

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM GRÃOS DE  
SOJA**

Autora: Liane Maldaner

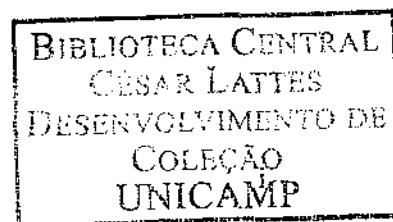
Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Fevereiro de 2007



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M292d	<p>Maldaner, Liane Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em grãos de soja / Liane Maldaner.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Cesar Costapinto Santana. Co-orientador: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Soja. 2. Produtos químicos agrícolas. 3. Extração (Química). 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	--

Título em Inglês: Development and validation of methodology for determination of pesticides in soybeans.

Palavras-chave em Inglês: Soy, Pesticides, MSPD, Method validation, HPLC-DAD.

Área de concentração: ; Desenvolvimento de processos biotecnológicos.

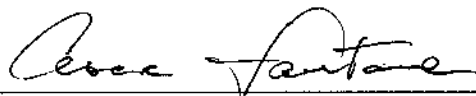
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Carol Hollingworth Collins, Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz.

Data da defesa: 23/02/2007

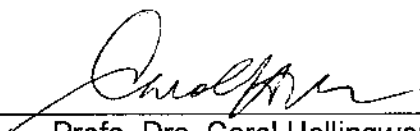
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Liane Maldaner e aprovada em 23 de fevereiro de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador



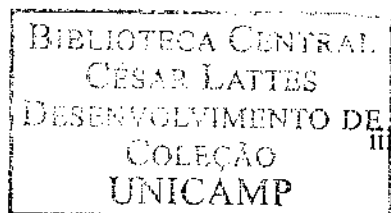
---

Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins



---

Profa. Dra. Sônia Claudia do Nascimento de Queiroz



Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador

200713240

## AGRADECIMENTOS

À minha Família, em especial  
aos meus pais, Marina e Darcysio (*in memoriam*) que não  
pouparam esforços, incentivo, dedicação e amor, *SEMPRE*.

Ao Rafael,  
Pela compreensão e paciência.  
Pelo amor e companheirismo.

Obrigado de coração!

À Prof. Isabel Jardim, por ter sido incansável para que eu pudesse ter essa oportunidade e realizar esse trabalho. Pela compreensão, pela confiança, pela amizade e por tudo aquilo que tive oportunidade de aprender. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Cesar Santana, pela oportunidade da realização do mestrado e pela orientação.

Aos Profs. Carol e Kenneth Collins, pela prontidão em ajudar e contribuir no desenvolvimento do trabalho.

Ao Anízio e a Lais, pelas muitas contribuições ao longo do trabalho. Pela amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos do LabCrom: Camila, César, Louise, Vanessa, Priscila, Priscila Lalli, Elias, Thais, Márcia, Anízio, Lais, Mariza, Rose, Paulo, Rafaela, Patrícia, Lívia, Cristien, Dione, Josimara, Marcelo, Lúcia, Alessandra, Wilker, Adriana, André, Roberta, Daniel e Fernanda, pelo convívio e bons momentos.

Aos colegas e amigos da FEQ: Alessandra, Raquel, Amaro, Ivanildo, João Paulo, e Paula pelas constantes ajudas nas disciplinas e pela amizade.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

E, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Obrigado!!

## RESUMO

A soja é um dos principais produtos de exportação do Brasil, sendo muito empregada na alimentação, por ser um alimento funcional, rico em vitaminas, proteínas e sais minerais. A crescente demanda e a busca da qualidade da soja exigem a aplicação constante, de agrotóxicos durante o seu cultivo, sendo as vezes abusiva. Por outro lado, para garantir o bem estar da população, uma vez que a maioria dos agrotóxicos são prejudiciais à saúde, as principais agências reguladoras impõem limites máximos de resíduos para os agrotóxicos que podem estar presentes nos alimentos. Em vista disso, neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método para determinação dos principais agrotóxicos (imazetapir, imazaquim, metsulfurom-metil, carboxim, clorimurom-etil e tebuconazol) usados nas lavouras de soja, empregando a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) como técnica de extração, seguida de uma etapa de *clean-up* e posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados mostraram que a DMFS é adequada para amostras sólidas e complexas, como a soja, é rápida e simples, entretanto, exige a otimização de várias variáveis durante o processo de desenvolvimento da metodologia. A etapa de *clean-up* foi necessária devido a quantidade de interferentes provenientes da matriz, que foram, na sua maioria, eliminados com o uso de uma co-coluna de C8. Permaneceram interferentes que co-eluíram nos tempos de retenção do imazetapir e do metsulfurom, que não invalidaram suas determinações, mas prejudicaram suas quantificações. A validação da metodologia mostrou bons resultados de recuperação para todos os agrotóxicos (60 -120 %), com exceção para o metsulfurom e tebuconazol no nível mais baixo de concentração; precisão < 15 % para todos os compostos, com exceção do imazetapir e metsulfurom; boa linearidade, coeficientes de correlação > 0,90 e nenhuma tendência foi visualizada no gráfico de resíduos. O limite de quantificação do método permitiu que os limites máximos de resíduos impostos pelas agências reguladoras para todos os compostos estudados fossem atingidos, com exceção para o imazetapir, devido a co-eluição do interferente. As amostras provenientes de uma cultura de soja analisadas não apresentaram contaminação pelos agrotóxicos em estudo.

Palavras-chave: soja, agrotóxicos, DMFS, validação de método, CLAE-DAD

## ABSTRACT

Soy is one of principal Brazilian exportation products of Brazil as it is much used as a foodstuff because of its functional properties: rich in vitamins, proteins and minerals. The increasing quantity and quality of soy demands a constant and even expressive application of pesticides during soy cultivation. On the other hand, for preservation of public health, since most pesticides may be prejudicial to health, the main regulatory agencies impose the maximum residues limits of pesticides in food. Thus, in this work, a method to determine the main pesticides applied in soy cultivation (imazethapyr, imazaquin, metsulfuron-methyl, carboxin, chlorimuror-ethyl and tebuconazole) using matrix solid phase dispersion (MSPD) as the extraction technique, followed by a clean-up step and subsequent chromatographic analysis by high performance liquid chromatography – diode array detection (HPLC-DAD), was developed and validated. The results have shown that MSPD is a suitable extraction procedure for solid and complex matrices, as is the case of soy and is a rapid and simple technique. However, it requires the optimization of some variables during the process of methodology development. The clean-up step was necessary because of the amount of matrix impurities, but the majority was eliminated using a C8 co-column. Remaining impurities with the same retention time as imazethapyr and metsulfuron do not invalidate the determination but prejudice the quantification of these compounds. The validated method has shown good results of recuperation for all pesticides (60 – 120 %) except for metsulfuron and tebuconazole at the lowest concentration level, precision < 15 % for all compounds, except for imazethapyr and metsulfuron, good linearity and correlation coefficients > 0.90 without visible bias. The quantification limit of the method allows determinations below the maximum residues limits for all pesticides, except for the imazethapyr, due to the presence of an impurity. Soy samples from soy cultivation were analyzed and did not present contamination for the pesticides under study.

Keywords: soy, pesticides, MSPD, method validation, HPLC-DAD



## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
NOMENCLATURA.....	xv
1 – INTRODUÇÃO .....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 – SOJA .....	2
2.1.1 – SOJA E SUAS ORIGENS .....	2
2.1.2 – SOJA NO BRASIL.....	2
2.1.3 – BENEFÍCIOS DA SOJA .....	4
2.2 – AGROTÓXICOS COMO CONTAMINANTES.....	6
2.3 – MÉTODOS DE ANÁLISE DOS AGROTÓXICOS .....	10
2.3.1 – TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....	11
2.3.1.1 – DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA .....	13
2.4 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	16
2.4.1 – PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS .....	17
2.4.1.1 – SELETIVIDADE.....	17
2.4.1.2 – LINEARIDADE E FAIXA LINEAR.....	17
2.4.1.3 – PRECISÃO .....	19
2.4.1.4 – EXATIDÃO.....	21
2.4.1.5 – LIMITE DE DETECÇÃO (LD) .....	24
2.4.1.6 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	25
2.4.1.7 – ROBUSTEZ .....	26
2.5 – AGROTÓXICOS ESCOLHIDOS PARA O ESTUDO .....	26
2.5.1 – IMAZETAPIR .....	27
2.5.2 – IMAZAQUIM .....	27
2.5.3 – METSULFUROM- METIL .....	28
2.5.4 – CARBOXIM.....	28
2.5.5 – CLORIMUROM – ETIL.....	29
2.5.6 – TEBUCONAZOL.....	29
3 – OBJETIVOS .....	30
4 – EXPERIMENTAL.....	31

<b>4.1 – MATERIAIS .....</b>	<b>31</b>
4.1.1 – REAGENTES, SOLVENTES E SORVENTES .....	31
4.1.2 – EQUIPAMENTOS .....	32
<b>4.2 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS .....</b>	<b>33</b>
4.2.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO .....	33
4.2.2 – PREPARO DA FASE MÓVEL .....	33
4.2.3 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	34
4.2.4 – CONFIRMAÇÃO DOS AGROTÓXICOS .....	34
4.2.5 – ESCOLHA DO COMPRIMENTO DE ONDA DE TRABALHO .....	34
<b>4.3 – CURVA ANALÍTICA .....</b>	<b>35</b>
4.3.1 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA SEM SUPERPOSIÇÃO DA MATRIZ .....	35
4.3.2 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA COM SUPERPOSIÇÃO DA MATRIZ .....	35
<b>4.4 – AMOSTRA DE SOJA .....</b>	<b>35</b>
4.4.1 – PROVENIENTE DE SOJA ORGÂNICA .....	35
4.4.2 – PROVENIENTE DE UMA PLANTAÇÃO DE SOJA .....	36
<b>4.5 – METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.7 – ANÁLISE DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE UMA CULTURA DE SOJA .....</b>	<b>37</b>
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	38
5.2 – CONFIRMAÇÃO DOS AGROTÓXICOS .....	40
5.3 – OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO .....	41
5.3.1 – SORVENTE DE DISPERSÃO .....	41
5.3.2 – QUANTIDADE DE SORVENTE E AMOSTRA .....	41
5.3.3 – TEMPOS DE INTERAÇÃO .....	42
5.3.3.1 – TEMPO DE INTERAÇÃO DOS AGROTÓXICOS COM A AMOSTRA .....	42
5.3.3.2 – TEMPO DE DISPERSÃO .....	42
5.3.3.3 – TEMPO DE INTERAÇÃO APÓS A DISPERSÃO .....	42
5.3.4 – SORVENTES PARA CLEAN-UP .....	43
5.3.5 – SOLVENTES PARA ELUIÇÃO .....	45
5.3.6 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO .....	47
5.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	49
5.4.1 – SELETIVIDADE .....	49
5.4.2 – LINEARIDADE, FAIXA LINEAR, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	50
5.4.3 – EXATIDÃO E PRECISÃO .....	53
5.4.4 – ROBUSTEZ .....	55
5.5 – ANÁLISE DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE UMA CULTURA DE SOJA .....	55

<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Evolução da soja no Brasil. .... 4
- Figura 2** - Produção mundial de agrotóxicos formulados. Os dados de 2005 foram estimados (Carvalho, 2006). .... 7
- Figura 3** - Representação esquemática do procedimento de extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (Ferrer *et al.*, 2005). .... 14
- Figura 4** - Cromatograma da separação dos agrotóxicos: 1 – Imazetapir, 2 – Imazaquim, 3 – Metsulfurom-metil, 4 – Carboxim, 5 – Clorimurom-etil e 6 – Tebuconazol a partir de uma solução padrão de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ . Condições cromatográficas: FM: acetonitrila:água (acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico), vazão  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , eluição por gradiente, com a seguinte programação: 0 min – 30:70; 10 min – 40:60; 13 min – 55:45; 15 min - 70:30; 17 min – 70:30; 18 min – 60:40; 20 min – 50:50; 22 min – 30:70; 28 min – 30:70. Coluna C18 com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de  $150 \times 4,6 \text{ mm}$ , tamanho de partícula de  $4 \mu\text{m}$  e coluna de guarda com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de  $4 \times 3 \text{ mm}$ , tamanho de partícula de  $4 \mu\text{m}$ , detecção por arranjo de diodos a 221 nm. .... 39
- Figura 5** - Cromatogramas individuais dos agrotóxicos na concentração de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ , com o seu tempo de retenção e seu respectivo espectro de absorção no UV. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4. .... 40
- Figura 6** - Variação da porcentagem de recuperação com o tempo de interação dos agrotóxicos com a sílica, após a dispersão. .... 43
- Figura 7** - Cromatogramas das amostras testemunha eluídas sem o uso de co-coluna e com co-coluna de Florisil e C8 a 221 nm. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4. .... 45
- Figura 8** - Recuperações dos agrotóxicos em estudo obtidas com diferentes solventes de eluição ( $n=2$ ) durante a etapa de otimização. .... 46
- Figura 9** - Cromatogramas das amostras branco, nos comprimentos de onda máximos de cada composto. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4, com menor atenuação do detector. .... 48
- Figura 10** - Cromatogramas das amostras testemunha e de soja fortificada ( $2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas após a otimização da metodologia de extração. Identificação: 1 – Imazetapir, 2 – Carboxim, 3 – Clorimurom-etil, 4 – Imazaquim, 5 –

Metsulfurom-metil e 6 – Tebuconazol. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4.....	49
<b>Figura 11</b> - Curvas analíticas dos agrotóxicos estudados obtidas para a padronização externa <i>sem</i> superposição da matriz e para padronização externa <i>com</i> superposição da matriz.....	52
<b>Figura 12</b> - Cromatogramas das amostras de soja (CD-205) sem fortificação (A) e fortificada (B) com 3 µg g <sup>-1</sup> dos agrotóxicos, detecção a 221 nm. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4. Identificação dos agrotóxicos: 1 – Imazetapir, 2 – Imazaquim, 3 – Metsulfurom-metil, 4 – Carboxim, 5 – Clorimurom-etil e 6 – Tebuconazol.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Composição da soja.....	6
<b>TABELA 2</b> - Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos impostos pela ANVISA para os grãos de soja.....	8
<b>TABELA 3</b> - Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos impostos pelo Codex Alimentarius para os grãos de soja secos e verdes e para o óleo bruto de soja.....	9
<b>TABELA 4</b> - Parâmetros das curvas analíticas para os agrotóxicos por padronização externa <i>sem</i> e <i>com</i> superposição da matriz.....	53
<b>TABELA 5</b> – Faixa linear, limites de detecção e quantificação do equipamento e do método desenvolvido <i>com</i> superposição da matriz.....	53
<b>TABELA 6</b> - Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida.....	55

## NOMENCLATURA

<i>CV</i>	Coeficiente de Variação
<i>r</i>	Coeficiente de Correlação
R	Recuperação
<i>r<sub>s</sub></i>	Resíduos
<i>RSD</i>	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
<i>s</i>	Estimativa do Desvio Padrão Absoluto
<i>t<sub>R</sub></i>	Tempo de Retenção

### *Símbolos Gregos*

$\lambda$	Comprimento de Onda
-----------	---------------------

### *Abreviaturas*

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EUA	Estados Unidos da América
CARB	Carboxim
CG	Cromatografia Gasosa
CG-DCE	Cromatografia Gasosa com detector por Captura de Elétrons
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CG-EM-EM	Cromatografia Gasosa acoplada em Tandem à Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CL-EM-EM	Cromatografia Líquida acoplada em Tandem à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos
CODEX ALIMENTARIUS	Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling

CLOR	Clorimurrom-etil
CPG	Cromatografia por Permeação em Gel
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
FAO	Food and Agriculture Organization
F1	1 x LQE
F2	2 x LQE
F3	10 x LQE
FR	Fase Reversa
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
Há	hectare
ICH	International Conference on Harmonization
IMZQ	Imazaquim
IMZT	Imazetapir
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Limite de Detecção
LDE	Limite de Detecção do Equipamento
LDM	Limite de Detecção do Método
LMR	Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos
LQ	Limite de Quantificação
LQE	Limite de Quantificação do Equipamento
LQM	Limite de Quantificação do Método
METS	Metsulfurom-metil
MRC	Materiais de Referência Certificados
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
TEBU	Tebuconazol
US-FDA	United States Food and Drug Administration
USP	United States Pharmacopeia Convention
UV	Ultravioleta



## 1 – INTRODUÇÃO

No desenvolvimento da agricultura, os agrotóxicos têm se tornado um importante agente de proteção das plantas aumentando a quantidade e a qualidade dos alimentos. Entretanto, o uso contínuo e abusivo de agrotóxicos deixa resíduos e contamina as águas, o solo e os alimentos, e, conseqüentemente, prejudica a saúde dos seres humanos e polui o meio ambiente.

Associado ao crescimento da agricultura, está a expansão da cultura da soja, que vem sendo empregada como alimento, por ser uma leguminosa que apresenta um alto valor nutritivo, uma composição química rica em óleos, vitaminas, alguns minerais como cálcio e ferro, e teor protéico superior a 34%. Destaca-se também como uma cultura de alta produtividade e fácil adaptação em quase todas as regiões (Correia, Oliveira e Tornisielo, 2001).

Com o aumento na demanda de produção de soja, o uso de agrotóxicos nas lavouras tornou-se essencial para viabilizar a produção e garantir a qualidade do produto. Assim, a aplicação constante de agrotóxicos tem sido uma das medidas necessárias para os agricultores.

Devido a expansão da cultura da soja, da necessidade de aplicação de agrotóxicos e do consumo da soja na alimentação, torna-se indispensável o controle rigoroso para avaliação da possível contaminação por resíduos de agrotóxicos. Para isso, faz-se uso de técnicas analíticas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa (CG), que detectam simultaneamente um grande número de compostos.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – SOJA

#### 2.1.1 – SOJA E SUAS ORIGENS

A soja (*Glycine Max (L.) Merrill*) hoje cultivada é muito diferente das ancestrais que lhe deram origem, que eram plantas rasteiras que se desenvolveram na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China.

A evolução da soja começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (Embrapa Soja, 2006).

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, o Ocidente ignorou o seu cultivo até a segunda década do século vinte, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram a sua exploração comercial (primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão).

Em 1941, a área de soja cultivada nos EUA cresceu de forma exponencial, bem como no Brasil e na Argentina.

Em 2003, os EUA figuraram como os maiores produtores a nível mundial, com uma produção de 80 milhões de toneladas, e o Brasil foi o segundo produtor mundial, responsável por 52 dos 194 milhões de toneladas produzidas em nível global ou por 26,8 % da produção mundial (Embrapa Soja, 2006).

#### 2.1.2 – SOJA NO BRASIL

A soja chegou ao Brasil via os Estados Unidos, em 1882, quando Gustavo Dutra, professor da Escola de Agronomia da Bahia, realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares provenientes dos Estados Unidos.

Em 1891, testes de adaptação de cultivares semelhantes aos conduzidos por Dutra na Bahia foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, estado de São Paulo (SP), que em 1900 e 1901 promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas.

Em 1914, teve-se o primeiro registro do cultivo de soja no Rio Grande do Sul (RS), no município de Santa Rosa, onde a cultura encontrou condições efetivas para se desenvolver e expandir, devido às semelhanças climáticas do ecossistema de origem (sul dos EUA) dos materiais genéticos existentes no país, com as condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil.

Mas, foi somente a partir dos anos 40 que a soja adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS: área cultivada de 640 hectares (ha), produção de 450 toneladas e rendimento de 700 kg/ha (Embrapa Soja, 2006).

A partir de 1960, a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil, impulsionada pela política de subsídios ao trigo, visando auto-suficiência. Nessa década, a sua produção multiplicou-se por cinco (passou de 206 mil toneladas, em 1960, para 1,056 milhões de toneladas, em 1969) e 98% desse volume era produzido nos três estados da região sul.

Apesar do crescimento significativo da produção no decorrer dos anos 60, foi na década seguinte que a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979). Esse crescimento se deveu, não apenas ao aumento da área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares), mas, também, ao expressivo incremento da produtividade (1,14 para 1,73 t/ha) graças às novas tecnologias disponibilizadas aos produtores pela pesquisa brasileira. Mais de 80% do volume produzido na época ainda se concentrava nos três estados da região sul do Brasil.

Nas décadas de 1980 e 1990 repetiu-se, na região tropical do Brasil, o crescimento explosivo da produção ocorrido nas duas décadas anteriores na região sul. Em 1970, menos de 2% da produção nacional de soja era colhida no centro-oeste. Em 1980, esse percentual passou para 20%, em 1990 já era superior a 40% e em 2003 foi próximo dos 60%, com tendências a ocupar maior espaço a cada nova safra. Essa transformação promoveu o Estado do Mato

Grosso, de produtor marginal a líder nacional de produção e de produtividade de soja, com boas perspectivas de consolidar-se nessa posição.

A soja foi a única cultura a ter um crescimento expressivo na sua área cultivada ao longo das últimas três décadas e a sua evolução no Brasil pode ser visualizada na Figura 1 (Embrapa Soja, 2006).

A soja brasileira é produzida de Norte a Sul do País. Os principais estados produtores, em ordem decrescente, são o Mato Grosso, o Paraná e o Rio Grande do Sul. O Centro-Oeste tornou-se a principal região produtora, sendo atualmente responsável por cerca de 40% do total da produção brasileira.

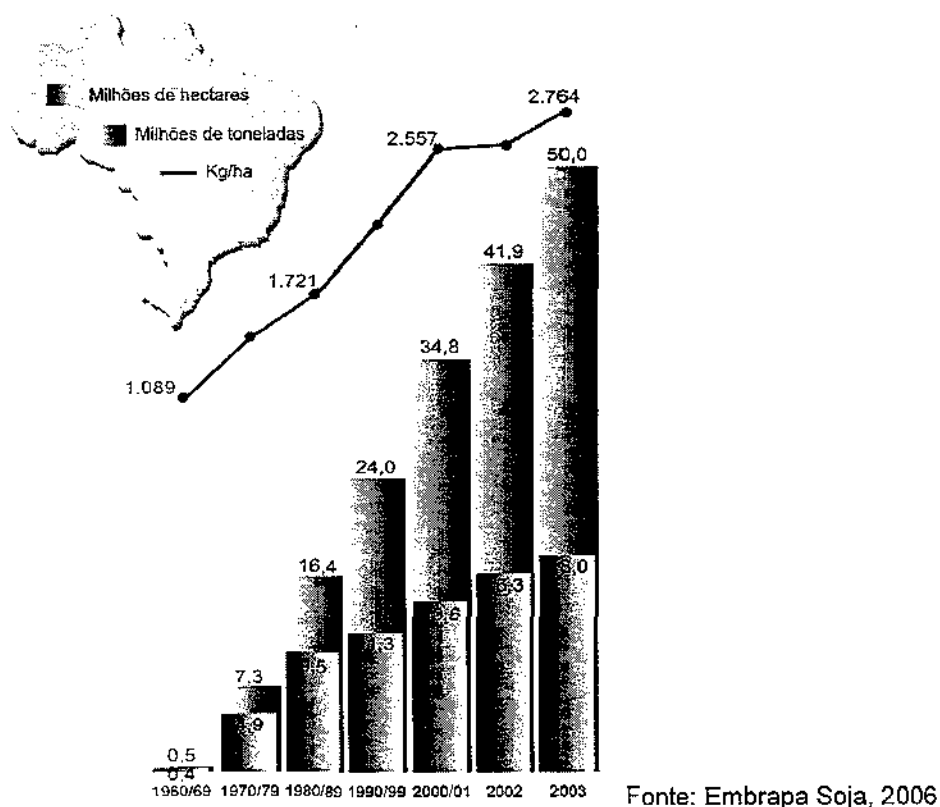


Figura 1 - Evolução da soja no Brasil.

### 2.1.3 – BENEFÍCIOS DA SOJA

Os chineses já conheciam, há milênios, os benefícios da soja para alimentação e para a saúde, mas somente nos últimos anos, os ocidentais passaram a considerar a soja como alimento funcional, que, além das funções

nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde, sendo segura para o consumo sem supervisão médica.

A soja é conhecida como um dos alimentos mais econômicos e nutritivos das últimas décadas e tem sido incorporada na dieta regular da população. A composição bioquímica e a aparência física dos grãos afetam a qualidade de vários derivados da soja, como leite, gelatina e produtos fermentados. São desejáveis também características como: alta concentração de proteínas, baixo índice de óleo e coloração clara do grão para o seu uso na alimentação (Kumar *et al.*, 2006).

A soja é considerada um alimento funcional, porque além das funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde, reduzindo os riscos de algumas doenças crônicas e degenerativas. É rica em proteínas de boa qualidade, possui ácidos graxos poliinsaturados e compostos fitoquímicos como: isoflavonas, saponinas, ftalatos, dentre outros. Também é uma excelente fonte de minerais como: cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e vitaminas do complexo B, A e E. Na Tabela 1 estão explicitadas as características gerais, os minerais, as vitaminas e as fibras alimentares encontradas nos grãos da soja.

Os efeitos fitoterápicos da soja foram identificados por pesquisadores que observaram que em países do Oriente, nos quais a população consome grandes quantidades de soja e derivados, a incidência de alguns tipos de câncer como: mama, colo de útero e próstata, bem como das doenças cardiovasculares, é muito menor que em países do Ocidente. Pesquisas constataram que a diferença estava na dieta alimentar dos orientais, que é rica em soja, seus subprodutos e arroz.

As pesquisas têm demonstrado que as isoflavonas da soja reduzem os riscos de alguns tipos de câncer, citados acima, e também é recomendada na tensão pré-menstrual, no alívio dos sintomas indesejáveis da menopausa e na prevenção da osteoporose. A *United States Food and Drug Administration* (US-FDA), órgão que regulamenta a produção de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, recomenda a ingestão diária de 25 g de proteína de soja, que correspondem à aproximadamente 60 g de grãos de soja, para o controle dos níveis de colesterol e triglicérides reduzindo, assim, os riscos de enfarto, trombose, aterosclerose e acidentes vasculares cerebrais (Embrapa Soja, 2006; Rostagno, Palma e Barroso, 2005).

A soja pode ser usada como alimento e na saúde preventiva. É também muito empregada pela indústria de adesivos e nutrientes, de alimentação animal, de adubos e na fabricação de fibra. Porém, seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível, o biodiesel.

**Tabela 1 - Composição da soja.**

Características Gerais		Minerais		Vitaminas		Fibras Alimentares*	
Energia	417 kcal	Ca	240 (mg/100g)	A	12 (µg/100g)	Solúveis	1,8 (g/100g)
Umidade	11 (g/100g)	P	580 (mg/100g)	E	1,80 (mg/100g)	Não solúveis	15,3 (g/100g)
Proteínas	38 (g/100g)	Fe	9,4 (mg/100g)	B1	0,83 (mg/100g)	Totais	17,1 (g/100g)
Lípidios	19 (g/100g)	Na	1,0 (mg/100g)	B2	0,30 (mg/100g)		
Carboidratos	23 (g/100g)	K	1900 (mg/100g)				
Açúcares	4 (g/100g)	Mg	220 (mg/100g)				
Cinzas	5 (g/100g)	Zn	3200 (µg/100g)				
		Cu	980 (µg/100g)				

\* As fibras alimentares são constituídas pelo teor das fibras propriamente ditas e pelo teor de carboidratos insolúveis.

FONTE: Kawaga, 1995

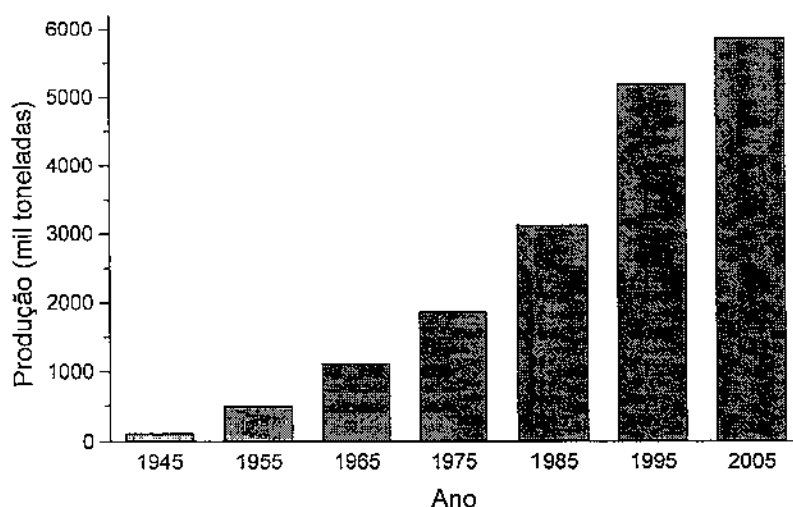
## 2.2 – AGROTÓXICOS COMO CONTAMINANTES

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pragas, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas.

Pode-se definir um agrotóxico como uma substância ou uma mistura de substâncias que previnem, destroem, repelem ou interrompem o crescimento de pragas e pestes (US-EPA, 2005). Todos os agrotóxicos químicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Assim, têm-se as definições específicas para cada agrotóxico de acordo com o seu uso, como por exemplo: herbicidas para matar ervas, inseticidas para matar insetos, fungicidas para matar fungos, raticidas para matar roedores, moluscocidas para matar moluscos (Bizuik *et al.*, 1996).

Como os agrotóxicos são compostos por diferentes substâncias ou misturas de substâncias, incluindo diferentes derivados específicos como produtos de degradação, metabólitos e impurezas, eles podem ser considerados significativamente tóxicos. De acordo com a sua composição e toxicidade, os agrotóxicos são classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (Caldas e Souza, 2000; Baird, 2002). Os estudos de Repetto e Baliga (1996) mostraram que os agrotóxicos podem danificar o sistema imunológico humano pela redução do número de glóbulos brancos. Pingali, Marquez e Palis (1994), em seus estudos, encontraram uma grande probabilidade dos problemas de visão e de pele estarem associados à exposição aos agrotóxicos.

O uso e a produção de agrotóxicos a nível mundial têm apresentado um crescimento contínuo, tanto em números quanto nas quantidades aplicadas (Figura 2). Hoje, existem registrados no mundo mais de 600 compostos, entre agrotóxicos e seus metabólitos. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) mais de 500 toneladas de agrotóxicos estão ameaçando o meio ambiente e a saúde humana em muitos países.



FONTE: Agrochemical Service

**Figura 2** - Produção mundial de agrotóxicos formulados. Os dados de 2005 foram estimados (Carvalho, 2006).

Resíduos de agrotóxicos têm sido identificados em todo meio ambiente (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas, incluindo aquelas mais distantes de sua aplicação original, como oceanos, desertos e zonas polares. Conseqüentemente, estão presentes na água e nos alimentos consumidos pela população, provocando inúmeros efeitos adversos quando essas concentrações excedem os Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos (LMR). Assim, a preocupação humana a respeito dos resíduos de agrotóxicos tem aumentado na última década (Baird, 2002; Rekha, Naik e Prasad, 2005; Carvalho, 2006).

Devido à soja ser um alimento com alto teor protéico e largamente utilizada na dieta da população, muitas agências ambientais têm imposto legislações rigorosas a respeito da qualidade dos seus grãos e derivados. Os limites máximos de resíduos de agrotóxicos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2006) e o Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2006) estão expressos nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. A US-FDA (FDA, 2006) apenas impõe limite máximo de resíduo para o agrotóxico fluazifop-P-butílico em óleo de soja, que é de (2 mg/kg).

**Tabela 2 - Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos impostos pela ANVISA para os grãos de soja.**

Agrotóxico	Grupo Químico	Classe Toxicológica	LMR (mg/kg)
2,4-D	ácido ariloxialcanóico	I	0,1
Acefato	organofosforado	III	1
Alacloro	cloroacetanilida	III	0,05
Bifentrina	piretróide	II	0,05
Bentazona	benzoatiadizinona	III	0,02
Captana	dicarboximida	IV	1
Carbendazim	Benzimidazol	III	0,5
Carboxim	carboaxanilida	III	0,2
Cianazina	triazina	II	0,02
Cipermetrina	piretróide	II	0,05
Cletodim	Oxima cicloexanodiona	II	1
Clomazona	isoxazolidinona	III	0,05
Clorimurrom-etil	sulfonituréia	III	0,05
Clorpirifós	organofosforado	II	0,01
Deltrametrina	piretróide	III	0,5
Difenoconazol	triazol	I	0,05



Diquate	bipiridílio	II	0,2
Diurrom	uréia	III	0,2
Endossulfam	clorociclodieno	I	1
Espinosade	espinosinas	III	0,01
Fenarimol	pirimidinil carbinol	III	0,05
Fenpropatrina	piretróide	II	0,05
Fipronil	pirazol	II	0,01
Fluazifop-P-butílico	ácido ariloxifenoxipropiônico	III	0,3
Glifosato	glicina substituída	IV	10
Glufosinato	homalanina substituída	III	0,05
Imazaquim	imidazolinona	III	0,05
Imazetapir	imidazolinona	III	0,1
Imidacloprido	neonicotinóide	III	0,1
Linurom	uréia	III	1
Metalaxil-M	acilalaninato	II	0,05
Metamidofós	organofosforado	I	0,01
Metsulfurom-metil	sulfoniluréia	III	-
Metomil	metilcarbamato de oxima	I	0,1
Paraquate	bipiridílio	I	0,1
Parationa-metilica	organofosforado	I	0,1
Permetrina	piretróide	III	0,01
Protiofós	organofosforado	II	0,03
Setoxidim	oxima cicloexadinona	III	0,5
Tebuconazol	triazol	IV	0,1
Tiofanato-metilico	benzimidazol	IV	0,5
Tiram	dimetilditiocarbarnato	II	-
Triasofós	organofosforado	II	0,02
Trifluralina	dinitroanilina	III	0,05

Classe Toxicológica: I – Extremamente Tóxico; II – Altamente Tóxico; III – Medianamente Tóxico e IV – Pouco Tóxico.

**Tabela 3 - Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos impostos pelo Codex Alimentarius para os grãos de soja secos e verdes e para o óleo bruto de soja.**

Agrotóxico	Grupo Químico	Classe Toxicológica	LMR (mg/kg)		
			Grãos Secos	Grãos Verdes	Óleo Bruto
2,4-D	ácido ariloxialcanóico	I	0,01		
Acefato	organofosforado	III	0,5		
Aldicarbe	metilcarbamato de oxima	I	0,02		
Azametifós	organofosforado	III	0,05		
Bentazona	benzoatiadizinona	III	0,05		
Carbaril	metilcarbamato de naftila	II	0,2		0,2

Carbendazim	Benzimidazol	III	0,2		
Cletodim	oxima cicloexanodiona	II	10		1
Cicloxidim	oxima	II	2		
Cipermetrina	piretróide	II	0,05		
Diquato	bipiridílio	II	0,05		
Endossulfam	clorociclodieno	I	0,2		
Espinosade	espinosinas	III	0,01		
Etopofrós	organofosforado	I	0,02		
Fenvalerato	piretróide	II	0,1		
Glufosinato	homoalanina substituída	III	2		
Glifosato	glicina substituída	IV	20	0,2	
Heptacloro	organoclorado	II		0,02	0,5
Metalaxil	acilalaninato	II	0,05		
Metamidofós	organofosforado	I	0,05		
Metomil	metilcarbamato de oxima	I	0,2	0,2	0,2
Paraquate	bipiridílio	I	0,1		
Permetrina	piretróide	III	0,05		0,1
Forato	organofosforado	I	0,05		
Quintozeno	cloroaromático	III	0,01		
Terbufós	organofosforado	I	0,05		
Triasofós	organofosforado	II	0,05		

### 2.3 – MÉTODOS DE ANÁLISE DOS AGROTÓXICOS

Os baixos limites de resíduos de agrotóxicos, impostos pelas agências reguladoras, requerem o desenvolvimento de procedimentos analíticos com detectabilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas, que permitam a determinação quantitativa de agrotóxicos compatíveis com os crescentes níveis de exigência.

As principais técnicas para análise de agrotóxicos são a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A expansão do emprego da CLAE na separação e quantificação de agrotóxicos deve-se às vantagens reais que ela possui em relação à CG, na qual é difícil a análise de algumas classes de resíduos de agrotóxicos que possuem instabilidade térmica, não-volatilidade e alta polaridade. Alguns desses problemas podem ser solucionados usando técnicas de derivatização, mas aumenta-se o tempo de análise, introduzem-se erros adicionais, o que torna esse procedimento não atrativo para muitos químicos (Bizuik *et al.*, 1996). Para evitar a etapa de

derivatização, a quantificação por CLAE em Fase Reversa (FR) com detecção por espectroscopia no ultravioleta (UV), por arranjo de diodos (DAD) ou por espectrometria de massas (EM) tem sido usada freqüentemente. O progresso da CLAE também deve-se ao fato de ter ocorrido um desenvolvimento de materiais de recheio mais eficientes e pela introdução da fase reversa.

### 2.3.1 – TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

A determinação de agrotóxicos em baixas concentrações por CLAE envolve uma ou mais etapas de preparo da amostra utilizando técnicas de extração e concentração, que visam isolar e concentrar os analitos de interesse a serem determinados. Essa é a etapa mais complexa do trabalho e torna-se um desafio para a obtenção de métodos rápidos, que utilizem menores quantidades de solventes orgânicos e com maior detectabilidade para matrizes com baixas concentrações dos analitos e grande quantidade de interferentes.

A análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos requer técnicas de extração cada vez mais sofisticadas, não só devido aos baixos limites de resíduos impostos pela legislação, mas principalmente pela complexidade dessas matrizes. Na maioria dos casos, as técnicas de extração, além de eficientes, devem extrair uma pequena quantidade de interferentes. Se isso não ocorrer, uma etapa de *clean-up* deve ser adicionada à etapa de extração.

De uma forma geral, para a extração de agrotóxicos dos mais diversos tipos de amostras, a extração líquido-líquido tem sido uma das técnicas mais intensamente estudadas e extensamente aplicada para extração e concentração juntamente com a extração em fase sólida (EFS), que é uma técnica de preparo de amostra relativamente simples que também pode ser usada para o *clean-up* de extratos. Muitos estudos recentes empregam estas técnicas de extração para determinações de agrotóxicos em amostras sólidas, semi-sólidas ou líquidas.

Correia, Oliveira e Tornisielo (2001) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos na vagem da soja empregando a extração líquido-líquido (método de Luke) com acetona, hexano, diclorometano, seguido de filtração, separação da fase orgânica, evaporação e análise por

cromatografia a gás. Eles alcançaram limites de quantificação de 0,01 a 0,5 mg kg<sup>-1</sup> e recuperações entre 70 e 120 %.

Rekha, Naik e Prasad (2005) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz e trigo, empregando a extração líquido-líquido com acetona, seguida de *clean-up* em coluna de Florisil e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE). Eles obtiveram limites de quantificação de 0,01 mg L<sup>-1</sup> e recuperações entre 70 e 102%.

Barrek, Paise e Grenier-Loustalot (2003) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em óleos essenciais de frutas cítricas usando extração líquido-sólido, separação e *clean-up* por extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM). Foram utilizados pentano como solvente de extração, cartucho de Florisil e diclorometano como solvente de eluição. Foram obtidos limites de quantificação entre 0,02 e 0,06 mg L<sup>-1</sup> e recuperações de 50 a 114% usando CL-EM.

Ortelli, Edder e Corvi (2004), desenvolveram uma metodologia de extração de agrotóxicos em frutas e vegetais, a partir da extração com acetato de etila e centrifugação seguida de análise por LC-EM-EM. Foram obtidos limites de quantificação de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> para todos os compostos e recuperações entre 2 e 149 %.

Lehotay, Mastovska e Yun (2005) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos gordurosos (leite, ovos e abacate) a partir do método de QuEChERS, empregando acetonitrila com 1% de ácido acético como solvente de extração e em seguida *clean-up* usando 50 mg de C18 + 150 mg de MgSO<sub>4</sub>. Os extratos foram analisados por CG-EM e CL-EM e apresentaram resultados de recuperação entre 0 e 271 % e limites de quantificação menores que 10 ng g<sup>-1</sup>.

Pang *et al.* (2006) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em grãos (milho, aveia, arroz e cevada) empregando a extração por solvente acelerado, seguida de *clean-up* por EFS e análise por CG-EM e LC-EM-EM. Como solvente de extração foi utilizada a acetonitrila, como sorventes de *clean-up* para as análises em CG-EM foram utilizados os seguintes

cartuchos em série: Envi-18, Envi-Carb e Sep-Pak NH<sub>2</sub>; para as análises em LC-EM-EM foram utilizados os seguintes cartuchos em série: Sep-Pak Alumina N, Envi-Carb e Sep-Pak NH<sub>2</sub>. Foram obtidos limites de detecção entre 0,0005 e 0,3 mg kg<sup>-1</sup> e recuperações entre 42 e 132%.

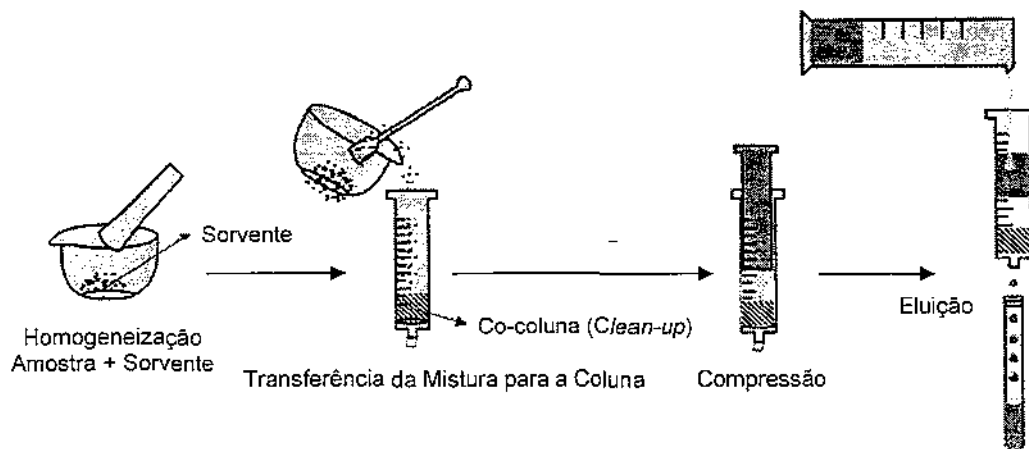
Pizzutti (2006) desenvolveu e validou duas metodologias de extração de agrotóxicos em soja a partir dos métodos de Luke e QuEChERS modificados e análise por CG-EM, CG-EM-EM e CL-EM-EM. Para o método de Luke foram utilizados como solventes de extração uma mistura de acetona, éter de petróleo e diclorometano (1:1:1) e para o método de QuEChERS foi utilizada a acetonitrila como solvente de extração. Para as análises realizadas por CG os extratos passaram por uma etapa de *clean-up* por cromatografia por permeação em gel (CPG). Foram obtidos limites de quantificação de 10 ou 50 µg kg<sup>-1</sup> e resultados de recuperação satisfatórios para a maioria dos compostos analisados.

Recentemente, para extração de agrotóxicos em amostras sólidas ou semi-sólidas, técnicas modernas, como a dispersão da matriz em fase sólida, extração com líquido pressurizado, extração com fluido supercrítico e extração assistida por microondas, têm-se mostrado mais rápidas, com os analitos mais livres de interferentes, requerendo um *clean-up* mais simples e fornecendo um extrato mais limpo que o obtido através de técnicas clássicas (Kristenson, Ramos e Brinkman, 2006).

#### 2.3.1.1 – DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA

Em 1989, um processo de rompimento e extração de amostras sólidas denominada de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) foi introduzido por Barker (Barker, 1998; Barker, 2000). A técnica de DMFS combina aspectos de várias técnicas analíticas, rompimento e dispersão dos componentes da amostra no suporte sólido, gerando um material cromatográfico que possui características particulares para a extração dos compostos da amostra dispersa.

Um esquema representativo da dispersão da matriz em fase sólida está apresentado na Figura 3.



**Figura 3** - Representação esquemática do procedimento de extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (Ferrer *et al.*, 2005).

A técnica de DMFS consiste basicamente em: (Kristenson, Ramos e Brinkman, 2006).

♦ Uma amostra líquida, viscosa, semi-sólida ou sólida é colocada em um almofariz de vidro juntamente com o suporte sólido e é homogeneizada com auxílio de um pistilo de vidro até obter o rompimento e a completa dispersão da amostra no suporte sólido. A quantidade de suporte sólido a ser usada depende do tipo de amostra. Tipicamente usam-se proporções de amostra/solvente de 1:1 a 1:4 e preferencialmente partículas de 40  $\mu\text{m}$  ou na faixa de 40 a 100  $\mu\text{m}$ . A distribuição dos componentes da amostra na superfície do suporte sólido está baseada na sua polaridade: componentes apolares dispersam-se em fases orgânicas apolares segundo seus coeficientes de distribuição com a fase e às mudanças dinâmicas que acontecem nesse processo; e moléculas polares, provavelmente, se associam aos silanóis na superfície das partículas de um suporte polar, como a sílica, e dentro dos poros desse suporte sólido. Provavelmente, a penetração das moléculas nos poros é facilitada quando a amostra apresenta alto teor de gordura, sendo a oleosidade responsável pelo carregamento das moléculas para dentro dos poros.

♦ Após a completa homogeneização a amostra pode ser transferida para uma coluna vazia ou para o topo de um cartucho de EFS. A coluna geralmente é um tubo de seringa ou um tubo de cartucho de EFS vazio, com um filtro de polipropileno, celulose ou lã de vidro na extremidade inferior. Geralmente um segundo filtro é colocado na extremidade superior antes da compressão da

amostra+solvente com o êmbolo da seringa. Colunas de vidro apenas são usadas quando se trabalha com grandes quantidades de amostras. A maior diferença entre DMFS de EFS é que a amostra está dispersa por toda extensão da coluna e retida não apenas nos cinco primeiros milímetros do solvente.

♦ Com respeito a eluição, têm-se duas possibilidades:

(a) os analitos são retidos na coluna e os interferentes são eluídos em uma etapa de lavagem e, posteriormente os analitos são eluídos com um solvente diferente;

(b) os interferentes da matriz são seletivamente retidos na coluna e os analitos são eluídos diretamente.

♦ Uma etapa adicional de *clean-up* pode ser necessária ou a amostra pode ser analisada diretamente. A coluna de DMFS pode ser acoplada *on-line* com a coluna de EFS, ou o solvente de EFS pode ser colocado na parte inferior da própria coluna de DMFS para a remoção dos interferentes da matriz.

A DMFS tem sido aplicada em diversos campos, mas principalmente na análise de medicamentos, poluentes, agrotóxicos e outros compostos em alimentos (Barker, 2000 ; Kristenson, Ramos e Brinkman, 2006).

Dórea e Lopes (2004) desenvolveram uma metodologia para a determinação de agrotóxicos em quiabo empregando DMFS e análise por CG-EM. Foi utilizada sílica gel como solvente de dispersão e acetato de etila como solvente de eluição. Foram alcançadas, em média, recuperações de 78% e limites de quantificação entre 0,1 e 0,7 mg L<sup>-1</sup>.

Ferrer *et al.* (2005) desenvolveram uma metodologia para determinação de resíduos de agrotóxicos em azeitona e óleo de oliva empregando DMFS seguida de CG-EM e CL-EM-EM. Foi empregado aminopropil como solvente dispersante, Florisil como co-coluna e acetone nitrila como solvente de eluição. Foram alcançados limites de detecção entre 0,2 e 3 µg kg<sup>-1</sup> para o óleo de oliva e entre 0,4 e 4 µg kg<sup>-1</sup> para azeitonas, nas análises por CL-EM-EM.

Garcinuño *et al.* (2004) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amêndoas empregando DMFS seguida de *clean-up* e análise por CLAE-DAD. Foram empregados C18 como solvente de dispersão e como co-coluna e acetone nitrila como solvente de eluição. Foram alcançados limites de quantificação de 0,05 e 0,07 mg kg<sup>-1</sup>.

Totti *et al.* (2006) desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel de abelha empregando DMFS seguida de análise por CL-EM. Eles empregaram C18 como sorvente dispersante e diclorometano:metanol 85:15 (v/v) como solvente de eluição. Foram alcançadas recuperações de 61 a 99 % e limites de quantificação de 0,02 a 0,3 mg kg<sup>-1</sup>.

## 2.4 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um novo método analítico requer que os resultados ou informações sobre a amostra sejam confiáveis e interpretáveis. Para atender esses requisitos, o método é avaliado através de um processo denominado *validação*. O objetivo da validação de uma metodologia é mostrar que o procedimento analítico é adequado para o fim pretendido.

Existem diferentes definições para a validação de métodos descritos pelas agências reguladoras:

- Segundo ANVISA (2003): A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

- Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) INMETRO (2003): Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos foram atendidos.

- Segundo a *United States Pharmacopeia Convention* (USP) USP (1999): A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer”.

Assim, da mesma forma que existem diferentes definições para validação, existem também diferenças nas regras dos parâmetros analíticos. Isso não é problema, desde que, quando validado o método, esteja especificado de qual agência reguladora as normas foram adotadas. As principais agências reguladoras são: ANVISA, INMETRO, USP, US-FDA, *International Conference on*



*Harmonization (ICH) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).*

#### **2.4.1 – PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS**

Os parâmetros analíticos normalmente avaliados para a validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Ribani *et al.*, 2004).

##### **2.4.1.1 – SELETIVIDADE**

Um método instrumental de separação é seletivo quando produz respostas para vários analitos, porém pode-se distinguir a resposta de um analito da resposta de outros (INMETRO, 2003). A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes.

As duas principais formas de definir a seletividade são: (A) Comparação da matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos da amostra; (B) Avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos e espectrômetro de massas) comparando-se o espectro do pico obtido na amostra com o espectro do padrão puro (Ribani *et al.*, 2004).

##### **2.4.1.2 – LINEARIDADE E FAIXA LINEAR**

A linearidade de um método é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a

determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (INMETRO, 2003).

A faixa linear é definida como a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou a concentração da substância a ser quantificada. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica*. Matematicamente, 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*. Essa relação matemática pode ser expressa pela seguinte equação da reta:

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

onde,

$y$  = resposta da medida (altura ou área do pico)

$x$  = concentração do analito

$a$  = coeficiente angular (inclinação da curva)

$b$  = coeficiente linear (intersecção com o eixo  $y$ ).

Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é possível calcular o coeficiente de correlação ( $r$ ). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação de 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

As curvas analíticas podem ser construídas pelos seguintes métodos: (A) *Padronização Externa*: este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. (B) *Padronização Interna*: consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais, se adiciona a mesma quantidade conhecida de um

composto chamado de padrão interno. (C) *Adição Padrão*: consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo.

As curvas analíticas construídas tanto pelo método da padronização externa como pelo método da padronização interna podem ser também construídas a partir da *Superposição da Matriz*, que consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à amostra, isenta da substância, e construção do gráfico relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Este método é usado para compensar o efeito 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. A interferência da matriz pode ser determinada sobrepondo-se as curvas obtidas pela padronização externa ou interna injetando-se os padrões puros e com a superposição da matriz. Se as retas forem paralelas a matriz não interfere nas determinações e a superposição da matriz não é necessária, mas, se as retas não forem paralelas e se cruzarem, a matriz está interferindo nas determinações e torna-se necessário fazer a quantificação usando a superposição da matriz (Ribani *et al.*, 2004).

Outra forma de avaliar a qualidade da curva analítica é através do cálculo dos *resíduos*,  $r_s$ , isto é, as medidas de quanto as áreas teóricas se afastam das experimentais. Para isso, as áreas obtidas para cada ponto da curva são utilizadas como se fossem uma amostra e, a partir desses valores, obtém-se a concentração experimental. Calcula-se a diferença entre os valores teóricos e os experimentais ( $r_s$ ) e plota-se um gráfico de resíduos *versus* concentração teórica. Para validar a curva analítica os resíduos devem estar distribuídos de forma aleatória entre valores positivos e negativos não apresentando nenhuma tendência (Valente, Augusto e Riedo, 2003).

#### 2.4.1.3 – PRECISÃO

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003). A precisão

é avaliada usualmente pela estimativa do desvio padrão absoluto ( $s$ ) e através da estimativa do desvio padrão relativo ( $RSD$ ) também conhecida como coeficiente de variação ( $CV$ ). Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos  $RSD$  de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.*, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

onde:

$\bar{x}$  é a média aritmética de um pequeno número de medições

$x_i$  é o valor individual de uma medição

$n$  é o número de medições.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

A precisão é normalmente determinada para condições específicas de medição e é geralmente expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

#### 2.4.1.3.1 – REPETITIVIDADE

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento de extração, mesmo observador, mesmo instrumento, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003).

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo ( $RSD$ ). Segundo o (INMETRO, 2003) para o cálculo da estimativa do desvio padrão são necessárias sete ou mais repetições. Segundo a ICH, 1996 e ANVISA, 2003 para o cálculo da

estimativa do desvio padrão são necessárias nove repetições (três níveis, três repetições cada um).

#### **2.4.1.3.2 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA**

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos (INMETRO, 2003).

O número de ensaios necessários para avaliar a precisão intermediária segundo a ICH, 1996 e ANVISA, 2003, são os mesmos recomendados para a repetitividade. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (*RSD*).

#### **2.4.1.3.3 – REPRODUTIBILIDADE**

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de medição, como, mudança de laboratórios, operadores e equipamentos (INMETRO, 2003).

A reprodutibilidade não é avaliada em validações rotineiras realizadas em um único laboratório. Elas são requeridas quando um determinado procedimento analítico será enquadrado, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc. (Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.4 – EXATIDÃO**

É o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

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.

O número de ensaios varia segundo a legislação, conforme ICH (1996) e ANVISA (2003) é necessário um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.4.1 – MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (MRC)**

Os MRC são materiais acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Assim, os valores obtidos pelo laboratório devem ser comparados com os valores certificados do material (Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.4.2 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS**

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência (Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.4.3 – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO**

A recuperação, R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (IUPAC, 2002).

A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, pois, 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.

Os ensaios de recuperação devem ser realizados, adicionando-se pelo menos três diferentes níveis de concentração da substância, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises em nível de resíduos, a Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP) (GARP, 1999) recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação.

O intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos geralmente é de 70 a 120 %, com precisão de  $\pm 20$  %. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esta faixa pode ser de 50 a 120 %, com precisão de  $\pm 15$  % (GARP, 1999).

A recuperação é calculada da seguinte forma:

$$R (\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (4)$$

onde:

$C_1$  = concentração determinada na amostra fortificada

$C_2$  = concentração adicionada à amostra.

#### 2.4.1.4.4 – ADIÇÃO PADRÃO

Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um testemunho da matriz sem a substância de interesse. No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância (Ribani *et al.*, 2004).

#### **2.4.1.5 – LIMITE DE DETECÇÃO (LD)**

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada e declarada com um intervalo de confiança, em que a concentração do analito é maior que zero (ICH, 1996 INMETRO, 2003).

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003).

O LD pode ser determinado através de três diferentes maneiras: método visual, método da relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica.

##### **2.4.1.5.1 – MÉTODO VISUAL**

O LD é determinado através da adição de concentrações conhecidas do analito à matriz, de tal modo, que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado (ICH, 1996).

##### **2.4.1.5.2 – MÉTODO DA RELAÇÃO SINAL-RUÍDO**

O LD é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco dessas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (ICH, 1996).



#### 2.4.1.5.2 – MÉTODO BASEADO EM PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA

O LD é determinado a partir dos parâmetros da curva analítica e pode ser expresso como:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

onde:

$s$  = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação

$S$  = inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

#### 2.4.1.6 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada em um nível aceitável de precisão e exatidão (INMETRO, 2003).

O limite de quantificação do equipamento (LQE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de seis a dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

O limite de quantificação do método (LQM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito pode ser quantificada com precisão e exatidão. O LQM é determinado a partir do LQE e do número de vezes que a amostra é concentrada durante o processo de extração.

Os mesmos critérios para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado através do método visual, método sinal-ruído (10:1) e pelo método baseado na curva analítica, conforme a equação (6):

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (6)$$

onde:

$s$  = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação

$S$  = inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

#### 2.4.1.7 – ROBUSTEZ

A robustez de um método 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 (INMETRO, 2003).

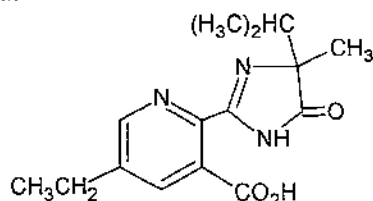
A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de agitação, extração, etc. (Ribani *et al.*, 2004).

#### 2.5 – AGROTÓXICOS ESCOLHIDOS PARA O ESTUDO

Dentre os agrotóxicos usados nas lavouras de soja, optou-se por determinar resíduos de imazetapir, imazaquim, metsulfurom-metil, carboxim, clorimurom-etil e tebuconazol, por serem os agrotóxicos utilizados com maior frequência e em maior quantidade nas plantações de soja. A tradução da nomenclatura dos agrotóxicos foi realizada conforme Abakerli *et al.*, (2003).

### 2.5.1 – IMAZETAPIR

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

(±)-2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1*H*-imidazol-2-il]-5-etil-3-piridina ácido carboxílico

♦ Número no CAS: 81335-77-5

♦ Classe: Herbicida aplicado em pós-emergência nas plantas infestantes da cultura da soja.

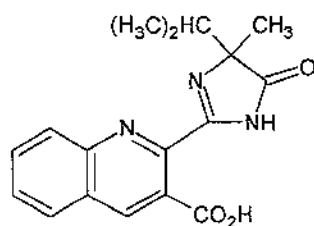
♦ Classe Toxicológica: Classe III – Medianamente tóxico

♦ pKa: pKa<sub>1</sub>= 2,1 e pKa<sub>2</sub>= 3,9

♦ Nome Comercial: Dinamaz WG<sup>®</sup>, Pivot<sup>®</sup>, Vezir<sup>®</sup>

### 2.5.2 – IMAZAQUIM

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

(±)-2-[4,5-diidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1*H*-imidazol-2-il]-5-etil-3-quinolina ácido carboxílico

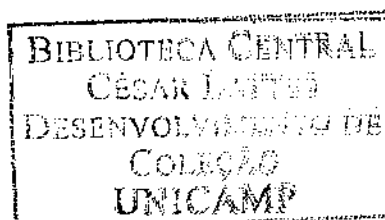
♦ Número no CAS: 81335-37-7

♦ Classe: Herbicida aplicado em pré-emergência nas plantas infestantes da cultura da soja.

♦ Classe Toxicológica: Classe III – Medianamente tóxico

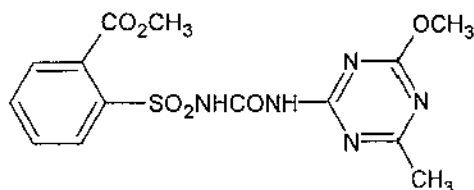
♦ pKa: 3,8

♦ Nome Comercial: Scepter<sup>®</sup>, Topgan<sup>®</sup>



### 2.5.3 – METSULFUROM- METIL

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

2-[ [ [ (4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)amino ]carbonil ]amino ]sulfonil ] benzoato de metila

♦ Número no CAS: 74223-64-6

♦ Classe: Herbicida aplicado em pós-emergência nas plantas infestantes da cultura da soja.

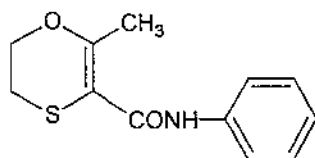
♦ Classe Toxicológica: Classe III – Medianamente tóxico

♦ pKa: 3,3

♦ Nome Comercial: Ally®

### 2.5.4 – CARBOXIM

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

5,6-diidro-2-metil-1,4-oxati-ina-3-carboxianilida

♦ Número no CAS: 5234-68-4

♦ Classe: Fungicida aplicado nas sementes

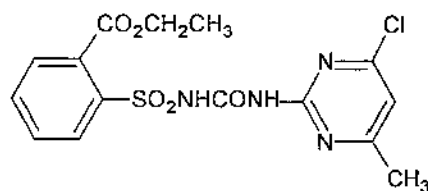
♦ Classe Toxicológica: Classe III – Medianamente tóxico

♦ pKa: <0,5

♦ Nome Comercial: Vitavax®

### 2.5.5 – CLORIMUROM – ETIL

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

2-[ [ [ (4-cloro-6-metoxi-2-pirimidinil)amino ]carbonil ]amino ]sulfonil ] benzoato de etila

♦ Número no CAS: 90982-32-4

♦ Classe: Herbicida aplicado em pós-emergência nas plantas infestantes na cultura da soja.

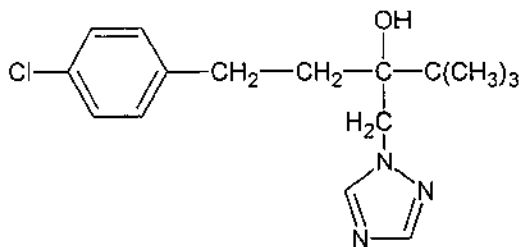
♦ Classe Toxicológica: III – Medianamente tóxico

♦ pKa: 4,2

♦ Nome Comercial: Clorimurum Etil Técnico<sup>®</sup>, Clorimurum Etil Técnico Nortox<sup>®</sup>, Clorimurum-Etil Técnico LDA<sup>®</sup>

### 2.5.6 – TEBUCONAZOL

♦ Fórmula Estrutural:



♦ Nome Químico:

(±)-α-[2-(4-clorofenil)etil]-α-(1,1-dimetiletil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol

♦ Número no CAS: 107534-96-3

♦ Classe: Fungicida aplicado nas folhas da soja

♦ Classe Toxicológica: IV – Pouco tóxico

♦ pKa: não fornecido

♦ Nome Comercial: Folicur Técnico<sup>®</sup>, Orius Técnico<sup>®</sup>

### 3 – OBJETIVOS

Em vista da importância da cultura da soja no Brasil, principalmente, como produto de exportação e pela ausência de metodologias analíticas na literatura, para a determinação de agrotóxicos em grãos de soja, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método para a determinação dos principais agrotóxicos usados nas lavouras de soja, empregando a dispersão da matriz em fase sólida, seguida de *clean-up* para o preparo da amostra e CLAE-DAD para a determinação quantitativa.

Para alcançar estes objetivos as seguintes metas foram delineadas:

- ◆ selecionar os principais agrotóxicos utilizados nas plantações de soja;
- ◆ otimizar as condições de separação dos agrotóxicos;
- ◆ otimizar a metodologia de extração no preparo de amostra;
- ◆ validar o método;
- ◆ analisar amostras provenientes de uma cultura de soja.

## 4 – EXPERIMENTAL

### 4.1 – MATERIAIS

#### 4.1.1 – REAGENTES, SOLVENTES E SORVENTES

- ◆ Acetonitrila Grau HPLC, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil);
- ◆ Acetato de Etila Grau Pesticida, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil);
- ◆ Diclorometano Grau HPLC, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- ◆ Metanol Grau HPLC, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil);
- ◆ Acetona PA, Synth (São Paulo, Brasil);
- ◆ Água Milli Q (Millipore, São Paulo, Brasil);
- ◆ Ácido Fosfórico 10%, Mallinckrodt (Printed, México);
- ◆ Imazetapir (99%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Imazaquim (99%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Metsulfurom-metil (98%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Carboxim (99%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Clorimurom-etil (99%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Tebuconazol (98%), Chem Service (West Chester, PA, USA);
- ◆ Sílica (35-70  $\mu\text{m}$ , 6 nm diâmetro de poro)(Acros Organics, Bélgica);
- ◆ Florisil (70-150  $\mu\text{m}$ ) (Acros Organics, Bélgica);
- ◆ Cartuchos de SPE: C18 (Supelclean LC-18, 500 mg), C8 (Supelclean Envi-8, 500 mg), Supelco (Bellafonte, PA, USA), DVB (estireno divinilbenzeno) (OASIS HLB 3 mL), Waters (Milford, MASS, USA), Alumina (100-200 mesh) (BIO RAD, Califórnia, USA);
- ◆ Soja (Mãe Terra) adquirida no supermercado Pão de Açúcar – Campinas/SP.

#### 4.1.2 – EQUIPAMENTOS

- ◆ Cromatógrafo a líquido marca Waters, composto por: duas bombas de alta pressão, recíproca, tipo pistão duplo, modelo 515; injetor Rheodyne, 7725i, com alça amostradora de 10 µL; detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, caminho ótico de 10 mm, modelo 996 e computador Digital Pentium II de 300 MHz, contendo software Milenium instalado para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos;
- ◆ Coluna (150 x 4,6 mm) Phenomenex Synergi™ Fusion RP C18 (4 µm) com grupo polar embutido;
- ◆ Coluna de Guarda (4 x 3 mm) Phenomenex Synergi™ Fusion-RP C18 (4 µm) com grupo polar embutido;
- ◆ pH metro modelo DM-21 (Digimed, São Paulo, Brasil);
- ◆ SPE manifold a vácuo com 12 portas (Supelco);
- ◆ Balança Analítica CP225 Sartorius (Hexis, Brasil);
- ◆ Agitador Magnético (Fisatom, Brasil);
- ◆ Agitador de frasco MA 161 (Marconi, Brasil);
- ◆ Sistema de filtração de fase móvel (Millipore, Brasil);
- ◆ Ultra-som Thornton T14 (Merse, Brasil);
- ◆ Liquidificador Britânia;
- ◆ Geladeira Electrolux;
- ◆ Pipetas Eppendorff;
- ◆ Membrana Nylon 0,45 µm (Millipore, Brasil);
- ◆ Filtros Millex 0,45 µm (Millipore, Brasil);
- ◆ Tubos de Extração (6 mL) Supelco;
- ◆ Baiões Volumétricos (10 e 5 mL);
- ◆ Seringa de Vidro, Arti Glass ( Due Carrarre – Itália);
- ◆ Tubos de Centrífuga;
- ◆ Almofariz e pistilo;



## 4.2 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

### 4.2.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Foram preparadas soluções estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de cada um dos padrões dos agrotóxicos, todos dissolvidos em acetonitrila, solvente no qual os agrotóxicos têm boa solubilidade. Estas soluções permanecem estáveis por um período de até 4 meses quando armazenadas adequadamente, ao abrigo de luz e refrigeradas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

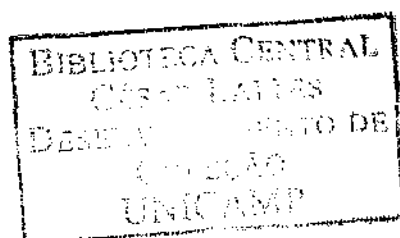
A partir dessa solução foram feitas as diluições em concentrações adequadas para preparar as soluções de trabalho para a construção das curvas analíticas. Estas soluções, principalmente as mais diluídas, permanecem estáveis por um período de sete dias, armazenadas adequadamente, ao abrigo de luz e refrigeradas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.2.2 – PREPARO DA FASE MÓVEL

Os solventes da fase móvel, tanto orgânico como a água, passaram pelo mesmo processo de preparação: filtração em um sistema apropriado a vácuo empregando membranas de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ , seguida de desgaseificação por 10 minutos em banho simultâneo de ultra-som e vácuo.

Para a preparação da água com pH ajustado, utilizou-se uma solução de ácido fosfórico 10% e o pH metro previamente calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7.

A fase orgânica empregada foi acetonitrila e a fase aquosa foi água Milli Q sem modificação de pH e água Milli Q a pH 2,5; 3,0 e 4,0.



#### **4.2.3 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

Para a separação cromatográfica dos agrotóxicos estudados, foram testadas as seguintes condições:

A – Modo Isocrático: composições de fase móvel (acetonitrila:água), (acetonitrila:água pH 3,0) e (acetonitrila:água pH 4,0): nas vazões de 0,4, 0,5, 0,6 e 0,8 mL min<sup>-1</sup>. As misturas dos solventes a serem utilizados como FM foram realizadas no cromatógrafo à líquido.

B – Modo Gradiente: composições de fase móvel (acetonitrila:água pH 3,0 e 2,5) conforme programação de diferentes gradientes (lineares, côncavos e convexos) desenvolvidos e testados.

#### **4.2.4 – CONFIRMAÇÃO DOS AGROTÓXICOS**

Após definidas as condições cromatográficas de separação, foi realizada a confirmação de cada um dos agrotóxicos. Para isso, cada agrotóxico foi injetado separadamente e seu tempo de retenção ( $t_R$ ) foi comparado ao tempo de retenção obtido na mistura, e também foi comparado o espectro de absorção no UV fornecido pelo detector por arranjo de diodos.

#### **4.2.5 – ESCOLHA DO COMPRIMENTO DE ONDA DE TRABALHO**

Através do espectro de absorção no UV pode-se determinar o comprimento de onda de absorção máxima de cada agrotóxico. Como os comprimentos de onda de absorção máxima dos agrotóxicos em estudo variam de 209,9 a 254 nm foi escolhido um comprimento de onda intermediário, no qual todos os compostos apresentam absorvância, para a apresentação do cromatograma da separação (221 nm) e as demais medidas foram realizadas no comprimento de onda de absorção máxima de cada composto.

## **4.3 – CURVA ANALÍTICA**

### **4.3.1 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA SEM SUPERPOSIÇÃO DA MATRIZ**

As curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração dos agrotóxicos (80 a 2400  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a partir da injeção, no sistema cromatográfico, dos padrões puros, em seis níveis de concentração e em triplicata. As curvas foram construídas com auxílio do programa Origin 6.1, o qual forneceu o coeficiente de correlação ( $r$ ) e os coeficientes de regressão.

### **4.3.2 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA COM SUPERPOSIÇÃO DA MATRIZ**

As curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração dos agrotóxicos (80 a 2400  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a partir da adição dos agrotóxicos, em seis níveis de concentração, na matriz isenta dessas substâncias, e posterior injeção, em triplicata, no sistema cromatográfico. As curvas foram construídas com auxílio do programa Origin 6.1, o qual forneceu o coeficiente de correlação ( $r$ ) e os coeficientes de regressão.

## **4.4 – AMOSTRA DE SOJA**

### **4.4.1 – PROVENIENTE DE SOJA ORGÂNICA**

Denomina-se *amostra testemunha* uma amostra que não tenha sido submetida ao tratamento com o ingrediente ativo que será determinado (GARP, 1999). Em vista disso, foi utilizada como amostra testemunha, a soja orgânica.

A soja foi triturada em um liquidificador por 5 minutos para formar grânulos homogêneos e poder ser empregada no procedimento de extração. Uma porção da amostra testemunha foi adicionada de quantidades conhecidas

dos agrotóxicos estudados, denominada de *amostra fortificada*, e foi empregada no desenvolvimento da metodologia de extração e de quantificação.

#### **4.4.2 – PROVENIENTE DE UMA PLANTAÇÃO DE SOJA**

As amostras de soja analisadas para a determinação de possíveis resíduos de agrotóxicos foram fornecidas pela COTRISOJA – Cooperativa Triticola Taperense Ltda, localizada no município de Tapera – RS, e são de duas variedades diferentes: CD - 205 e CD - 213. O processo de trituração foi semelhante ao da amostra testemunha.

#### **4.5 – METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO**

Para o desenvolvimento e a otimização da metodologia de extração, usando a dispersão da matriz em fase sólida, foram realizados diferentes testes para obterem-se resultados satisfatórios, tanto em termos de recuperação quanto em quantidade de interferentes.

Depois de estudadas e avaliadas as principais variáveis da metodologia: solvente orgânico, sorvente de dispersão, tempo de dispersão, tempo de homogeneização, tempo de interação após homogeneização e sorvente para *clean-up*, a metodologia foi definida.

#### **4.6 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA**

Definidas as melhores condições de separação dos agrotóxicos e a metodologia de extração, foi feita a validação do método, seguindo os parâmetros analíticos, descritos na seção 2.4.1.

#### **4.7 – ANÁLISE DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE UMA CULTURA DE SOJA**

Após a validação da metodologia foram analisadas duas amostras de soja de variedades diferentes (CD-205 e CD-213) para a avaliação do método desenvolvido quando aplicado às amostras provenientes de lavouras nas quais se utilizam agrotóxicos.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos agrotóxicos, buscou-se o uso das condições mais simples, ou seja, fase móvel sem ajuste do pH e eluição isocrática. Porém, estas condições não propiciaram a separação, devido a baixa ou nula retenção dos compostos na coluna cromatográfica. Isto está associado às características ácidas (pKa entre 0,5 e 4) apresentadas pelos agrotóxicos, que, em contato com a fase móvel, permanecem na forma dissociada, tendo pouca interação com a fase estacionária.

Desta forma, passou-se a trabalhar com fase móvel na qual a fase aquosa foi modificada, com o uso de ácido fosfórico, a diferentes pH (2,5, 3 e 4) e eluição isocrática. Com essas alterações, os compostos passaram a apresentar retenção na coluna cromatográfica, mas a eluição isocrática não forneceu resolução satisfatória entre os agrotóxicos estudados. O aumento da retenção e a maior interação dos compostos com a fase estacionária estão associadas a supressão iônica da dissociação dos agrotóxicos, causada pelo uso de fase móvel acidificada.

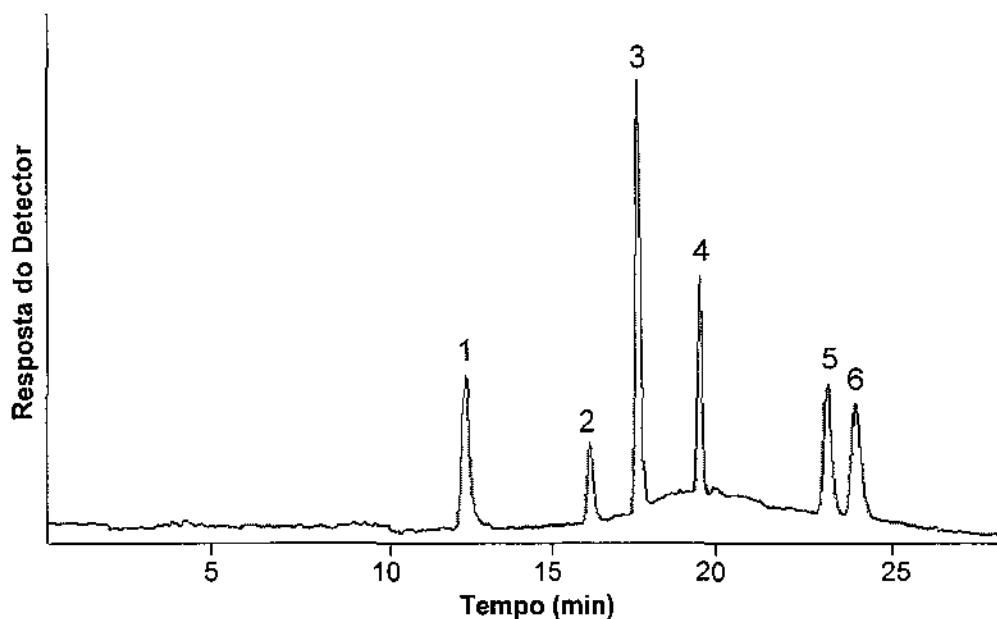
O ácido fosfórico foi escolhido, por ser um ácido que apresenta uma baixa absorção na região do UV, por ser ácido inorgânico e, além disso, por ser mais forte que o ácido acético, que também poderia ter sido utilizado.

A vazão de trabalho de 0,5 mL min<sup>-1</sup> foi determinada devido a necessidade de aumentar o tempo de retenção do primeiro composto da mistura, a fim, de se obter um intervalo no início do cromatograma para a eluição dos possíveis interferentes provenientes da matriz.

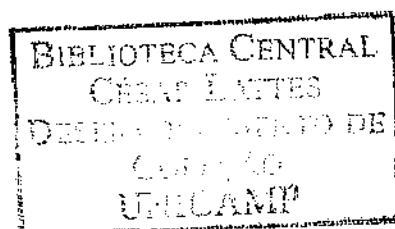
Assim, otimizaram-se as condições de separação usando fase móvel acetonitrila:água (acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico), vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>, eluição por gradiente, com a seguinte programação: 0 min – 30:70; 10 min – 40:60; 13 min – 55:45; 15 min – 70:30; 17 min – 70:30; 18 min – 60:40; 20 min – 50:50; 22 min – 30:70; 28 min – 30:70. Coluna C18 com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4

$\mu\text{m}$ ; coluna de guarda com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 4 x 3 mm, tamanho de partícula de 4  $\mu\text{m}$ ; detecção por arranjo de diodos a 221 nm para o registro do cromatograma contendo os picos de todos os agrotóxicos.

O cromatograma apresentado na Figura 4 mostra que se conseguiu uma boa separação dos agrotóxicos estudados, em um bom tempo de análise.

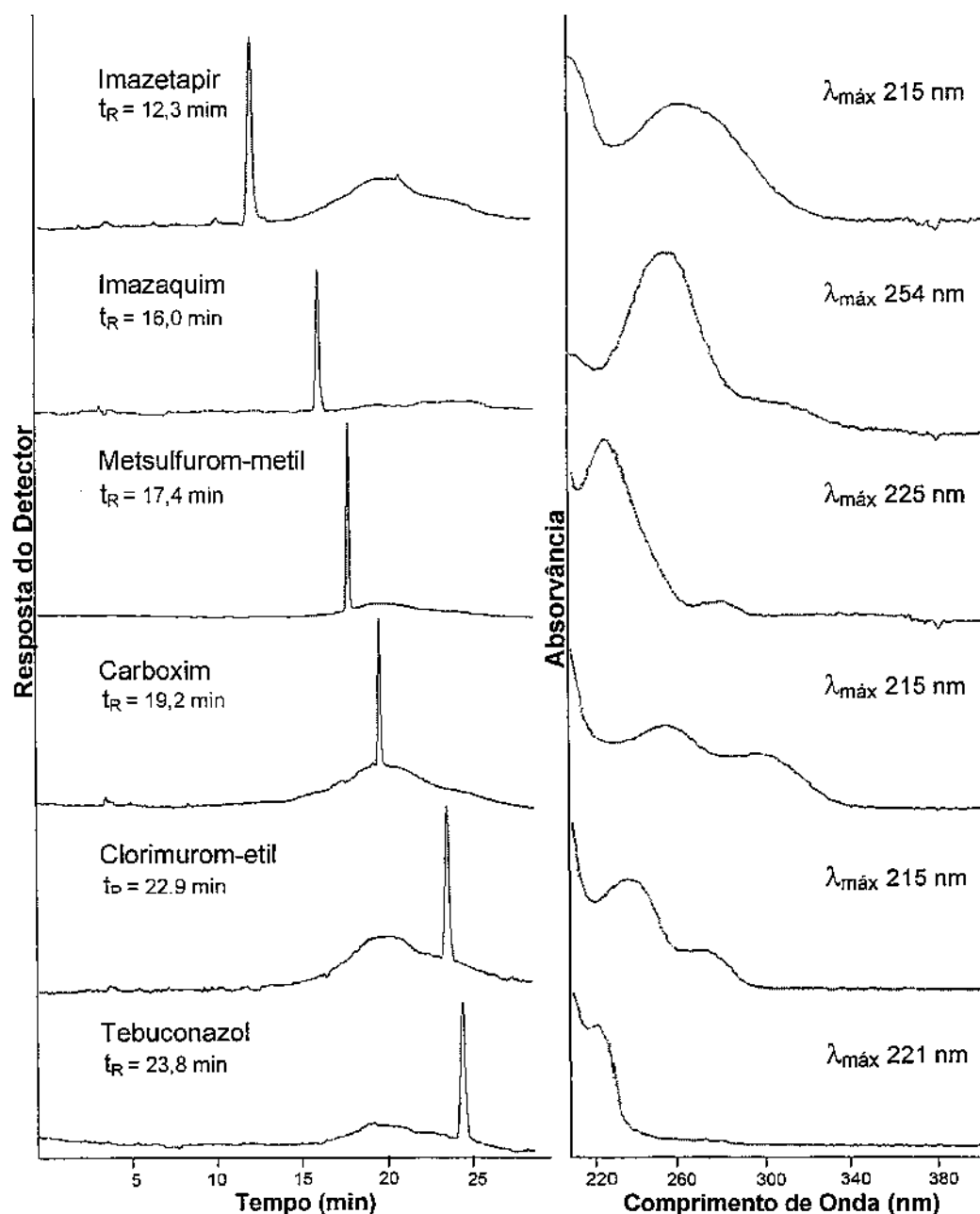


**Figura 4** - Cromatograma da separação dos agrotóxicos: 1 – Imazetapir, 2 – Imazaquim, 3 – Metsulfurom-metil, 4 – Carboxim, 5 – Clorimurom-etil e 6 – Tebuconazol a partir de uma solução padrão de 10  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Condições cromatográficas: FM: acetonitrila:água (acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico), vazão 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , eluição por gradiente, com a seguinte programação: 0 min – 30:70; 10 min – 40:60; 13 min – 55:45; 15 min - 70:30; 17 min – 70:30; 18 min – 60:40; 20 min – 50:50; 22 min – 30:70; 28 min – 30:70. Coluna C18 com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4  $\mu\text{m}$  e coluna de guarda com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 4 x 3 mm, tamanho de partícula de 4  $\mu\text{m}$ , detecção por arranjo de diodos a 221 nm.



## 5.2 – CONFIRMAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Na Figura 5 são mostrados os cromatogramas dos agrotóxicos injetados separadamente, nas mesmas condições cromatográficas descritas na Figura 4, e os espectros de absorção no UV, que forneceram os comprimentos de onda de absorção máxima de cada um dos agrotóxicos.



**Figura 5** - Cromatogramas individuais dos agrotóxicos na concentração de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ , com o seu tempo de retenção e seu respectivo espectro de absorção no UV. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4.



### **5.3 – OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO**

Um método de extração satisfatório, com bons resultados de recuperação e reduzida quantidade de interferentes, foi obtido após a otimização de algumas variáveis.

#### **5.3.1 – SORVENTE DE DISPERSÃO**

A escolha do sorvente de dispersão recai na polaridade do analito e na natureza da matriz. Para o isolamento de analitos mais polares usa-se comumente sorventes polares e para os menos polares, sorventes de menor polaridade. Além disso, o sorvente, deve propiciar o rompimento, a dispersão e a retenção dos compostos. Desta forma, neste trabalho, foi usado como sorvente dispersante a sílica ativada a 140 °C durante 12 horas, considerando-se as características da matriz e dos compostos em estudo. Foram também realizados testes utilizando-se como sorvente dispersante C18, mas os compostos apresentaram pouca ou nenhuma retenção nesse material.

#### **5.3.2 – QUANTIDADE DE SORVENTE E AMOSTRA**

Quando se trabalha com amostras sólidas, geralmente, procura-se otimizar uma metodologia que utilize pequenas quantidades de amostra, para evitar o uso de grandes quantidades de solventes e sorventes no processo da extração. Paralelamente, o fator de concentração da metodologia de extração depende da quantidade de amostra empregada. Baseado nesses fatores definiu-se como 1 g a quantidade de amostra a ser usada.

Na dispersão da matriz em fase sólida, usam-se, tipicamente, proporções de amostra:sorvente de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. Definida a quantidade de amostra, foi avaliada a proporção amostra:sorvente, em busca da melhor condição, ou seja, a proporção de sorvente suficiente para promover o rompimento, a dispersão e a retenção dos compostos e que necessita-se de um pequeno volume de solventes

de eluição. Tomando-se esses fatores como base, 1:2 foi a melhor proporção avaliada, em termos de porcentagem de recuperação e quantidade de interferentes extraídos, para a amostra de soja.

### **5.3.3 – TEMPOS DE INTERAÇÃO**

#### **5.3.3.1 – TEMPO DE INTERAÇÃO DOS AGROTÓXICOS COM A AMOSTRA**

A amostra de soja (1 g) foi fortificada com 1 mL de uma solução padrão dos agrotóxicos de concentração conhecida. Esse volume foi escolhido, por ser suficiente para umedecer toda amostra. Após, foi estudado o tempo necessário para a interação dos agrotóxicos com a soja e a completa evaporação do solvente, a fim de se obter a soja completamente seca. O tempo necessário foi de 1 hora, colocando-se a amostra na capela com um bom fluxo de ar.

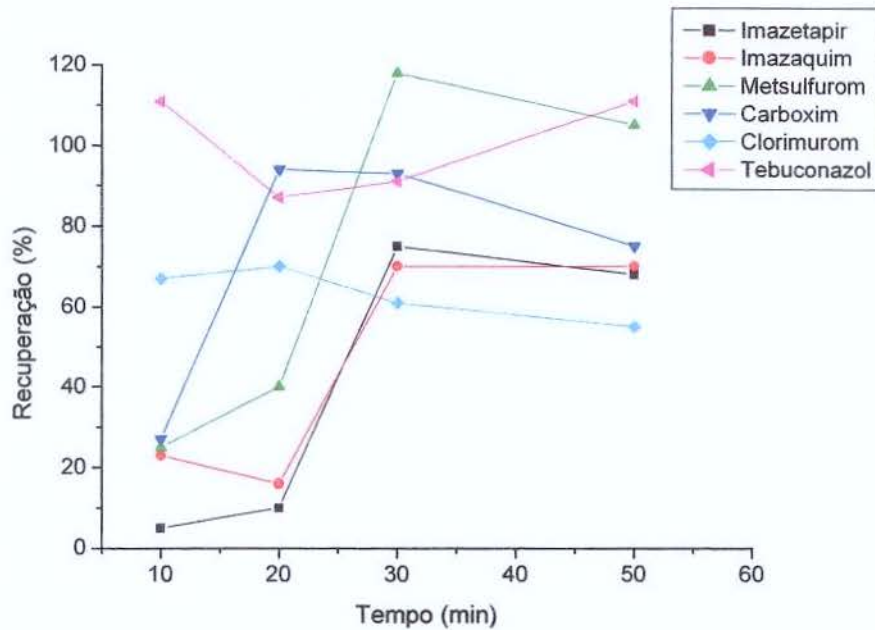
#### **5.3.3.2 – TEMPO DE DISPERSÃO**

A mistura amostra+solvente foi transferida para um almofariz de vidro, no qual, com auxílio de um pistilo, foram realizados movimentos circulares e uniformes visando a homogeneização completa, a reprodutibilidade, bem como a dispersão dos agrotóxicos. Foram estudados tempos de 5 e 10 minutos. Verificou-se, visualmente e através dos valores de recuperação, que 10 minutos foi o tempo suficiente para a completa dispersão da soja na sílica.

#### **5.3.3.3 – TEMPO DE INTERAÇÃO APÓS A DISPERSÃO**

Após a etapa de dispersão, avaliou-se o tempo necessário para que ocorresse a completa migração dos compostos para a sílica antes da etapa de eluição. Foram avaliados intervalos de tempos de 10 a 50 minutos, analisando os resultados de recuperação. Verificou-se que, em intervalos de tempos superiores

a 30 minutos, de um modo geral, não houve aumento nos valores de recuperação (Figura 6). Assim, ficou definido como 30 minutos o tempo de interação ideal após a dispersão.



**Figura 6** - Variação da porcentagem de recuperação com o tempo de interação dos agrotóxicos com a sílica, após a dispersão.

#### 5.3.4 – SORVENTES PARA *CLEAN-UP*

A necessidade de acrescentar uma etapa de *clean-up*, denominada de co-coluna, surgiu devido ao grande número de interferentes extraídos na etapa de extração, em função da complexidade da matriz, que apresenta uma alta quantidade de gordura. Para reduzir o efeito da matriz e tornar os cromatogramas mais limpos, foram testados diferentes sorventes para serem usados como co-coluna.

Conforme trabalhos já publicados e descritos anteriormente, diversos sorventes são usados na etapa de *clean-up* e os resultados apresentados, mesmo bastante satisfatórios, geralmente não são aplicáveis para uma amostra similar, porque uma pequena alteração na composição dessas amostras resulta, por exemplo, na co-eluição de interferentes novos e com diferentes intensidades. Sem referências para a escolha do sorvente de *clean-up*, foram testados

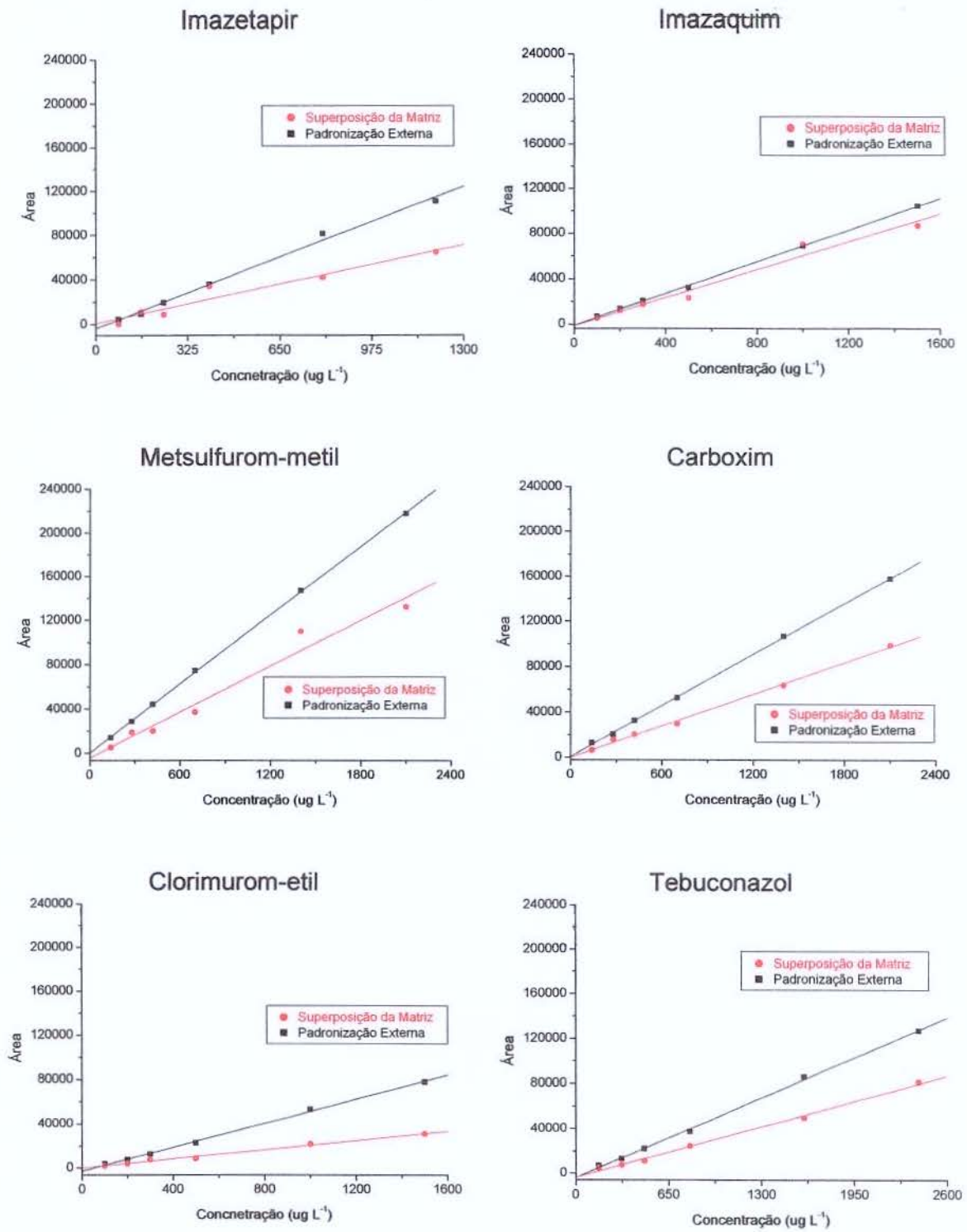
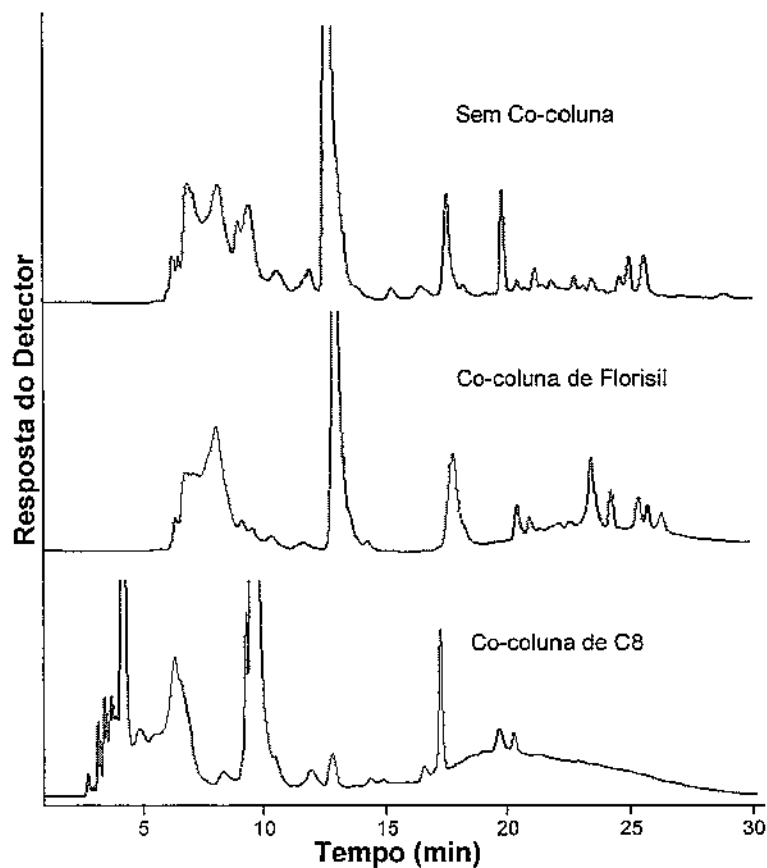


Figura 11 - Curvas analíticas dos agrotóxicos estudados obtidas para a padronização externa *sem* superposição da matriz e para padronização externa *com* superposição da matriz.

sorventes com diferentes propriedades físicas e químicas. O primeiro teste foi realizado empregando o Florisil como co-coluna, mas os resultados mostraram a pouca eficiência desse sorvente para a amostra de soja, uma vez que poucos interferentes foram eliminados e somente alguns reduzidos. Em seguida, foram realizados testes empregando C18 e C8 como sorvente de *clean-up*, e estes, apresentaram um desempenho muito similar e bastante satisfatório na redução dos interferentes, mas em termos de comparação, o C8 apresentou uma eficiência um pouco maior na remoção dos interferentes, com picos menos intensos e, desta forma, foi escolhido como sorvente de *clean-up*. Foram realizados testes também empregando estireno divinil benzeno (DVB) e alumina como sorventes de *clean-up*, mas ambos não foram eficientes na remoção dos interferentes.

A quantidade de sorvente empregada para o *clean-up* foi de 0,5 g. Essa quantidade é comumente empregada na literatura, indiferente da proporção amostra/sorvente.

Os cromatogramas obtidos sem a etapa de *clean-up* e com a etapa de *clean-up* utilizando Florisil e C8 estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7** - Cromatogramas das amostras testemunha eluídas sem o uso de co-coluna e com co-coluna de Florisil e C8 a 221 nm. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4.

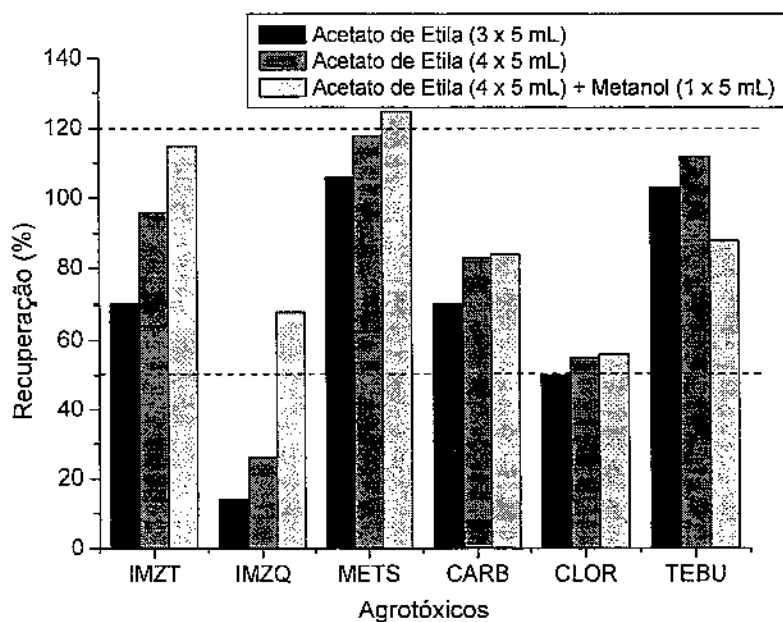
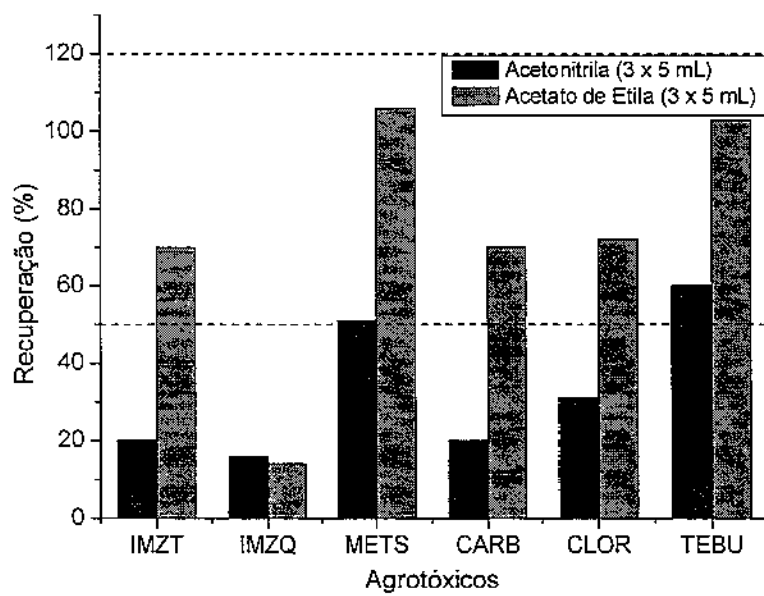
### 5.3.5 – SOLVENTES PARA ELUIÇÃO

Nesta etapa, foram avaliados solventes de diferentes polaridades, a fim de selecionar o de maior capacidade de remoção ou eluição dos agrotóxicos do sorvente e, conseqüentemente, obter bons resultados de recuperação.

Os solventes testados foram: acetonitrila, diclorometano, metanol e acetato de etila. Ainda nesta etapa, foi avaliada a quantidade de solvente necessária para a completa eluição dos agrotóxicos da amostra.

Os resultados mais significativos obtidos com o uso individual desses solventes, ou combinados, estão apresentados na Figura 8. Estes resultados mostram que o acetato de etila é mais eficiente que a acetonitrila para a eluição dos compostos em estudo e que, o aumento da quantidade de solvente de 15 mL

para 20 mL provoca um aumento significativo na recuperação dos compostos. Devido aos resultados ainda não satisfatórios para o imazaquim, optou-se por acrescentar uma porção de um solvente mais polar que o acetato de etila, o metanol, que se mostrou muito eficiente, aumentando a recuperação em aproximadamente 30 %. Desta forma, ficou definido como solventes de eluição 4 porções de 5 mL de acetato de etila + 1 porção de 5 mL de metanol.



**Figura 8** - Recuperações dos agrotóxicos em estudo obtidas com diferentes solventes de eluição ( $n=2$ ) durante a etapa de otimização.

### 5.3.6 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO

Após os estudos realizados definiu-se o seguinte método de extração dos agrotóxicos da soja: pesa-se 1 g de uma amostra de soja triturada e isenta de agrotóxicos em um almofariz de vidro e fortifica-se com 1 mL de uma solução padrão dos agrotóxicos em concentração conhecida. A amostra fortificada é deixada na capela durante 60 minutos para a interação dos agrotóxicos com a soja e para a total evaporação do solvente. Em seguida, adiciona-se à amostra 2 g de sílica (ativada a 140 °C por 12 horas) e homogeneiza-se com um pistilo de vidro, durante 10 minutos. Em seguida, a amostra+sílica é transferida para um tubo de seringa de 6 mL contendo 0,5 g de C8, confeccionando-se um cartucho similar aos cartuchos de EFS. Elui-se com 4 porções de 5 mL de acetato de etila e 1 porção de 5 mL de metanol, sob vácuo, em um manifold, a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. O extrato é evaporado até *secura* com N<sub>2</sub> e após ressuspendido em 500 µL de acetonitrila e filtrado com filtro Millex de 0,45 µm para posterior injeção no sistema cromatográfico.

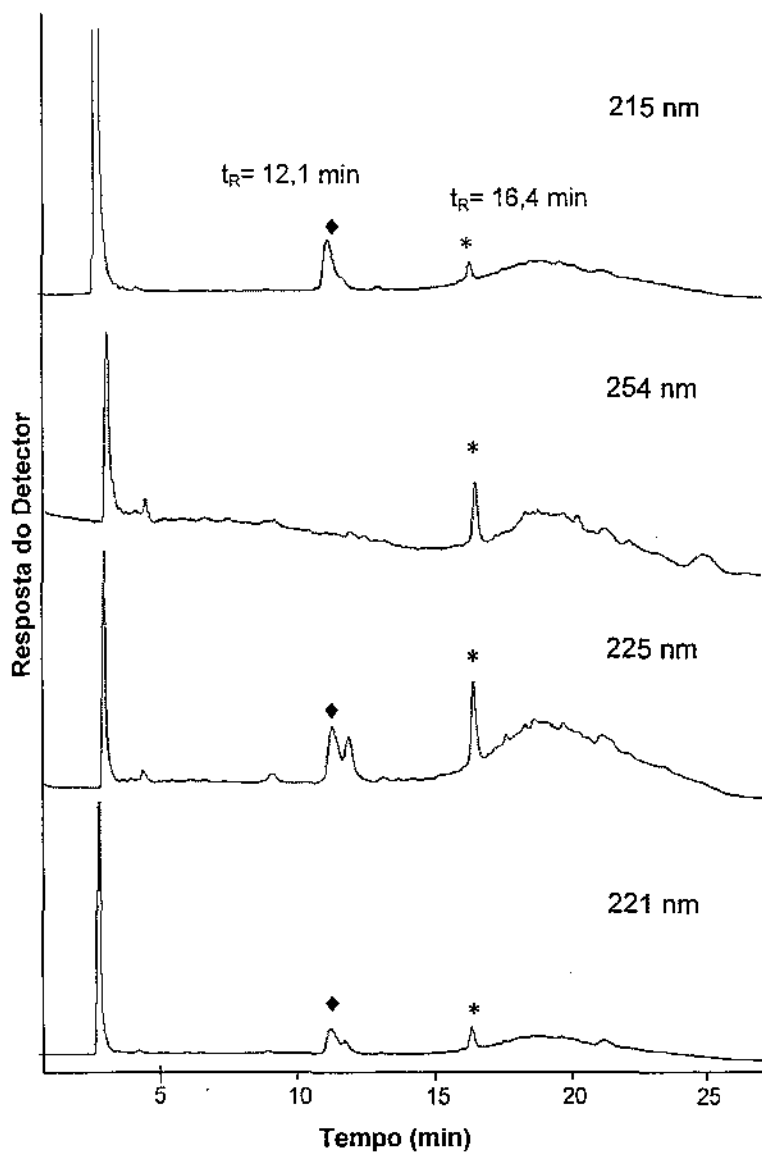
O mesmo procedimento foi realizado com uma amostra de soja testemunha, para identificação dos compostos interferentes provenientes da matriz.

Este procedimento foi realizado também com uma amostra preparada da mesma forma, excluindo a matriz e as substâncias testes, denominada de *branco* ou *amostra branco* para verificar os interferentes provenientes dos solventes, vidraria, reagentes e etc. (GARP, 1999). Na Figura 9 estão ilustrados os cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda máximos de cada composto, em uma escala bem maior em relação a escala dos cromatogramas da Figura 10, para que estes interferentes pudessem ser visualizados. Analisando-se os cromatogramas da Figura 9 pode-se observar a presença de dois interferentes ( $t_R=12,1$  min e  $t_R=16,4$  min) sendo que apenas o primeiro elui próximo a de um dos compostos de interesse, o imazetapir ( $t_R=12,3$  min). Mesmo presentes, são interferentes de baixa intensidade, de forma que não chegam a afetar as análises de maneira significativa.

Na Figura 10 estão ilustrados os cromatogramas obtidos a partir da metodologia otimizada para as amostras testemunhas e fortificadas, nos comprimentos de onda máximos de cada composto. Analisando as Figuras 9 e



10 verifica-se que o interferente que elui no mesmo tempo de retenção do imazetapir é proveniente principalmente da amostra testemunha com uma pequena contribuição do branco, e o interferente que elui no mesmo tempo de retenção do metsulfurom é oriundo somente da amostra testemunha.



**Figura 9** - Cromatogramas das amostras branco, nos comprimentos de onda máximos de cada composto. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4, com menor atenuação do detector.

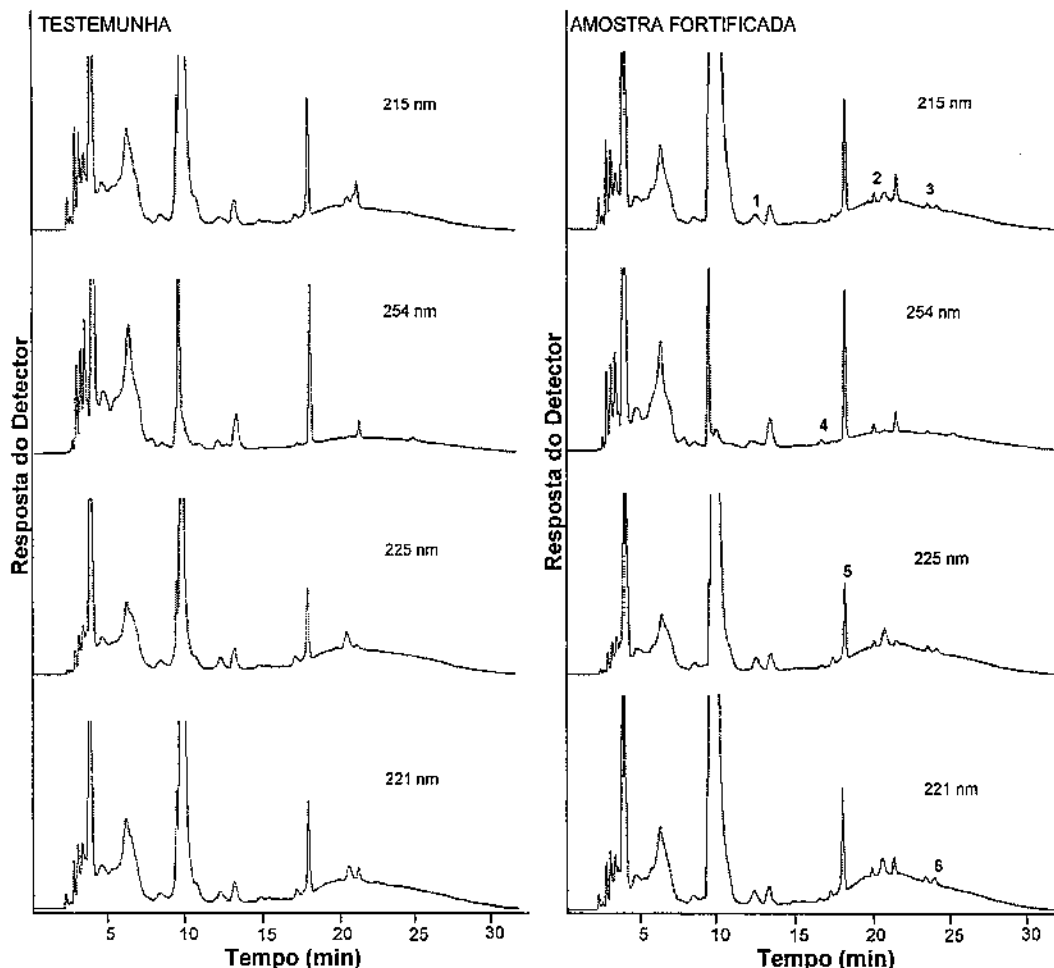


Figura 10 - Cromatogramas das amostras testemunha e de soja fortificada ( $2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas após a otimização da metodologia de extração. Identificação: 1 – Imazetapir, 2 – Carboxim, 3 – Clorimurom-etil, 4 – Imazaquim, 5 – Metsulfurometil e 6 – Tebuconazol. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4.

## 5.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

### 5.4.1 – SELETIVIDADE

Quando se trabalha com o desenvolvimento de metodologia que envolve a separação de vários compostos, como em métodos multirresíduos, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou co-eluição de interferentes com o composto de interesse. Comparando-se a amostra testemunha com a amostra fortificada, pode-se afirmar que a metodologia

desenvolvida para a separação dos seis agrotóxicos é seletiva somente para quatro compostos, que se apresentam bem resolvidos enquanto que o imazetapir e o metsulfurom-metil tiveram interferentes sendo co-eluídos nos seus respectivos tempos de retenção.

Além da comparação entre amostra testemunha e amostra fortificada, a seletividade pode ser avaliada pela pureza do pico cromatográfico, ou seja, comparando-se o espectro de absorção no UV do pico obtido para o padrão puro com o espectro de absorção na UV obtido no início, no meio e no fim do pico cromatográfico da amostra. Essa comparação foi realizada e os resultados obtidos confirmaram a seletividade para apenas quatro dos compostos analisados (imazaquim, carboxim, clorimurrom-etil e tebuconazol), enquanto que para o imazetapir apenas o espectro no ponto central do pico cromatográfico correspondeu ao espectro do padrão puro e para o metsulfurom-metil, em todos pontos do pico cromatográfico, o espectro não foi correspondente ao espectro do padrão puro.

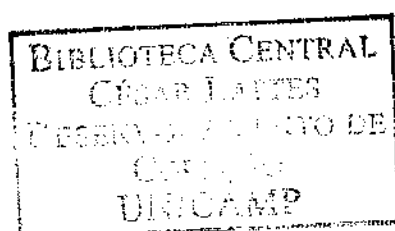
#### **5.4.2 – LINEARIDADE, FAIXA LINEAR, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO**

A partir da construção das curvas analíticas, foram obtidas as equações da reta e os coeficientes de correlação ( $r$ ) para cada um dos agrotóxicos em estudo. Foram construídas curvas analíticas a partir da injeção dos padrões puros, ou seja, padronização externa *sem* a superposição da matriz e a partir da adição dos padrões no extrato da matriz, ou seja, padronização externa *com* superposição da matriz. Na Figura 11, estão apresentadas as curvas analíticas obtidas, nas quais, se pode verificar que as retas não se apresentaram paralelas para nenhum dos compostos, indicando assim, a importância no processo de validação do método, do uso da superposição da matriz para a quantificação dos agrotóxicos extraídos, para corrigir os efeitos da matriz provocados pelos interferentes co-extraídos. Os resultados obtidos a partir da construção das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 4 e mostram que todos os coeficientes de correlação são superiores a 0,90. Desta forma, confirmam a linearidade do método, estando de acordo com as normas do INMETRO (2003).

Estão também apresentados os valores extremos obtidos para os resíduos, os demais valores estão distribuídos nessa faixa de forma aleatória, e a partir deles pode-se confirmar a baixa dispersão dos resultados e mostrar que os resíduos não apresentaram nenhuma tendência, validando as curvas obtidas.

A faixa linear obtida é satisfatória, uma vez que abrange todas as concentrações de trabalho e está apresentada na Tabela 5.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através do método da razão sinal-ruído 3:1 e 10:1, respectivamente, e os valores estão mostrados na Tabela 5. Os valores de LDE e LQE mostram que os compostos têm boa detectabilidade no sistema cromatográfico. Levando-se em consideração que na etapa de extração os agrotóxicos foram concentrados duas vezes, os valores de LQM foram satisfatórios para a análise destes agrotóxicos em grãos de soja, pois, atendem os limites máximos de resíduos impostos pela legislação.



**Tabela 4** - Parâmetros das curvas analíticas para os agrotóxicos por padronização externa *sem* e *com* superposição da matriz.

Agrotóxico	Sem superposição da matriz			Com superposição da matriz		
	Equação da reta	Linearidade (r)	Resíduos (rs)	Equação da reta	Linearidade (r)	Resíduos (rs)
IMZT	$y = -3849 + 99x$	0,996	-68 à +48	$y = 2574 + 53x$	0,970	-155 à +125
IMZQ	$y = -874 + 70x$	0,999	-22 à +27	$y = -840 + 61x$	0,984	-107 à +99
METS	$y = 306 + 104x$	0,999	-27 à +10	$y = -3604 + 68x$	0,982	-153 à +162
CARB	$y = 986 + 75x$	0,999	-57 à +67	$y = 586 + 46x$	0,998	-111 à +186
CLOR	$y = -3078 + 54x$	0,999	-74 à +61	$y = 51 + 21x$	0,995	-197 à +124
TEBU	$y = -3867 + 55x$	0,999	-43 à +60	$y = -3385 + 35x$	0,997	-77 à +136

**Tabela 5** – Faixa linear, limites de detecção e quantificação do equipamento e do método desenvolvido *com* superposição da matriz.

Agrotóxico	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LDE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQM* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LMR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
IMZT	80-1200	25	80	40	100
IMZQ	100-1500	32	100	50	50
METS	140-2100	40	140	70	-
CARB	140-2100	40	140	70	200
CLOR	100-1500	30	100	50	50
TEBU	160-2400	46	160	80	100

\* fator de concentração = 2

#### 5.4.3 – EXATIDÃO E PRECISÃO

A exatidão da metodologia desenvolvida foi avaliada a partir de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração (1 x LQ, 2 x LQ e 10 x LQ) e em triplicatas, somando nove determinações conforme sugerido pela ICH, 1996 e ANVISA, 2003. Esses resultados se mostraram muito satisfatórios, para os três níveis de concentração avaliados (Tabela 6), com exceção do metsulfurom-metil e tebuconazol, que no primeiro nível de fortificação apresentaram recuperações acima de 120 %. No caso do metsulfurom isso pode ser explicado pela presença de interferente no mesmo tempo de retenção. A literatura considera satisfatória, recuperações entre 50 e 120 % para amostras complexas (GARP, 1999).

Para os dois compostos que apresentaram interferentes no mesmo tempo de retenção (imazetapir e metsulfurom-metil), para o cálculo dos valores de recuperação, foi descontada da área obtida para a amostra fortificada a área do interferente.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, também em três diferentes níveis de concentração e em triplicata. A repetitividade apresentada pelos compostos livres de interferentes, imazaquim, carboxim, clorimurrom e tebuconazol foi muito boa, estando todas abaixo de 15 % no segundo e terceiro níveis de concentração avaliados e apresentando valores um pouco acima para o imazaquim e clorimurrom no primeiro nível de concentração. Já para os compostos que possuem interferentes co-eluídos no seu tempo de retenção, imazetapir e metsulfurom-metil, a repetitividade obtida somente foi satisfatória para o menor e o maior nível de concentração do metsulfurom, mostrando dessa forma, que a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção prejudica a análise.

A precisão intermedária foi avaliada realizando-se os ensaios em dias diferentes para avaliar se a metodologia desenvolvida apresenta o mesmo comportamento quando mudam algumas variáveis como temperatura, umidade, fase móvel entre outras. Os resultados obtidos para essas análises foram adequados sendo que apenas os compostos que possuem interferentes co-eluídos apresentaram um coeficiente de variação acima de 15 %, comprovando que a metodologia não é apenas repetitiva quando as análises são realizadas no mesmo dia, mas permanece constante mesmo com as mudanças de algumas variáveis.

Cabe ressaltar, que os resultados de recuperação e precisão obtidos nesse trabalho, quando comparados aos trabalhos citados na seção 2.3.1, que envolvem a determinação de agrotóxicos em matrizes complexas semelhantes à soja, foram significativos, uma vez que, se conseguiu determinar todos os compostos e só foram obtidos valores de recuperação fora da faixa aceitável, para dois compostos, sendo que um deles com interferente co-eluído, e mesmo assim, apenas no menor nível de concentração.

**Tabela 6** - Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida.

Agrotóxico	Recuperação (%)			Repetitividade (% CV)			Precisão Intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
IMZT	60	117	118	24	27	17	24	26	15
IMZQ	85	89	81	18	6	5	8	7	8
METS	231	114	98	8	25	8	14	24	14
CARB	110	108	115	4	15	3	8	7	8
CLOR	77	68	100	17	3	14	11	16	13
TEBU	190	120	110	5	9	5	5	9	8

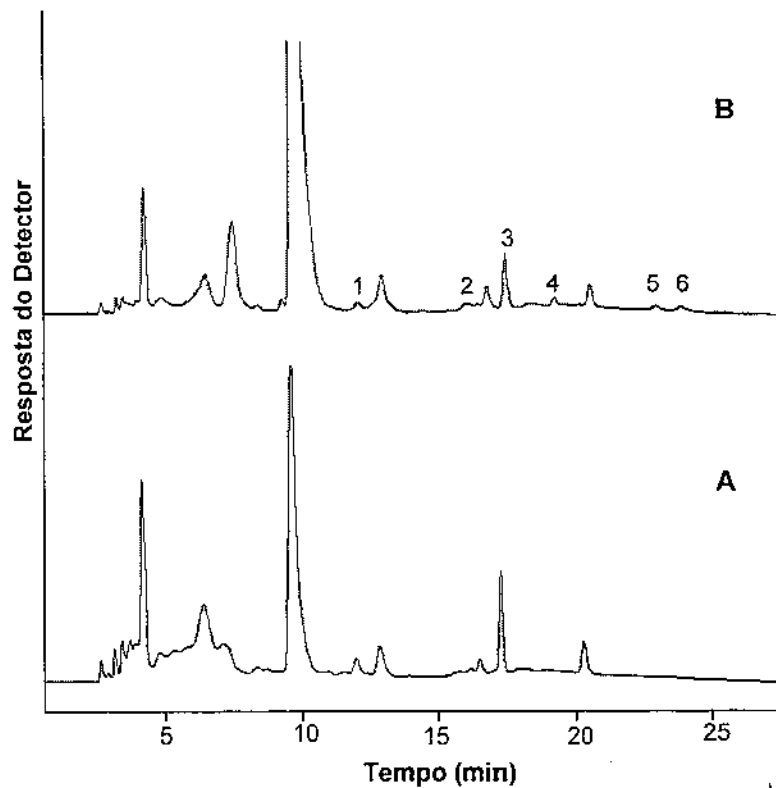
F1 = 1 x LQE ; F2 = 2 x LQE e F3 = 10 x LQE

#### 5.4.4 – ROBUSTEZ

A metodologia desenvolvida pode ser considerada robusta, por não ter sido afetada quando pequenas mudanças, como variação no pH da fase móvel em  $\pm 0,03$  e variações na temperatura da coluna foram introduzidas.

#### 5.5 – ANÁLISE DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE UMA CULTURA DE SOJA

Nas amostras analisadas (CD-205 e CD-213) não foram detectados resíduos de nenhum dos agrotóxicos em estudo e a matriz teve o mesmo comportamento apresentado pela amostra testemunha, como pode ser verificado na Figura 12, na qual está apresentado um cromatograma da amostra CD-205 e um cromatograma dessa mesma amostra fortificada com  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  dos agrotóxicos, mostrando a eficiência do método desenvolvido.



**Figura 12** - Cromatogramas das amostras de soja (CD-205) sem fortificação (A) e fortificada (B) com  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  dos agrotóxicos, detecção a 221 nm. Condições cromatográficas semelhantes à Figura 4. Identificação dos agrotóxicos: 1 – Imazetapir, 2 – Imazaquim, 3 – Metsulfurom-metil, 4 – Carboxim, 5 – Clorimurom-etil e 6 – Tebuconazol.



## 6 – CONCLUSÕES

As condições cromatográficas de separação otimizadas para os seis agrotóxicos (imazetapir, imazaquim, metsulfurom-metil, carboxim, clorimurrom-etil e tebuconazol), fase móvel acetonitrila:água (acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico), vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>, eluição por gradiente, com a seguinte programação: 0 min – 30:70; 10 min – 40:60; 13 min – 55:45; 15 min – 70:30; 17 min – 70:30; 18 min – 60:40; 20 min – 50:50; 22 min – 30:70; 28 min – 30:70, coluna C18 com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4 µm; coluna de guarda C18 com grupo polar embutido, Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, de 4 x 3 mm, tamanho de partícula de 4 µm e detecção por arranjo de díodos a 221 nm para o registro do cromatograma contendo os picos de todos de todos agrotóxicos, permitiram uma boa separação, em um tempo de análise de 25 min.

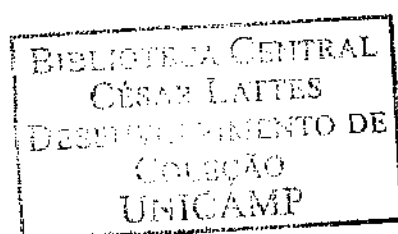
A DMFS é uma técnica de extração que exige a otimização de várias variáveis e que o operador seja constante durante a etapa da dispersão. Mas, por outro lado, se mostrou uma técnica de extração rápida, simples e que requer pequenas quantidades de solventes. Foi necessária uma etapa de *clean-up*, devido ao grande número de interferentes co-eluídos, que foram reduzidos com o uso de uma co-coluna de C8. A eliminação completa dos interferentes não foi alcançada devido a complexidade da matriz, mas pelos resultados obtidos na validação, pode-se afirmar, que é possível fazer-se a determinação do imazetapir e do metsulfurom-metil mesmo com a presença de interferentes, porém, a quantificação segura desses compostos só é possível, a partir do terceiro nível de quantificação, no qual os compostos apresentaram resultados satisfatórios de recuperação, repetitividade e precisão intermediária. Portanto, considera-se esta concentração como o limite de quantificação do metsulfurom-metil e do imazetapir.

A validação da metodologia desenvolvida mostrou bons resultados de recuperação para todos os agrotóxicos em estudo (50 – 120 %) com exceção para o metsulfurom-metil e tebuconazol no primeiro nível de concentração; precisão < 15 %, com exceção para o imazetapir e metsulfurom-metil nos menores níveis de concentração; boa linearidade, coeficiente de correlação > 0,9 e nenhuma tendência foi visualizada no gráfico de resíduos. O LQ obtido para o

método permite que os LMR impostos pelas agências reguladoras sejam atingidos, com exceção do imazetapir, levando-se em consideração a presença de interferente.

As análises das amostras provenientes de uma plantação de soja não apresentaram nenhuma contaminação pelos agrotóxicos estudados e tiveram um comportamento semelhante à amostra testemunha.

Em vista desses resultados, os objetivos delineados para esse trabalho foram alcançados de forma satisfatória, uma vez que o método desenvolvido e validado pode ser aplicado para a determinação dos agrotóxicos estudados em grãos de soja.



## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAKERLI, R. B.; FAY, E. F.; REMBISCHEVSKI, P.; VEKIC, A. M.; GODOY, K.; MAXIMIANO, A. A.; BONIFÁCIO, A.; Regras para nomenclatura dos nomes comuns dos agrotóxicos. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologica e Meio Ambiente*, v. 13, p. 29-36, jan./dez. 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 02 fev. 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

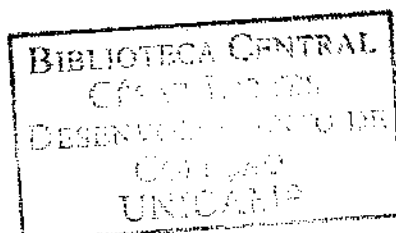
BAIRD, C.; *Química Ambiental*, 2ª ed., Editora Bookman, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, p. 622, 2002.

BARKER, S. A.; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 880, p. 63-68, June 2000.

BARKER, S. A.; Matrix Solid-Phase Dispersion. *LCGC North America supplement*, p. s37-s40, May 1998.

BARKER, S. A.; *Matrix Solid-Phase Dispersion – Review*. *Journal of Chromatography A*, v. 885, p. 115-127, July 2000.

BARREK, S.; PAISSE, O.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F.; Analysis of pesticide residues in essential oils of citrus fruit by GC-MS and HPLC-MS after solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 376, p. 157-161, Apr. 2003.



BIZUIK, M.; PRZYJAZNY, A., CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M.; Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 103-123, Nov. 1996.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R.; Avaliação do risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista da Saúde Pública*, v. 34 n. 5, p. 529-537, out. 2000.

CARVALHO, F. P.; Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, v. 9, p. 685-692, Oct. 2006.

CODEX ALIMENTARIUS (Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling). Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em 01 fev. 2006.

CORREIA, C. M. D.; OLIVEIRA, J. J. V.; TORNISIELO, V. L.; Avaliação de resíduos de endossulfan em matriz de vagem e soja para comparação de dois sistemas de aplicação do produto formulado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, p. 135 -139, maio 2001.

DÓREA, H. S.; LOPES W. G.; Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 892-896, out. 2004.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em 06 out. 2006.

FERRER, C.; GÓMEZ, M. J.; GARCIA-REYES, J. F.; FERRER, I.; THURMAN, E. M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; Determination of pesticides in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass

spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1069, p. 183-194, Feb. 2005.

GARCINUÑO, R. M.; RAMOS, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÂMARA, C.; Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1041, p. 35-41, Apr. 2004.

GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas), *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*, apostila, 1999.

ICH (International Conference Harmonisation), *Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/381/95)*. p. 1-13, Nov. 1996.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008*, p. 1-35, mar. 2003.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74 n. 5, p. 835-855, 2002.

KAWAGA, A.; *Standard table of food composition in Japan*. University of nutrition of Women, Tokyo, p. 104-105, Mar. 1995. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php?pagina=7](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=7)

KRISTENSON, M. E.; RAMOS, L.; BRINKMAN, U. A. Th.; Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25 n. 2, p. 96-111, Nov. 2006.

KUMAR, V.; RANI, A.; SOLANKI, S.; HUSSAIN, S. M.; Influence of growing environment on biochemical composition and physical characteristics of soybean seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 188 -195, Jun. 2006.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J.; Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes, *Journal of AOAC International*, v. 88 n. 2, p. 630-638, Apr. 2005.

ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C.; Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 520, p. 33-45, May 2004.

PANG, G. F.; LIU, Y. M.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; CAO, Y. Z.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; WU, Y. P.; GUO, T. T.; Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 384, p. 1366-1408, Mar. 2006.

PINGALI, P. L.; MARQUEZ, C. B.; PALIS, F. G.; Economic and health consequences of pesticide use in developing country agriculture. *American Journal of Agricultural Economics*, v. 76, p. 587-592, Mar. 1994.

PIZZUTTI, I. R.; Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para a análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS , GC-MS/MS e LC-MS/MS. 2006. 297 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

REKHA, B.; NAIK, S. N.; PRASAD, R.; Pesticide residue in organic and conventional food – risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety*, v. 13, p. 12-19, Feb. 2006.

REPETTO, R.; BALIGA, S.; Pesticides and the Immune System: The Public Health Risks, World Resources Institute, Washington, DC, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n.5, p. 771-780, jun. 2004.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G.; Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, v. 1076, p. 110-117, Apr. 2005.

TOTTI, S.; FERNÁNDEZ, M.; GHINI, S.; PICÓ, Y.; FINI, F.; MAÑES, J.; GIROTTI, S.; Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Talanta*, v. 69, p. 724-729, May 2006.

US-EPA (United States Environmental Protection Agency). Disponível em: <http://www.epa.gov>. Acesso em 01 fev. 2006.

US-FDA (United States Food and Drug Administration). Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em 01 fev. 2006.

USP (United States Pharmacopeia Convention), *US Pharmacopeia 24*, Validation of Compendial Methods, 1225, Rockville, 1999.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F.; Análise quantitativa por cromatografia. *ChemKeys*, São Paulo, p. 1-18, out. 2003. Disponível em: [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com), acessado em 22 set. 2006.