Journal of the Association of Official Analitycal Chemists International**, v.86, p.412-431, 2003.

ANGHINONI, I. *et al*. **Fertilidade dos Solos Cultivados com Arroz Irrigado no Rio Grande do Sul**. Cachoeirinha: Instituto Rio Grandense do Arroz. EEA/Divisão de Pesquisa, 2004. 51 p. (Boletim Técnico).

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RE n^0 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 26 jan. 2010.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos. 2005. Disponível em: < http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso >. Acesso em: 27 jan. 2010.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Brasília. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm >. Acesso em: 28 jan. 2010.

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

AZEVEDO, A. C.; DALMOLIN, R. S. D. **Solos e Ambiente: uma introdução**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2006. 100 p.

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

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

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2. ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BARIZON, R. R. M.; *et al*. Sorção e dessorção do imazaquim em solos com diferentes características granulométricas, químicas e mineralógicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 695-703, 2005.

BATTAGLIN, W. A. *et al*. Occurrence of sulfonylurea, sulphonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. **Science Total Environmental**, v. 248, n. 2-3, p. 123-133, 2000.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Consórcio Museu Emílio Goeldi. **Agricultura sustentável**. Brasília, 2000.

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: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm >. Acesso em: 11 abr. 2009.

BRITO, N. M. *et al*. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CABRERA, L.; COSTA F.P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região Sul do Estado do RS. **Química Nova,** v. 31, p.1982-1986, 2008.

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

CASSIANO, M. N. *et al*. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CAVALCANTE, R. M. *et al*. Técnicas de extrações e procedimentos de *clean-up* para a determinação de hidrocarbonetos policílicos aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1371-1377, 2008.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/definicao.asp>. Acesso em: 12 jun. 2010.

CHEN, L. *et al*. Residue dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 73-77, 2010.

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

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

D' ASCENZO, G. *et al*. Optimization of High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Apparatus for Determination of Imidazolinone Herbicides in Soil at Levels of a Few PPB. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 12, p. 1359-1365, 1998.

DEMOLINER, A. **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

DIÉZ, C. *et al*. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solidphase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

DONG, F. *et al*. Determination of metaflumizone residues in cabbage and soil using ultra-performance liquid chromatography/ESI-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3692-3697, 2009.

DROZDZYNSKI, D. *et al*. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 394, p. 2241-2247, 2009.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação dos solos**. Rio de Janeiro, 1999. 412 p.

EMBRAPA. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Embrapa Clima Temperado, 2007. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/>. Acesso em: 08 jun. 2009.

EURACHEM Guide. 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: 15 fev. 2010.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/375/default.aspx>. Acesso em: 05 jun. 2009.

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

FAVORETTO, C. M. *et al*. Determinação da humificação da matéria orgânica de um latossolo e de suas frações organo-minerais. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1994-1996, 2008.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Editora Elsevier, Amsterdam, v. XLIII, Capítulo 4, 2005.

GARP. ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. 1999.

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. 148 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

GRANATSTAIN, D.; BEZDICEK, D. F. The need for a soil quality index: local and regional perspective. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 7, p. 12-16, 1992.

GRÜTZMACHER, D. D. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e 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.

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

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

HIGARASHI, M. M. **Processos Oxidativos Avançados Aplicados à Remediação de Solos Brasileiros Contaminados com Pesticidas**. 1999. 77p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, UNICAMP.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. 2001. Disponível em <http://www.labcompliance.com>. Acesso em: 22 abr. 2010.

HYÖTYLÄINEN, T. Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 14-28, 2007.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**, Revisão 02 - Junho/2007: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.

IUSS, Relatórios apresentados no *18th World Congress of Soil Science*, International Union of Soil Sciences, 9 e 14 de Julho de 2006, Philadelphia, USA.

JARDIM, I. *et al*. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JAVARONI, R. *et al*. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açucar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999.

JONATAN, T. **Introduction of environmental studies**. 3rd ed. New York: Saunders College, 1989, 304 p.

KAH, M. *et al.* Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil, **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 55, p. 4487-4492, 2007.

KAHLE, M. Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. **Environonmental Science & Technology**, v. 42, p. 7193 -7200, 2008.

KERNS, E. *et al*. Recent Applications of Accelerated Structure Analysis Protocols. 1997. Disponível em: < http://www.netsci.org/Science/LIMS/feature01.html>. Acesso em: 02 nov. 2010.

KLAMT, E.; KÄMPF, N.; SCHNEIDER, P. **Solos de várzea no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS: Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Departamento de Solos, 1985. 43 p. Boletim Técnico Nº 4.

KRAEMER, A. F. **Residual da mistura formulada dos herbicidas imazethapyr e imazapic em áreas de arroz sob diferentes manejos de solo**. 2008. 29 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - UFSM, Santa Maria, RS.

KRUVE, A. *et al.* Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

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

LAGANA, A. *et al.* Simultaneous Determination of Imidazolinone Herbicides from Soil and Natural Waters Using Soil Column Extraction and Off-Line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography with UV Detection or Liquid Chromatography/ Electrospray Mass Spectroscopy. **Analytical Chemistry,** v. 70, p. 121-130, 1998.

LAGANA, A. *et al.* Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction. **Analytica Chimica Acta,** v. 415, p. 41-56, 2000.

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

LANÇAS, M. F. *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, A. R.; LIGHTFIELD, J. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LEHOTAY, S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.

LESUEUR, C. *et al.* Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, n.1, p. 284-293, 2008.

LEVIGARD, Y. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervodo no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), ENSP, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

LISKA, I.; SLOBODNÍK, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analyzing polar pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 235-258, 1996.

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 jun. 2009.

MANAHAN, S. E. **Fundamentals of Environmental Chemistry**. Boca Raton, CRC Press, 2001, 993 p.

MARCHESE, S. *et al*. Pressurized-liquid extraction for determination of imidazolinone herbicides in soil. **Chromatographia**, v. 54, p. 531-535, 2001.

MARCHEZAN, E. *et al.* Consumo de água e perdas de nutrientese e de sedimentos na água de drenagem inicial do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 36, p. 65-71, 2006.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MEURER E. J. **Fundamentos de Química do Solo**, UFRGS, Porto Alegre, 2000. 174p.

MULLER, K. *et al.* A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** v.120, p. 93-116, 2007.

OLIVEIRA, M. F. Comportamento dos herbicidas no ambiente. Disponível em: <http://www.dag.uem.br/napd/up/material_88833>. Acesso em: 05 jan. 2010.

OLIVEIRA, V. *et al.* Sorção do inseticida tiametoxam em latossolos sob efeito de fosfato e vinhaça. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1432-1435, 2009.

PESTICIDE ACTION NETWORK. PAN. Union King. Disponível em: <http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/fipronil.htm>. Acesso em: 31 out. 2009.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and Food Applications of LC-tandem Mass Espectrometry in Pesticide-Resídue Analysis: an overview. **Mass Espectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PICÓ, Y. *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

PINTO, C. G. *et al*. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, p. 385-391, 2010.

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. 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. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1620-1634, 2009.

PRIMEL, E. G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. (eds.) **Weed Ecology: implications for management**. New York: John Wiley & Sons, Inc. (editora). 2ª edição, 1997, 589 p.

RAMEZANI, M. *et al.* Improved extraction and clean-up of imidazolinone herbicides from soil solutions using different solid-phase sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5092-5100, 2009.

RAMOS, A. M. *et al*. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2307-2319, 2010.

RASHID, A. *et al.* Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2933 -2939, 2010.

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

RÉFFEGA, A. A. G. **Acerca da evolução do conceito de solo** (Revisto), Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 1998, p. 2-21.

RESENDE, M. *et al.* **Pedologia: Base para distinção de ambientes.** Viçosa, UFV, 4. ed. 2002. 338 p.

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: Editora Bookman, 2ª ed., 2009, 256 p.

ROGATSKY, E.; STEIN, S. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n.11, p. 1757-1759, 2005.

ROMERO-GONZÁLEZ, R. *et al*. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211-225, 2008.

ROSEN, R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 246-251, 2007.

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.

SANCO, COMISSION 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. 31/10/2007.

SANTOS, J. S. **Remediação de solos contaminados com agrotóxicos pelo tratamento com radiação gama**. 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear). USP, São Paulo, SP.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51-61, 2000.

SHANER, D. L.; HORNFORD, R. **Soil interactions of imidazolinone herbicide used in Canada**. Canadian Weed Science Society 3, v. 3, p. 23-30, 2005.

SHI, C. *et al.* Determination of Oxadiargyl Residues in Environmental Samples and Rice Samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 236-239, 2010.

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

SILVA, A. A. *et al*. Herbicidas: Comportamento no solo. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, Viçosa: Ed. UFV, Cap 5, p. 189-248, 2007.

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

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). Disponível em: < http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php >. Acesso em: 30 ago. 2010.

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

SPADOTTO, C. A. *et al*. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. (Documentos, 42) Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004. 29 p.

STEPAN, R.; TICHA, J.; HAJSLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1231-1242, 2005.

STUBER, M.; REEMTSMA, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 910-916, 2004.

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 e-Pesticide Manual**, **Thirtheen Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TROSKEN, E. R. *et al.* Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 113-119, 2005.

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

WARE, G. W. **The Pesticide Book**. Fresno: Thomson Publications, 4ª ed. 1994. p. 3-12.

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.

ZHU, H. X.; SELIM, H. M. Hysteretic behavior of metolachlor adsorption-desorption in soils. **Soil Science**, v. 165, p. 632-645, 2000.

ZROSTLÍKOVÁ, J. *et al*. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, n. 1-2, p. 73-86, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Ensaios de fortificação utilizando o método QuEChERS modificado

Ensaios de fortificação para propiconazol

Nível de fortificação (µg kg^{-1})	Concentração da solução de fortificação (mg L^{-1})	Volume adicionado da soluçao (µL)	Quantidade de solo (g)	Volume de solvente (mL)	*Fator de diluição
40	2,0	100	5,0	10	2
20	2,0	50	5,0	10	2
4	0,2	100	5,0	10	2

* Fator = volume do solvente /quantidade de amostra

Ensaios de fortificação para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina

Nível de fortificação (µg kg^{-1})	Concentração da solução de fortificação (mg L^{-1})	Volume adicionado da solução (µL)	Quantidade de solo (g)	Volume de solvente (mL)	*Fator de diluição
200	10,0	100	5,0	10	2
100	10,0	50	5,0	10	2
20	1,0	100	5,0	10	2

* Fator = volume do solvente /quantidade de amostra

Obs: As fortificações das amostras de solo “branco” foram realizadas com todos os pesticidas simultaneamente nos níveis de concentração de 4; 20 e 40 µg kg^{-1} para propiconazol e nas concentrações de 20; 100 e 200 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina. Para injeção no sistema LC-MS/MS foram realizadas diluições do extrato na proporção 1:1 (v/v) em fase móvel (água ultrapura e acetonitrila, ambas acidificadas com 100 mmol L^{-1} de ácido fórmico), de modo que os níveis de concentrações finais avaliados foram 2, 10 e 20 µg kg^{-1} para propiconazol e 10, 50 e 100 µg kg^{-1} para tiametoxam, imazapique, imazetapir, clomazona, fipronil e trifloxistrobina.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo