



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

CAMILA HONDA OGIHARA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO
DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SOLO EMPREGANDO O
MÉTODO QUECHERS E A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

**CAMPINAS
2018**

CAMILA HONDA OGIHARA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO
DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SOLO EMPREGANDO O
MÉTODO QUECHERS E A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Química na área de Química Analítica.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Cristina Breitz

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CAMILA HONDA OGIHARA, ORIENTADA PELA
PROF^a DR^a MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ.**

**CAMPINAS
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Og4d Ogihara, Camila Honda, 1989-
Desenvolvimento e validação de método para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em solo empregando o método QuEChERS e a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial / Camila Honda Ogihara. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marcia Cristina Breitreitz.
Coorientador: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Solos. 2. Agrotóxicos. 3. QuEChERS, Método de. 4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM-EM). 5. Validação de método analítico. I. Breitreitz, Marcia Cristina, 1979-. II. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and method validation for determination of multiresidues of pesticides in soil using the QuEChERS method and ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Soils

Pesticides

QuEChERS method

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Method validation

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Marcia Cristina Breitreitz [Orientador]

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Osmar Damian Prestes

Data de defesa: 26-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Cristina Breitz (Orientadora)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (DQ-UFSM-Santa Maria)

Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pelo(a) aluno(a)
CAMILA HONDA OGIHARA, aprovada pela Comissão
Julgadora em 26 de fevereiro de 2018.

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus avós,
Akio, Leico, Rosa (in memoriam) e Hiroyuki
que sempre me apoiaram e me incentivaram
nos estudos e na vida.*

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.*
(Madre Teresa de Calcutá)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida e me dar forças para seguir em frente.

À Prof^a Dr^a Márcia Cristina Breitreitz pela orientação, amizade e ensinamentos que muito contribuíram durante essa jornada.

À Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela co-orientação, pela amizade, disponibilidade, por acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente e pelos ensinamentos que muito me enriqueceram pessoalmente e profissionalmente, os meus mais sinceros agradecimentos.

À banca examinadora, Prof^a Dr^a Carla Beatriz Grespan Bottoli e ao Prof^o Dr^o Osmar Damian Prestes pelas excelentes sugestões e contribuições que muito enriqueceram este trabalho.

Aos meus pais Ivete e Sergio, pelo apoio, incentivo e compressão e que sem eles nada seria possível.

Aos meus irmãos Vanessa e Rafael por me apoiarem e acompanharem durante todos esses anos. A minha irmã pela sua paciência, cumplicidade e por ser a amiga a quem sempre recorri e que nunca me abandonou nos momentos que precisei e ao meu irmão que me ajudou na execução de alguns experimentos, muito obrigada.

Aos amigos e colegas dos laboratórios NovaCrom e LabFarQui pela convivência, amizade e colaboração. Em particular, Cláudio, Julie, Luana, Leandro e Marcela e pela amizade e por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos e descontraídos. E em especial a Fabi, pela amizade por todos esses anos.

À Lucília, técnica responsável pelo laboratório, por todo apoio técnico e pela amizade.

À Priscila, técnica responsável pelo Laboratório de Espectrometria de Massas Institucional, pelo apoio técnico, paciência, amizade e pelos valiosos ensinamentos.

À Heloisa Kalvan, pelas amostras de agrotóxicos fornecidas para a realização dos testes de dissipação com formulações comerciais.

Aos agricultores que muito gentilmente cederam as amostras de solo para a aplicação do método.

A Embrapa Solos pelas amostras de solo empregadas na etapa de validação do método.

A todos aqueles de forma direta ou indireta contribuíram no desenvolvimento e execução desta dissertação de mestrado.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química pelo suporte técnico e acolhimento.

Ao órgão de fomento Capes pela bolsa concedida.

Resumo

O uso indiscriminado de agrotóxicos nas lavouras pode acarretar problemas à segurança alimentar, bem como gerar contaminação do meio ambiente, nomeadamente, solos e águas subterrâneas e superficiais, tornando necessários métodos simples, exatos e precisos para determiná-los. No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método para determinação de agrotóxicos em solo. Para isto foram avaliadas as três versões do método QuEChERS, “Original”, tampão “Acetato” e tampão “Citrato”, na ausência e na presença da etapa *clean up* na extração de agrotóxicos do solo e a UHPLC-MS/MS na quantificação e confirmação dos mesmos. A limpeza dos extratos consistiu em uma extração em fase sólida dispersiva com MgSO₄ anidro e PSA ou MgSO₄ anidro, PSA e C18. As três versões apresentaram resultados satisfatórios para a maioria dos agrotóxicos, segundo preconiza o guia SANTE 2015 (recuperações entre 70-120% e CV ≤ 20%), no entanto, a versão QuEChERS “Acetato” com *clean up* apresentou, em média, as melhores recuperações, sendo escolhida para a validação. Previamente ao preparo da amostra, o solo foi homogeneizado e peneirado. O método estabelecido para o preparo da amostra consistiu na hidratação do solo 1:1 (m/v), 30 min após a fortificação, seguida pela extração com acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético e partição com a adição de MgSO₄ anidro e acetato de sódio anidro e *clean up* utilizando PSA e MgSO₄ anidro. O método desenvolvido foi validado em dois tipos de solos (Solo I e Solo II) que possuíam diferentes porcentagens de matéria orgânica. Foram alcançados os valores estabelecidos pelo guia SANTE 2015 para a maior parte dos agrotóxicos estudados e observou-se que, devido às propriedades químicas do Solo II, foi necessário empregar um maior tempo e velocidade de centrifugação na etapa de partição para que ocorresse a separação das fases. Para o Solo I, foram obtidos LOQ de 2, 4, 10 e 20 µg kg⁻¹ e faixa linear de trabalho entre 2/10-70 µg kg⁻¹ e 4/20-140 µg kg⁻¹. O efeito matriz (EM) foi significativo (≥ ± 20%) para a maior parte dos agrotóxicos, as recuperações ficaram entre 71 – 119% e as repetibilidades apresentaram CV ≤ 20%, para a maior parte dos analitos, com exceção do fenarimol, do fipronil e do clorpirifós, mas em todos estes casos os valores de recuperação foram satisfatórios. Apenas o clorpirifós apresentou precisão intermediária com CV ≥ 20%. Para o Solo II, os valores de LOQ e faixa linear de trabalho foram semelhantes aos obtidos para o Solo I, o EM foi significativamente superior ao obtido para o Solo I, as recuperações ficaram entre 67 – 131%, as repetibilidades apresentaram CV ≤ 20%, exceto para o fipronil, em todos os casos e a precisão intermediária foi inferior a 20%. O método foi aplicado, com sucesso, em amostras de solos provenientes de diferentes cultivos de hortaliças não folhosas e folhosas, sendo detectados 10 agrotóxicos do escopo estudado. No estudo de dissipação de agrotóxicos comerciais nos solos estudados, pode-se verificar que os mesmos são mais estáveis na presença de iluminação artificial do que na presença de umidade e também foi possível correlacionar determinadas propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados com o tempo de dissipação e, em alguns casos, estimar o DT50.

Palavras-chaves: Solos; Agrotóxicos; Método QuEChERS; Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial; Validação de método analítico.

Abstract

The indiscriminate use of pesticides in crops can lead to food safety problems, as well as to environmental contamination of soil, groundwater and surface water, therefore simple, accurate and precise methods for their quantification are necessary. In the present work, a method for the determination of pesticides in soil was developed and validated. Three versions of the QuEChERS method, "Original", "Acetate" and "Citrate" were evaluated in the absence and presence of the clean-up step for the extraction of pesticides from soil with UHPLC-MS/MS for quantification and confirmation. The clean-up of the extracts consisted of a dispersive solid phase extraction with anhydrous MgSO_4 and PSA or anhydrous MgSO_4 , PSA and C18. The three versions presented satisfactory results for pesticides, according to SANTE guide 2015 (recoveries between 70-120% and $\text{CV} \leq 20\%$), however, the QuEChERS version with acetate buffer and a clean-up step, gave on average, the best recoveries, being chosen for validation. Prior to sample preparation, the soil was homogenized and sieved. The validated method involved 1:1 (w/v) soil hydration, 30 min after fortification, followed by extraction with acetonitrile acidified with 1% (v/v) acetic acid and partition with the addition of anhydrous MgSO_4 and anhydrous sodium acetate and clean-up using PSA and anhydrous MgSO_4 . The method developed was validated in two types of soils (Soil I and Soil II) with different percentages of organic matter. The values established by the SANTE guide 2015 for most of the pesticides studied were reached and it was observed that, due to the chemical properties of Soil II, it was necessary to use a longer time with a higher speed of centrifugation in the partitioning step to separate the phases. For Soil I, LOQ were 2, 4, 10 and $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a linear working range between $2/10-70 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $4/20-140 \mu\text{g kg}^{-1}$. The matrix effect (ME) was significant ($\geq \pm 20\%$) for most pesticides, recoveries were between 71 - 119% and repeatability showed $\text{CV} \leq 20\%$, for most of the analytes, except for fenarimol, fipronil and chlorpyrifos, but in all these cases the recovery values were satisfactory. Only chlorpyrifos presented intermediate accuracy with $\text{CV} \geq 20\%$. For Soil II, LOQ and linear range were similar to those obtained for Soil I and the ME was significantly higher than that obtained for Soil I, recoveries were between 67 - 131%, repeatability had a $\text{CV} \leq 20\%$, except for fipronil. In all cases the intermediate accuracy was less than 20%. The method was successfully applied to soil samples from different leafless vegetables and vegetables crops, and nine of the studied pesticides were detected. In the study of dissipation of commercial pesticides in the studied soils, it can be verified that they are more stable in the presence of artificial lighting than in the presence of humidity and it was also possible to correlate certain physicochemical properties of the selected pesticides with the time of dissipation and, in some cases, estimate the DT50.

Keywords: Soils; Pesticides; QuEChERS method; Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; Method validation.

Lista de figuras

Figura 1: Vendas de agrotóxicos por classe de produto comercial, de 2011 a 2015	31
Figura 2: Quantidade vendida de agrotóxicos como produto comercial e ingrediente ativo de 2011 a 2015	32
Figura 3: Produção de hortaliças não folhosas (A) e folhosas (B), segundo o Censo Agropecuário de 2006	33
Figura 4: Agrotóxicos estudados detectados em hortaliças não folhosas, pelo programa PARA, de 2013 a 2015.....	37
Figura 5: Agrotóxicos estudados detectados em hortaliças folhosas, pelo programa PARA, de 2013 a 2015	37
Figura 6: Perfil do solo e seus horizontes	39
Figura 7: Destino dos resíduos de agrotóxicos no solo.....	41
Figura 8: Método QuEChERS em suas três versões (A) “Original”, (B) “Acetato” e (C) “Citrato”	56
Figura 9: Esquema do processo de ionização por ESI em modo positivo	62
Figura 10: Solução contendo a mistura de 11 agrotóxicos comerciais.....	83
Figura 11: Mapa pedológico do estado de São Paulo	93
Figura 12: Gráfico da variação da porcentagem de metanol em função do tempo de análise esquematizando a programação do gradiente empregada.	97
Figura 13: Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS para separação dos agrotóxicos e do padrão interno em solvente (metanol).....	97
Figura 14: Extratos obtidos utilizando as três versões do método QuEChERS na ausência e na presença da etapa de <i>clean up</i> . Matriz: Solo I.	98
Figura 15: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato branco da matriz Solo I após extração utilizando a versão QuEChERS “Acetato”, na presença da etapa de <i>clean up</i> (PSA + MgSO ₄). Matriz: Solo I.	101
Figura 16: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato fortificado da matriz Solo I após extração utilizando a versão QuEChERS“ Acetato” na presença da etapa de <i>clean up</i> (PSA + MgSO ₄). Matriz: Solo I.	102
Figura 17: Porcentagem do efeito matriz para os agrotóxicos estudados. Matriz: Solo I.....	104
Figura 18: Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos estudados. Matriz: Solo I.	105
Figura 19: Amostras de solo após a etapa de partição. (A) Solo I e (B) Solo II.....	108

Figura 20: Esquema do método QuEChERS "Acetato" empregado na validação.....	108
Figura 21: Extratos obtidos após a extração com o método QuEChERS "Acetato" na presença de <i>clean up</i> (PSA + MgSO ₄).	109
Figura 22: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato branco utilizando a versão QuEChERS "Acetato" na presença da etapa de <i>clean up</i> (PSA + MgSO ₄). Matriz: Solo II.	110
Figura 23: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato fortificado após extração utilizando a versão QuEChERS "Acetato" na presença da etapa de <i>clean up</i> (PSA + MgSO ₄). Matriz: Solo II.	111
Figura 24: Porcentagem de efeito matriz para os agrotóxicos estudados.	114
Figura 25: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na presença de luz artificial e de umidade.....	121
Figura 26: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na presença de luz artificial e na ausência de umidade.....	121
Figura 27: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na ausência de luz artificial e na presença umidade.....	121
Figura 28: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na ausência de luz artificial e de umidade.....	121
Figura 29: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na presença de luz artificial e de umidade.....	122
Figura 30: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na presença de luz artificial e na ausência de umidade.....	122
Figura 31: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na ausência de luz artificial e na presença umidade.....	122
Figura 32: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na ausência de luz artificial e de umidade.....	122

Lista de tabelas

Tabela 1: Cronologia do desenvolvimento dos agrotóxicos.	25
Tabela 2: Modo de aplicação e classificação dos agrotóxicos estudados.	26
Tabela 3: Propriedades físico - químicas dos agrotóxicos estudados.....	30
Tabela 4: Agrupamento de culturas das hortaliças não folhosas e folhosas para extrapolação de LMR.....	35
Tabela 5: Número de agrotóxicos detectados nas amostras monitoradas versus número de agrotóxicos não autorizados.	36
Tabela 6: Valores permitidos segundo a Portaria 2.914 do Ministério da Saúde e segundo o Regulamento Nacional de Água Potável dos Estados Unidos	46
Tabela 7: Valores orientadores para agrotóxicos organoclorados em solos e águas subterrâneas, segundo a CETESB.	47
Tabela 8: Valores orientadores de intervenção para agrotóxicos em solos e águas subterrâneas segundo a Lista Holandesa	48
Tabela 9: Técnicas de preparo de amostras sólidas.....	50
Tabela 10: Comparação entre as técnicas de extração sólido- líquido.....	52
Tabela 11: Comparação das diferentes técnicas analíticas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos.	58
Tabela 12: Exemplos de análises de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS em amostras ambientais.....	64
Tabela 13: Análises de resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS em amostras de solo	65
Tabela 14: Informações químicas, pureza do padrão utilizado e estruturas dos agrotóxicos estudados	76
Tabela 15: Informações químicas, pureza e estruturas do padrão interno utilizado.	80
Tabela 16: Concentrações das soluções dos agrotóxicos estudados na mistura 1a.....	81
Tabela 17: Dados gerais dos agrotóxicos comerciais utilizados nos estudos de dissipação. ..	84
Tabela 18: Composição química das amostras de solo empregadas no desenvolvimento e validação do método.....	85
Tabela 19: Composição das fases móveis avaliadas.	86
Tabela 20: Tipos e programas de gradientes testados na eluição dos analitos em uma vazão de 0,1 mL min ⁻¹ e temperatura da coluna de 40 °C.....	87

Tabela 21: Tratamento das amostras de solo no estudo de dissipação dos agrotóxicos comerciais.....	92
Tabela 22: Composição química das amostras de solo provenientes de Atibaia – SP.....	93
Tabela 23: Parâmetros otimizados do sistema UHPLC-MS/MS.	98
Tabela 24: Parâmetros otimizados no sistema UHPLC-MS/MS para as transições no modo MRM.	99
Tabela 25: Valores de faixa linear de trabalho, curva analítica e coeficiente de determinação obtido em solução preparada no extrato da matriz Solo I.	112
Tabela 26: Valores de faixa linear de trabalho, curva analítica e coeficiente de determinação obtido em solução preparada no extrato da matriz Solo II.	112
Tabela 27: Níveis de fortificação e as respectivas concentrações dos agrotóxicos. Matriz Solo I.	115
Tabela 28: Níveis de fortificação e as respectivas concentrações dos agrotóxicos. Matriz Solo II.	115
Tabela 29: Valores de LOQ, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), matriz Solo I.	117
Tabela 30: Valores de LOQ, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), matriz Solo II.	118
Tabela 31: Valores de DT50 (dias) estimados para as amostras de Solo I e Solo II.....	124
Tabela 32: Concentrações (mg kg^{-1}) e estimativa do desvio padrão absoluto dos agrotóxicos encontrados nas amostras de solo.	126
Tabela 33: Resíduos de agrotóxicos detectados em solo (mg kg^{-1}) e seus respectivos LMR (mg kg^{-1}) para as diferentes culturas analisadas	128

Lista de abreviaturas

- 3D IT - do inglês, *3 Dimension Ion Trap* (Armadilha de íons Tridimensional)
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI - do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
- API – do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization* (Ionização a Pressão Atmosférica)
- ASE – do inglês, *Accelerated Solvent Extraction* (Extração Acelerada por Solvente)
- C18 – Octadecil
- C8 – Octil
- CV – Coeficiente de Variação
- CE- do inglês, *Capillary Electrophoresis* (Eletroforese Capilar)
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- CSFI – Cultura com Suporte Fitossanitário Insuficiente
- CZE - do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis* (Eletroforese Capilar de Zona)
- DDD - Diclorodifenildicloetano
- DDE - Diclorodifenildicloroetileno
- DDT – Diclorodifeniltricloroetano
- DPX: do inglês, *Disposable Pipette Extraction* (Extração em Ponteiros Descartáveis)
- d-SPE – do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida Dispersiva)
- DT50 – Tempo de meia vida
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA US – do inglês, *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
- EPI- Equipamento de Proteção Individual
- ESI - do inglês, *Electrospray Ionization* (Ionização por *Eletrospray*)
- FAO – do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
- FDA – do inglês, *Food and Drug Administration* (Agência Administradora de Alimentos e Fármacos dos Estados Unidos)
- GC – do inglês, *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
- GC-MS – do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas)

GC-MS/MS – do inglês, *Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial)

GUS - do inglês, *Groundwater Ubiquity Score*

HCH - Hexaclorocicloexano

HSPME – do inglês, *Headspace-Solid Phase Microextraction* (Microextração em Fase Sólida por *Headspace*)

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

K_a – Constante de Ionização

K_d - Coeficiente de Partição do Solo

K_{om} - Coeficiente de Partição do Solo Normalizado em Unidades de Matéria Orgânica

K_{oc} - Coeficiente de Partição do Solo Normalizado em Unidades de Carbono Orgânico

K_{foc} – Constante de Sorção do Solo Normalizado em Unidades de Carbono Orgânico

LC – do inglês, *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida)

LC-MS – do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas)

LC-MS/MS – do inglês, *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial)

LC-UV - do inglês, *Liquid Chromatography- Ultraviolet Visível* (Cromatografia Líquida com detector por Absorção no Ultravioleta Visível)

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – do inglês, *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LOQ – do inglês, *Limit of Quantification* (Limite de Quantificação)

LPME – do inglês, *Liquid-Phase Microextraction* (Microextração em Fase Líquida)

LSE – do inglês, *Liquid-Solid Extraction* (Extração Sólido-Líquido)

MAE – do inglês, *Microwave Assisted Extraction* (Extração Assistida por Micro-ondas)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCPA - Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético

MIP – do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers* (Polímeros Impressos Molecularmente)

MIP – Manejo Integrado de Pragas

MRM - do inglês, *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Múltiplas)

MSPD – do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion* (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)

ONU – Organização das Nações Unidas

On-line SPE - do inglês, *On-line Solid- Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida *on-line*)

PAH – do inglês, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos)

PARA- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

pH – Potencial Hidrogeniônico

pK_a - Constante de dissociação

PCB – do inglês, *Polychlorinated Biphenyls* (Bifenil Policlorados)

PI – Padrão Interno

PLE – do inglês, *Pressurized Liquid Extraction* (Extração por Líquido Pressurizado)

PPA – Potencial de Periculosidade Ambiental

PSA – do inglês, *Primary Secondary Amine* (Amina Primária Secundária)

PSWE – do inglês, *Pressurized Subcritical Water Extraction* (Extração com Água Pressurizada Subcrítica)

QqQ – do inglês, *Triple Quadrupole* (Tripla Quadrupolo)

QqLIT – do inglês, *Quadrupole Linear Ion Trap* (Quadrupolo- Armadilha de Íons Linear)

Q – TOF - do inglês, *Quadrupole Time of Flight* (Quadrupolo- Tempo de Vôo)

QuEChERS – do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (Acrônimo de Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro)

SFC - do inglês, *Supercritical Fluid Chromatography* (Cromatografia com Fluido Supercrítico)

SFE – do inglês, *Supercritical Fluid Extraction* (Extração com Fluido Supercrítico)

SFE-DLLME – do inglês, *Supercritical Fluid Extraction-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* (Microextração Dispersiva Líquido-Líquido-Extração com Fluido Supercrítico)

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SPME – do inglês, *Solid Phase Microextraction* (Microextração em Fase Sólida)

SWE – do inglês, *Subcritical Water Extraction* (Extração com Água Subcrítica)

TOF - do inglês, *Time of Flight* (Tempo de Vôo)

TP – do inglês, *Transformation Products* (Produtos de Transformação)

UHPLC-MS/MS - do inglês, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial)

USE – do inglês, *Ultrasonic Solvent Extraction* (Extração Assistida por Ultrassom)

Sumário

<i>Capítulo I: Introdução</i>	22
1. Introdução	23
1.1 Agrotóxicos	23
1.1.1 Definição e um breve histórico.....	23
1.1.2 Classificação e propriedades físico-químicas.....	24
1.1.2 (a) Solubilidade em água	27
1.1.2 (b) log P	27
1.1.2 (c) Pressão de vapor	27
1.1.2 (d) Coeficiente de adsorção no solo (K_{oc}) e coeficiente de sorção normalizado (K_{foc}).....	28
1.1.2 (e) Tempo de meia vida (DT50)	29
1.1.2 (f) Constante de dissociação (pK_a).....	29
1.1.2 (g) Índice GUS	29
1.2 Comércio de agrotóxicos no Brasil	31
1.3 Produção de hortaliças não folhosas e folhosas	32
1.3.1 Culturas com suporte fitossanitário insuficiente	34
1.3.2 Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos- PARA	35
1.4 Solo	38
1.4.1 Definição, propriedades e composição	38
1.4.2 Contaminação de solos por agrotóxicos	40
1.4.2 (a) Degradação química	41
1.4.2 (b) Fotodegradação	42
1.4.2 (c) Degradação microbiológica	43
1.5 Legislação	45
1.6 Preparo de amostra aplicado na extração de agrotóxicos de matrizes sólidas	48
1.7 Método QuEChERS	55
1.8 Técnicas analíticas utilizadas na determinação de agrotóxicos	57
1.9 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	59
1.9.2 Interfaces	61
1.9.3 Analisadores de massas	62
1.9.4 Efeito matriz	62
1.10 Análise multirresíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS em amostras	

ambientais.....	63
1.11 QuEChERS e técnicas cromatográficas empregadas à amostras ambientais.....	64
1.12 Validação de métodos analíticos.....	64
1.12.1 Parâmetros analíticos (figuras de mérito) para validação de métodos	67
1.12.1 (a) Seletividade	68
1.12.1 (b) Faixa linear de trabalho	68
1.12.1 (c) Efeito matriz	68
1.12.1 (d) Exatidão (Recuperação)	69
1.12.1 (e) Precisão.....	69
 <i>Capítulo II: Objetivos.....</i>	 <i>70</i>
2. Objetivos.....	71
2.1 Etapas do trabalho.....	71
 <i>Capítulo III: Parte experimental.....</i>	 <i>72</i>
3. Parte experimental.....	73
3.1 Reagentes, solventes e gases	73
3.2 Materiais	74
3.3 Equipamentos.....	74
3.4 Padrões analíticos dos agrotóxicos estudados	75
3.5 Padrão interno selecionado	80
3.6 Preparo das soluções estoque e de trabalho	80
3.6.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho dos agrotóxicos para desenvolvimento do método.....	81
3.6.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho dos agrotóxicos para a validação do método.....	82
3.6.3 Preparo da solução empregada nos testes de dissipação.....	83
3.7 Solo empregado no desenvolvimento e na validação do método	83
3.8 Otimização das condições de análise dos resíduos de agrotóxicos utilizando a UHPLC-MS/MS	85
3.8.1 Escolha da composição da fase móvel e das condições cromatográficas.....	86
3.8.2 Condições de análise empregando a UHPLC-MS/MS	87

3.9 Avaliação da potencialidade das três versões do método QuEChERS na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em solo.....	88
3.9.1 Método QuEChERS "Original"	88
3.9.2 Método QuEChERS "Citrato"	89
3.9.3 Método QuEChERS "Acetato"	89
3.10 Ensaios preliminares para a avaliação do método QuEChERS a ser empregado	90
3.10.1 Seletividade.....	90
3.10.2 Faixa linear de trabalho.....	90
3.10.3 Efeito matriz	90
3.10.4 Exatidão (Recuperação).....	91
3.11 Validação do método QuEChERS "Acetato"	91
3.12 Aplicação do método QuEChERS versão "Acetato" na avaliação do tempo de dissipação dos agrotóxicos em solo.....	91
3.13 Aplicação do método QuEChERS versão "Acetato" em amostras de solo provenientes de diferentes tipos de cultivos	92
3.14 Destino dos resíduos gerados	94
<i>Capítulo IV: Resultados e Discussão.....</i>	<i>95</i>
4. Resultados e Discussão	96
4.1 Escolhas da composição da fase móvel e das condições cromatográficas.....	96
4.2 Otimização das condições de fragmentação no UHPLC-MS/MS.	97
4.3 Comparação visual dos extratos obtidos com a aplicação das três versões do método QuEChERS	98
4.4 Ensaios preliminares para avaliação do método QuEChERS a ser empregado...	100
4.4.1 Seletividade.....	100
4.4.2 Faixa linear de trabalho.....	100
4.4.3 Efeito matriz	103
4.4.4 Exatidão (Recuperação).....	103
4.5 Validação do método QuEChERS versão "Acetato"	107
4.5.1. Seletividade.....	109
4.5.2 Faixa linear de trabalho.....	109
4.5.3 Efeito matriz	113

4.5.4 Limites de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	113
4.6 Dissipação de produtos formulados de agrotóxicos em solo	119
4.7 Aplicação do método QuEChERS versão “Acetato” em amostras de solo provenientes de diferentes tipos de cultivos	124
<i>Capítulo V: Conclusões e Sugestões de trabalhos futuros</i>	<i>129</i>
5. Conclusões	130
5.1 Sugestões de trabalhos futuros	132
<i>Capítulo VI: Referências bibliográficas.....</i>	<i>133</i>
6. Referências bibliográficas	108
<i>Capítulo VII: Apêndice</i>	<i>144</i>
<i>Gráficos de dissipação de produtos formulados: Matriz Solo I</i>	<i>145</i>
<i>Gráficos de dissipação de produtos formulados: Matriz Solo II.....</i>	<i>157</i>

Capítulo I: Introdução

1. Introdução

O uso de agrotóxicos se faz necessário devido ao aumento da população mundial e à queda na produtividade, relacionada às perdas por doenças, pragas e ao desgaste do solo. No entanto, a aplicação de agrotóxicos deve ser consciente, pois o uso indiscriminado pode gerar efeitos negativos na biodiversidade, causados pela contaminação de solos, águas subterrâneas e superficiais e no ar, e prejudicar a saúde dos trabalhadores rurais, que muitas vezes desconhecem os malefícios desses compostos e não fazem uso correto dos equipamentos individuais de proteção (EPI), e dos consumidores, devido à contaminação dos alimentos. Atualmente, centenas de agrotóxicos estão registrados para serem aplicados nas mais diversas culturas e, a cada dia, novas moléculas são desenvolvidas com o intuito de serem mais seletivas ao alvo desejado, diminuindo, assim, a toxicidade aos outros seres vivos^{1; 2}. Além disso, novas técnicas, como o manejo integrado de pragas (MIP) e doenças, a produção orgânica e o desenvolvimento de bioagrotóxicos (produtos feitos a partir de substâncias naturais, como plantas e microrganismos), estão sendo empregadas, visando aumentar a produtividade com menor impacto ambiental.

1.1 Agrotóxicos

1.1.1 Definição e um breve histórico

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), agrotóxicos são quaisquer substâncias ou misturas destinadas a prevenção, destruição ou controle de qualquer tipo de praga, incluindo vetores de doenças humanas e de animais, espécies indesejáveis de plantas ou animais que possam interferir na produção, processamento, transporte ou comercialização de alimentos, *commodities*, madeira e seus derivados e substâncias administradas aos animais para o controle de parasitas. O termo também inclui substâncias destinadas ao uso como reguladores de crescimento em plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes preventivos na queda de frutos e substâncias aplicadas às culturas antes ou após a colheita para proteger os produtos da deterioração durante o armazenamento e o transporte.³

Desde o início da agricultura, os produtores utilizavam “agrotóxicos” para evitar danos às suas culturas, sendo o enxofre o primeiro que se tem conhecimento. No século XV,

produtos químicos tóxicos, como arsênio e mercúrio, foram utilizados no controle de pragas. Dois séculos mais tarde, o sulfato de nicotina foi extraído das folhas de tabaco para ser usado como inseticida.⁴

O início da era moderna dos agrotóxicos se deu com a síntese do diclorodifeniltricloroetano (DDT) em 1939, pelo químico suíço Paul Hermann Müller. Além de ser usado como inseticida em lavouras, foi utilizado também no controle de vetores de doenças, como a malária e o tifo, e seu emprego foi muito difundido durante a Segunda Guerra Mundial.²

No entanto, em 1960 foi confirmado que alguns inseticidas da mesma classe do DDT, os organoclorados, como o dieldrin, endrim e aldrim, não eram degradados no meio ambiente e se bioacumulavam em organismos vivos. Em 1972, esses compostos foram banidos, primeiramente nos Estados Unidos e em seguida na Europa.² No Brasil, o DDT foi retirado do mercado em duas etapas, na primeira, sua autorização foi cancelada em 1985 para uso agrícola e na segunda, em 1998, foi proibido seu uso em campanhas de saúde pública. Mas, apenas em 2009 foi sancionada a lei que proibiu a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso desse agrotóxico.⁵

Após a síntese do DDT houve um grande impulso na indústria de agrotóxicos, novos compostos orgânicos com diferentes aplicações foram introduzidos na agricultura, como pode ser observado na **Tabela 1**.

1.1.2 Classificação e propriedades físico-químicas

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras, como classe química (organoclorados, piretróides, etc.), o organismo alvo que combatem (inseticidas, fungicidas, etc.), modo de ação bioquímico, grau toxicológico (I Extremamente tóxico; II Altamente tóxico; III Medianamente tóxico; IV Pouco tóxico) e potencialidade de periculosidade ambiental (PPA) (Classe I – Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente; Classe II – Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente; Classe III – Produto PERIGOSO ao meio ambiente; Classe IV – Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente).^{2,6} A **Tabela 2** ilustra algumas dessas classificações e o modo de aplicação dos agrotóxicos estudados.

*Dissertação de Mestrado***Tabela 1:** Cronologia do desenvolvimento dos agrotóxicos.

Período	Exemplo	Fonte	Características
1800-1900	Nitrofenóis, clorofenóis, creosoto, naftaleno, óleos derivados de petróleo	Química orgânica, subprodutos da produção de gás do carvão	Geralmente não eram específicos e apresentavam alta toxicidade para o agricultor ou outros organismos
1945-1955	Organoclorados, DDT e hexaclorocicloexano (HCCH)	Síntese orgânica	Persistentes, boa seletividade, bons resultados na agricultura e no combate de vetores de doenças (insetos), porém com grandes efeitos nocivos ao ambiente, podendo gerar resistência às pragas.
1955-1970	Inibidores de colinesterase, organofosforados e carbamatos	Síntese orgânica, uso da relação entre estrutura e atividade	Menor persistência no ambiente, menor toxicidade ao agricultor e redução dos problemas ambientais
1970-1985	Piretróides, abamectinas e agrotóxicos biológicos	Refinamento da relação entre a estrutura e a atividade, novos sistemas que direcionam para o alvo desejado	Não são tão seletivos e podem gerar resistência às pragas, alto custo e persistência variável
1985-presente	Engenharia genética	Alteração genética em plantas para criar resistência a determinados agrotóxicos.	Pode ocasionar problemas como mutação dos genes e ruptura do sistema microbiológico.

Adaptada da referência.⁴

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos é um pré-requisito necessário para entender o seu comportamento no meio ambiente, no metabolismo de animais e plantas e no desenvolvimento de métodos analíticos. As propriedades mais relevantes no estudo da determinação desses compostos em solos são: solubilidade em água, log P, pressão de vapor, coeficiente de adsorção no solo (K_{oc}), coeficiente de sorção normalizado (K_{foc}), tempo de meia vida (DT50), constante de dissociação (pK_a) e índice GUS (do inglês, *Groundwater Ubiquity Score*).² Essas propriedades, em sua maioria, indicam a tendência de um agrotóxico em ser lixiviado e contaminar águas superficiais e subterrâneas e estão descritas na **Tabela 3** para os agrotóxicos estudados neste trabalho.

Dissertação de Mestrado

Tabela 2: Modo de aplicação e classificação dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Modo de Aplicação	Classificação organismo alvo	Grupo Químico	Classificação toxicológica	PPA
Atrazina	-	Herbicida	Triazina	III	II
Azoxistrobina	Foliar	Fungicida	Estrobilurina	III	III
α-Cipermetrina	Foliar	Inseticida	Piretróide	II	II
Ciromazina	Foliar	Inseticida	Triazina	IV	III
Clorantraniliprole	Foliar	Inseticida	Antranilamida	III	II
Clorpirifós	Foliar	Inseticida	Organofosforado	I	I
Diafentiurom	Foliar	Inseticida	Feniltiouréia	III	II
Difenoconazol	Foliar	Fungicida	Triazol	I	II
Fenarimol	Foliar	Fungicida	Pirimidina	III	II
Fipronil	Foliar	Inseticida	Fenilpirazol	I	II
Fluopicolida	Foliar	Fungicida	Benzamida	III	II
Imidacloprido	Foliar	Inseticida	Neonicotinóide	II	III
Lufeniurom	Foliar	Acaricida/Inseticida	Benzoiluréia	IV	II
Metribuzim	-	Herbicida	Triazinona	III	II
Mandipropamida	Foliar	Fungicida	Mandelamida	II	IV
Napropamida	-	Herbicida	Alcanamida	III	NE
Piraclostrobina	Foliar	Fungicida	Estrobilurina	II	II
Tebuconazol	Foliar	Fungicida	Triazol	I	II
Profenofós	Foliar	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	III	II
Tiametoxam	Foliar e Solo	Inseticida	Neonicotinóide	III	III

Classificação toxicológica: I Extremamente tóxico; II Altamente tóxico; III Medianamente tóxico; IV Pouco tóxico;

Classificação de acordo com a avaliação do PPA- Classe I – Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente; Classe II – Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente; Classe III – Produto PERIGOSO ao meio ambiente; Classe IV – Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente;

NE= Não Especificado.

1.1.2 (a) Solubilidade em água

A solubilidade em água de uma dada substância é definida como sendo a máxima quantidade que pode ser dissolvida em um dado volume de água quando ambos estão em contato e em equilíbrio.² Agrotóxicos com alta solubilidade em água são transportados por escoamento com maior facilidade, ocasionando a poluição de águas subterrâneas e superficiais.

$< 50 \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \text{Baixa}$

$50 - 500 \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \text{Moderada}$

$> 500 \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \text{Alta}$

1.1.2 (b) log P

O log P é o logaritmo do coeficiente de partição entre n-octanol e água. Agrotóxicos que apresentam valores iguais ou superiores a 4 possuem maior tendência de acumulação em organismos vivos.⁷ O conhecimento do log P é de grande utilidade no processo de escolha das condições cromatográficas e na extração de agrotóxicos onde as interações hidrofóbicas estão envolvidas no mecanismo de retenção. Os valores log P também se mostraram valiosos para a previsão da mobilidade e da persistência na sorção de agrotóxicos em solo.²

1.1.2 (c) Pressão de vapor

A pressão de vapor de um composto é definida como sendo a pressão parcial de sua fase gasosa em equilíbrio com o seu líquido ou sólido. A pressão de vapor depende da temperatura, sendo medida a 25 °C, e expressa em Pa (mPa) ou em mmHg.⁷ Sendo assim, a pressão de vapor é uma medida da facilidade com que determinada substância tem em se volatilizar. Dependendo da finalidade do agrotóxico, uma pressão alta é desejada, como no caso dos agrotóxicos de ação fumegante em que o poder de penetração aumenta com a pressão de vapor. Mas, para a maioria dos casos, uma elevada pressão pode causar a deriva do vapor e, conseqüentemente, a poluição ambiental e a perda do princípio ativo. Por outro lado, agrotóxicos com baixa pressão de vapor tendem a não se moverem no ar, gerando potencial acumulação em água (caso seja solúvel) ou no solo.⁸ O conhecimento dessa propriedade

Dissertação de Mestrado

física também é importante na escolha da técnica a ser empregada na análise (cromatografia líquida ou gasosa) e da técnica de extração do agrotóxico.²

$$< 1 \times 10^{-6} = \text{Não volátil}$$

$$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-6} = \text{Estado intermediário}$$

$$> 1 \times 10^{-4} = \text{Volátil}$$

1.1.2 (d) Coeficiente de adsorção no solo (K_{oc}) e coeficiente de sorção normalizado (K_{foc})

O coeficiente de partição de um agrotóxico no solo (K_d) **Equação (1)**, é definido como a relação, no equilíbrio, entre a concentração do agrotóxico no solo e em solução aquosa e reflete a afinidade de um agrotóxicos em ser adsorvido no solo ou lixiviado.⁹ O coeficiente de adsorção normalizado, relaciona o K_d com o teor de matéria orgânica ou com o teor de carbono orgânico, podendo ser expresso em unidades de matéria orgânica, K_{om} , **Equação (2)**, ou em unidades de carbono orgânico, K_{oc} , **Equação (3)**, sendo o K_{oc} o mais reportado na literatura. A importância desse parâmetro é que ele afeta as propriedades de lixiviação dos agrotóxicos em águas subterrâneas. Agrotóxicos com valores de K_{oc} inferiores a 15 são considerados de mobilidade elevada.² A constante de sorção normalizada para carbono orgânico (K_{foc}) pode ser calculada utilizando-se a **Equação (4)**.¹⁰

$$K_d = \frac{\text{Concentração do produto químico no solo}}{\text{Concentração do produto químico na água}} \quad \text{Equação (1)}$$

$$K_{om} = \frac{100K_d}{\% \text{ matéria orgânica}} \quad \text{Equação (2)}$$

$$K_{oc} = \frac{100K_d}{\% \text{ carbono orgânico}} \quad \text{Equação (3)}$$

$$K_{foc} = \frac{100K_f}{\% \text{ carbono orgânico}} \quad \text{Equação (4)}$$

Parâmetros de referência para K_{oc} e K_{foc} :

$$< 15 = \text{Alta mobilidade}$$

$$15 - 75 = \text{Móvel}$$

$$75 - 500 = \text{Mobilidade moderada}$$

$$500 - 4000 = \text{Frac mobilidade}$$

Dissertação de Mestrado

> 4000 = Não móvel

1.1.2 (e) Tempo de meia vida (DT50)

O tempo de meia vida é definido como sendo o tempo necessário para que a concentração inicial do agrotóxico sofra degradação e se reduza à metade. Este termo é altamente dependente das condições ambientais ² e é um indicativo da persistência do agrotóxico no solo, quanto mais elevado for o tempo de meia vida maior será a tendência de contaminação.

< 30 (dias) = Não persistente

30 - 100 (dias) = Moderadamente persistente

100 - 365 (dias) = Persistente

> 365 (dias) = Muito persistente

1.1.2 (f) Constante de dissociação (pK_a)

A constante de ionização, K_a, está relacionada com o equilíbrio entre as concentrações iônicas e não iônicas e é, usualmente, expressa pelo seu logaritmo pK_a = (-log K_a). Quanto maior o valor do pK_a mais fraco é o ácido e menor é a sua tendência de ionização. Uma vez que os agrotóxicos iônicos se comportam de forma diferente dos agrotóxicos não iônicos, é importante saber quais são capazes de ionizar-se na faixa de pH = 5- 8 (faixa de pH geralmente encontrada em solo e água em condições naturais) para prever sua lixiviação ou retenção. ²

1.1.2 (g) Índice GUS

O índice GUS é um indicador do poder de lixiviação do agrotóxico em águas subterrâneas, sendo calculado segundo a **Equação (5)**. ⁷

$$\text{GUS} = \log (\text{DT50}) \times (4 - \log (\text{K}_{\text{oc}} \text{ ou } \text{K}_{\text{foc}})) \quad \text{Equação (5)}$$

GUS < 1,8 = Lixiviação improvável

GUS 1,8 – 2,8 = Potencial de lixiviação marginal

GUS > 2,8 = Susceptível a lixiviação

Dissertação de Mestrado

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Log P (pH=7 a 20 °C)	Solubilidade em água a 20 °C (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor a 25 °C (mPa)	K _{oc} (mL g ⁻¹)	K _{foc} (mL g ⁻¹)	DT50 (solo a 20 °C em laboratório e condições aeróbicas) (dias)	DT50 (campo) (dias)	pKa	GUS
α-Cipermetrina	5,5	0,004	0,00034	57889	-	100	35	5,0	-1,53
Atrazina	2,7	35	0,039	100	174	66	29	1,7	3,20
Azoxistrobina	2,5	6,7	1,10 x 10 ⁻⁷	589	423	84,5	180,7	N.A.	2,65
Ciromazina	0,069	13000	4,48 x 10 ⁻⁴	-	409	31,8	9,7	5,22	2,09
Clorantraniliprole	2,86	0,88	6,3 x 10 ⁻⁹	362	301	597,0	204	10,88	4,22
Clorpirifós	4,7	1,05	1,43	8151	-	76,0	21	N.A.	0,17
Diafentiurum	5,76	0,06	0,002	43546	-	- ¹	-	N.A.	0,19
Difenoconazol	4,36	15,0	3,33 x 10 ⁻⁵	-	3760	130,0	85	1,07	0,90
Fenarimol	3,69	13,7	0,065	-	734	703,0	74	N.A.	3,23
Fipronil	3,75	3,78	0,002	-	727	142,0	65	N.A.	2,45
Fluopicolida	2,9	2,8	3,03 x 10 ⁻⁴	-	321,1	271,0	138,8	N.A.	3,63
Imidacloprido	0,57	610	4,0 x 10 ⁻⁷	-	225	187,0	174	N.A.	3,74
Lufenurum	5,12	0,046	4,00 x 10 ⁻³	-	41182	20,8	256	10,2	-0,81
Mandipropamida	3,2	4,2	9,40 x 10 ⁻⁴	-	847	49,1	13,6	N.A.	1,81
Metribuzim	1,65	1165	0,121	-	37,92	11,5	19	0,99	2,57
Napropamida	3,3	74,0	2,2 x 10 ⁻²	839	885	308,0	72	N.A.	2,62
Piraclostrobina	3,99	1,9	2,60 x 10 ⁻⁵	9304	9315	62,0	32	N.A.	0,06
Profenofós	1,7	28	2,53	2016	-	7,0	7,0	N.A.	0,59
Tebuconazol	3,7	36	1,30 x 10 ⁻³	-	769	365,0	47,1	5,0	2,85
Tiametoxam	-0,13	4100	6,60 x 10 ⁻⁶	56,2	-	121,0	39,0	N.A.	4,69

¹ Valores da literatura indicam DT50 entre 1 hora e 1,5 dias. ⁷

N. A.= Não Aplicável

Fonte: Site PAN *Pesticides Database*. ⁷

1.2 Comércio de agrotóxicos no Brasil

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), em 2015 foram comercializados US\$ 9,61 bilhões em vendas de agrotóxicos no país, representando uma queda de 21,56 % comparada ao ano anterior. Mesmo com a queda, a quantidade de produto comercial vendida atingiu 887,87 mil toneladas.

A classe dos inseticidas foi a que respondeu pelo maior valor das vendas, sendo responsável por 33,00% do faturamento total, ou seja, US\$3,17 bilhões em 2015. No entanto, no cômputo geral, observou-se queda no valor das vendas de todas as classes dos produtos comerciais, em especial dos inseticidas, cuja comercialização em valor baixou em 35,18% comparativamente a 2014. Declínio acentuado também ocorreu com os herbicidas, tendo sido registrado uma queda de 26,38% em igual período.

A **Figura 1** mostra que durante os últimos quatro anos ocorreu um aumento linear significativo nas vendas de todas as classes de agrotóxicos, tendo em 2014 o ápice em termos monetários, e em 2015 foi observada uma ligeira queda.

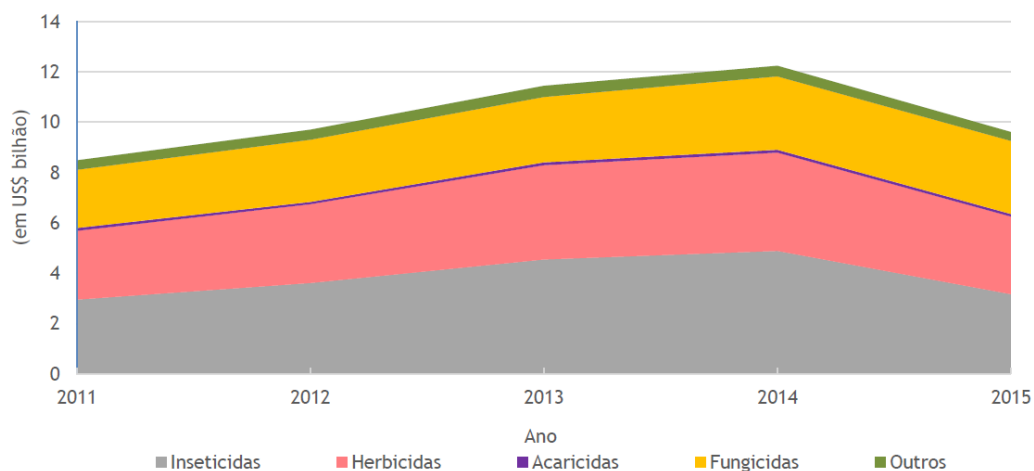


Figura 1: Vendas de agrotóxicos por classe de produto comercial, de 2011 a 2015. ¹¹

Em todas as classes de agrotóxicos foi observada, em 2015, uma queda na quantidade de agrotóxicos vendidos como produtos comerciais e um aumento como ingrediente ativo (**Figura 2**). Isso indica que os agrotóxicos comercializados possuem maiores concentrações dos ingredientes ativos, permitindo a diminuição das embalagens comercializadas e maior rendimento da calda de aplicação. ¹¹

Na análise por classe de produto comercial, observou-se que, em 2015, frente ao ano anterior, a classe de agrotóxicos de maior acréscimo relativo nas vendas, em termos de quantidade de produto comercial, foi a dos acaricidas, que registrou expansão de 13,6%, seguida pelos fungicidas (expansão de 12,1%) e pelos herbicidas, com incremento de apenas 4,4%, com os outros apresentando ligeiro crescimento. Entretanto, tais incrementos não foram suficientes para mitigar a queda contabilizada pelos inseticidas (-27,72%).

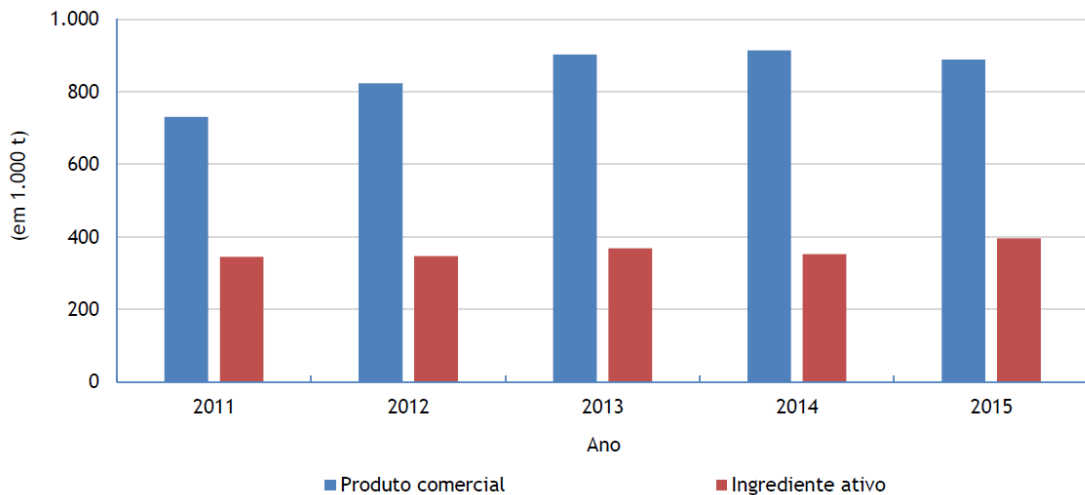


Figura 2: Quantidade vendida de agrotóxicos como produto comercial e ingrediente ativo de 2011 a 2015. ¹¹

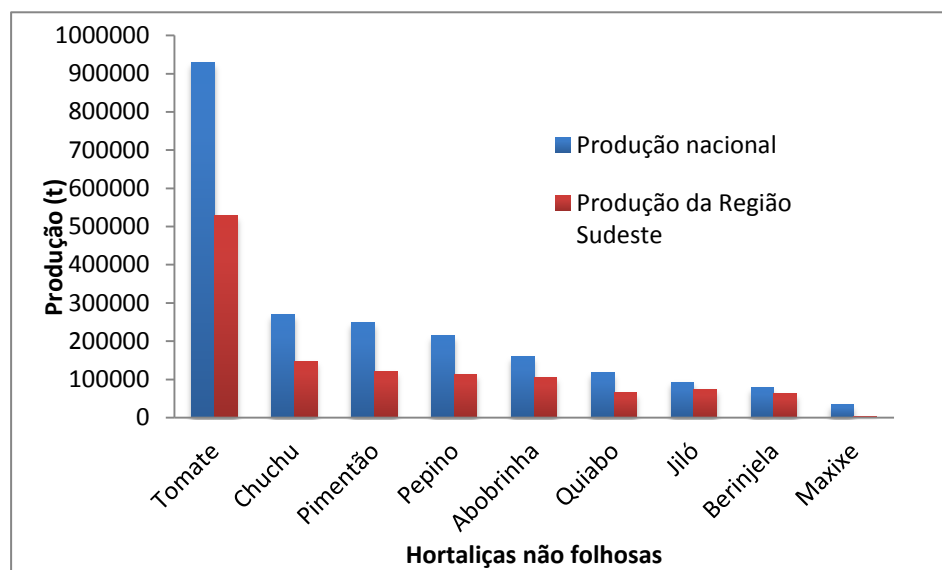
Dados mais recentes da SINDIVEG indicam que em 2016, o setor de defensivos agrícolas apresentou recuo de 1% nas vendas, atingindo US\$ 9,56 bilhões, contra US\$ 9,6 bilhões em 2015. ¹²

1.2 Produção de hortaliças não folhosas e folhosas

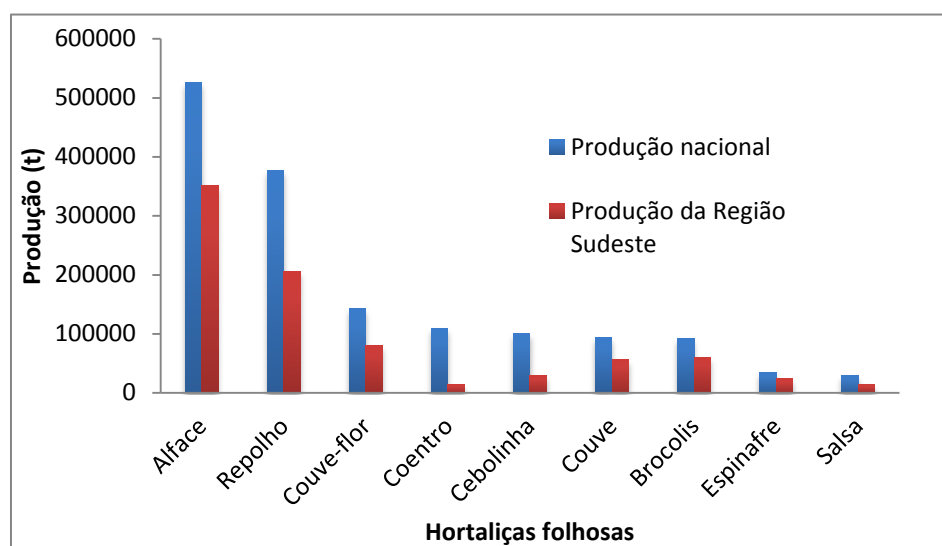
A produção de hortaliças não folhosas tem-se destacado na produção agrícola do país, sendo a cultura de tomates a de maior importância econômica. Segundo dados do censo agropecuário de 2006, ¹³ foram produzidos cerca de 900 000 toneladas de tomate estaqueado, sendo que metade desse montante foi produzida na Região Sudeste. Dentre o grupo das hortaliças não folhosas, além do tomate, figuram chuchu, pimentão, pepino, abobrinha, berinjela, jiló, entre outras, que também têm sua produção concentrada na Região Sudeste, respondendo por quase metade da produção nacional, **Figura 3 (A)**.

Dissertação de Mestrado

Com relação à produção das hortaliças folhosas, a produção se concentra principalmente em pequenas e médias propriedades, nas quais, geralmente, são feitos mais de um cultivo e com rotação dos mesmos, sendo assim, o solo se encontra sujeito a uma contaminação por uma gama maior de agrotóxicos. Assim como no cultivo das hortaliças não folhosas, o cultivo das hortaliças folhosas se concentra na Região Sudeste em 2006 foram produzidas cerca de 500 000 toneladas de alface, a cultura mais representativa do grupamento das hortaliças folhosas, seguida pelas demais culturas avaliadas, sendo na maioria dos casos a maior parte produzida na Região Sudeste conforme ilustra a **Figura 3 (B)**, com exceção das culturas de cebolinha, coentro e salsa.¹³



(A)



(B)

Figura 3: Produção de hortaliças não folhosas (A) e folhosas (B), segundo o Censo Agropecuário de 2006.¹³

Dentre o total de produtores de horticulturas e floriculturas apenas 9,8% eram de produtores orgânicos,¹³ o que mostra que grande parte da produção era proveniente de produtores rurais que empregam agrotóxicos em sua produção. Não foram obtidos dados mais recentes sobre a produção de horticulturas, apesar de o Brasil ser um país de economia agrária, infelizmente os dados da produção e comercialização, principalmente das culturas de menor importância econômica (*minor crops*) são escassos e carecem de atualização.

Neste trabalho, serão abordados os agrotóxicos empregados na cultura do tomate e dos grupos das hortaliças não folhosas e folhosas e agrotóxicas não autorizadas para essas culturas encontrados no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) nos anos de 2013-2015.

1.3.1 Culturas com suporte fitossanitário insuficiente

Com o intuito de criar um suporte fitossanitário legal para as culturas de menor representatividade econômica e que, na maioria dos casos, não possuem agrotóxicos registrados para aplicação, em 16 de junho de 2014 foi instituída a Instrução Normativa Conjunta nº1, entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁴

A Instrução Normativa Conjunta visa estabelecer as diretrizes e exigências para o registro dos agrotóxicos, seus componentes e afins para culturas com suporte fitossanitário insuficiente (CSFI), bem como o limite máximo de resíduos (LMR) permitido. Portanto, se denomina CSFI as culturas para as quais existe falta ou número reduzido de agrotóxicos e afins registrados, comprometendo o atendimento das demandas fitossanitárias. Para sanar tais deficiências foram criados grupos de culturas tendo como referência uma ou mais culturas representativas (culturas de maior importância econômica, área de cultivo, consumo humano, disponibilidade de agrotóxicos registrados e problemas fitossanitários semelhantes) e para esse grupo foram extrapolados, provisoriamente, os LMR para os demais integrantes do grupo que não possuem agrotóxicos registrados, conforme Anexo I da Instrução Normativa Conjunta, representada parcialmente na **Tabela 4**.

Dessa forma, estabelece-se que os agrotóxicos registrados para as culturas de tomate e pepino podem ser aplicados em culturas como berinjela, quiabo, chuchu, entre

Dissertação de Mestrado

outras. O mesmo se aplica para as culturas folhosas, os agrotóxicos registrados para as culturas de alface e repolho podem ser registrados para as culturas do mesmo grupo.

Tabela 4: Agrupamento de culturas das hortaliças não folhosas e folhosas para extrapolação de LMR.

Grupo	Culturas representativas	Agrupamento de culturas
Hortaliças não folhosas	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Abóbora (<i>Curcubita moschata</i>), Abobrinha (<i>Curcubita pepo</i>), Berinjela (<i>Solanum melogena</i>), Chuchu (<i>Sechium edule</i>), Jiló (<i>Solanum jilo</i>), Maxixe (<i>Cucumis anguria</i>), Pimenta (<i>Capsicum sp.</i>), Quiabo (<i>Abelmoschus esculentus</i>), Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)
Hortaliças folhosas e ervas aromáticas frescas	Alface (<i>Lactuca sativa</i>), Repolho (<i>Brassica oleracea var. capitata</i>)	Agrião (<i>Nasturtium officinale</i>), Almeirão (<i>Cichorium intybus</i>), Brócolis (<i>Brassica oleracea</i>), Couve chinesa (<i>Brassica sinensis</i>), Couve-flor (<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>), Espinafre (<i>Spinacea oleracea</i>), Rúcula (<i>Eruca sativa</i>), Cebolinha (<i>Allium fistulosum</i>), Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>), Salsa (<i>Petroselinum crispum</i>), Hortelã (<i>Mentha spicata</i>), Mostarda (<i>Brassica juncea</i>), Acelga (<i>Beta vulgaris var. flavescens</i>), Couve (<i>Brassica oleracea</i>), entre outras culturas.

1.3.2 Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos- PARA

Com a implementação da Instrução Normativa Conjunta de 2014, aproximadamente, 800 novos LMR foram estabelecidos para diferentes culturas, estando eles distribuídos entre as diferentes categorias de classificação toxicológica: 11% Classe IV (Pouco Tóxico); 60% na categoria Classe III (Medianamente Tóxico); 19% Classe II (Altamente Tóxico) e 10% (Extremamente Tóxico).¹⁴

Os resultados do relatório PARA 2013-2015 mostraram que existe uma correlação entre o elevado percentual de resíduos de agrotóxicos detectados, não autorizados para a cultura, com os índices de amostras insatisfatórias. A presença de agrotóxicos não autorizados pode ser explicada pelo fato de haver poucos pleitos de registro por parte das empresas registrantes para culturas consideradas de baixo retorno econômico.

Dissertação de Mestrado

Com relação ao grupo das hortaliças não folhosas, cujos representantes são o tomate e o pepino, como ilustra a **Tabela 5**, das 1676 amostras analisadas, a abobrinha foi a que apresentou a maior porcentagem de amostras contendo agrotóxicos não autorizados, 81%, em segundo lugar tem-se o pimentão com 71% das amostras com agrotóxicos não autorizados. No caso do grupo das hortaliças folhosas e ervas aromáticas frescas, em que os representantes são a alface, couve e repolho, foram analisadas 1167 amostras, tendo sido a couve a cultura com a maior porcentagem de agrotóxicos não autorizados, conforme a **Tabela 5**.

Nas **Figura 4 e 5** encontram-se os agrotóxicos detectados em hortaliças não folhosas (abobrinha, pepino, pimentão e tomate) e folhosas (alface, couve e repolho), respectivamente, pelo programa PARA, de 2013 a 2015¹⁵ e que foram estudados no presente trabalho.

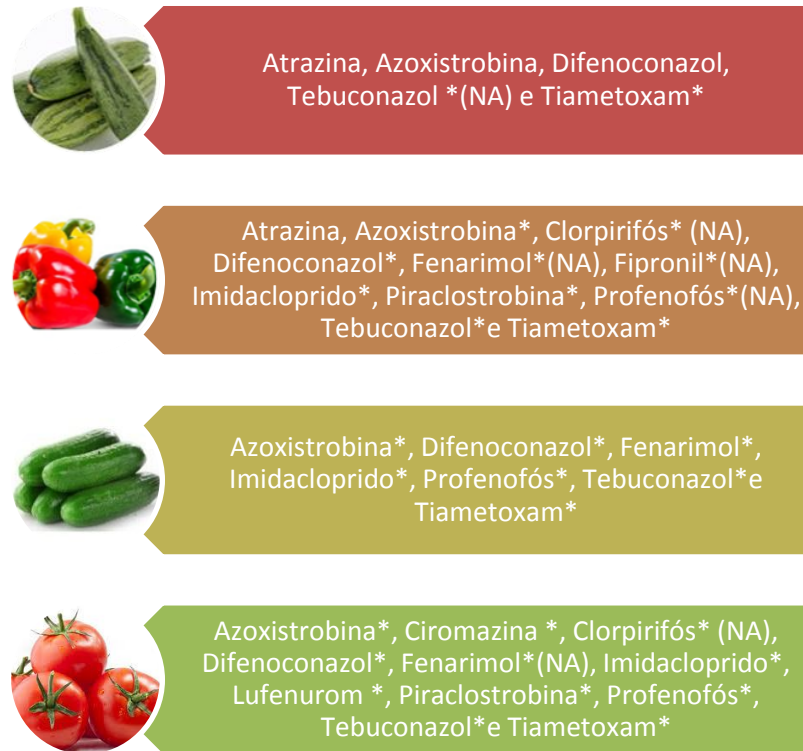
Tabela 5: Número de agrotóxicos detectados nas amostras monitoradas versus número de agrotóxicos não autorizados.

Grupo	Alimento	Nº de agrotóxicos detectados nas amostras monitoradas	Nº de agrotóxicos NA detectados nas amostras monitoradas	% de agrotóxicos NA do total de agrotóxicos detectados
Hortaliças não folhosas	Abobrinha*	31	25	81%
	Pimentão*	59	42	71%
	Pepino*	38	21	55%
	Tomate	63	13	21%
Hortaliças folhosas	Alface	42	30	71%
	Couve*	35	29	83%
	Repolho*	19	10	53%

NA- Não Autorizado

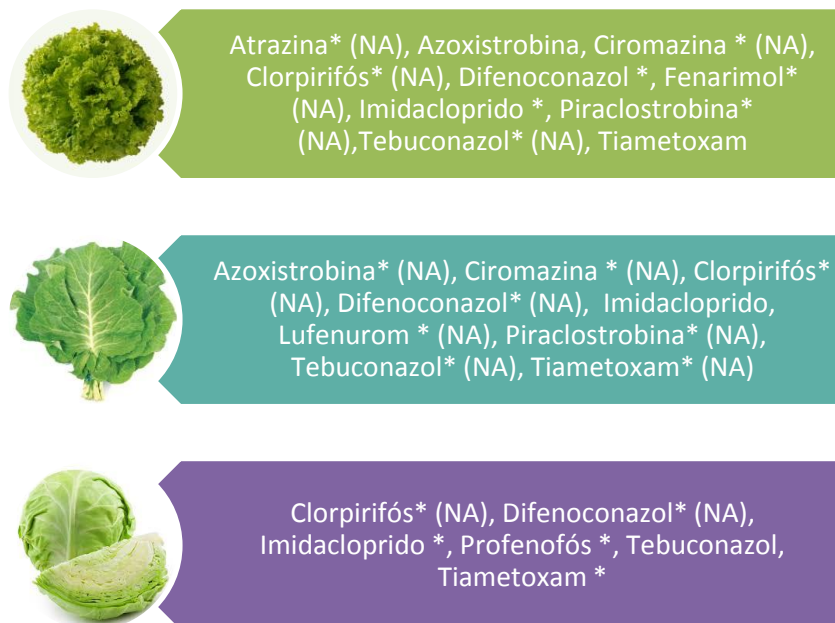
* *Minor crops*: Conforme Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015.

Dissertação de Mestrado



* Valores acima de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$; NA= Não Autorizado

Figura 4: Agrotóxicos estudados detectados em hortaliças não folhosas, pelo programa PARA, de 2013 a 2015. ¹⁵



* Valores acima de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$; NA= Não Autorizado.

Figura 5: Agrotóxicos estudados detectados em hortaliças folhosas, pelo programa PARA, de 2013 a 2015. ¹⁵

1.4 Solo

1.4.1 Definição, propriedades e composição

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) define o solo como sendo um meio complexo, heterogêneo, produto das alterações do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob ação da vida, da atmosfera e das trocas de energia que nele se manifestaram, e é constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água da zona não saturada e saturada, ar e organismos vivos, incluindo plantas, bactérias, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais. Dentre as principais funções do solo estão a sustentação da vida e do *habitat* para as pessoas, animais, plantas e outros organismos, manutenção do ciclo da água e dos nutrientes, proteção da água subterrânea e a produção de alimentos.¹⁶

As propriedades físicas do solo (textura, estrutura, densidade, porosidade, permeabilidade, fluxo de água, ar e calor) são responsáveis pelos mecanismos de atuação física em poluentes, como a filtração e a lixiviação e ainda colaboram com a atenuação química e biológica. As propriedades químicas do solo (pH, teor de nutrientes, capacidade de troca iônica, condutividade elétrica e matéria orgânica) juntamente com as atividades biológicas são responsáveis pela adsorção, fixação química, oxidação e neutralização dos poluentes.¹⁶

Os solos se constituem em camadas distintas denominadas horizontes, organizadas de acordo com a profundidade, conforme ilustrado na **Figura 6**. Os horizontes foram formados por meio de interações complexas entre processos que ocorreram durante o intemperismo, resultando em diferentes colorações, dependendo do grau de hidratação do ferro, dos teores de cálcio, de óxido de silício e de matéria orgânica. O perfil do solo é o conjunto dos horizontes e/ou camadas que abrangem, verticalmente, desde a superfície até o material originário.¹⁷

No solo encontram-se três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é constituída pelo material parental (rocha) local ou transportado e material orgânico, originário da decomposição vegetal e animal. A fase líquida é composta por água ou solução do solo (elementos orgânicos e inorgânicos em solução), e a fase gasosa possui composição variável, de acordo com os gases produzidos e consumidos pelas raízes das plantas e pelos animais (CO₂ e O₂).¹⁶ No solo são encontradas comunidades de bactérias, de fungos e de

invertebrados que são importantes para a produção agrícola, como as bactérias fixadoras de nitrogênio.

A fração sólida de um solo produtivo típico contém cerca de 5% (m/m) de matéria orgânica, que inclui húmus e outros compostos em menor quantidade, e 95% (m/m) de matéria inorgânica, composta basicamente por silício e oxigênio, além dos carbonatos de cálcio e magnésio, magnetita entre outros óxidos. A matéria orgânica do solo age como fonte de nutrientes o que determina, em grande parte, a sua produtividade.¹⁷

Devido à importância do solo na manutenção das atividades humanas e da vida terrestre, a Organização das Nações Unidas (ONU) declarou o ano de 2015 como sendo o Ano Internacional dos Solos com o intuito de conscientizar a população e seus governantes de sua importância e da necessidade de medidas de conservação e de manejo sustentável do solo, a fim de se evitar a sua degradação, visando a segurança alimentar, as mudanças climáticas e a redução da pobreza, além de se destacar a necessidade de investimentos na área e no monitoramento a nível global, regional e nacional.¹⁸

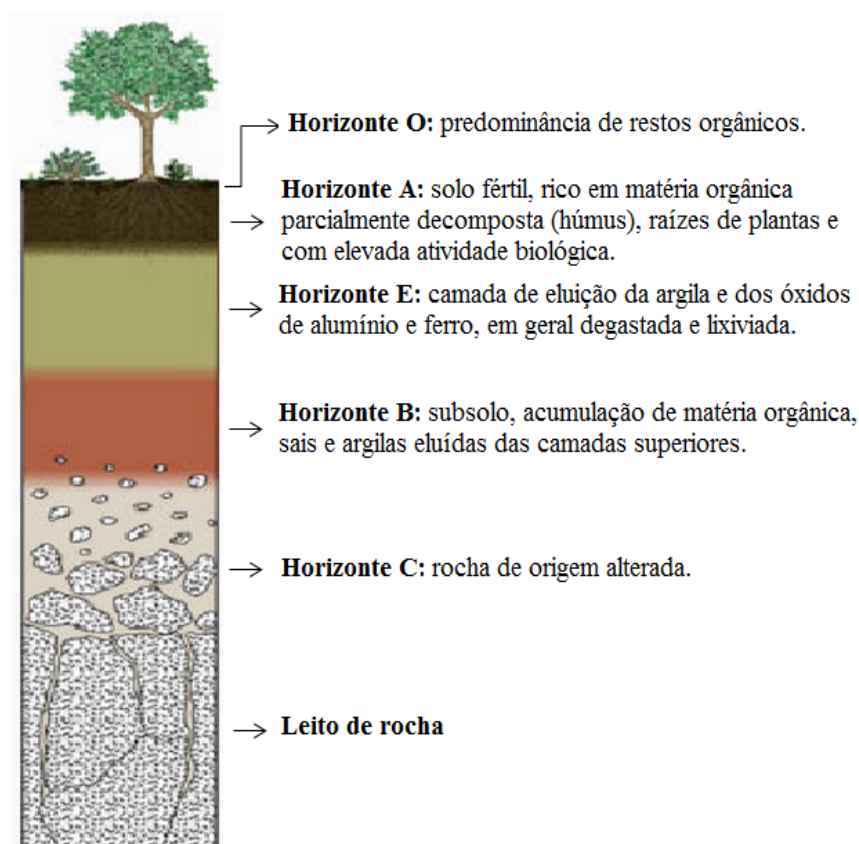


Figura 6: Perfil do solo e seus horizontes (adaptada das referências^{16,17}).

1.4.2 Contaminação de solos por agrotóxicos

O solo atua como um “filtro”, tendo capacidade de depuração, uma vez que imobiliza grande parte das impurezas nele depositadas. No entanto, essa capacidade é limitada, podendo ocorrer alteração da qualidade do solo, devido ao efeito cumulativo da deposição de poluentes atmosféricos, aplicação de agrotóxicos e fertilizantes e disposição de resíduos sólidos industriais, urbanos, materiais tóxicos e radioativos. No momento em que um contaminante ou poluente atinge a superfície do solo, ele pode ser adsorvido, arrastado pelo vento ou pelas águas do escoamento superficial, ou lixiviado pelas águas de infiltração, passando para as camadas inferiores e atingindo as águas subterrâneas. Uma vez atingida as águas subterrâneas, esse poluente será então carregado para outras regiões, através do fluxo dessas águas.¹⁶

O destino dos agrotóxicos no solo é controlado pelas propriedades químicas, biológicas e físicas dessa matriz. Estes processos podem ser agrupados naqueles que afetam a persistência, incluindo a degradação química e a microbiana, e aqueles que afetam a mobilidade, como a sorção, captação pelas plantas, erosão, volatilização, vento, escoamento e lixiviação (**Figura 7**).¹ Existem três tipos de degradação dos agrotóxicos no solo: química, fotodegradação e microbiológica.

As degradações dos agrotóxicos nas plantas, nos animais e no ambiente, causadas por mecanismos biológicos, químicos e físicos, geram produtos de transformação (do inglês, *Transformation Products*, TPs) ou metabólitos. Esses compostos possuem propriedades físico-químicas diferentes das moléculas que o originaram, podendo ser mais tóxicos e mais persistentes.²

Os fatores que influenciam a persistência dos agrotóxicos no solo estão relacionados com o agrotóxico em si, como a estrutura química, a volatilidade, a solubilidade, a formulação, a concentração, o modo de aplicação (frequência, método de aplicação e quantidade), com o solo, como as condições no qual ele se encontra (aspectos geográficos, fauna e flora, população de microrganismos, presença de poluentes e agrotóxicos, tipo de irrigação, entre outros), com o tipo de solo (textura, estrutura, compactação, quantidade de matéria orgânica, pH, entre outros) e com as condições climáticas, como temperatura, radiação solar, umidade relativa, evaporação, pluviosidade e movimentação do ar. A análise

da persistência dos agrotóxicos no solo é relevante no que se diz respeito ao risco da poluição dos corpos hídricos subterrâneos e superficiais.¹⁹

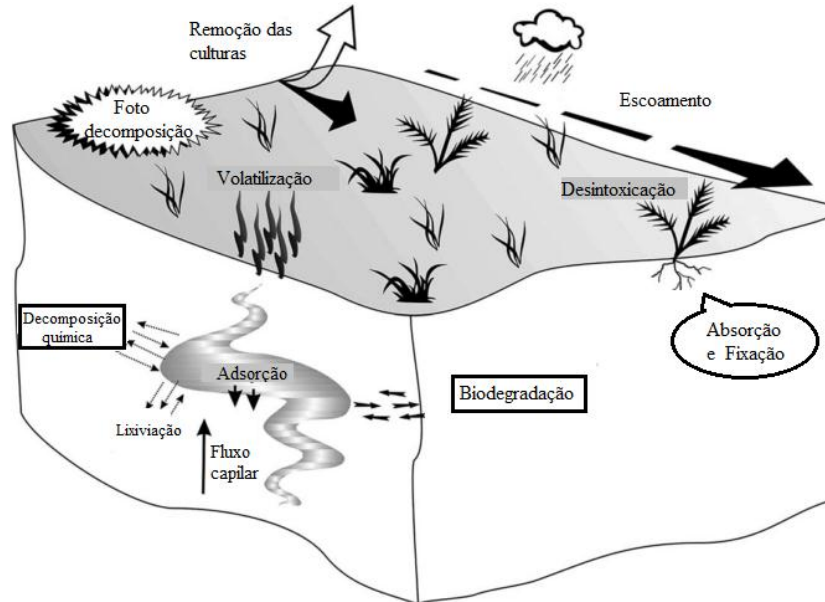


Figura 7: Destino dos resíduos de agrotóxicos no solo (adaptada da referência ¹).

Pose-Juan *et al.*²⁰ analisaram a relação entre a distribuição temporal e espacial de 17 agrotóxicos em solos de plantações de uva na Espanha. Nesse estudo, verificou-se que os agrotóxicos das classes dos herbicidas, inseticidas e fungicidas foram encontrados em regiões diferentes das analisadas, mas apenas para os herbicidas foi possível relacionar a distribuição temporal e espacial, devido ao tipo de aplicação realizada. Foram encontrados o fungicida metalaxil, os herbicidas terbutilazina e fluometurom e o inseticida metoxifenoazida em níveis semelhantes aos encontrados em águas subterrâneas e superficiais da região, demonstrando que a contaminação do solo nas regiões estudadas atingiu o lençol freático.

1.4.2 (a) Degradação química

A degradação química dos agrotóxicos ocorre através de reações, como oxidação/redução, hidrólise, conjugação e rearranjo e é caracterizada pela quebra dos agrotóxicos em que não há o envolvimento de seres vivos. Das reações citadas, a hidrólise merece destaque no que diz respeito à degradação de agrotóxicos em solos.⁴

Os fatores que influenciam a degradação química são basicamente:⁴

Dissertação de Mestrado

- ✚ Conteúdo de matéria orgânica e argila: A quantidade de matéria orgânica e de argila são os dois componentes que mais influenciam na degradação química, pois proporcionam maior área superficial para degradação hidrolítica;
- ✚ pH: Afeta os processos hidrolíticos de dissipação e depende da natureza dos agrotóxicos, pois alguns podem sofrer hidrólise ácida ou básica;
- ✚ Temperatura: Com o aumento da temperatura, as moléculas adquirem maior energia e, dessa forma, podem se mover mais rapidamente, favorecendo algumas reações como a hidrólise;
- ✚ Natureza dos substituintes: A reatividade dos agrotóxicos depende dos substituintes presentes na molécula. Alguns substituintes são substituídos mais facilmente em reações de hidrólise e os produtos gerados são estáveis em meio aquoso.

A hidrólise pode ocorrer de forma abiótica ou biótica, sendo fortemente dependente do pH e do pK_a do composto, mas as condições climáticas e a temperatura também podem influenciar na taxa de decomposição por hidrólise. Os produtos da hidrólise são geralmente mais polares e mais solúveis em água que seus compostos de origem.² Os agrotóxicos avaliados neste trabalho apresentam alta estabilidade à hidrólise, o que permite que permaneçam maior tempo no solo em sua forma original, possibilitando a sua detecção.²

1.4.2 (b) Fotodegradação

A fotodegradação resulta na quebra dos agrotóxicos pela luz solar e pode ocorrer na folhagem, na superfície do solo, na água e até mesmo no ar.⁴ A fotodegradação pode ocorrer de forma direta ou indireta (induzida por outra molécula denominada fotossensibilizador). No processo direto, um fóton é absorvido pelo agrotóxico resultando na clivagem da ligação química. No processo indireto, o fóton é absorvido pelo fotossensibilizador para produzir espécies reativas capazes de degradarem o agrotóxico. Grupos químicos diferentes nos agrotóxicos possuem diferentes mecanismos de fotodegradação, como perda de um grupo alquil, halogênio ou hidroxila, quebra da ligação alcoxi, amida, amino-alquil e éster, fotoisomerização, hidroxilação e reações de descarboxilação.²

A fotodegradação dos agrotóxicos é influenciada pela intensidade da luz solar, propriedades do local de aplicação, tempo de exposição, propriedades dos agrotóxicos, pH do meio, profundidade da água, e presença de íons comuns. As reações fotoquímicas

desempenham um papel fundamental na degradação ambiental dos agrotóxicos e as presenças de grupos cromóforos ou complexos metal-orgânicos facilitam a degradação devido à absorção direta da energia. A fotodegradação nos solos é aumentada na presença da matéria orgânica do solo, como ácido fúlvico e ácido húmico. ⁴

1.4.2 (c) Degradação microbiológica

A degradação biológica ocorre quando os microrganismos do solo consomem ou quebram as estruturas dos agrotóxicos. Esses microrganismos são encontrados basicamente na porção superior do solo onde a quantidade de matéria orgânica é maior. ¹

Os processos biológicos, principalmente a degradação microbiológica, são muito eficazes na degradação dos agrotóxicos em solos e em águas. Sob condições apropriadas, os microrganismos podem utilizar os agrotóxicos como nutrientes e permitir a sua mineralização. No entanto, muitos agrotóxicos possuem grupos químicos em sua estrutura que não são biodegradáveis, como os organoclorados. ²

Como mencionado, o solo possui um ecossistema complexo habitado por inúmeros seres vivos: bactérias, fungos, plantas, nematódeos, microartrópodes, entre outros. A função exata dos microrganismos não está bem elucidada, mas se sabe que o uso de agrotóxicos além de gerar poluição das águas, também afeta negativamente a comunidade microbiana do solo. ²¹

No processo de degradação microbiológica, os agrotóxicos são absorvidos dentro da membrana celular dos microrganismos e as enzimas quebram os agrotóxicos em fragmentos menores, gerando como produto final os minerais. ⁴

A distribuição dos microrganismos no solo não é homogênea, a maior parte da população se concentra na superfície devido a maior quantidade de matéria orgânica. A degradação bacteriana predomina em solos e águas com pH > 5,5, enquanto que em meio ácido a degradação por fungos se torna predominante. ⁴

Os fatores que influenciam na degradação microbiológica no solo são basicamente: ⁴

Dissertação de Mestrado

- ✚ Mobilidade, se um agrotóxico estiver fortemente ligado ao solo o processo de biodegradação pode não ocorrer. O conteúdo de matéria orgânica no solo influencia fortemente a ligação apolar dos agrotóxicos no solo e sua biodegradação;
- ✚ Metabolismo primário/secundário: o metabolismo primário ocorre quando os microorganismos são capazes de derivar a energia do metabolismo de um agrotóxico. A população microbiana é diretamente proporcional à concentração dos agrotóxicos. Se a população microbiana não usa esses compostos como fonte de energia primária, ocorre o metabolismo secundário em que o agrotóxico é degradado à medida que outros materiais do solo são degradados;
- ✚ Temperatura: alta temperatura aumenta a taxa de degradação devido ao aumento da atividade metabólica dos microorganismos;
- ✚ pH: a degradação microbiana aumenta com o pH;
- ✚ Umidade do solo: solos encharcados em combinação com um número elevado de nutrientes promovem o crescimento de espécies microbianas anaeróbicas. As bactérias, em geral, requerem um alto nível de umidade para a degradação;
- ✚ Matéria orgânica: em solos ricos em matéria orgânica, geralmente a degradação dos agrotóxicos aumenta;
- ✚ Estrutura do agrotóxico: a degradação microbiana dos agrotóxicos depende da estrutura dos mesmos para que ocorra a degradação.

Como exemplos da influência dos agrotóxicos na microbiota do solo pode-se citar alguns dos agrotóxicos estudados no presente trabalho, como o herbicida napropamida, que inicialmente reduz a abundância de bactérias e fungos e, após alguns dias, causa o aumento das bactérias Gram negativas e dos fungos,²² o inseticida cipermetrina, que eleva a comunidade de bactérias Gram negativas e diminui a quantidade de bactérias do filo *Fermicutes* (geralmente Gram positivas),²³ o inseticida clorpirifós, que diminui a atividade microbiana no solo²⁴ e o fungicida tebuconazol que gera uma perturbação negativa na comunidade bacteriana.²⁵

Os herbicidas são os compostos químicos que mais poluem o solo e interferem nos organismos que nele habitam, pois, para serem eficientes, precisam entrar em contato direto com o mesmo e devem permanecer por tempo suficiente para serem eficazes.¹⁷

1.5 Legislação

No Brasil não existe uma legislação específica que estabelece os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em solos, sendo assim, o estudo teve como base a dose utilizada em campo no combate das principais doenças que atingem o grupo das hortaliças não folhosas e folhosas. Devido a essa limitação em termos de legislação, serão informadas a Portaria 2.914/2011 que dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano, uma vez que uma das implicações da contaminação do solo por resíduos de agrotóxicos é a contaminação de águas superficiais e subterrâneas; os valores orientadores estipulados pela CETESB vigentes com respeito à qualidade da água subterrânea e o solo e a Resolução CONAMA 420/2009 que também estipula os valores orientadores para solo e águas subterrâneas.

O Ministério da Saúde, por meio da Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011, revogada em 03 de outubro de 2017, através do Suplemento DOU nº 190 no qual foi publicado a Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, que através do Art. 864, inciso CXXXIII dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Nessa portaria, estão definidos os parâmetros de potabilidade da água incluindo os valores máximos permitidos para um número restrito de agrotóxicos. Segundo a portaria, o plano de amostragem para os agrotóxicos considera a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica do manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas.²⁶ Nos Estados Unidos a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (do inglês, *Environmental Protection Agency*, EPA) também estipula os valores máximos permitidos de alguns agrotóxicos em água potável por meio de seu Regulamento Nacional de Água Potável.²⁷ Os valores máximos permitidos para agrotóxicos de ambos se encontram na **Tabela 6**.

A CETESB, no estado de São Paulo através da Decisão de Diretoria Nº 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016, estabelece limites de resíduos de agrotóxicos organoclorados com os chamados valores orientadores (de referência de qualidade, de prevenção e de intervenção, para uso agrícola, residencial e industrial), no solo e na água subterrânea, como mostrado na **Tabela 7**.²⁸ Esses valores geralmente são maiores quando comparados aos retratados na Resolução CONAMA Nº 420, de 28 de dezembro de 2009²⁹, no entanto, o escopo de agrotóxicos da CETESB é mais abrangente.

Dissertação de Mestrado

Tabela 6: Valores permitidos segundo a Portaria 2.914 do Ministério da Saúde ²⁵ e segundo o Regulamento Nacional de Água Potável dos Estados Unidos. ²⁷

Agrotóxicos	Ministério da Saúde	Regulamento Nacional de Água Potável
	Valor máximo permitido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor máximo permitido ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,4 D + 2,4,5 T	30	2,4 D = 70 e 2,4,5 T= 50
Alaclor	20	2
Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfóxido	10	-
Aldrim + Dieldrim	0,03	-
Atrazina *	2	3
Carbendazim + Benomil	120	-
Carbofuram	7	40
Clordano	0,2	2
Clorpirifós * + Clorpirifós-oxon	30	-
DDT + DDD + DDE	1	-
1,2-Dibromo-3-cloropropano	-	0,2
Dalapom	-	200
Dinosebe	-	7
Diquat	-	20
Diurum	90	-
Endossulfam (α, β, e sais)	20	-
Endotal	-	100
Endrim	0,6	2
Glifosato + AMPA	500	700
Heptaclor	-	0,4
Heptaclor epóxido	-	0,2
Hexaclorobenzeno	-	1
Lindano (gama HCH)	2	0,2
Mancozebe	180	-
Metamidofós	12	-
Metolacloro	10	-
Metoxicloro	-	40
Molinato	6	-
Oxamil	-	200
Parationa Metílica	9	-
Pendimentalina	20	-
Permetrina **	20	-
Picloram	-	500
Profenofós *	60	-
Simazina	2	4
Toxafeno	-	3
Tebuconazol *	180	-
Terbufós	1,2	-
Trifluralina	20	-

* Agrotóxicos estudados no presente trabalho;

** Agrotóxico pertencente ao mesmo grupo químico da α -cipermetrina (composto analisado no trabalho).

Dissertação de Mestrado

Tabela 7: Valores orientadores para agrotóxicos organoclorados em solos e águas subterrâneas, segundo a CETESB.²⁸

Agrotóxicos Organoclorados	Solos (mg kg ⁻¹ massa seca)					Águas Subterrâneas (µg L ⁻¹)
	Valor de Referência Qualidade (VRQ)	Valor de Prevenção (VP)	Valor de Intervenção (VI)			Valor de Intervenção (VI)
			Agrícola	Residencial	Industrial	
Aldrim	-	0,02	0,4	0,8	6	0,03 (a)
Diieldrim	-	0,01	0,3	0,8	5,9	
Endrim	-	0,001	0,8	2,5	17	0,6
Carbofuram	-	0,0001	0,3	0,7	3,8	7
Endossulfam	-	0,7	4,7	12	66	20 (a)
DDD	-	0,02	1	7,5	23	1 (b)
DDE	-	0,01	1,2	8,5	25	
DDT	-	0,01	5,5	22	82	
HCH alfa	-	0,0003	0,002	0,02	0,04	0,05
HCH beta	-	0,001	0,01	0,06	0,2	0,17
HCH gama (Lindano)	-	0,001	0,008	0,06	0,2	2

VQR- Valor de Referência de Qualidade: é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea.

VP- Valor de Prevenção: é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. Este valor indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias, protegendo-se os receptores ecológicos e a qualidade das águas subterrâneas. Para a manutenção da multifuncionalidade do solo deve-se considerar a proteção da biota do solo (receptores ecológicos), a proteção da água subterrânea (importante recurso hídrico) e a proteção à saúde humana. O valor mais restritivo, dentre estes três critérios, foi definido como o valor de prevenção.

VI- Valor de Intervenção: é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição genérico.

(a) Somatória de endossulfam e sais; (b) Somatória dos isômeros ou metabólitos.

Com relação às normas estabelecidas em outros países, tem-se a Lista Holandesa³⁰ no qual são reportados os valores orientadores para solos e águas subterrâneas para diversas substâncias incluindo algumas classes de agrotóxicos, cujo seus valores estão descritos na **Tabela 8**. A Lista Holandesa engloba além do grupo dos agrotóxicos da classe química dos organoclorados, também determinados agrotóxicos organoestanhosos, herbicidas de ácido clorofenoxiacético, triazinas e carbamatos.³⁰

Dissertação de Mestrado

Tabela 8: Valores orientadores de intervenção para agrotóxicos em solos e águas subterrâneas segundo a Lista Holandesa.³⁰

Classe Química	Agrotóxicos	Solos (mg kg ⁻¹ massa seca)	Águas Subterrâneas (µg L ⁻¹)
		Valores de Intervenção	Valores de Intervenção
Organoclorados	Clordano	4	0,2
	DDT	1,7	-
	DDE	2,3	-
	DDD	34	-
	DDT/DDE/DDD	-	0,01
	Aldrim	0,32	-
	Dieldrim	-	-
	Endrim	-	-
	Drins	4	0,1
	α-endossulfam	4	5
	α-HCH	17	-
	β-HCH	1,6	-
	γ-HCH (lindano)	1,2	-
	HCH compostos	-	1
	Heptacloro	4	0,3
Heptacloro-epóxido	4	3	
Organoestanhosos	Compostos organoestanhosos	2,5	0,7
Herbicidas de ácido clorofenoxiacético	MCPA	4	50
Triazina	Atrazina	0,71	150
Carbamato	Carbaril	0,45	50
	Carbofurano	0,017	100

1.6 Preparo de amostra aplicado na extração de agrotóxicos de matrizes sólidas

A extração visa remover, o máximo possível, os analitos presentes na matriz, por isso é essencial que os parâmetros de extração sejam otimizados. Contudo, deve-se considerar que nenhuma técnica de extração com solvente pode ser utilizada para todos os tipos de amostras, pois a seleção da técnica depende de diversos fatores como, complexidade da matriz, seu estado físico e as propriedades dos analitos.³¹

Na literatura são descritas diversas técnicas utilizadas para a extração de agrotóxicos dos solos baseadas, em sua maioria, na extração sólido - líquido (do inglês, *Liquid-Solid Extraction*, LSE). Esse conjunto de técnicas, ditas como convencionais, foram as primeiras desenvolvidas e são caracterizadas por sua morosidade, laboriosidade e por problemas relacionados à evaporação de grandes volumes de solventes. Porém, como são usados materiais simples para sua execução, essas técnicas ainda são frequentemente

utilizadas em laboratórios de análises.³² Dentre essas técnicas podem-se citar a extração por Soxhlet, agitação mecânica e banho ultrassom.¹

A extração Soxhlet foi utilizada por muitos anos, sendo aceita por agências regulatórias como a EPA e a Administração de Alimentos e Fármacos dos EUA (do inglês, *Food and Drug Administration*, FDA), e tem sido empregada como referência para comparação com novas técnicas de extração. Porém, como são utilizados longos períodos de aquecimento, pode ocorrer a degradação de compostos termolábeis e, além disso, é necessário o uso de solventes orgânicos fortes, os quais não solubilizam a matéria orgânica, o que prejudica a análise. As alternativas para esses problemas são a extração por agitação mecânica ou por ultrassom que permitem realizar a análise em temperatura ambiente e usar misturas de solventes orgânicos e água ou até mesmo soluções alcalinas.¹

Nas últimas décadas, houve um grande avanço na área de análise de resíduos de agrotóxicos, buscando diminuir o tempo de análise e a quantidade de solventes, bem como o uso de solventes menos agressivos ao meio ambiente e alcançar limites de detecção e quantificação cada vez menores. Sendo assim, outras técnicas foram desenvolvidas, como a extração por fluido supercrítico (do inglês, *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), extração com água subcrítica (do inglês, *Subcritical Water Extraction*, SWE) e a extração com água subcrítica pressurizada (do inglês, *Pressurized Subcritical Water Extraction*, PSWE),³³ extração por líquido pressurizado (do inglês, *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) também denominada por extração acelerada por solvente (do inglês, *Accelerated Solvent Extraction*, ASE), extração assistida por micro-ondas (do inglês, *Microwave Assisted Extraction*, MAE), novas modalidades de extração Soxhlet, dispersão da matriz em fase sólida (do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) e as miniaturizadas, como a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Microextraction*, SPME).³⁴

Mais recentemente, outros métodos foram desenvolvidos, como o método QuEChERS (acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), e as técnicas combinadas como a SFE-DLLME (*Supercritical Fluid Extraction - Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).³⁵ A **Tabela 9** resume as principais características de algumas técnicas de extração em matrizes sólidas mais utilizadas e a **Tabela 10** compara algumas delas.

Na técnica de SFE, um fluido em condições supercríticas de temperatura e pressão é bombeado através do solo, não sendo necessário o uso de solventes. Devido às características intermediárias entre um gás e um líquido desse fluido, como a menor

Dissertação de Mestrado

Tabela 9: Técnicas de preparo de amostras sólidas (Continua).

Técnicas de Preparo de Amostra	Princípios da Técnica	Comentários
Extração Sólido - Líquido	A amostra e o solvente são colocados em um recipiente fechado e agitados; a solução resultante é separada do sólido por filtração (também é chamada de técnica do “frasco agitado”).	O solvente pode ser fervido ou submetido ao refluxo para melhorar a solubilidade; a amostra deve estar em um estado finamente dividido para auxiliar o processo de lixiviação do analito.
Extração Soxhlet	A amostra é colocada em um filtro de extração; o refluxo do solvente gera um fluxo que passa pelo filtro de extração e extrai os analitos que são recolhidos continuamente num balão de ebulição.	A extração ocorre pelo contato com o solvente; a amostra deve ser estável no ponto de ebulição do solvente; é um processo lento, mas a extração é realizada sem vigilância até estar completa; excelentes recuperações (usada como referência para comparar com outras técnicas de extração de amostras sólidas).
Extração por Fluido Supercrítico (SFE)	A amostra é colocada em um recipiente de fluxo, o fluido supercrítico (por exemplo, o CO ₂) passa através da amostra; após despressurizarão, o analito extraído é recolhido.	Para modificar a polaridade do fluido em SFE e variar a sua densidade, modificadores orgânicos são adicionados.
Extração por Fluido Pressurizado (PLE)/ Extração Acelerada por Solvente (ASE)	A amostra e o solvente extrator são colocados em um recipiente selado e aquecidos acima do ponto de ebulição do solvente, fazendo com que a pressão no recipiente aumente; a amostra extraída é removida e transferida para um pequeno frasco para posterior tratamento.	Aumenta consideravelmente a velocidade do processo de extração sólido - líquido; pode ser automatizada; a amostra extraída encontra-se diluída e exige concentração posterior.

Dissertação de Mestrado

Tabela 9: Técnicas de preparo de amostras sólidas (Conclusão).

Técnicas de Preparo de Amostra	Princípios da Técnica	Comentários
Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)	A amostra é colocada em um frasco aberto ou fechado e aquecida por radiação micro-onda.	Em frascos fechados, a técnica MAE permite o uso de pressão para melhorar a extração.
Dispersão da Matrix em Fase-Sólida (MSPD)	Um sorvente ou dispersante é usado como um abrasivo para produzir transtornos na arquitetura da matriz da amostra e a ligação do solvente para remover a amostra durante o processo de mistura.	Amostras sólidas ou viscosas ($\cong 0,5$ g) são homogeneizadas em um almofariz ou outro recipiente adequado, com cerca de 2 g de sorvente SPE (por exemplo, C ₁₈). A mistura é transferida para uma coluna vazia e os analitos são eluídos com um solvente.
Extração com Água Subcrítica (SWE)	Água em estado subcrítico é utilizada com solvente na extração dos analitos. Como a temperatura da água líquida aumenta sobre pressão, a cerca de 100 e 374 °C, a polaridade decresce notavelmente e isso pode ser usado na extração de diversos tipos de analitos.	Resultados comparáveis à extração Soxhlet, porém mais rápida e sem o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos.
Método QuEChERS	O método QuEChERS baseia-se numa extração <i>salting-out</i> com um solvente que, geralmente, é a acetonitrila.	Pode ser utilizado em três versões, nas quais a mudança se faz basicamente nos sais utilizados para manter o pH do meio. Dependendo da matriz pode não ser necessária a etapa de <i>clean up</i> .

Adaptado das referências ^{31; 35; 36}

Dissertação de Mestrado

Tabela 10: Comparação entre as técnicas de extração sólido - líquido.

Técnica de Extração	Características	Vantagens	Desvantagens
Extração Sólido - Líquido por Soxhlet	Tempo: 3-48 h Amostra: 1-30 g Solvente extrator: 100-500 mL Somente solventes orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Amostra fica em contato com o solvente durante toda a etapa de extração. • Não é necessária filtração após a extração. • Procedimento bem conhecido. • Amplo emprego no campo de extrações por mais de um século. 	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de extração • Elevado consumo de solventes • Degradação de alguns agrotóxicos, como N-metilcarbamatos • Requer etapa de <i>clean up</i>
Extração Sólido - Líquido Descontínua	Tempo: 10 min-18 h Amostra: 1-30 g Solvente extrator: 30-200 mL Solventes orgânicos, água ou misturas Ultrassom ou agitação mecânica	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiplas extrações • Executado em temperatura ambiente, evitando a degradação de alguns agrotóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer filtração ou centrifugação • Elevado consumo de solventes • Requer etapa de <i>clean up</i>
MAE	Tempo: 3-30 min Amostra: 1-10 g Solvente extrator: 10- 40 mL Solventes orgânicos, água ou misturas	<ul style="list-style-type: none"> • Extração rápida • Baixo volume de solventes • Extração simultânea de múltiplas amostras 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvente extrator precisa absorver radiação micro-ondas • Degradação de alguns agrotóxicos • Requer etapa de <i>clean up</i>
PLE	Tempo: 5-60 min Amostra: 0,4-30 g Solvente extrator: 1-50 mL Solventes orgânicos, água ou misturas	<ul style="list-style-type: none"> • Extração rápida • Baixo volume de solventes • Não requer filtração • Sistema automatizado 	<ul style="list-style-type: none"> • Quando é acoplado <i>on-line</i>, o armazenamento em sorvente tem tempo de vida curto (deve ser trocado depois de 7-8 h). • Degradação de alguns agrotóxicos • Requer etapa de <i>clean up</i>
QuEChERS	Tempo: 15-20 min Amostra: 1-15 g Solvente extrator: 4-40 mL Solventes orgânicos e água (Usualmente acetoneitrila e água)	<ul style="list-style-type: none"> • Extração rápida • Baixo volume de solventes • Executado em temperatura ambiente evitando a degradação de alguns agrotóxicos • Método flexível e de fácil execução 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo fator de concentração da amostra

Adaptada da referência.¹

viscosidade, quando comparado a um líquido, o mesmo pode se difundir mais facilmente e proporcionar uma melhor extração. Além disso, para melhorar a seletividade da extração pode-se ajustar a pressão e a temperatura do mesmo.³⁶ O fluido mais utilizado é o CO₂ que possui como vantagens ser quimicamente inerte e possuir temperatura e pressão críticas moderada.¹

Semelhantes à SFE têm-se as técnicas SWE e a PSWE, nas quais se utiliza água no estado subcrítico como solvente para extrair poluentes orgânicos dos solos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*, PAH), bifenil policlorados (do inglês, *Polychlorinated Biphenyls*, PCB) e agrotóxicos.³³ As vantagens de se utilizar a água em condições subcríticas em temperatura entre 100-374 °C e alta pressão residem no decréscimo acentuado da polaridade, da viscosidade e da tensão superficial, o que permite extrair compostos de baixa polaridade em alta temperatura e compostos altamente polares em baixa temperatura. Ambas as técnicas são consideradas “amigas do meio ambiente” uma vez que utilizam água ou fluido supercrítico como alternativas ao uso de solventes orgânicos. No entanto, as técnicas SWE e SFE apresentam algumas desvantagens, como baixa eficiência de extração, e não podem ser utilizadas com compostos instáveis termicamente e devem ser otimizados muitos parâmetros.³⁶

A PLE, também é chamada de extração acelerada por solvente, que seria o nome do primeiro equipamento comercial desenvolvido pela empresa Dionex para ser utilizado com essa técnica. Nessa técnica, a amostra é colocada em um dispositivo semelhante a um cartucho de extração e os analitos são extraídos da matriz por um solvente ou uma mistura de solventes que são mantidos em temperatura e pressão relativamente altas.³² A PLE é muito semelhante à SWE, com exceção dos solventes utilizados (no caso, a PLE utiliza solventes orgânicos ou misturas de solventes orgânicos e água) e, portanto, apresenta as mesmas desvantagens relacionadas com a estabilidade dos compostos a serem extraídos e a seletividade da extração, mas devido à diferença no solvente tem-se uma maior possibilidade de contornar esses problemas.³⁶

Na extração assistida por micro-ondas, em princípio, somente amostras ou solventes contendo compostos dipolares ou materiais que absorvem radiação micro-ondas podem ser utilizados, porém recentes estudos mostraram a possibilidade do uso de solventes apolares na extração de agrotóxicos organofosforados.³⁷ Devido ao tempo de análise curto, que previne a degradação de alguns compostos e, conseqüentemente, a possibilidade de análise de algumas substâncias termicamente instáveis, seu uso foi bastante difundido na

Dissertação de Mestrado

extração de agrotóxicos de solos, como as triazinas³⁸, os carbamatos³⁹ e os organoclorados⁴⁰.

A dispersão da matriz em fase sólida consiste basicamente de três passos: I) a amostra é misturada com o material dispersante (sorvente) em um almofariz com o auxílio de um pistilo; II) o pó obtido é transferido para um cartucho de extração em fase sólida e comprimido; III) a eluição é realizada com o auxílio da gravidade ou de uma bomba a vácuo, utilizando-se um solvente adequado ou uma mistura de solventes. O sucesso dessa técnica se deve à sua simplicidade (não requer nenhuma instrumentação específica ou equipamento), flexibilidade, robustez, rapidez, baixo custo e ao fato da extração e do *clean up* (se necessário) poderem ser realizadas em uma única etapa quando as amostras são pequenas.⁴¹

As condições de análises da MSPD são brandas, temperatura e pressão ambientes, preservando a degradação e a desnaturação dos analitos. Quando os analitos possuem uma interação muito forte com a matriz, pode ser utilizada a extração com líquido pressurizado.⁴¹

Devido às vantagens citadas anteriormente, a MSPD tem sido alvo de diversos artigos que ressaltam as tendências da técnica^{42; 43; 44} e, principalmente, os novos sorventes, como os polímeros impressos molecularmente (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP).⁴⁵ Sua aplicação vasta na área de análise de agrotóxicos se estende à matrizes diversas, como o solo⁴⁶ e as frutas⁴⁷. Porém, apesar das vantagens citadas, esta técnica possui como desvantagem a dificuldade de automação² que pode refletir em uma menor reprodutibilidade da análise.

A miniaturização do preparo de amostras combinada com as técnicas cromatográficas teve uma grande importância no desenvolvimento de métodos mais limpos de análise. O acoplamento *on-line* de técnicas de preparo de amostras miniaturizadas com microcolunas gera um sistema com inúmeras vantagens, como análise rápida, com alta eficiência, baixo custo operacional devido ao consumo reduzido de solventes, e alta seletividade.⁴⁸ Dentre as técnicas miniaturizadas utilizadas na extração de agrotóxicos de solos podem-se citar a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME)⁴⁹ e a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Microextraction*, SPME).⁵⁰

As novas tendências em relação às técnicas de extração apontam para o emprego de técnicas combinadas, que proporcionam melhores resultados. Um exemplo é a combinação da extração com fluido supercrítico com a microextração líquido-líquido dispersiva que minimiza os problemas encontrados na extração com fluido supercrítico (*off-line*), como a

evaporação do solvente coletado no final da extração para obter um alto fator de concentração.³⁵

O método QuEChERS é baseado em uma etapa de extração *salting-out* com solvente, geralmente acetonitrila, seguida por uma extração em fase sólida dispersiva (do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE). Este método é muito flexível e apresenta várias vantagens que se encontram descritas em seu nome: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro). Por ser alvo de estudo neste trabalho, essa técnica será descrita com mais detalhes a seguir.

1.7 Método QuEChERS

O método QuEChERS, **Figura 8 (A)**, foi desenvolvido em 2003, por Anastassiades *et al.*⁵¹, para a análise de multirresíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Desde a sua criação, modificações foram introduzidas, como a extração efetuada com acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético e o tamponamento a pH=4,8 promovido pela troca do cloreto de sódio pelo acetato de sódio na etapa de partição, originando, em 2005, a versão QuEChERS ‘Acetato’ desenvolvida por Lehotay *et al.*⁵² (AOAC *Official Method*), **Figura 8 (B)**. Mais tarde, em 2007, Anastassiades *et al.*⁵³ propuseram a versão QuEChERS ‘Citrato’ (*Standard Method* EN 15662- *European Commitee for Standardization* (CEN)). E que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado para gerar um efeito tamponante em pH= 5,0-5,5, **Figura 8 (C)**.

O método de preparo de amostra QuEChERS consiste basicamente em três etapas: (1) extração realizada com acetonitrila; (2) partição promovida pelos sais adicionados, como o sulfato de magnésio e o cloreto de sódio e (3) etapa de limpeza do extrato utilizando a d-SPE.

Na etapa de extração, a acetonitrila é o solvente mais comumente empregado por possibilitar a extração de uma ampla faixa de analitos, com diferentes polaridades, e por ser compatível com as técnicas instrumentais de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) ou de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, *Gas Chromatography -Tandem Mass Spectrometry*, GC-MS/MS).⁵¹

Dissertação de Mestrado

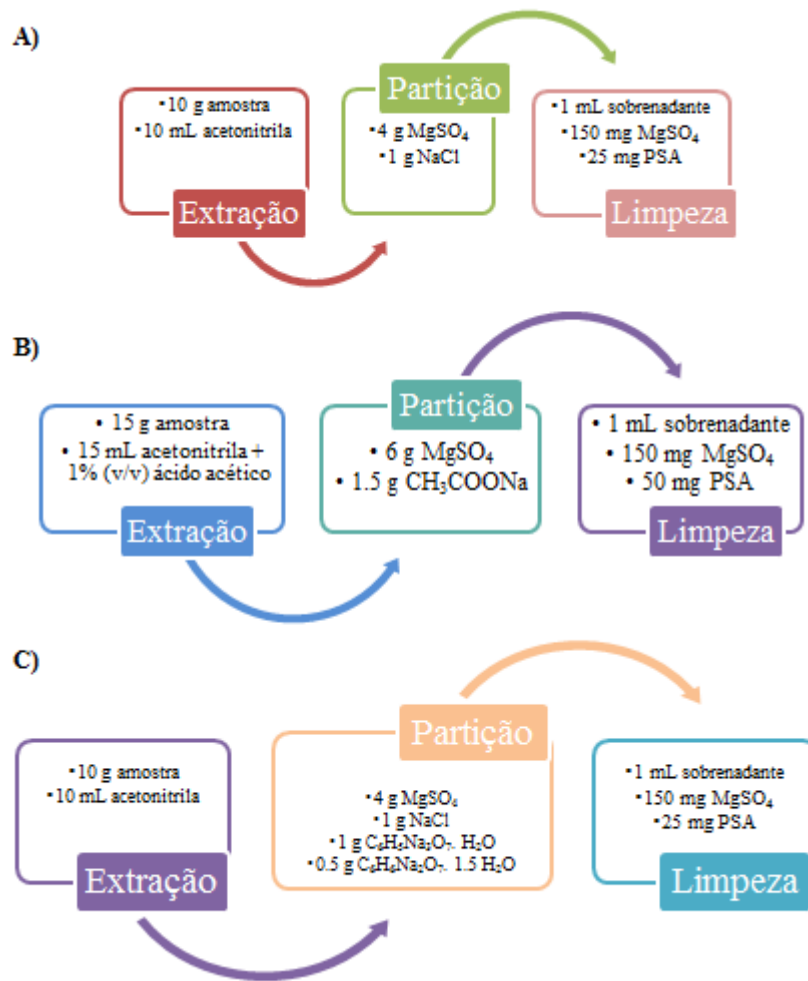


Figura 8: Método QuEChERS em suas três versões (A) “Original”, (B) “Acetato” e (C) “Citrato” Adaptado da referência.⁵⁴

A etapa de partição realizada com o uso de sais, como o cloreto de sódio, promove o efeito *salting-out*, utilizado em diversos métodos de extração de multirresíduos de agrotóxicos. A adição de sais secantes, como o sulfato de magnésio, proporciona a remoção da água e seu processo de hidratação envolve uma reação exotérmica, na qual a temperatura da amostra aumenta ficando em torno de 40 a 45 °C, favorecendo a extração de compostos apolares.⁵¹

Simultaneamente ao desenvolvimento do método de extração foi desenvolvido um novo método de *clean up* denominado d-SPE, tendo como objetivo a obtenção de um extrato final com menor quantidade de interferentes aliada a um menor custo, quando comparado aos métodos tradicionais. Uma das principais vantagens da d-SPE é a sua versatilidade, uma vez que permite a utilização de diferentes tipos de sorventes em quantidades variadas.⁵⁵ O sorvente mais utilizado é o etilenodiamino-N-propilsilano, uma amina primária secundária (do

inglês, *Primary Secondary Amine*, PSA) que atua como trocador aniônico e pode interagir por ligação de hidrogênio ou dipolo-dipolo.⁵¹

A primeira aplicação do método QuEChERS na análise de agrotóxicos em solo foi relatada em 2008 por Leseur *et al.*⁵⁶, na qual foram analisados 24 agrotóxicos de diferentes classes por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Nesse trabalho, foram comparadas 4 técnicas de preparo de amostra: (i) Extração por Ultrassom com solvente (do inglês, *Ultrasonic Solvent Extraction*, USE); (ii) PLE; (iii) Norma Européia DIN 12393 (do inglês, *European Norm* DIN 12393); (iv) QuEChERS. Os resultados indicaram que os menores limites de detecção foram obtidos usando a Norma Européia DIN 12393 e os mais elevados com o QuEChERS e a PLE, no entanto, as melhores recuperações foram alcançadas com o método QuEChERS.

1.8 Técnicas analíticas utilizadas na determinação de agrotóxicos

Dentre as técnicas mais utilizadas na determinação de agrotóxicos em amostras ambientais tais como, água e solo, as mais conhecidas e tradicionalmente empregadas são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, devido as suas inúmeras vantagens. Porém, com o avanço na ciência de separações, diferentes técnicas vêm sendo utilizadas, como a eletroforese capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis*, CE) e a cromatografia com fluido supercrítico (do inglês, *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) que visam obter melhor eficiência aliada ao menor consumo de solventes e ao menor tempo de análise. Na **Tabela 11** estão listadas as vantagens e as desvantagens das técnicas citadas.^{17,53}

A GC tem seu uso limitado à amostras que são voláteis abaixo de 300 °C, o que corresponde a cerca de 75% de todos os compostos conhecidos. Entretanto, compostos com alto ponto de ebulição ou não voláteis também podem ser analisados por GC, desde que sejam derivatizados. A GC é mais eficiente que a cromatografia líquida e as separações ocorrem em tempos semelhante ou até mais rápidos. Em análise de agrotóxicos o detector mais comumente utilizado é o espectrômetro de massas.³¹

A perspectiva do uso da CE na análise de agrotóxicos é muito promissora, devido às suas diversas vantagens, como alta eficiência, análises rápidas, pouco consumo de amostra, de reagentes e de solventes, e a possibilidade de miniaturização para análises de rotina de amostras contendo agrotóxicos de alta periculosidade. Contudo, apesar das diversas vantagens

Dissertação de Mestrado

Tabela 11: Comparação das diferentes técnicas analíticas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Alto poder de resolução Alta detectabilidade e seletividade Existência de bibliotecas de espectros de massas para examinar amostras desconhecidas 	<ul style="list-style-type: none"> Inadequada para compostos polares, termo lábeis e de baixa volatilidade Alto consumo de gases de elevado valor e pureza 	<ul style="list-style-type: none"> Derivatização (atualmente é utilizada somente para glifosato e seus produtos de degradação).
LC-UV	<ul style="list-style-type: none"> Aplicada para praticamente qualquer soluto orgânico independente da volatilidade ou da estabilidade térmica, desde que absorvam no UV Composições da fase móvel e da fase estacionária são variáveis Pode ser automatizada e miniaturizada (tecnologia de <i>microchip</i>) Simples, robusta e com larga faixa linear 	<ul style="list-style-type: none"> Eficiência de separação e seletividade inadequadas Uso de volumes elevados de solventes orgânicos de alto custo e toxicidade na fase móvel Baixa interferência da matriz 	<ul style="list-style-type: none"> Desenvolvimento para aumentar a eficiência e a seletividade dos materiais de limpeza e separação (imunossorventes, polímeros impressos molecularmente e materiais de acesso restrito)
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Aplicada para praticamente qualquer soluto orgânico independentemente da volatilidade ou da estabilidade térmica Composições da fase móvel e da fase estacionária são variáveis Pode ser automatizada e miniaturizada (tecnologia de <i>microchip</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> Fortemente afetada pelos interferentes da matriz (aumento de íons e, na maioria das vezes, supressão iônica) Dificuldade de identificação quando se utiliza interfaces de ionização branda. Falta de bibliotecas de espectros 	<ul style="list-style-type: none"> Desenvolvimento de extrações e <i>clean up</i> adequados; Uso de padrões isotopicamente lábeis Espectrometria de massas sequencial (MS/MS)
LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Aplicada para praticamente qualquer soluto orgânico independentemente da volatilidade ou da estabilidade térmica Composições da fase móvel e da fase estacionária são variáveis 	<ul style="list-style-type: none"> Fortemente afetada pelos interferentes da matriz (aumento de íons e, na maioria das vezes, supressão iônica) Falta de bibliotecas de espectros 	<ul style="list-style-type: none"> Desenvolvimento de extrações e <i>clean up</i> adequados.
CE	<ul style="list-style-type: none"> Alto poder de separação e resolução Rapidez na análise Baixo consumo de amostra, reagentes e solventes tóxicos Pode ser automatizada e miniaturizada (tecnologia de <i>microchip</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> Limites de detecção inadequados Baixa detectabilidade dos detectores Não adequada para compostos voláteis e de massa molar baixa 	<ul style="list-style-type: none"> Enriquecimento da amostra (SPE, <i>stacking</i>) Aumento do caminho óptico de detecção Uso de detectores de alta detectabilidade

Adaptada das referências ^{1,57}

o maior empecilho da técnica reside nas inadequadas detectabilidade atribuídas ao pequeno volume de amostra injetado, geralmente 1-10 nL, sendo indicado para tentar solucionar esse problema o uso de técnicas de pré concentração.⁵⁷

A cromatografia com fluido supercrítico é similar a cromatografia líquida no que se diz respeito à parte instrumental, no entanto o solvente é, por definição, um fluido supercrítico, usualmente o CO₂ em condições de elevada pressão e temperatura. Nesta técnica, compostos não voláteis podem ser separados. A SFC pode ser considerada como um híbrido entre a LC e a GC, sendo caracterizada por uma maior eficiência de separação do que a LC, mas apresenta menor eficiência do que a GC. A fase móvel em SFC desempenha maior influência na separação do que em GC, mas menor do que em LC.

Devido às suas características peculiares, o emprego da SFC na separação de agrotóxicos tem sido voltado para compostos quirais, utilizando como detector o espectrômetro de massas, em diversas matrizes como água⁵⁸, vegetais, frutas e solos⁵⁹, pólen, mel, água e solo⁶⁰ e em solos.^{61,62} Tem-se o relato do uso de detector por arranjo de diodos por Salvatierra-Stamp *et al.*⁶³ na análise de contaminantes emergentes em água.

1.9 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Há duas décadas, uma interface apropriada para o acoplamento LC-MS era uma tarefa desafiadora, pois este arranjo era considerado um “casamento não natural”. A LC-MS combina um instrumento que opera em fase condensada com outro que opera sob vácuo. Este problema foi resolvido com a fonte de ionização a pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization*, API), que tem tornado a LC-MS um método ideal e amplamente utilizado para análises de contaminantes em alimentos, devido à sua alta especificidade, detectabilidade e eficiência. A interface API é compatível com sistemas de fase reversa, levando em conta o uso de solventes e aditivos na separação cromatográfica, e preservando todas as suas vantagens.⁶⁴

Os avanços mais importantes nas análises de multirresíduos de agrotóxicos vêm sendo realizados no campo dos analisadores de massas. Dentre os diferentes modelos utilizados podem-se citar o quadrupolo, triplo quadrupolo (do inglês, *Triple Quadrupole*, QqQ), *ion trap* tridimensional (do inglês, *3 Dimension Ion Trap*, 3D IT), quadrupolo-*ion trap* linear (do inglês, *Quadrupole Linear Ion Trap*, QqLIT), tempo de voo (do inglês, *Time of Flight*, TOF), quadrupolo - tempo de voo (do inglês, *Quadrupole Time of Flight*, Q-TOF) e o

orbitrap e são caracterizados pelos seguintes parâmetros: exatidão, resolução, faixa de massa, capacidade de análise sequencial e velocidade de aquisição de dados. A escolha do analisador de massas deve levar em consideração as vantagens, desvantagens e custo/benefício da aquisição do equipamento.⁶⁵

A primeira aplicação da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas na análise de resíduos de agrotóxicos foi com o uso de um quadrupolo como analisador de massas, porém, como o mesmo não acatava as especificações da União Européia, foi substituído pelo triplo quadrupolo.⁶⁵

1.9.1 Separação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O principal modo para separação de compostos orgânicos por LC-MS em fase reversa com ou sem o uso de par iônico. Devido a robustez e facilidade no desenvolvimento do método, a cromatografia líquida em fase reversa cobre mais de 95% das aplicações.⁶⁴

Nesse modo de separação, os contaminantes orgânicos de média polaridade, polares e iônicos são separados por partição, de acordo com as diferenças de hidrofobicidade entre uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar. Em sua maioria, as fases estacionárias utilizadas são baseadas em sílica modificadas quimicamente com cadeias de octadecil (C18) ou octil (C8), porém, também são encontradas aplicações de sílica modificada com aminopropil, cianopropil e fenil, além das fases baseadas em polímeros sintéticos como o estireno divinilbenzeno. As modificações nas fases C18 com a adição de um grupo funcional polar (amida ou carbamato) ou apolar entre o esqueleto de sílica e o grupo C18 ou no final na cadeia C18, modificam a seletividade em comparação com as fases convencionais baseadas somente no grupo alquil.⁶⁴

Os solventes mais comumente empregados como fase móvel em LC-MS no modo fase reversa são água, metanol e acetonitrila, com eluição por gradiente. Os tampões utilizados como fase móvel devem ser voláteis para evitar problemas na interface com o espectrômetro de massas, sendo assim, os mais comuns são: ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio, formiato de amônio e amônia. A composição da fase móvel é de suma importância para se obter uma boa separação, além de influenciar na ionização dos analitos e na detectabilidade do espectrômetro de massas. A quantidade do modificador orgânico pode ou não favorecer a eficiência de ionização, dependendo da interface utilizada.⁶⁴

A eficiência do processo de ionização por ESI (do inglês, *Electrospray Ionization*) depende da condutividade e da tensão superficial do líquido a ser nebulizado. Quando a condutividade é muito elevada (alta porcentagem de água) a produção de um *spray* estável, bem como a evaporação das gotas formadas por ação da alta voltagem e a nebulização do gás são dificultadas. Devido a tensão superficial da água ser maior que a do metanol ou da acetonitrila, a detectabilidade é reduzida quando se utiliza quantidades superiores a 70-80% de água na fase móvel. A relação entre a quantidade de solvente orgânico e água é mais significativa quando se trabalha em vazões maiores, pois maiores quantidades de solvente deve ser nebulizada e evaporada. Por outro lado, uma porcentagem maior de solvente orgânico também pode diminuir a detectabilidade, especialmente se não for adicionado nenhum aditivo, pois a condutividade dos solventes orgânicos é muito baixa. Uma pequena porcentagem de água na fase móvel ajuda na formação das gotas. Geralmente, maiores porcentagens de solvente orgânico aumenta a ionização em ESI. Solventes próticos, como o metanol, melhoram a ionização positiva. A adição de tampões voláteis, como ácido fórmico/formiato de amônio ou ácido acético/acetato de amônio, favorece a ionização de analitos básicos, porém a presença de amônia pode ocasionar a supressão do sinal de analitos ácidos. A adição de modificadores de pH, como ácido acético, ácido fórmico ou hidróxido de amônio exerce grande influencia na separação e ionização dos analitos. No entanto, nem sempre as respostas são as esperadas e, muitas vezes, pode se obter sinal intenso para íons $[M+H]^+$ em solução básicas e sinal intenso de íons $[M-H]^-$ em soluções ácidas.⁶⁴

1.9.2 Interfaces

Atualmente, a maioria das aplicações é feita empregando a ionização por ESI ou APCI (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). A ESI é uma técnica de ionização branda, especialmente apropriada para compostos iônicos e com alta massa molar. Como pode ser visualizado na **Figura 9**,⁶⁶ o capilar é mantido em alta voltagem a pressão atmosférica para gerar o *spray*⁶⁵ por uma descarga elétrica no líquido. O líquido carregado na agulha se torna instável e é forçado a reter cada vez mais carga. Então, o líquido chega a um ponto crítico, no qual não consegue mais segurar as cargas elétricas e as gotas explodem por repulsão coulômbica, gerando moléculas carregadas.⁶²

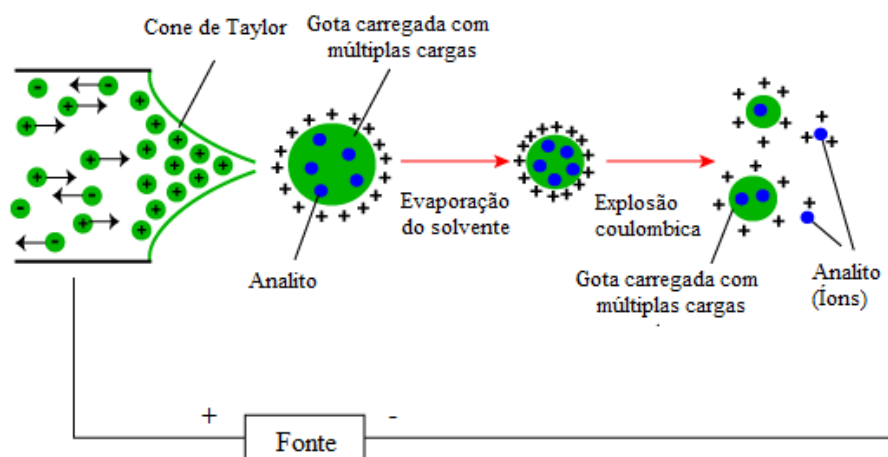


Figura 9: Esquema do processo de ionização por ESI em modo positivo (Adaptado, University of Bristol).⁶⁶

1.9.3 Analisadores de massas

Os analisadores de massas são os responsáveis pela separação dos íons no espectrômetro de massas, de acordo com a razão massa/carga (m/z). Eles podem ter a forma de filtros formados por hastes paralelas nos quais rádiofrequência e corrente contínua apropriadas são aplicadas (filtros quadrupolo), ou de armadilhas de íons tridimensionais, onde também se aplica rádiofrequência e corrente contínua (*Orbitrap*) ou também podem-se aplicar campos magnético ou eletrostático (tempo de voo). Usualmente, pode-se utilizar mais de um analisador, como os encontrados nos equipamentos sequenciais.⁶⁷

1.9.4 Efeito matriz

A LC-MS e LC-MS/MS são ferramentas poderosas para separação, confirmação e quantificação de compostos. No entanto, devido à complexidade da amostra e o número de compostos que podem coeluir com os analitos, pode ocorrer o chamado efeito matriz, que é o aumento ou supressão do sinal dos analitos de interesse.

O mecanismo exato desse efeito não é bem conhecido, o que gera diferentes teorias sobre a sua origem. Uma dessas teorias afirma que compostos orgânicos presentes na amostra em concentrações superiores a 10^5 mol L⁻¹ podem competir com o analito pelo acesso às superfícies das gotas e, na fase gasosa, interferentes ácidos ou básicos podem ter maior afinidade para a transferência do próton do que o analito de interesse, favorecendo a sua ionização, diminuindo assim a intensidade do sinal do analito.

Outra hipótese se refere ao raio das gotas a partir da qual os íons na fase gasosa são emitidos. Se a amostra contém componentes não voláteis, as gotículas são impedidas de alcançar seu campo de raio e de superfície críticas, portanto a eficiência da ionização diminui e o sinal do analito é reduzido. Componentes da matriz podem influenciar efetivamente na formação do íons no processo de ionização por alteração na tensão superficial das gotículas no *electrospray* e pela formação de adutos ou pares iônicos com os analitos. O caráter ácido ou básico dos componentes da matriz podem promover a protonação ou desprotonação dos íons moleculares durante o processo de ionização, causando aumento do sinal.⁶⁵

1.10 Análise multirresíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS em amostras ambientais

No desenvolvimento de métodos multirresíduos de agrotóxicos, em sua maioria, emprega-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, devido às diversas vantagens associadas, como boa detectabilidade e seletividade, quando acoplada a um analisador triplo quadrupolo ou por armazenamento de íons. A possibilidade de detectar o maior número possível de analitos em uma única corrida fez com que o acoplamento da LC com o espectrômetro de massas sequencial tornasse a melhor opção na análise multirresíduos de agrotóxicos, permitindo alcançar os LMR requeridos.⁶⁸

Além das vantagens citadas anteriormente, a determinação de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS tem-se também as vantagens do sistema UHPLC como o menor consumo de solvente e a maior rapidez nas análises quando comparada com a LC.

Os trabalhos mais recentes envolvendo as análises multirresíduos de agrotóxicos em solos e amostras ambientais utilizam a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada com o espectrômetro de massas sequencial (do inglês, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*, UHPLC-MS/MS), favorecendo a aquisição de dados e tempos de análises reduzidos. A **Tabela 12** apresenta alguns exemplos de análises de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS, encontrados na literatura.

Tabela 12: Exemplos de análises de resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS em amostras ambientais.

Agrotóxicos	Matriz	Técnica de extração	Referência
37 agrotóxicos	Águas superficiais	On-line SPE e SPE	Hurtado-Sánchez <i>et al.</i> ⁶⁹
Hexazinona, Atrazina, Femedifam, Mefenacete, Metolaclor	Solo	QuEChERS	Mei <i>et al.</i> ⁷⁰
Ciantraniliprole e J9Z38 (TP)	Couve chinesa e solo	QuEChERS	Sun <i>et al.</i> ⁷¹
Piraclostrobina	Amendoim e solo	QuEChERS	Zhang <i>et al.</i> ⁷²
Clorantraniliprole	Solo, água superficial, palha de arroz	Extração com acetonitrila e QuEChERS	Zhang <i>et al.</i> ⁷³
Fenbuconazol e TPs	Solo e água	QuEChERS e SPE	Li <i>et al.</i> ⁷⁴

1.11 QuEChERS e técnicas cromatográficas empregadas à amostras de solo

O método QuEChERS é particularmente popular para a determinação de uma ampla gama de compostos, principalmente agrotóxicos em diferentes matrizes, por sua simplicidade, baixo custo e alta eficiência com um número reduzido de etapas.

Modificações no procedimento original do método QuEChERS utilizando extrações tamponadas, com a adição de água para obter umidade adequada (hidratação da amostra), ou com o uso diferentes sorventes na etapa de *clean up*, para uma melhor remoção dos interferentes da matriz, fazem desse método uma ferramenta versátil não apenas para a análise de agrotóxicos em frutas^{75, 76} e vegetais⁷⁷, mas também de carnes⁷⁸, ovos⁷⁹, peixes⁸⁰ e amostras ambientais e de solo (**Tabela 13**).

Conforme descrito na **Tabela 13** na maior parte dos estudos observa-se o emprego de uma etapa de hidratação pelo fato do solo ser previamente seco antes das análises, essa etapa é necessária para que ocorra a separação das fases na etapa de partição. O emprego de diferentes sorventes na etapa de limpeza leva em consideração as propriedades do solo empregado, sendo mais comumente utilizado C18, PSA e MgSO₄.

Dissertação de Mestrado

Tabela 13: Análises de resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS em amostras de solo (Continua).

Compostos	Tratamento da amostra	Limpeza	Recuperação (%)	LOD e LOQ	Deteção	Referência
8	Amostra: 4 g; 20 mL água; 10 mL ACN + 1% (v/v) NH ₃ QuEChERS: 2 g CH ₃ COONa + MgSO ₄	2 g MgSO ₄	14 - 95 e < 1 para Carboxina	LOD= 0,1 -2 ng g ⁻¹ LOQ= 1 - 6 ng g ⁻¹	LC- MS/MS	Kvičalová <i>et al.</i> ⁸¹
1	Amostra: 10 g; 40 mL ACN QuEChERS: 4 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	d- SPE: 150 mg de MgSO ₄ , 50 mg PSA, 50 mg C18; 0,2 mL do sobrenadante foi diluído em 0,8 mL de solução aquosa contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico	76,9 – 82,4	LOD= 0,15 µg kg ⁻¹	UHPLC- ESI- MS/MS	Zhang <i>et al.</i> ⁷³
1	Amostra: 10 g; 10 mL ACN QuEChERS: 4 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	d- SPE: 100 mg PSA e 150 mg MgSO ₄	99,1 – 108,5	LOD= 0,17 µg kg ⁻¹ LOQ= 0,57 µg kg ⁻¹	LC- MS/MS	Zhang <i>et al.</i> ⁷²
8	Amostra: 10 g; 5 mL água + 10 mL ACN QuEChERS: 4 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	d-SPE: 50 mg C18 e 150 mg MgSO ₄	81,2 – 106,5	LOD= 0,04 – 1,0 µg kg ⁻¹ LOQ= 0,12 – 3,0 µg kg ⁻¹	UHPLC- MS/MS	Li <i>et al.</i> ⁷⁴
5	Amostra: 10 g; 100 µL ácido acético + 10 mL ACN QuEChERS: 4 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	Sem <i>clean up</i> foram obtidos melhores resultados	70,3 - 120	LOQ= 10 - 50 µg kg ⁻¹	LC-APCI- MS/MS	Caldas <i>et al.</i> ⁸²
5	Amostra: 10 g; 0,5 mL H ₂ O; 4 mL ACN QuEChERS: 0,1 g MgSO ₄	d-SPE: 0,1 g PSA + 0,1 g C18	75,4 – 98,5	LOD= 0,005 – 0,020 µg kg ⁻¹ LOQ= 0,017 – 0,067 µg kg ⁻¹	UHPLC- MS/MS	Mei <i>et al.</i> ⁷⁰
35	Amostra: 5 g ou 10 g; 10 mL ACN com e sem adição de 3 mL H ₂ O; QuEChERS: 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 0,5 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O e 1 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	d-SPE: 150 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C18;	67 - 148	LOQ= 1,5-7,6 µg kg ⁻¹	GC- MS/MS	Fernandes <i>et al.</i> ⁸³
		DPX: 150 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C18	70 - 151			

Dissertação de Mestrado

Tabela 13: Análises de resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS em amostras de solo (Conclusão).

Compostos	Tratamento da amostra	Limpeza	Rec (%)	LOD e LOQ	Deteção	Referência
5	Amostra: 10 g; 5 mL H ₂ O e 10 mL ACN; QuEChERS: 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 0,5 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O e 1 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	d-SPE: 150 mg MgSO ₄ + 30 mg C18	70-110	LOQ= 0.10–1.8 µg kg ⁻¹	GC-MS e LC-MS	Mantzós <i>et al.</i> ⁸⁴
14	Amostra: 5 g; 3 mL H ₂ O + 7 mL ACN; QuEChERS: 6 g MgSO ₄ , 1,5 g NaCl, 0,750 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O e 1,5 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	d-SPE: 1,5 mL de sobrenadante 50 mg de PSA, 150 mg de MgSO ₄ e 50 mg de C18	Variável de acordo com o solo	Variável de acordo com o solo	GC- ECD e GC-MS/MS	Correia-Sá <i>et al.</i> ⁸⁵
26	Amostra: 5 g; 10 mL H ₂ O, 0,5 mL NaOH (c= 5 mol L ⁻¹) 0,5 mL HCl (c= 4 mol L ⁻¹) 10 mL ACN + 1% (v/v) ácido acético QuEChERS: 1 g NaCl, 4 g MgSO ₄ , 0,5 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O e 1 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	Sem <i>clean up</i> e com <i>clean up</i> d-SPE com diferentes sorventes (PSA, C18, C8, Florisil entre outros)	65-127	LOD= 0,002 mg kg ⁻¹ LOQ= 0,01 mg kg ⁻¹	LC-MS/MS	Kaczyński <i>et al.</i> ⁸⁶
5	Amostra: 5 g; 5 mL H ₂ O, 10 mL ACN + 1% (v/v) ácido acético; QuEChERS: 4 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	d-SPE: 25 mg PSA +150 mg MgSO ₄ ;	72-104	LOD= 1,0 mg kg ⁻¹ LOQ= 2,0 mg kg ⁻¹	LC-MS	Dankyi <i>et al.</i> ⁸⁷
5	Amostra: 5 g; 10 ACN + 100 µL ácido acético e 2 mL H ₂ O QuEChERS: 2 g MgSO ₄ e 1 g NaCl	d-SPE: 200 mg MgSO ₄ e 25 mg C18.	80-110	LOQ= 2,4- 6 ng g ⁻¹	LC-MS/MS	Pang <i>et al.</i> ⁸⁸
50	Amostra: 1 g amostra liofilizada, 7,5 mL H ₂ O, 10 mL ACN QuEChERS: 6 g MgSO ₄ , 1,5 g NaCl; 0,75 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O; 1,5 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	d-SPE: 50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	Variável de acordo com a amostra	Variável de acordo com a amostra	LC-MS/MS	Masiá <i>et al.</i> ⁸⁹
50	Amostra: 1 g amostra liofilizada, 7,5 mL H ₂ O, 10 mL ACN QuEChERS: 6 g MgSO ₄ , 1,5 g NaCl; 0,75 g Na ₂ HCit 1,5H ₂ O; 1,5 g Na ₃ Cit 2H ₂ O	d-SPE: 50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C18	40-105	LOD= 0,17-1,67 ng L ⁻¹ LOQ= 0,5-5,0 ng g ⁻¹	LC-MS/MS	Masiá <i>et al.</i> ⁹⁰

1.12 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um processo necessário na etapa do seu desenvolvimento para que o mesmo possa gerar informação sobre a amostra de forma confiável. O objetivo da validação de um método é mostrar que o procedimento utilizado é adequado para o fim pretendido.

Os órgãos que regulamentam a validação dos métodos analíticos no Brasil são: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia), cada um deles apresenta uma definição de validação, bem como diferenças nas regras dos parâmetros analíticos, por isso, sempre que um método for validado o mesmo deve indicar a agência regulamentadora cujas normas foram seguidas.

Segundo a ANVISA (2003): a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, adequados à análise.⁹¹

Segundo o INMETRO (2011): a validação possui o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido. Sendo assim, o processo de validação deve ser descrito em um procedimento e os estudos para a determinação dos parâmetros devem ser executados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados.⁹²

Segundo o Guia SANTE (2015), cujas normas foram seguidas neste trabalho: a validação é um processo de caracterização do desempenho esperado de um método em termos de seu escopo, especificidade, sensibilidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade laboratorial. Informações sobre esses parâmetros devem ser estabelecidas antes da análise das amostras, com exceção da reprodutibilidade laboratorial.⁹³

1.12.1 Parâmetros analíticos (figuras de mérito) para validação de métodos

As figuras de mérito usualmente avaliadas durante a validação de um método cromatográfico são: linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, efeito matriz e robustez. Neste trabalho, seguiu-se o Guia SANTE 2015 e os parâmetros analíticos determinados foram: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de quantificação, efeito matriz, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

1.12.1 (a) Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir em suas determinações em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes.⁹⁴ A seletividade deve ser assegurada para garantir que os parâmetros de linearidade, recuperação e precisão não sejam comprometidos.⁹²

1.12.1 (b) Faixa linear de trabalho

Para que a quantificação de determinado analito seja confiável é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida (y) e a concentração (x). Em cromatografia, a relação entre a área e a concentração é linear, podendo ser descrita pela **Equação (6)** que relaciona essas duas variáveis.⁹²

$$y = a + bx \quad \text{Equação (6)}$$

sendo:

y = área do pico cromatográfico; x = concentração; a = interseção com o eixo y, quando x = 0 (coeficiente linear); b = inclinação da curva analítica (coeficiente angular).

No presente trabalho, para verificar a linearidade foram avaliados os valores do coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear, os gráficos de resíduos e de resíduos padronizados. Para a escolha da faixa de trabalho, levou-se em consideração níveis de concentração compatíveis com a concentração esperada dos agrotóxicos em solo.

Segundo o Guia SANTE 2015, a linearidade deve ser avaliada em cinco níveis e o critério de aceitação são os resíduos $< \pm 20\%$.⁹³

1.12.1 (c) Efeito matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou aumento do sinal ou resposta instrumental.⁹⁵ O efeito matriz pode ser mensurado por meio da **Equação (7)**.⁹⁶

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{\text{coeficiente angular da curva analítica no extrato da matriz}}{\text{coeficiente angular da curva analítica no solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

O efeito matriz calculado conforme a **Equação (7)** quando $< \pm 20\%$ pode ser considerado desprezível e, nesse caso, a curva analítica pode ser preparada tanto em solvente quanto no extrato da matriz. Para valores $> \pm 20\%$, o efeito matriz é significativo, sendo necessária a construção da curva analítica no extrato da matriz a fim de se reduzir a influência dos coextrativos da matriz.⁹³

1.12.1 (d) Exatidão (Recuperação)

A exatidão foi calculada como recuperação segundo a **Equação (8)**.⁹²

$$\text{Recuperação(\%)} = \left(\frac{C1-C2}{C3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

sendo:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada; C2 = concentração do analito na amostra não fortificada; C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Os valores de recuperação recomendados pelo Guia SANTE 2015 estão na faixa de 70-120%, porém, para casos em que não é possível obter esses valores, devido a perdas na etapa de partição em caso de analitos de maior polaridade, por exemplo, e desde que se tenha precisão $\leq 20\%$, valores de recuperações mais baixos são aceitos.⁹³

1.12.1 (e) Precisão

Os três modos mais comuns de representar a precisão são repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, que são expressas pela estimativa do desvio padrão absoluto ou pelo coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV), também conhecido como estimativa do desvio padrão relativo, é calculado pela **Equação (9)**.⁹²

$$CV (\%) = \left(\frac{s}{x(\text{médiao})} \right) \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

sendo:

s: estimativa do desvio padrão absoluto; (x): Concentração média obtida.

Os valores de precisão aceitos pelo Guia SANTE 2015 são $CV \leq 20\%$.⁹³

Capítulo II: Objetivos

2. Objetivos

Os objetivos deste projeto foram o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em solos, utilizando o método QuEChERS no preparo de amostra e a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) na separação, confirmação e quantificação dos analitos, a aplicação do método desenvolvido e validado em amostras de solos nos quais foram cultivados, em modo convencional, diferentes tipos de culturas do grupo das hortaliças não folhosas e folhosas e a estimativa, em laboratório, do tempo de meia vida (DT50) em diferentes condições experimentais.

2.1 Etapas do trabalho

Para atingir esses objetivos, as etapas do trabalho foram:

- a) Desenvolver o método cromatográfico por UHPLC-MS/MS para separação dos 20 agrotóxicos selecionados para o estudo;
 - b) Realizar a infusão direta das soluções analíticas contendo os agrotóxicos no espectrômetro de massas para determinar os íons precursores e íons produtos para identificação e quantificação, bem como as condições de análise;
 - c) Selecionar uma técnica de preparo de amostra para extrair os agrotóxicos estudados do solo;
 - d) Validar o método analítico desenvolvido analisando as principais figuras de mérito, segundo o guia SANTE 2015;
 - e) Aplicar o método desenvolvido e validado na análise de diferentes amostras de solo oriunda de plantações do grupamento das hortaliças não folhosas e folhosas;
 - f) Analisar, em diferentes intervalos de tempo, solos nos quais foram aplicados agrotóxicos comerciais, visando estimar o tempo de dissipação dos agrotóxicos em duas amostras de solos distintas.
-

Capítulo III: Parte experimental

3. Parte experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Farmacêuticas e Quimiometria (LabFarQui), antes denominado Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e as análises por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (UHPLC-MS/MS) foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Institucional na mesma instituição.

A parte experimental consistiu na avaliação do método QuEChERS em suas três versões (“Original”, “Acetato” e “Citrato”), na ausência e na presença da etapa de *clean up*, na extração de 20 agrotóxicos de solos, sendo a versão que forneceu os melhores resultados validada em dois tipos de solo, de acordo com os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, efeito matriz, faixa linear de trabalho, limites de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), seguindo as recomendações do guia SANTE 2015. Após a validação o método desenvolvido foi aplicado em análises de amostras de solo, de diferentes tipos de culturas, cultivadas no modo convencional, provenientes da Microrregião de Bragança Paulista em São Paulo. Foi avaliado também, em laboratório, o tempo de dissipação dos agrotóxicos em duas amostras de solo distintas.

3.1 Reagentes, solventes e gases

- ✚ Acetato de amônio- p.a. (Synth, Brasil);
- ✚ Acetato de sódio –p.a (J.T. Baker, EUA);
- ✚ Acetato de etila- grau cromatográfico (Tedia, EUA);
- ✚ Acetona – UV-IR-HPLC-GPC (Panreac, Espanha);
- ✚ Acetonitrila - UHPLC- Supergradient (Panreac, Espanha);
- ✚ Ácido acético glacial- p.a. (Synth, Brasil);
- ✚ Ácido fórmico- 98-100% p.a. (Vetec, Brasil);
- ✚ Água destilada; Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q-Plus, Direct- Q™ (Millipore, Brasil), resistividade de 18,2 MΩ cm, 25 °C;
- ✚ Ar sintético 99,9% de pureza (White Martins, Brasil);
- ✚ C18 – Cartuchos para SPE (Supelco, EUA);
- ✚ Citrato de sódio di-hidratado (J.T.Baker, EUA);

Dissertação de Mestrado

- ✚ Cloreto de sódio (Synth, Brasil);
- ✚ Diclorometano- Ultra Resi-Analyzed[®] (J.T.Baker, EUA);
- ✚ Dimetilsulfóxido - UV-IR-HPLC-GPC (Panreac, Espanha);
- ✚ Etanol- UV-IR-HPLC (Panreac, Espanha);
- ✚ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ✚ Formiato de amônio- 98% (Riedel-de Haen[®], Alemanha);
- ✚ Gás argônio, analítico, utilizado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✚ Gás nitrogênio, utilizado como gás de dessolvatação na fonte de *electrospray* (ESI) (White Martins, Brasil);
- ✚ Hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidratado (J.T.Baker, EUA);
- ✚ Metanol– UV-IR-HPLC (Panreac, Espanha);
- ✚ Sorvente Bondesil PSA, com tamanho de partícula de 50 µm (Supelclean, EUA);
- ✚ Sulfato de magnésio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ✚ Tampão pH = 4,00 ± 0,05 a 25 °C (Synth, Brasil);
- ✚ Tampão pH = 7,00 ± 0,05 a 25 °C (Synth, Brasil).

3.2 Materiais

- ✚ Vidrarias de laboratório;
- ✚ Frascos de vidro âmbar de 2 mL, 5 mL, 10 mL e 50 mL;
- ✚ Filtros de seringa de 22 µm em PTFE hidrofílico;
- ✚ Ponteiros de micropipetas com capacidades de 10 µL, 200 µL, 1000 µL e 5 mL;
- ✚ Tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL.

3.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante a execução do desenvolvimento experimental foram: agitador tipo vortex, Gehaka, modelo AV-1 (Brasil), balança analítica, Sartorius, modelo CP 225 D (Alemanha); balança analítica, Fisher Scientific, modelo A-250 (EUA); banho ultrassom, Logen Scientific, modelo LSUC2-120-3,0 (EUA); bomba a vácuo de membrana, Vacuubrand, modelo ME 1C (Alemanha); centrífuga, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, modelo Rotofix 32 A (Alemanha), micropipetas com capacidades variadas,

Eppendorf Research (EUA); pH metro, Metrohm, modelo 827 pH Lab (Suíça); sistema de deionização de água, Milli-Q-Plus, modelo Direct-Q™ (Brasil), sistema de filtração de fase móvel com membranas Millipore Durapore® em PVDF 0,22 µm GV (Irlanda).

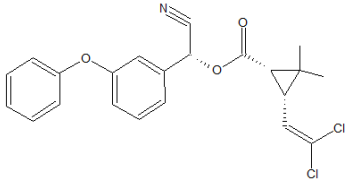
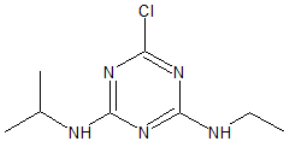
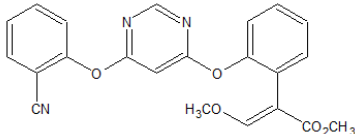
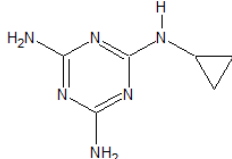
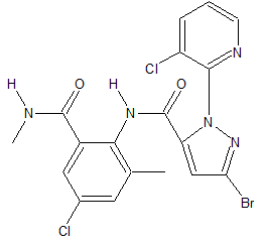
Nas análises cromatográficas foi utilizado o cromatógrafo UPLC® Acquity™, Waters (Milford, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas, Micromass Quattro Micro™ API, Waters (Manchester, RU) com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por ESI e o software *MassLynx* 4.1 para a aquisição de dados. A coluna utilizada foi a *Acquity UPLC® BEH C18* (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula) (Waters, Irlanda) precedida por coluna de guarda *VanGuard™ BEH C18* (5 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula) (Waters, Irlanda).

3.4 Padrões analíticos dos agrotóxicos estudados

Os agrotóxicos estudados (**Tabela 14**) foram adquiridos das empresas: Chem Service- EUA, Sigma-Aldrich, Pestanal® - Alemanha e Riedel-de Haën, Pestanal® - Alemanha, todos com grau de pureza igual ou superior a 94%. Para o trabalho, foram selecionados agrotóxicos permitidos para a cultura de tomate e para o grupo das hortaliças não folhosas e folhosas e que estão de acordo com a ANVISA. Foram avaliados também, agrotóxicos que não são permitidos para essas culturas, mas que foram encontrados em amostras desses grupamentos analisadas pelo PARA no ano de 2013- 2015.

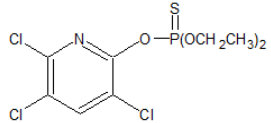
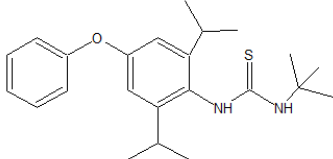
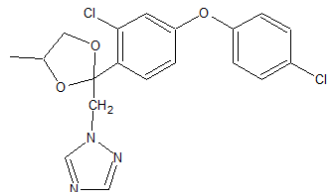
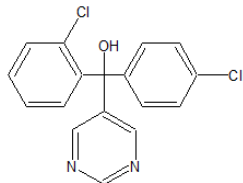
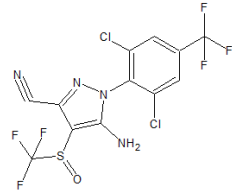
Dissertação de Mestrado

Tabela 14: Informações químicas, pureza do padrão utilizado e estruturas dos agrotóxicos estudados (Continua).

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Química	Pureza (%)	Estrutura Química
α- Cipermetrina	416,3	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	94,3	
Atrazina	215,7	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	98,0	
Azoxistrobina	403,4	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	99,4	
Ciromazina	166,2	C ₆ H ₁₀ N ₆	99,8	
Clorantraniliprole	483,2	C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂	99,1	

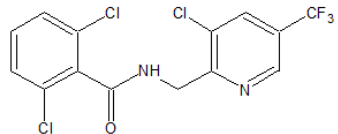
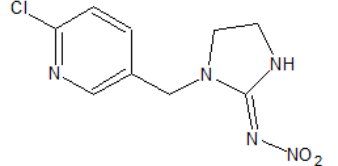
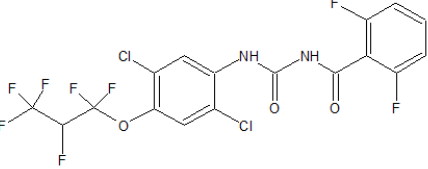
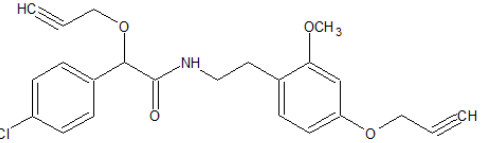
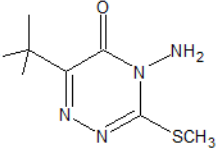
Dissertação de Mestrado

Tabela 14: Informações químicas, pureza do padrão utilizado e estruturas dos agrotóxicos estudados (Continuação).

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Química	Pureza (%)	Estrutura Química
Clorpirifós	350,9	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	99,2	
Diafentiurom	384,6	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ OS	99,9	
Difenoconazol	406,3	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	97,0	
Fenarimol	331,2	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	99,8	
Fipronil	437,2	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	97,9	

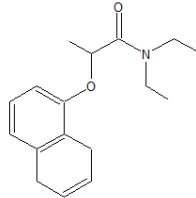
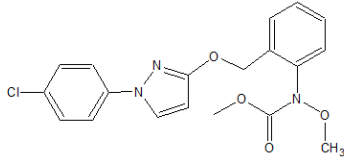
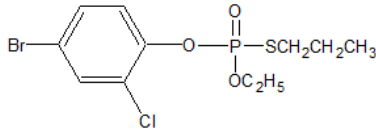
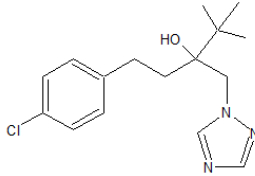
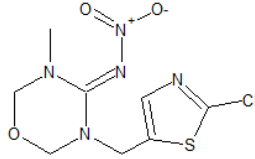
Dissertação de Mestrado

Tabela 14: Informações químicas, pureza do padrão utilizado e estruturas dos agrotóxicos estudados (Continuação).

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Química	Pureza (%)	Estrutura Química
Fluopicolida	383,6	C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O	99,9	
Imidacloprido	255,7	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	99,9	
Lufenurom	511,2	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	99,7	
Mandipropamida	411,9	C ₂₃ H ₂₂ ClNO ₄	99,1	
Metribuzim	214,3	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	99,7	

Dissertação de Mestrado

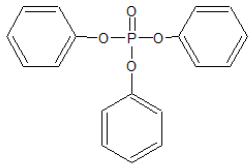
Tabela 14: Informações químicas, pureza do padrão utilizado e estruturas dos agrotóxicos estudados (Conclusão).

Agrotóxico	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Química	Pureza (%)	Estrutura Química
Napropamida	271,4	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	99,8	
Piraclostrobina	387,8	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	99,9	
Profenofós	373,6	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	98,6	
Tebuconazol	307,8	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	99,5	
Tiametoxam	291,7	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	99,7	

3.5 Padrão interno selecionado

Para a verificação da estabilidade do sinal analítico no sistema UHPLC-MS/MS foi utilizado como padrão interno o trifenilfosfato, cujas informações químicas, pureza e estrutura encontram-se na **Tabela 15**.

Tabela 15: Informações químicas, pureza e estruturas do padrão interno utilizado.

Composto	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Fórmula Química	Pureza (%)	Estrutura Química
Trifenilfosfato (PI)	326,3	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	99,0	

PI: Padrão Interno.

3.6 Preparo das soluções estoque e de trabalho

Para o preparo das soluções estoque de cada agrotóxico foi considerada a pureza analítica conforme indicado na **Tabela 14**. Inicialmente foram preparados 10 mL da solução estoque 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico em metanol. A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições necessárias para preparar as soluções de trabalho, também em metanol. Foram preparadas soluções de 100 mg L⁻¹ de cada composto e a partir da mesma, foram preparadas soluções individuais de 10 mg L⁻¹ para a infusão direta no espectrômetro de massas para a determinação dos parâmetros de ionização.

O padrão interno foi preparado de forma similar aos agrotóxicos na concentração de 1000 mg L⁻¹ em 10 mL de metanol. Em seguida foram realizadas diluições para 100 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹. Ao extrato final a ser injetado no sistema UHPLC-MS/MS foram adicionados 20 µL da solução de trifenilfosfato na concentração de 1 mg L⁻¹.

Todas as soluções foram colocadas em frascos âmbar e estocadas em freezer, a -20 °C, para evitar a degradação das mesmas. As soluções estoques foram preparadas a cada 6 meses e as soluções de trabalho semanalmente.

3.6.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho dos agrotóxicos para desenvolvimento do método

A partir da solução estoque, foi preparada, em metanol, uma solução intermediária contendo todos os agrotóxicos nas concentrações de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ (mistura 1a), conforme descrito na **Tabela 16**, dependendo da intensidade do sinal analítico e das características dos agrotóxicos, afim de se obterem cromatogramas com sinais semelhantes.

Tabela 16: Concentrações das soluções dos agrotóxicos estudados na mistura 1a.

Agrotóxico	Concentração (mg L ⁻¹)
α-cipermetrina	100
Atrazina	10
Azoxistrobina	20
Ciromazina	20
Clorantraniliprole	20
Clorpirifós	20
Diafentiurom	100
Difenoconazol	10
Fenarimol	10
Fipronil	10
Fluopicolida	10
Imidacloprido	20
Lufeniurom	100
Mandipropamida	20
Metribuzim	10
Napropamida	10
Piraclostrobina	20
Profenofós	20
Tebuconazol	10
Tiametoxam	20

A partir da solução intermediária, mistura 1a, foi preparada uma solução dos agrotóxicos nas concentrações de 1, 2 e 10 mg L⁻¹ (mistura 2a) em metanol. A partir da mistura 2a foram preparadas as soluções analíticas de trabalho nas concentrações de 2,5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 350,0 µg L⁻¹ para a atrazina, difenoconazol, fenarimol, fipronil, fluopicolida, metribuzim, napropamida e tebuconazol, nas concentrações de 5,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 700,0 µg L⁻¹ para a azoxistrobina, ciromazina, clorantraniliprole, clorpirifós, imidacloprido, mandipropamida, piraclostrobina, profenofós e

tiametoxam e nas concentrações de 25,0; 100,0; 250,0; 500,0; 1000,0; 1500,0; 2000,0; 2500,0 e 3500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a α - cipermetrina, diafentiurom e lufeniurom.

Para injeção no sistema cromatográfico, seguiu-se a metodologia descrita por Vicari,⁹⁷ em que são realizadas diluições das soluções de trabalho na proporção de 1:4 (extrato/solvente:água), ou seja, 200 μL do extrato ou do solvente, no caso o metanol, e 800 μL de água purificada, com o intuito de melhorar a simetria dos picos cromatográficos e diminuir os danos ao sistema, resultando nas concentrações de 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a atrazina, difenoconazol, fenarimol, fipronil, fluopicolida, metribuzim, napropamida e tebuconazol, nas concentrações de 1,0; 4,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 e 140 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a azoxistrobina, ciromazina, clorantraniliprole, clorpirifós, imidacloprido, mandipropamida, piraclostrobina, profenofós e tiametoxam, e as concentrações de 5,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 700,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a α - cipermetrina, diafentiurom e lufeniurom. Essas soluções foram utilizadas no estudo de linearidade do método.

3.6.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho dos agrotóxicos para a validação do método

Com a retirada dos analitos α - cipermetrina, diafentiurom e lufeniurom, verificou-se um aumento na sensibilidade para a maioria dos analitos, sendo assim, foi possível reduzir a concentração de alguns analitos. Dessa forma, a solução intermediária para a validação foi preparada em metanol, contendo todos os agrotóxicos nas concentrações de 20 mg L^{-1} para o imidacloprido e o tiametoxam e de 10 mg L^{-1} para os demais analitos (mistura 1b).

A partir da solução intermediária, mistura 1b, foi preparada uma solução nas concentrações de 1 e 2 mg L^{-1} (mistura 2b) em metanol. A partir dessa mistura (mistura 2b) foram preparadas as soluções de 20; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o imidacloprido e o tiametoxam e de 10; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais agrotóxicos.

Conforme citado anteriormente no item **3.6.1**, para a injeção no sistema cromatográfico seguiu-se a metodologia descrita por Vicari,⁹⁷ resultando em concentrações de 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 10 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os agrotóxicos imidacloprido e tiametoxam e de 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais. Essas soluções foram utilizadas no estudo de validação do método.

3.6.3 Preparo da solução empregada nos testes de dissipação

A partir das soluções dos produtos comerciais, foi preparada, em 500 mL de metanol, uma mistura contendo 11 agrotóxicos de formulações comerciais nas concentrações empregadas em campo no combate de pragas e doenças no cultivo de tomates, cujos nomes comerciais, bem como o tipo de formulação, lote, validade, princípio ativo, tipos de pragas que combatem, estão descritos na **Tabela 17**, sendo o aspecto da solução visualizada na **Figura 10**. A mistura foi então filtrada em filtro quantitativo e armazenada em frasco âmbar em freezer à -20 °C.



Figura 10: Solução contendo a mistura de 11 agrotóxicos comerciais.

3.7 Solo empregado no desenvolvimento e na validação do método

Os solos empregados no desenvolvimento e validação do método foram cedidos pela Embrapa Solos (Rio de Janeiro). O Solo I não apresentou nenhum dos agrotóxicos estudados, o que garantiu a ausência de interferências dos mesmos, que resultariam em quantificações errôneas dos analitos de interesse. No entanto, o Solo II apresentou a presença dos agrotóxicos clorpirifós, profenofós e tebuconazol o que impediu a validação desses três agrotóxicos nessa matriz. A ausência ou presença dos agrotóxicos estudados nesses solos foi verificada por meio da realização de uma extração prévia utilizando a versão QuEChERS “Acetato” empregando-se na etapa de *clean up* o PSA e MgSO₄ e análise do extrato por UHPLC-MS/MS.

Dissertação de Mestrado

Tabela 17: Dados gerais dos agrotóxicos comerciais utilizados nos estudos de dissipação.

Nome comercial Fabricante	Tipo de formulação	Lote Validade	Princípio ativo	Pragas comuns em cultivos de tomate		Dose recomendada
				Nome comum	Nome científico	
Actara® 250 WG Syngenta	Granulado dispersível	PLN5 Fev/ 2018	Tiametoxam	Mosca branca Pulgão verde Tripos	<i>Bemisia tabaci</i> Raça B <i>Myzus persicae</i> <i>Frankliniella shultzei</i>	16-20 g/100 L 12-15 g/100 L 16-20 g/100 L 800 g/ha gotejamento
Comet® BASF	Concentrado emulsionável	-	Piraclostrobina	Pinta-preta Septoriose Mancha-amarela	<i>Alternaria solani</i> <i>Septoria lycopersici</i> <i>Drechslera tritici-repentis</i>	40 mL/100 L
Connect® Bayer	Suspensão concentrada	006-16-9804 Set/19	Imidacloprido + β- ciflutrina	Mosca branca Tripos	<i>Bemisia tabaci</i> Raça B <i>Thrips palmi</i>	500-750 mL/ha 750-1000 mL/ha 500-1000 L/ha
Elatus®* Syngenta	Granulado dispersível	-	Azoxistrobina + Benzovindiflupir	Pinta preta Septoriose	<i>Alternaria solani</i> <i>Septoria lycopersici</i>	100-200 g/ ha 200 L/ ha
Folicur® 200 EC Bayer	Concentrado emulsionável	003-14-9468 Jul/17	Tebuconazol	Pinta-preta Septoriose	<i>Alternaria solani</i> <i>Septoria lycopersici</i>	100 mL/ 100 L
Lorsban® 480 BR Dow	Concentrado emulsionável	119-14-1388 Ago/17	Clorpirifós	Broca pequena do tomateiro Mosca-minadora	<i>Neoleucinodes elegantalis</i> <i>Liriomyza huidobrensis</i>	1,5 L/ha 1,0-1,5 L/ha 100-300L/ha
Premio® Du Pont	Suspensão concentrada	166-15-084 Jul/18	Clorantraniliprole	Traça do tomateiro Broca pequena do tomateiro Broca grande do tomateiro	<i>Tuta absoluta</i> <i>Neoleucinodes elegantalis</i> <i>Helicoverpa zea</i>	15 mL/ 100 mL foliar 200 mL/ha gotejamento 20 mL/100 L 15 mL/100 L
Regent® 800 WG BASF	Granulado dispersível	036-16-05760 Set/20	Fipronil	Não autorizado	-	40 g/ha 100-200 L/ha
Revus® Syngenta	Suspensão concentrada	-	Mandipropamida	Requeima	<i>Phytophthora infestans</i>	40-60 mL/100 L
Rival® Nufam	Concentrado emulsionável	0015-16-17400TIB Jun/2020	Tebuconazol	Septoriose	<i>Septoria lycopersici</i>	20 g/ 100 L
Score® Syngenta	Concentrado emulsionável	PLN56 Jul/18	Difenoconazol	Pinta-preta Septoriose	<i>Alternaria solani</i> <i>Septoria lycopersici</i>	50 mL/100 L
Sencor® 480 Bayer	Suspensão concentrada	001-166840 Ago/2019	Metribuzim	Plantas daninhas	-	1 L/ha 200-400 L/ha

Em negrito as doses utilizadas no estudo de dissipação de produtos formulados em laboratório; * Dose recomendada para milho.

Dissertação de Mestrado

As amostras empregadas já se encontravam secas, sendo a composição dessas amostras descritas na **Tabela 18**, sendo o Solo I um solo com menor quantidade de matéria orgânica e maior quantidade de argila e o Solo II um solo com maior quantidade de matéria orgânica e menor quantidade de argila. As análises foram realizadas na EMBRAPA Solos - Rio de Janeiro. Previamente ao preparo da amostra, o solo foi peneirado em peneira de 32 mesh e armazenado a temperatura ambiente em sacos plásticos e na ausência de iluminação.

A composição do solo é importante para a escolha do método de extração e de limpeza a ser empregado. Uma maior quantidade de matéria orgânica, ou seja, a presença de ácidos húmicos e fúlvicos, tendem a favorecer a degradação química, por proporcionar uma maior área superficial para a degradação hidrolítica, a fotodegradação e a adsorção por influenciar na ligação apolar desses compostos no solo,⁴ sendo necessárias técnicas de extração capazes de remover os analitos de modo rápido e eficiente.

Tabela 18: Composição química das amostras de solo empregadas no desenvolvimento e validação do método.

Composição	Solo I	Solo II
pH	5,9	7,7
MO (g kg ⁻¹)	29,5	45,7
P (mg dm ⁻³)	2,3	8,9
K (mg dm ⁻³)	43,8	153,9
Ca (mg dm ⁻³)	2,5	142,6
Mg (mmolc dm ⁻³)	2,0	16,6
H+Al (mmolc dm ⁻³)	65,5	0
Zn (mmolc dm ⁻³)	0,78	1704
Fe (mmolc dm ⁻³)	92,1	8,1
B (mg dm ⁻³)	0,2	0,50
Cu (mg dm ⁻³)	4,2	0,17
Mn (mg dm ⁻³)	46,2	56,1
Na (mg dm ⁻³)	4,9	11,2
Al (mmolc dm ⁻³)	3,6	0,10
Argila (g kg ⁻¹)	385,3	156,4
Silte (g kg ⁻¹)	126,3	146,7
Areia (g kg ⁻¹)	464,2	667,0

MO = Matéria Orgânica.

3.8 Otimização das condições de análise dos resíduos de agrotóxicos utilizando a UHPLC-MS/MS

3.8.1 Escolha da composição da fase móvel e das condições cromatográficas

Com base em revisão bibliográfica, foram testados diferentes aditivos na fase móvel (FM) e de modificador orgânico, a fim de obter uma boa separação e ionização dos agrotóxicos, conforme descrito na **Tabela 19**. Todas as fases móveis foram filtradas em membranas de 0,22 μm e desgaseificadas em banho ultrassom por 20 minutos.

Para os testes de escolha do aditivo da fase móvel e do modificador orgânico, foi utilizada a seguinte programação de gradiente: 0 min 95:5 (v_A/v_B , sendo A correspondente à fase aquosa e B à fase orgânica); 8 min 10:90 (v_A/v_B); 10,40 min 10:90 (v_A/v_B); 11 min 95:5 (v_A/v_B); 13 min 95:5 (v_A/v_B), com volume de injeção de 1,00 μL e vazão de 0,30 mL min^{-1} , para todas as fases móveis avaliadas e a concentração individual de cada analito na mistura teste utilizada de foi de 1 mg L^{-1} .

Tabela 19: Composição das fases móveis avaliadas.

Fase Móvel	Composição
FM 1	98% (v/v) H_2O , 2% (v/v) Metanol, 0,1% (v/v) Ácido Fórmico, 5 mol L^{-1} Formiato de Amônio, pH=3,17: Metanol, 0,1% (v/v) Ácido Fórmico, 5 mol L^{-1} Formiato de Amônio
FM 2	H_2O , 0,1% (v/v) Ácido Acético, 5 mol L^{-1} Acetato de Amônio, pH=4,20: Metanol
FM 3	H_2O , 0,1% (v/v) Ácido Acético, 5 mol L^{-1} Acetato de Amônio, pH=4,20: Acetonitrila
FM 4	H_2O , 0,1 % (v/v) Ácido Fórmico, pH=2,78: Metanol, 0,1 % (v/v) Ácido Fórmico
FM 5	H_2O , 0,1 % (v/v) Ácido Fórmico, pH=2,78: Acetonitrila, 0,1 % (v/v) Ácido Fórmico
FM 6	H_2O , 0,1% (v/v) Ácido Acético, pH=3,29: Acetonitrila, 0,1% (v/v) Ácido Acético
FM 7	H_2O , 0,1% (v/v) Ácido Acético, pH=3,29: Metanol, 0,1% (v/v) Ácido Acético

Após a escolha do aditivo da fase móvel e do solvente orgânico, com o intuito de otimizar o tempo de análise e obter resoluções adequadas foram avaliados parâmetros como, a vazão (0,10, 0,15, 0,20 e 0,30 mL min^{-1}), a programação do gradiente conforme indicado na **Tabela 20** e a temperatura a ser utilizada na coluna cromatográfica (25 $^\circ\text{C}$ ou 40 $^\circ\text{C}$). Para esses testes também foram empregadas a mistura teste de agrotóxicos com a concentração individual de 1 mg L^{-1} .

*Dissertação de Mestrado***Tabela 20:** Tipos e programas de gradientes testados na eluição dos analitos em uma vazão de 0,1 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 40 °C.

	Tempo (min)	% A	%B
Gradiente 1 - Linear	0	90	10
	3	70	30
	8	10	90
	10	10	90
	12	90	10
	14	90	10
Gradiente 3 - Linear e curva côncava 7, 8 e 9 e convexa 5, 4 e 3	0	60	40
	3	40	60
	8	10	90
	10	10	90
	12	60	40
	14	60	40
Gradiente 5 - Linear e curva côncava 9	0	60	40
	3	40	60
	8	5	95
	10	5	95
	12	60	40
	14	60	40
Gradiente 6 - Linear e curva côncava 9	0	60	40
	3	40	60
	8	5	95
	10	5	95
	14	60	40
	16	60	40

3.8.2 Condições de análise empregando a UHPLC-MS/MS

Para otimizar as condições de fragmentação do espectrômetro de massas foram realizadas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas com as soluções individuais de cada agrotóxico e do padrão interno na concentração de 10,0 mg L⁻¹. A fase móvel empregada consistiu em uma mistura 50:50 (v/v) (água contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico: metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico), a uma vazão de 0,10 mL min⁻¹. A partir das infusões, foram otimizados o modo de ionização da fonte, a voltagem do cone e a energia de colisão, por meio da varredura dessas condições pelo *software MassLynx 4.1*, utilizando a ferramenta *AutoTune*.

Posteriormente, realizou-se a análise de uma solução contendo todos os agrotóxicos e o padrão interno na concentração de 1 mg L^{-1} , preparada em uma mistura de metanol e água na proporção de 80:20 (v/v), a fim de se verificar o tempo de retenção de cada um dos compostos.

3.9 Avaliação da potencialidade das três versões do método QuEChERS na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em solo

A análise de agrotóxicos em solos requer um preparo de amostra que, simultaneamente, elimine o máximo de interferentes e permita a determinação de concentrações em nível de traços.

Após a definição das condições cromatográficas a serem empregadas, foram avaliadas as três versões do método QuEChERS, “Original”, “Acetato” e “Citrato”, na ausência e na presença da etapa de *clean up*.

Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$), ao nível de fortificação dependente da concentração dos agrotóxicos na mistura 1a, sendo assim, para a α -cipermetrina, lufenurom e diafentiurom a concentração foi de $1000 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, para a azoxistrobina, ciromazina, clorpirifós, clorantraniliprole, imidacloprido, mandipropamida, piraclostrobina, profenofós e tiametoxam foi de $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e para o difenoconazol, fenarimol, fipronil, fluopicolida, metribuzim, napropamida e tebuconazol foi de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Após a diluição dos extratos em água 1:4 v/v, as concentrações finais foram de 200, 40 e $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.9.1 Método QuEChERS "Original"

Conforme procedimento descrito por Anastassiades *et al.*⁵¹, inicialmente foram pesados ($10,0 \pm 0,1$) g de solo, previamente peneirado em peneira de 32 mesh, em tubos do tipo Falcon (50 mL) de tampa rosqueável. Em seguida, a amostra foi fortificada com a mistura de agrotóxicos descrita no item 3.6.1 e mantida em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. Optou-se pelo tempo de 30 min baseando-se nos resultados descritos na literatura (Tabela 13). No caso de amostras de solo espera-se que ocorra o efeito de acumulação e adsorção (em amostras reais) dificultando a sua extração, sendo assim, tempos de fortificação curtos tendem a gerar resultados que em prática podem não corresponder com a realidade e

tempos longos tornam o método impraticável em laboratórios de análises de rotina. Após, foram adicionados 10 mL de água deionizada (etapa de hidratação), seguida de agitação em vortex durante 1 min e manteve-se a mistura em repouso por mais 30 min. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila e agitou-se em vortex durante 1 min. A seguir, foram adicionados 1 g NaCl e 4 g MgSO₄ anidro, agitando-se em vortex por 1 min. A mistura foi então centrifugada a 5000 rpm durante 5 min, sendo o sobrenadante retirado com o auxílio de uma seringa de vidro (capacidade de 3 mL) e filtrado em filtro de seringa de 0,22 µm. Uma fração do sobrenadante foi diluída em água deionizada 1:4 (v/v) e injetada no sistema cromatográfico (fração sem a etapa de *clean up*) e com a outra fração (4 mL) foi realizada a etapa de *clean up* com a adição de 600 mg de MgSO₄ anidro e 100 mg de PSA em um tubo Falcon (50 mL), seguida de agitação em vortex durante 1 min e centrifugação a 5000 rpm durante 5 min, sendo o sobrenadante filtrado em filtro de seringa de 0,22 µm, diluído em água deionizada 1:4 (v/v) e injetado no sistema cromatográfico.

3.9.2 Método QuEChERS “Citrato”

O procedimento para a execução da versão QuEChERS “Citrato”⁵³ foi semelhante ao descrito para a versão QuEChERS “Original”, com exceção dos sais utilizados. Nesse método, foram empregados 1 g NaCl, 4 g MgSO₄ anidro, 1 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O e 0,5 g C₆H₆Na₂O₇·1,5 H₂O. A etapa de *clean up* foi análoga à descrita na versão “Original”.

3.9.3 Método QuEChERS “Acetato”

O procedimento para a execução da versão QuEChERS “Acetato”⁹⁸ foi semelhante ao descrito para a versão QuEChERS “Original”, com exceção da quantidade de solo utilizada, (15,0 ± 0,1) g e de água deionizada 15 mL, do solvente, tendo sido utilizada a acetonitrila acidificada com 1 % (v/v) de ácido acético, e dos sais, havendo a troca de 1 g de NaCl por 1,5 g de CH₃COONa e foi adicionada uma quantidade maior de MgSO₄ anidro, 6 g. A etapa de *clean up* foi semelhante à utilizada nas versões “Original” e “Citrato”, com variação apenas na quantidade de PSA de 100 mg para 200 mg. Após os resultados obtidos na primeira etapa de escolha do método, verificou-se que a versão “Acetato” apresentou os melhores resultados, sendo então, para esta versão realizado um teste, em triplicata, utilizando 200 mg de PSA, 600 mg de MgSO₄ anidro e 200 mg de C18.

Para a validação do Solo II, na etapa de partição foram testadas a velocidade de centrifugação de 6000 rpm por 5, 8 e 10 min, pois nas condições estabelecidas para o Solo I (velocidade= 5000 rpm e tempo= 5 min) não houve uma separação satisfatória das fases, sendo necessário o aumento do tempo e da velocidade de centrifugação. O melhor custo benefício foi obtido para o tempo de 8 min.

3.10 Ensaios preliminares para a avaliação do método QuEChERS a ser empregado

Os ensaios preliminares das três versões do método QuEChERS foram avaliadas por meio das análises das seguintes figuras de mérito: seletividade, faixa linear de trabalho, efeito matriz e recuperação, para selecionar a melhor versão a ser empregada.

3.10.1 Seletividade

A seletividade dos métodos foi avaliada pela injeção do branco das amostras após a extração em cada uma das versões do método QuEChERS.

3.10.2 Faixa linear de trabalho

As linearidades das curvas analíticas foram avaliadas a partir das soluções contendo todos os agrotóxicos descritos no item **3.6.1**, preparadas em solvente (metanol) e no extrato da matriz, ambas diluídas a 1:4 (v/v) em água deionizada e injetadas em triplicata em cada ponto, sendo os dados da regressão linear obtidos com auxílio do software *MassLinx* 4.1 e *Excel*.

3.10.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado para as curvas analíticas obtidas para as três versões do método na ausência e na presença da etapa de *clean up*.

3.10.4 Exatidão (Recuperação)

Para avaliar a versão do método QuEChERS a ser empregada na etapa de validação, foi realizado o ensaio de fortificação em níveis correspondentes à concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o clorpirifós, difenoconazol, fenarimol, fipronil, fluopicolida, mandipropamida, metribuzim, napropamida, piraclostrobina, profenofós e tebuconazol, de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a azoxistrobina, ciromazina, clorantraniliprole, imidacloprido e tiametoxam e de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a α - cipermetrina, diafentiurom e lufenurom. Os extratos foram diluídos 1:4 (v/v) em água deionizada, resultando nas concentrações de 20, 40 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.11 Validação do método QuEChERS “Acetato”

O método QuEChERS acetato foi validado em dois tipos de solo de acordo com o guia SANTE - 11945/2015, determinando as seguintes figuras de mérito, faixa linear de trabalho, limite de quantificação (LOQ), seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).⁹³

3.12 Aplicação do método QuEChERS versão “Acetato” na avaliação do tempo de dissipação dos agrotóxicos em solo

Para estimar o tempo em que uma amostra contendo os agrotóxicos estudados pode ser armazenada em laboratório sem que ocorra a degradação dos mesmos e o tempo de dissipação, foi realizado um teste que consistiu na aplicação no Solo I de 400 μL e de 100 μL para o Solo II da mistura de agrotóxicos nas doses aplicadas em campo, conforme a **Tabela 17**. As amostras foram separadas em 4 grupos conforme indicado na **Tabela 21**. Nos testes as amostras de solo ($15,0 \pm 0,1$) g foram adicionadas diretamente ao tubo Falcon de 50 mL. Para as amostras úmidas na etapa de hidratação foram adicionados 7,5 mL de água deionizada e para as amostras secas foram adicionados 15 mL.

As coletas foram realizadas em intervalos de tempos de:

Solo I: HF e SF: 30 min, 6 h, 1 dia, 4, 12, 19, 22, 31 e 40 dias.

S e H: 30 min, 6 h, 1 dia, 4, 12, 19, 22, 31 dias.

Solo II: HF, SF, H e S: 30 min, 6 h, 1 dia, 4 dias, 9 dias, 14 dias, 25 dias, 35 dias.

Tabela 21: Tratamento das amostras de solo no estudo de dissipação dos agrotóxicos comerciais.

Grupos	Tratamento dos solos
HF	Amostra hidratada com 7,5 mL de água deionizada, na presença de iluminação artificial
SF	Amostra seca na presença de iluminação artificial
H	Amostra hidratada com 7,5 mL de água deionizada, na ausência de iluminação artificial
S	Amostra seca, na ausência de iluminação artificial

3.13 Aplicação do método QuEChERS versão “Acetato” em amostras de solo provenientes de diferentes tipos de cultivos

As amostras foram coletadas no período de novembro a dezembro de 2017 na Microrregião de Bragança Paulista em São Paulo. No processo de coleta foi removida a camada superior e retiradas porções de solo de 0-5 cm de profundidade. Estas foram condicionadas em sacos plásticos escuros e armazenadas em caixas de isopor, sendo, posteriormente, transferidas para um freezer a -20°C até que fossem realizadas as análises.

Previamente ao preparo das amostras, foi necessária a secagem do material em capela (com a exaustão ligada) durante 12 h. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas, peneiradas em peneira de 32 mesh e analisadas seguindo o procedimento descrito em **3.9.3**.

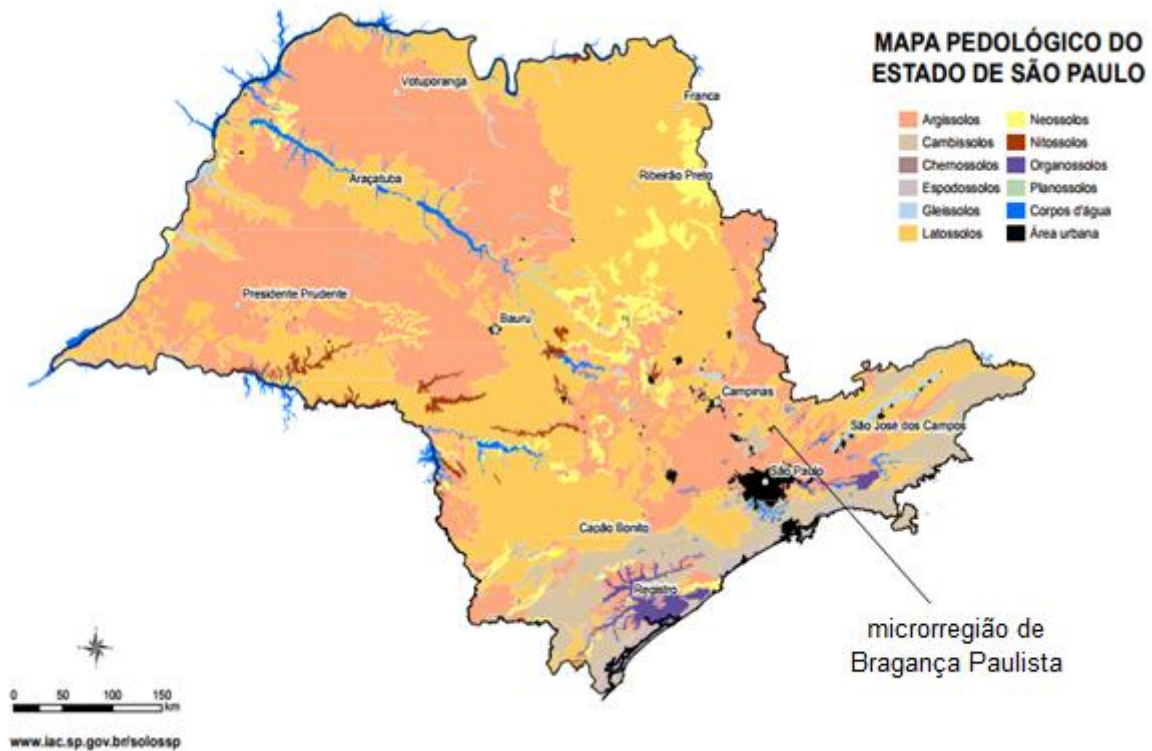
As amostras de solo utilizadas na aplicação do método foram provenientes das cidades de diferentes cidades da Microrregião de Bragança Paulista. Foram analisadas duas amostras de solo provenientes de produtores rurais distintos, da cidade de Atibaia, para que pudessem ser comparadas com os solos empregados na validação, cujo os resultados estão descritos na **Tabela 22**. As análises foram realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas-IAC. Segundo Campos e Carneiro,⁹⁹ o município de Atibaia situa-se no eixo entre grandes centros como São Paulo, Campinas, São José dos Campos e o sul do estado de Minas Gerais. Localizada na porção centro-sudeste do Estado de São Paulo, situa-se a nor-nordeste da capital paulista, **Figura 11**.¹⁰⁰Sua pedologia se baseia em três tipos de solos: Latossolos, Argissolos e Cambissolos, com predominância dos dois primeiros.

Dissertação de Mestrado

Tabela 22: Composição química das amostras de solo provenientes de Atibaia – SP.

Composição	Amostras 1	Amostra 2
pH	5,4	4,7
MO (g dm ⁻³)	38,0	23,0
P (mg dm ⁻³)	824,0	25,0
K (mmolc dm ⁻³)	6,5	2,3
Ca (mmolc dm ⁻³)	132,0	24,0
Mg (mmolc dm ⁻³)	29,0	10,0
H + Al (mmolc dm ⁻³)	26,0	40,0
B (mg dm ⁻³)	2,2	0,2
Cu (mg dm ⁻³)	7,7	4,0
Fe (mg dm ⁻³)	44,0	33,0
Mn (mg dm ⁻³)	50,0	21,3
Zn (mg dm ⁻³)	17,2	1,3
S.B. (mmolc dm ⁻³)	167,5	36,3
C.T.C. (mmolc dm ⁻³)	193,5	76,3
V% (%)	87,0	48,0

MO = Matéria Orgânica; S.B = Soma de bases trocáveis; C.T.C= Capacidade de troca de cátions; V%= Porcentagem de saturação por bases.

**Figura 11:** Mapa pedológico do estado de São Paulo. ⁹⁸

3.14 Destino dos resíduos gerados

Durante o processo de execução do trabalho foram gerados resíduos sólidos e líquidos, sendo ambos enviados para a empresa contratada pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, para sua correta disposição final.

Capítulo IV: Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

Para a avaliação da versão do método QuEChERS a ser empregado na validação foram realizados testes preliminares na matriz Solo I.

4.1 Escolhas da composição da fase móvel e das condições cromatográficas

É importante ressaltar que durante o processo de escolha da composição da fase móvel, foi utilizada apenas uma parte dos agrotóxicos estudados, sendo os demais adicionados posteriormente. A fase móvel escolhida foi a FM 7, **Tabela 19**, por ter proporcionado melhor desempenho cromatográfico, sendo utilizada também na otimização das condições de fragmentação. Porém, com a posterior adição de novos agrotóxicos, novos testes foram realizados e a fase móvel FM 4, **Tabela 19**, mostrou-se mais adequada para esta nova mistura.

Observou-se que, devido às características distintas entre os agrotóxicos estudados, a eluição isocrática, provavelmente, não seria eficiente para a separação dos mesmos, o que foi comprovado com as corridas utilizando a FM 7 nas proporções 70:30 (v_A/v_B) e 50:50 (v_A/v_B). A programação de gradiente 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B) foi a que resultou em maior retenção dos agrotóxicos ciromazina, imidacloprido e tiametoxam (importante para evitar que os mesmos sofressem interferência com os compostos polares presentes na matriz) e melhor separação dos analitos, conforme **Figura 12**.

Dentre as vazões analisadas, a vazão de 0,10 mL min⁻¹ foi escolhida, devido ao favorecimento da dessolvatação e da ionização dos analitos no *electrospray*, bem como ao aumento do tempo de retenção dos agrotóxicos mais polares em corridas com a programação citada, além disso, não foi observado o alargamento dos picos cromatográficos. A **Figura 13** ilustra o cromatograma de íon total obtido utilizando a FM 4, vazão de 0,10 mL min⁻¹ e a programação por gradiente citada acima.

Após a determinação da fase móvel a ser empregada, da vazão e da programação do gradiente, foram realizados testes com a variação da temperatura da coluna cromatográfica que por sua vez, mostraram que não houve variação significativa entre as temperaturas avaliadas, 25 e 40 °C, sendo escolhida a temperatura de 40 °C. O volume de injeção adotado foi de 10 µL, devido à metodologia de diluição de 1:4 (v/v) em água deionizada descrita por Vicari⁹⁷ empregada no desenvolvimento do trabalho.

Dissertação de Mestrado

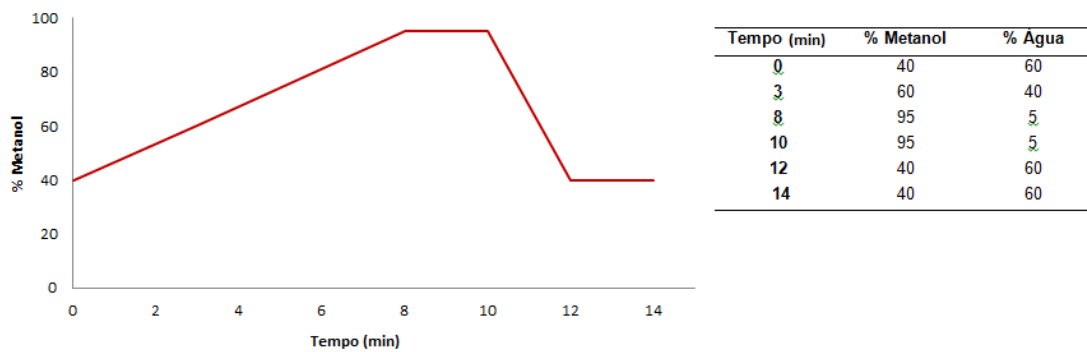


Figura 12: Gráfico da variação da porcentagem de metanol em função do tempo de análise esquematizando a programação do gradiente empregada.

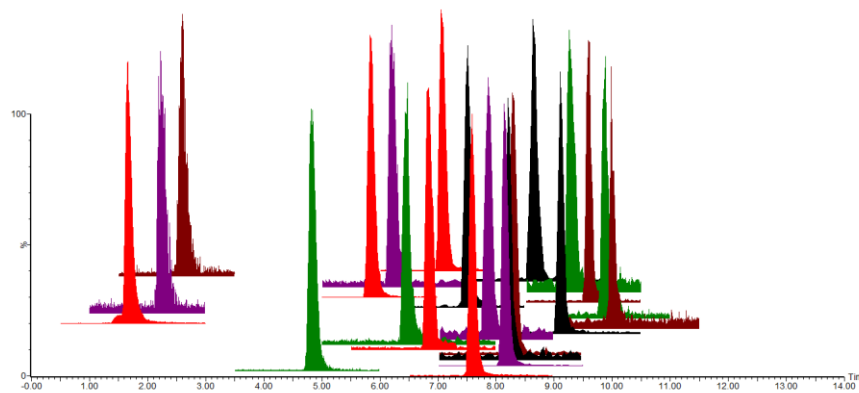


Figura 13: Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS para separação dos agrotóxicos e do padrão interno em solvente (metanol). Condições cromatográficas: Volume de injeção: 10,0 μL ; Coluna: *Acquity* UPLC[®] BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 μm de diâmetro de partícula); Composição da fase móvel: A: H_2O , 0,1% (v/v) ácido fórmico, pH=2,78; B: MeOH, 0,1% (v/v) ácido fórmico; vazão: 0,10 mL min^{-1} ; Programação do gradiente: 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B). Temperatura da coluna: 40 $^\circ\text{C}$.

4.2 Otimização das condições de fragmentação no UHPLC-MS/MS

Para cada analito, foram escolhidas duas transições características utilizando o monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*, MRM), sendo que a transição de maior intensidade foi utilizada para quantificação e a segunda de maior intensidade para confirmação. A fragmentação refere-se à extensão em que um dado composto é fragmentado na fonte de íons, sendo útil para auxiliar na sua elucidação estrutural, conseqüentemente, na sua confirmação, em análises em espectrômetros sequenciais. Existem diversos mecanismos de fragmentação, sendo eles dependentes da estrutura e da composição do analito. A **Tabela 23** apresenta os parâmetros otimizados do sistema UHPLC-MS/MS e a

Tabela 24 contém os agrotóxicos estudados e seus parâmetros de detecção otimizados no modo MRM.

Tabela 23: Parâmetros otimizados do sistema UHPLC-MS/MS.

Temperatura da coluna (°C)	40
Voltagem do Extrator (V)	3,00
Voltagem do capilar (kV)	2,00
Temperatura de dessolvatação (°C)	400
Vazão do gás de dessolvatação (N ₂) (L h ⁻¹)	800
Vazão do gás do cone (L h ⁻¹)	120
Temperatura da fonte (°C)	150

4.3 Comparação visual dos extratos obtidos com a aplicação das três versões do método QuEChERS

A **Figura 14** ilustra os seis extratos do branco obtidos empregando as três versões do método QuEChERS na presença e na ausência da etapa de *clean up*. Pode-se observar que, visualmente, todas as versões, tanto na ausência como na presença da etapa de *clean up*, se apresentaram límpidas. No entanto, os extratos nos quais não foi realizada a limpeza, principalmente o oriundo da versão “Citrato”, apresentaram uma coloração levemente amarelada. Após a etapa de limpeza, todos os extratos mostraram-se incolores. As extrações foram realizadas na matriz Solo I.

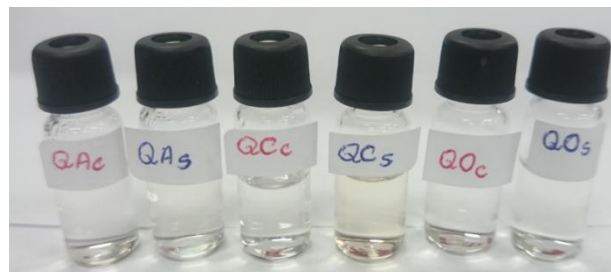


Figura 14: Extratos obtidos utilizando as três versões do método QuEChERS na ausência e na presença da etapa de *clean up* (PSA + MgSO₄). QAc = QuEChERS versão “Acetato” com *clean up*; QAs = QuEChERS versão “Acetato” sem *clean up*; QCc = QuEChERS versão “Citrato” com *clean up*; QCs = QuEChERS versão “Citrato” sem *clean up*; QOc = QuEChERS versão “Original” com *clean up*; QOs = QuEChERS versão “Original” sem *clean up*. Matriz: Solo I.

Dissertação de Mestrado

Tabela 24: Parâmetros otimizados no sistema UHPLC-MS/MS para as transições no modo MRM.

Agrotóxicos	Modo de Ionização ESI	Íon Precursor	Íons Produtos (m/z)	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
Atrazina	+	216	174	30	15
			96	30	25
Azoxistrobina	+	404	372	15	10
			329	15	30
α - Cipermetrina	+	416	127	20	25
			191	20	10
Ciromazina	+	167	68	25	30
			85	25	15
Clorantraniliprole	+	484	286	15	10
			177	15	40
Clorpirifós	+	350	198	20	10
			153	20	20
Diafentiurom	+	385	278	30	30
			329	30	20
Difenoconazol	+	406	251	30	20
			337	30	15
Fenarimol	+	331	139	30	30
			268	30	20
Fipronil	-	435	330	25	15
			250	25	25
Fluopicolida	+	385	175	25	20
			147	25	45
Imidacloprido	+	256	209	25	15
			175	25	15
Lufenurom	-	509	339	25	10
			326	25	15
Mandipropamida	+	412	328	20	35
			125	20	15
Metribuzim	+	215	84	30	20
			187	30	15
Napropamida	+	272	129	20	15
			171	20	15
Piraclostrobina	+	388	163	15	20
			194	15	10
Profenofós	+	375	305	25	15
			347	25	10
Tebuconazol	+	308	125	25	30
			70	25	15
Tiametoxam	+	292	211	20	10
			181	20	20
Trifenilfosfato (PI)	+	327	152	35	35
			215	35	20

Em negrito estão indicadas as transições de quantificação;

PI- Padrão Interno.

4.4 Ensaios preliminares para avaliação do método QuEChERS a ser empregado

4.4.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos com os extratos brancos mostraram que o solo empregado, Solo I, bem como os reagentes utilizados nas extrações, encontravam-se isentos dos agrotóxicos estudados. A **Figura 15** exemplifica uma injeção do extrato branco da amostra de Solo I, após a extração aplicando a versão “Acetato” na presença da etapa de *clean up* e a **Figura 16** ilustra os cromatogramas obtidos, nas mesmas condições, com o extrato do Solo I fortificado com a mistura 1a e diluído na proporção 1:4 (v/v) em água deionizada.

4.4.2 Faixa linear de trabalho

Para que os resultados obtidos de recuperação fossem confiáveis foram preparadas 7 curvas analíticas, no extrato da matriz (Solo I), uma para cada versão do método QuEChERS, com triplicata de injeção, além da curva no solvente (metanol). Na verificação da estabilidade da resposta do instrumento foi utilizado, em todas as injeções, o padrão interno trifenilfosfato.

Para a escolha da faixa de trabalho, buscaram-se os menores níveis de concentração com razão sinal/ruído igual a 10, por ser este método mais rápido. Os coeficientes de determinação foram superiores a 0,999 para todos os agrotóxicos em todos os métodos empregados, tanto para curva na matriz como no solvente, o que indica que o modelo linear proposto se ajusta aos dados.

Além do valor do coeficiente de determinação, com o auxílio da ferramenta de análise de dados da planilha *Excel*, foram obtidos os gráficos de resíduos e de resíduos padronizados, os quais foram inferiores a 2, indicando que os resíduos seguem uma distribuição Normal e que não existe nenhum resultado anômalo. Os cálculos de valores recuperados de acordo com a equação da reta indicaram que os resultados se ajustam ao modelo linear, pois os valores de erros associados foram inferiores a 5 %.

Dissertação de Mestrado

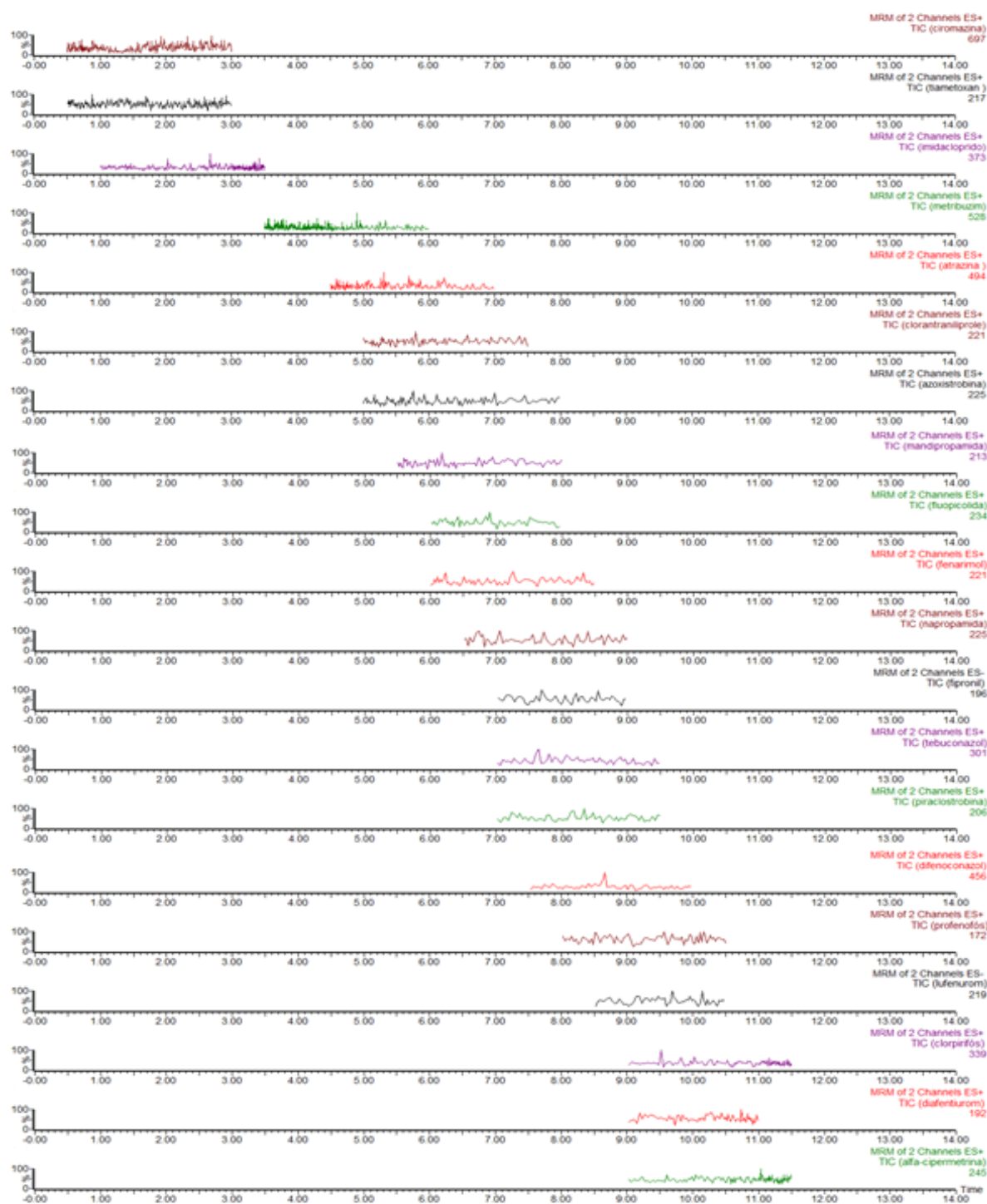


Figura 15: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato branco da matriz Solo I após extração utilizando a versão QuEChERS “Acetato”, na presença da etapa de *clean up* (PSA + MgSO₄). Condições cromatográficas: Volume de injeção: 10 µL; Coluna: *Acquity* UPLC® BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula); Composição da fase móvel: A: H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico, pH=2,78; B: MeOH, 0,1% (v/v) ácido fórmico; Programação do gradiente: 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B); Vazão: 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da coluna: 40 °C; Matriz: Solo I.

Dissertação de Mestrado

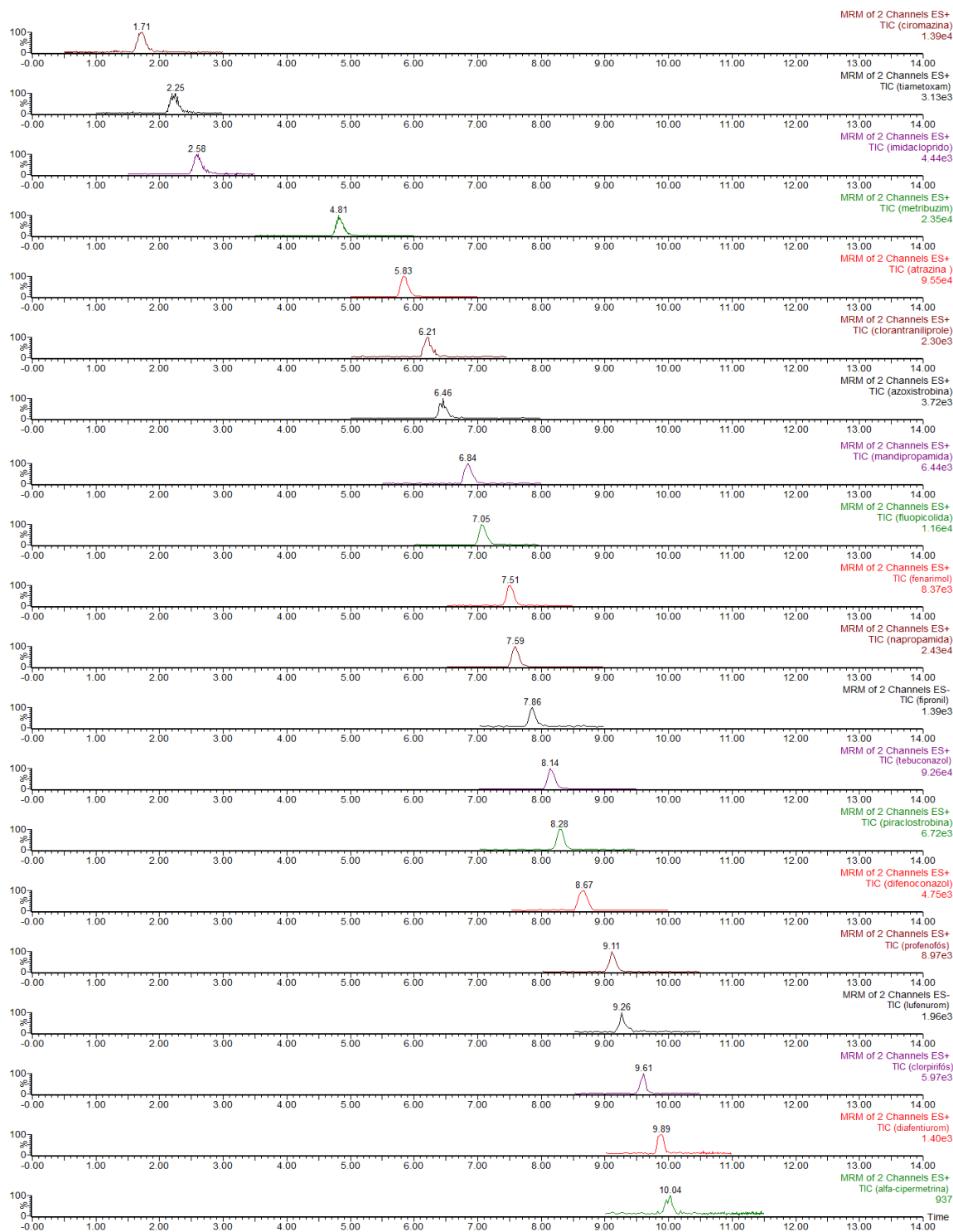


Figura 16: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato fortificado da matriz Solo I após extração utilizando a versão QuEChERS“ Acetato” na presença da etapa de *clean up* (PSA + MgSO₄). Condições cromatográficas: Volume de injeção 10,0 µL; Coluna: *Acquity UPLC*[®] BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula); Composição da fase móvel: A: H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico, pH=2,78; B: MeOH, 0,1% (v/v) ácido fórmico; Programação do gradiente: 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B); Vazão: 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da coluna: 40 °C; Matriz: Solo I.

4.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado conforme a **Equação 2** e está apresentado na **Figura 17**, na qual se pode verificar que a porcentagem do efeito matriz foi superior a $\pm 20\%$ para a maioria dos compostos, independente da versão utilizada e da limpeza dos extratos, sendo os compostos metribuzim e atrazina os únicos que apresentaram valores de efeito matriz inferiores a $\pm 20\%$, em todas as versões utilizadas do método QuEChERS, indicando que para esses compostos o efeito matriz não foi significativo. Verificou-se que, de modo geral, os agrotóxicos de média e alta polaridade apresentaram menor porcentagem de efeito matriz quando a etapa de *clean up* foi empregada, devido à remoção dos coextrativos mais polares da matriz pelo PSA.

Os agrotóxicos de menor polaridade, de modo geral, apresentaram maiores porcentagens de efeito matriz, independente da versão utilizada, sendo mais proeminente para a versão “Original” na ausência da etapa de *clean up*. Sendo assim, foi realizado um teste complementar com o uso de C18 na etapa de *clean up* juntamente com o PSA apenas para o método QuEChERS “Acetato”, uma vez que essa versão apresentou os melhores resultados. Observou-se que o uso de C18 gerou uma maior supressão de sinal em compostos de média a baixa polaridade.

Com base nos resultados constatou-se que a curva analítica deve ser construída no extrato da matriz a fim de se minimizar o efeito provocado pelos interferentes da matriz.

4.4.4 Exatidão (Recuperação)

Os ensaios de fortificação foram realizados conforme item **3.10.4**. Devido às características do solo, como a presença de ácidos húmicos e de matéria orgânica, optou-se pelo uso de PSA, uma amina que, devido as suas propriedades químicas, permite remover coextrativos polares e para a remoção de coextrativos de menor polaridade foi empregado o C18. O sulfato de magnésio anidro foi empregado para a remoção da água remanescente do processo de extração.

Os resultados se encontram na **Figura 18**. Analisando a **Figura 18** pode-se verificar que o agrotóxico ciromazina não apresentou recuperação satisfatória, conforme preconiza o guia SANTE 2015,⁹³ de 70-120 %, em nenhuma das versões do método QuEChERS testadas.

Dissertação de Mestrado

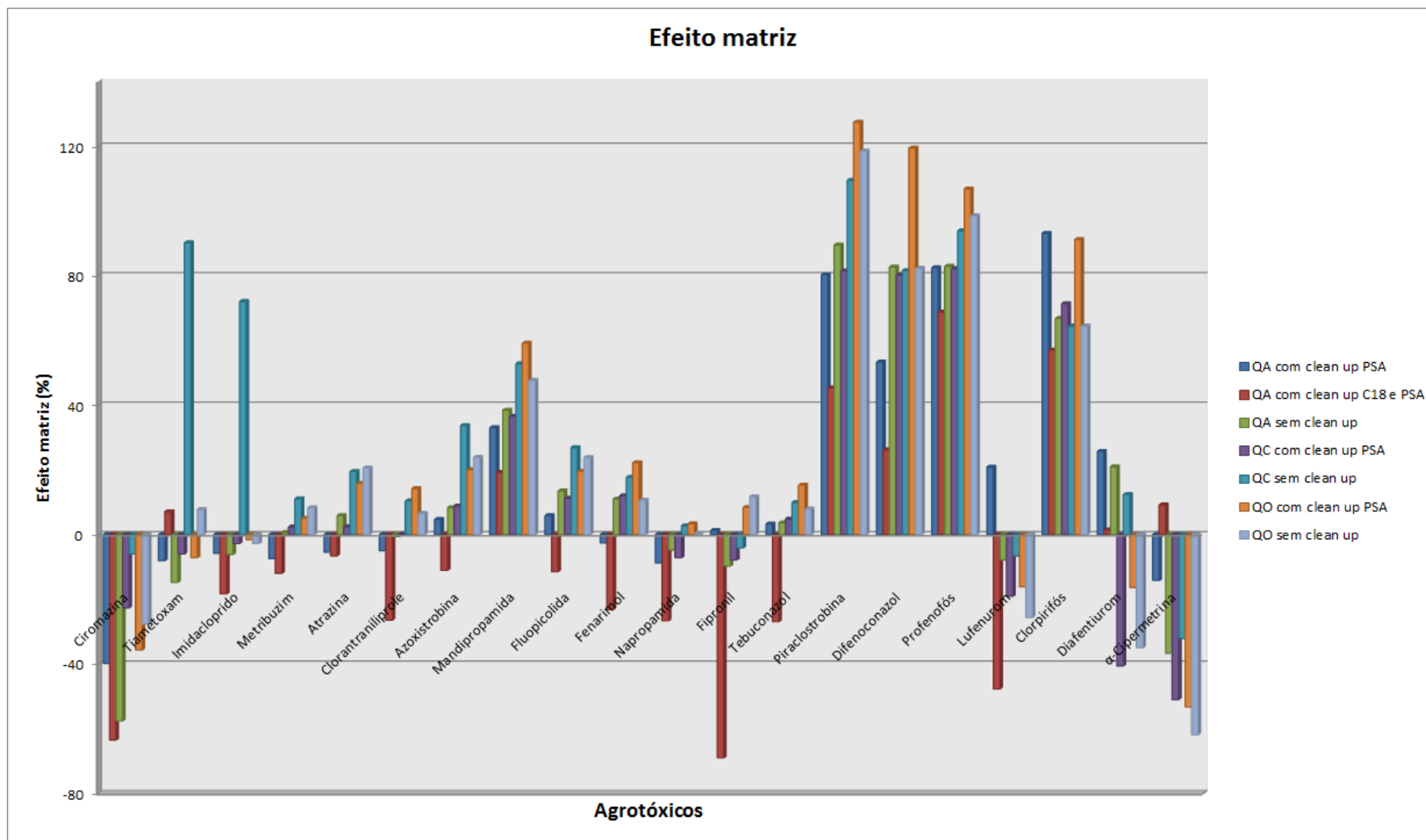


Figura 17: Porcentagem do efeito matriz para os agrotóxicos estudados. QA = QuEChERS versão “Acetato”; QC = QuEChERS versão “Citrato”; QO = QuEChERS versão “Original”. Matriz: Solo I.

Dissertação de Mestrado

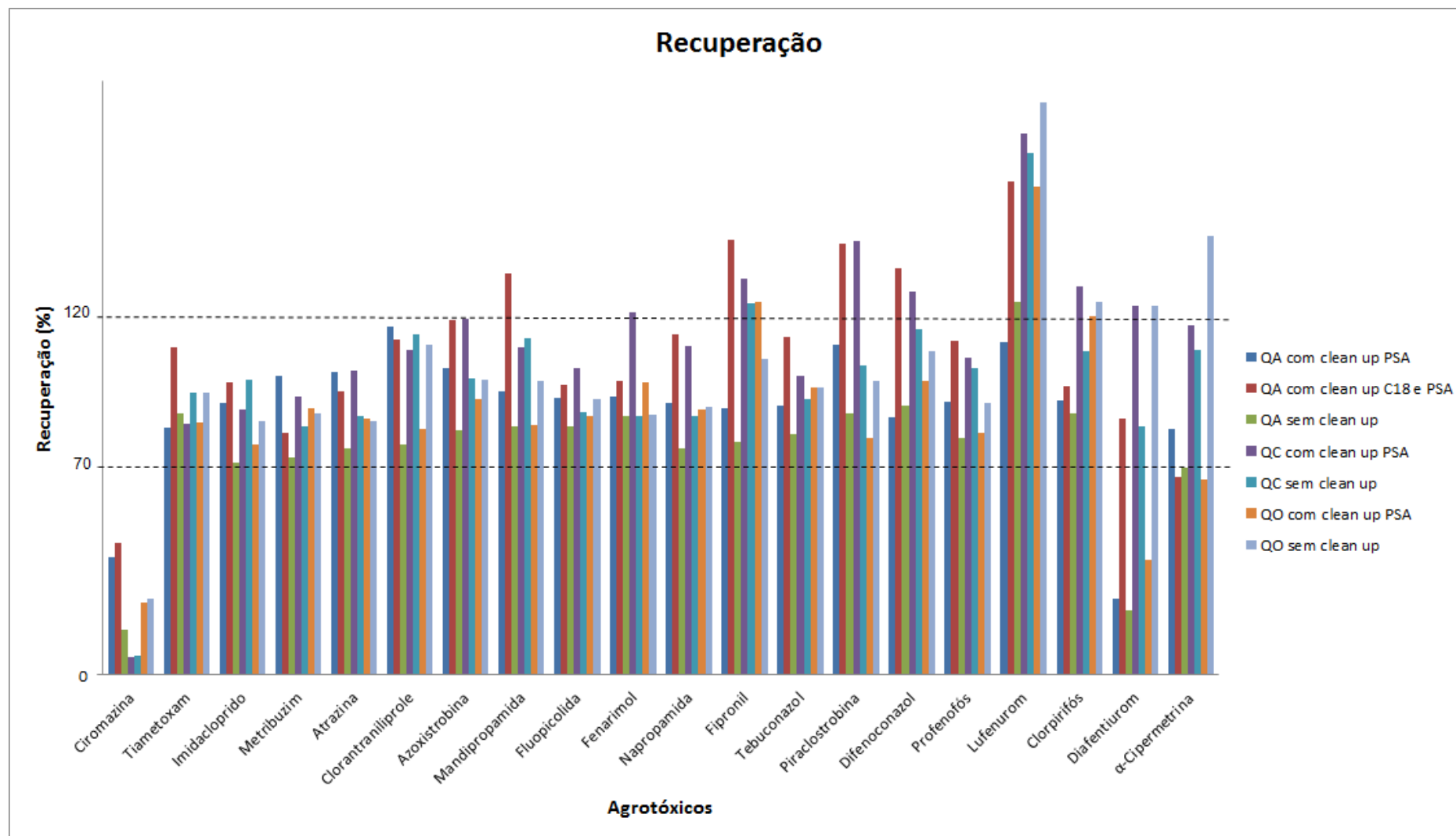


Figura 18: Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos estudados. QA = QuEChERS versão “Acetato”; QC = QuEChERS versão “Citrato”; QO = QuEChERS versão “Original”. Matriz: Solo I.

Uma das razões para a baixa recuperação desse composto se deve, possivelmente, à sua alta polaridade que pode favorecer a sua interação com coextrativos polares da matriz, ocasionando a sua coeluição com os mesmos e, conseqüente, supressão do sinal analítico. A possibilidade de esse agrotóxico ter sido removido por absorção no PSA pode ser descartada, uma vez que as recuperações das extrações na ausência e na presença da etapa de *clean up* foram semelhantes para todas as versões. Com relação à presença ou ausência da etapa de *clean up*, pode-se observar que para as versões “Citrato” e “Original” não houve diferença significativa na recuperação, porém para a versão “Acetato” a recuperação apresentou um aumento com o uso de *clean up* utilizando tanto o PSA como o PSA + C18.

O agrotóxico lufenirom também apresentou supressão de sinal analítico, porém os valores de recuperação foram superiores a 120 %, em praticamente todos os testes. Um fator que poderia explicar esses resultados seria a alta concentração empregada na mistura, apesar do agrotóxico apresentar supressão de sinal. Apenas a versão “Acetato” na presença da etapa de *clean up* utilizando apenas PSA e MgSO₄ forneceu resultados satisfatórios (entre 70-120%), possivelmente, devido ao emprego de acetonitrila acidificada que pode ter favorecido a recuperação do mesmo.

Dentre os agrotóxicos diafentirom e α -cipermetrina, o diafentirom apresentou valores de recuperação inferiores a 70% para as versões “Acetato” na ausência e na presença da etapa de *clean up* e para a versão “Original” com *clean up*, e valores de recuperação acima de 120% para as versões “Citrato” com *clean up* e “Original” sem *clean up*. Para a α -cipermetrina foram obtidos resultados insatisfatórios com a versão “Original” tanto na presença quanto na ausência da etapa de *clean up* e para a versão “Acetato” com *clean up* (PSA + C18). Esses resultados indicam que esses compostos de maior volatilidade podem ser extraídos, dependendo da versão utilizada. As maiores dificuldades nas análises desses compostos referem-se à alta concentração a ser empregada, que pode gerar limites de quantificação elevados, o que, muitas vezes, não condizem com as concentrações presentes na matriz a ser analisada, e a necessidade de serem analisados logo após sua extração, devido às possíveis perdas por volatilização. Considerando esses pontos, as análises dos agrotóxicos diafentirom e α -cipermetrina são mais indicadas por cromatografia gasosa.

Resumidamente, foram obtidos valores de recuperação satisfatórios para a maioria dos compostos para todas as versões empregadas. Comparando os resultados obtidos, a versão que apresentou o maior número de recuperações insatisfatórias foi a versão “Citrato” com

clean up (6 – 182)% com 8 valores, seguida pela versão “Original” com *clean up* (24 – 164)% com 6 agrotóxicos com valores de recuperação insatisfatórios, e a versão “Original” sem *clean up* (26 – 193)% com 5 valores sendo, portanto, o uso dessas versões descartado. As versões “Acetato” sem *clean up* (15 – 125)% e “Citrato” sem *clean up* (7 – 176)% apresentaram o mesmo desempenho com 3 resultados insatisfatórios. Sendo assim, optou-se pela versão “Acetato” na presença da etapa de *clean up* (26 – 112)% utilizando-se apenas PSA e MgSO₄ devido ao melhor desempenho em termos de recuperação (apenas 2 valores insatisfatórios de recuperação), que foi de 90 % em média, ao passo que para a versão sem a etapa de *clean up* foi de 77 %, considerando todos os valores.

Com a escolha da versão “Acetato” na presença da etapa de *clean up*, optou-se por realizar um teste para verificar se o emprego de C18, PSA e MgSO₄ na etapa de *clean up* poderia melhorar a recuperação e diminuir o efeito matriz dos compostos de baixa polaridade. No entanto, verificou-se que 6 agrotóxicos apresentaram recuperações insatisfatórias, sendo a faixa obtida entre (40 – 166)%, α - cipermetrina, ciromazina, fipronil, mandipropamida, piraclostrobina e lufenurom, para os quatro últimos as recuperações foram superiores a 120 %. Dessa forma, pode-se concluir que o emprego de C18 juntamente com PSA não promoveu melhora significativa na recuperação dos agrotóxicos estudados, sendo assim, foi escolhida para a etapa de validação a versão “Acetato” com a etapa de *clean up* utilizando somente PSA e MgSO₄.

Devido às elevadas concentrações necessárias para a análise dos agrotóxicos lufenurom, diafentiurom e α -cipermetrina os mesmos não foram avaliados na etapa de validação, bem como a ciromazina, por seus valores de recuperação estarem abaixo dos limites aceitáveis.

4.5 Validação do método QuEChERS versão “Acetato”

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, verificou-se que a versão QuEChERS “Acetato” na presença da etapa de *clean up* utilizando-se somente PSA e MgSO₄ foi a que, em média, forneceu os melhores resultados, sendo então escolhida para a validação. Nesta etapa, foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, faixa linear de trabalho, LOQ, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão em termos de recuperação recomendados pelo guia SANTE 2015.

Dissertação de Mestrado

Verificou-se que para o Solo II foi necessário empregar velocidade e tempo de centrifugação maiores para que ocorresse a separação das fases na etapa de partição, sendo adotado 6000 rpm de velocidade e tempo de centrifugação de 8 min, conforme descrito no item 3.9.3. A **Figura 19** ilustra a etapa de partição para os dois tipos de solo, após a centrifugação. Na **Figura 20** pode ser visualizado o esquema do método QuEChERS empregado no preparo de amostra na validação.

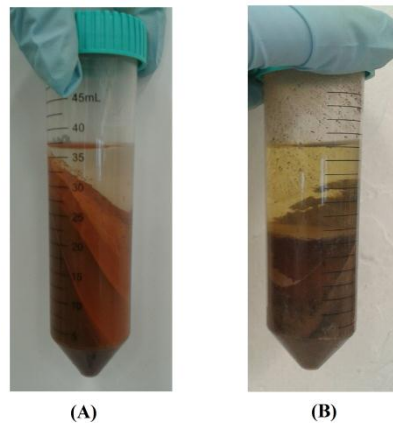


Figura 19: Amostras de solo após a etapa de partição. (A) Solo I e (B) Solo II.

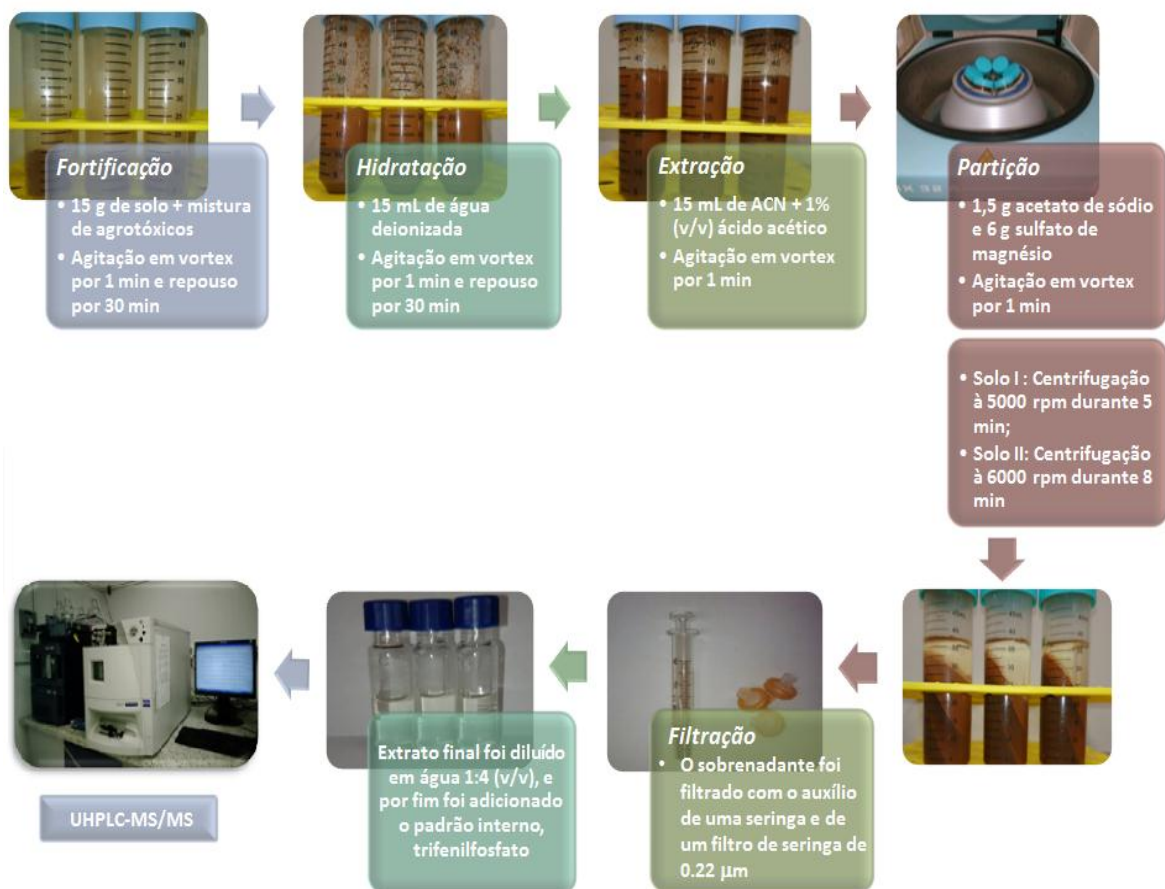


Figura 20: Esquema do método QuEChERS "Acetato" empregado na validação.

4.5.1. Seletividade

Conforme descrito no item **3.10.1**, foram avaliados os reagentes utilizados no preparo da amostra e as matrizes Solo I e Solo II para a verificação de interferentes. A seletividade para o Solo I foi apresentada no item **4.4.1** e verificou ausência de interferentes. Constataram-se que os extratos obtidos do Solo II apresentaram-se com a coloração ligeiramente amarelada (**Figura 21**) o que pode ter ocasionado a presença de interferentes nos tempos de retenção dos agrotóxicos clorpirifós, profenofós e tebuconazol, como pode ser visualizado na **Figura 22**. Como a amostra de Solo II apresentou interferentes com o mesmo padrão de fragmentação e no mesmo tempo de retenção dos analitos citados anteriormente, para se evitar quantificação errônea, os resultados dos mesmos não foram reportados para Solo II. A **Figura 23** apresenta os cromatogramas obtidos após a fortificação de $70 \mu\text{g kg}^{-1}$.

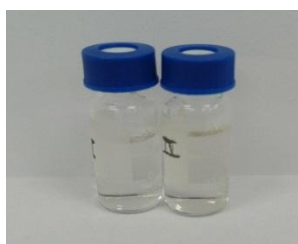


Figura 21: Extratos obtidos após a extração com o método QuEChERS "Acetato" na presença de *clean up* (PSA + MgSO_4). Frasco à direita corresponde ao Solo II e à esquerda ao Solo I.

4.5.2 Faixa linear de trabalho

Para a determinação da faixa de trabalho e da linearidade seguiu-se o procedimento descrito no item **3.10.2**, com as soluções preparadas conforme o item **3.6.2**. Os valores obtidos para o coeficiente de determinação foram superiores a 0,999 para ambos os tipos de solo (**Tabela 25** Solo I e **Tabela 26** Solo II).

Para confirmar a linearidade, foram construídos os gráficos de resíduos e de resíduos padronizados, com o auxílio da ferramenta de análise de dados da planilha *Excel*, obtendo-se valores inferiores a 2 para os resíduos padronizados, o que indicou que os resíduos seguiram uma distribuição normal e que não foi encontrado nenhum resultado anômalo. Os cálculos de valores recuperados de acordo com a equação da reta indicaram que os resultados se ajustam ao modelo linear, pois os valores de erros associados foram inferiores a 5 %.

Dissertação de Mestrado

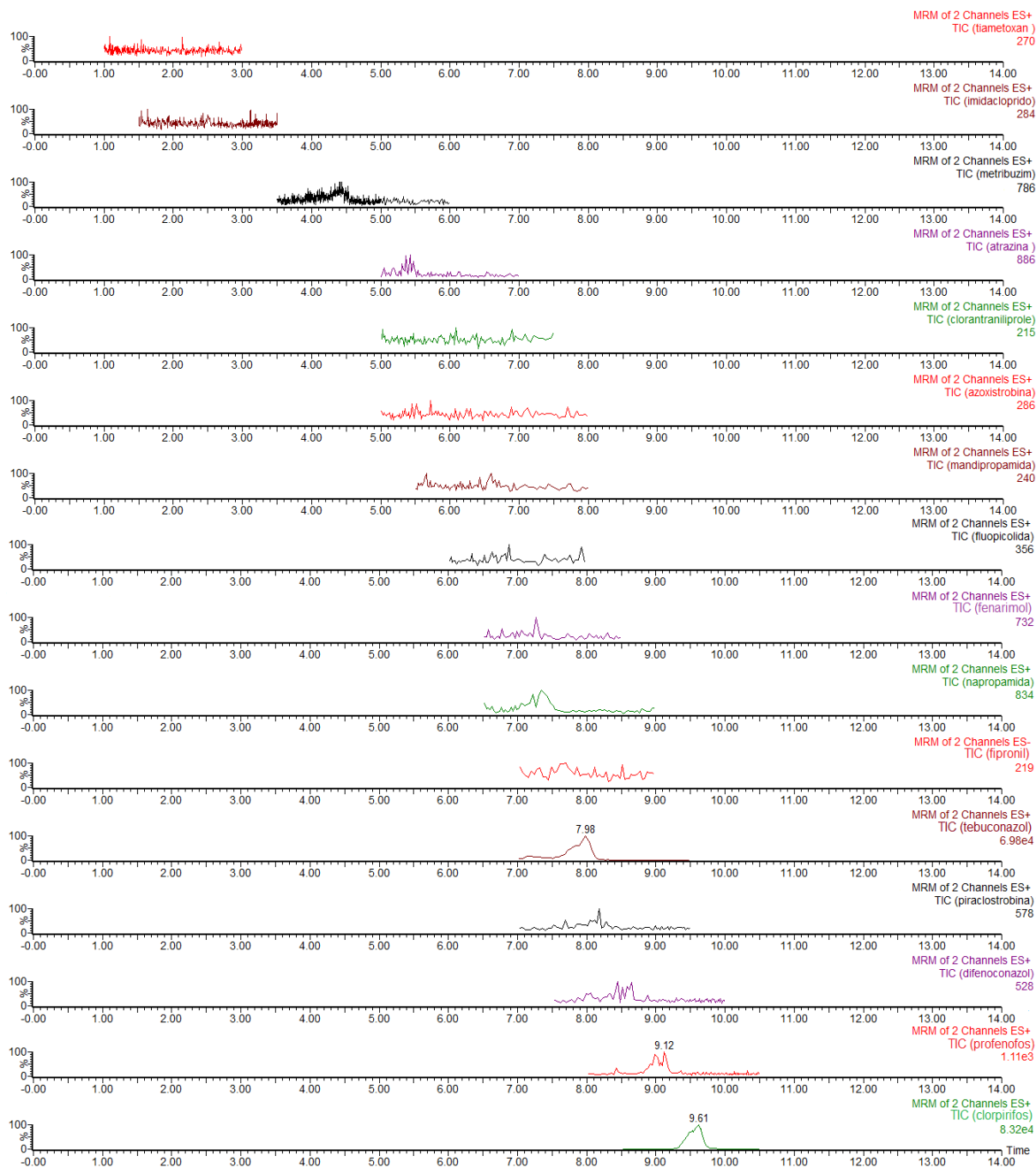


Figura 22: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato branco utilizando a versão QuEChERS “Acetato” na presença da etapa de *clean up* (PSA + MgSO₄). Condições cromatográficas: Volume de injeção 10,0 µL; Coluna: Acquity UPLC[®] BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula); Composição da fase móvel: A: H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico, pH=2,78; B: MeOH, 0,1% (v/v) ácido fórmico; Programação do gradiente: 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B); Vazão: 0,10 mL min⁻¹. Temperatura da coluna: 40 °C; Matriz: Solo II.

Dissertação de Mestrado

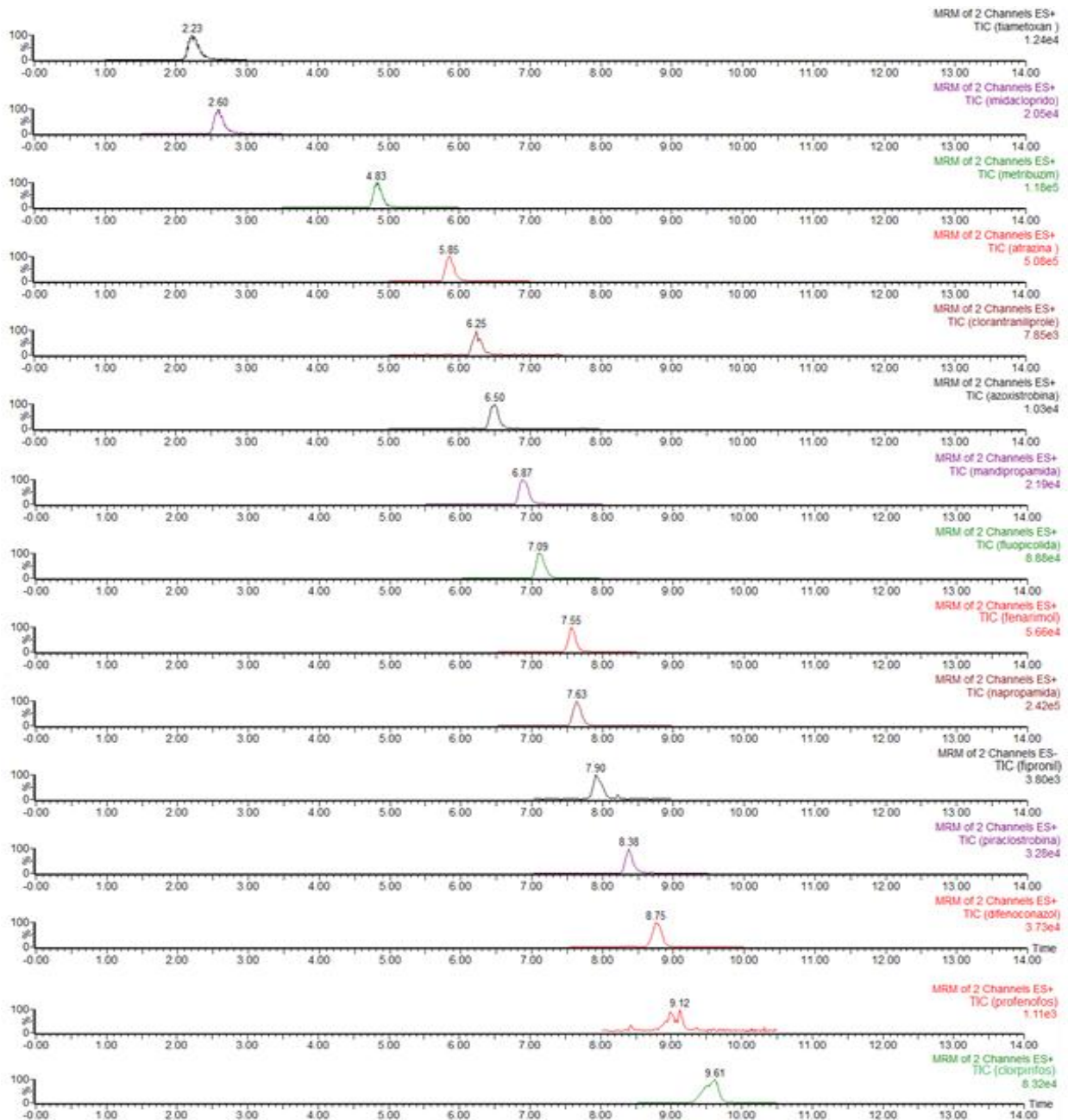


Figura 23: Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com o extrato fortificado após extração utilizando a versão QuEChERS “Acetato” na presença da etapa de *clean up* (PSA + MgSO₄). Condições cromatográficas: Volume de injeção 10,0 µL; Coluna: *Acquity UPLC*[®] BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula); Composição da fase móvel: A: H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico, pH=2,78; B: MeOH, 0,1% (v/v) ácido fórmico; Programação do gradiente: 0 min 60:40 (v_A/v_B); 3 min 40:60 (v_A/v_B); 8 min 5:95 (v_A/v_B); 10 min 5:95 (v_A/v_B); 12 min 60:40 (v_A/v_B); 14 min 60:40 (v_A/v_B); Vazão: 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da coluna: 40 °C; Matriz: Solo II.

Dissertação de Mestrado

Tabela 25: Valores de faixa linear de trabalho, curva analítica e coeficiente de determinação obtido em solução preparada no extrato da matriz Solo I.

Agrotóxicos	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Tiametoxam	20-140	$y = 7,9x + 27,6$	0,999
Imidacloprido	20-140	$y = 8,8x - 13,5$	0,999
Metribuzim	2-70	$y = 158,7x + 139,9$	0,999
Atrazina	2-70	$y = 237,1x + 128,4$	0,999
Clorantraniliprole	10-70	$y = 7,0x + 19,5$	0,999
Azoxistrobina	10-70	$y = 10,2x + 15,9$	0,999
Mandipropamida	10-70	$y = 28,8 + 9,8$	0,999
Fluopicolida	2-70	$y = 141,3x + 9,9$	0,999
Fenarimol	10-70	$y = 12,3x - 4,2$	0,999
Napropamida	2-70	$y = 278,9x + 105,9$	0,999
Fipronil	10-70	$y = 4,7x + 12,6$	0,999
Tebuconazol	2-70	$y = 803,7x + 372,6$	0,999
Piraclostrobina	10-70	$y = 23,7x + 22,9$	0,999
Difenoconazol	10-70	$y = 50,7x + 40,3$	0,999
Profenofós	2-70	$y = 57,6x + 102,3$	0,999
Clorpirifós	10-70	$y = 53,2x + 3782,8$	0,999

Tabela 14: Valores de faixa linear de trabalho, curva analítica e coeficiente de determinação obtido em solução preparada no extrato da matriz Solo II.

Agrotóxicos	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Tiametoxam	20-140	$y = 9,1x + 37,0$	0,999
Imidacloprido	20-140	$y = 9,5x + 6,0$	0,999
Metribuzim	2-70	$y = 179,4x + 158,4$	0,999
Atrazina	2-70	$y = 313,7x + 164,6$	0,999
Clorantraniliprole	10-70	$y = 8,8x + 18,5$	0,999
Azoxistrobina	10-70	$y = 12,7x + 21,0$	0,999
Mandipropamida	10-70	$y = 43,9x + 36,9$	0,999
Fluopicolida	2-70	$y = 159,5x + 93,0$	0,999
Fenarimol	10-70	$y = 13,5x + 19,2$	0,999
Napropamida	2-70	$y = 401,1x + 279,3$	0,999
Fipronil	10-70	$y = 5,2x + 15,5$	0,999
Piraclostrobina	10-70	$y = 38,9x + 46,8$	0,999
Difenoconazol	10-70	$y = 72,2x + 55,4$	0,999

4.5.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado conforme a **Equação 2** e está apresentado na **Figura 24**, na qual se pode verificar que a porcentagem do efeito matriz foi superior a $\pm 20\%$ para a maioria dos compostos. O Solo II apresentou efeito matriz significativamente superior ao Solo I para todos os agrotóxicos, excluindo-se o tiametoxam que apresentou uma maior supressão do sinal analítico para o Solo I.

Os agrotóxicos de menor polaridade, de modo geral, apresentaram maiores porcentagens de efeito matriz tanto para o Solo I do que para o Solo II. Isto pode ser atribuído às características ácidas ou básicas dos interferentes da matriz, que favorecem a protonação ou desprotonação dos analitos, ocasionando aumento do sinal analítico.⁶⁵ O aumento do sinal analítico para o Solo II foi superior ao observado para o Solo I, provavelmente, devido a maior presença de carga orgânica, como os ácidos húmicos na matriz.

Com base nos resultados constatou-se que a curva analítica deve ser construída no extrato da matriz a fim de se minimizar o efeito provocado pelos interferentes da matriz.

4.5.4 Limites de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para as determinações dos limites de quantificação do método foram fortificadas as amostras e realizadas as extrações, sendo considerados os menores valores para os quais se obtiveram exatidão e precisão, conforme recomendado por Ribani *et al.*⁹⁴ e o guia SANTE⁹³

Em amostras heterogêneas como o solo não é possível fazer comparações com resultados reportados na literatura, uma vez que as características desse tipo de amostra variam de acordo com a região, e mesmo com pequenas variações podem-se obter resultados diferentes, como foi observado para os Solos I e Solo II. Além das propriedades do solo, a quantidade e as propriedades físico-químicas dos analitos, bem como as concentrações empregadas nas análises também podem influenciar na determinação dos LOQ.

A exatidão (recuperação) foi avaliada em quatro níveis de fortificação, realizadas em quintuplicata (n=5), nas concentrações descritas na **Tabela 27** para o Solo I e **Tabela 28** para o Solo II, tendo sido reportado apenas três níveis, dependendo do limite de quantificação de cada analito.

Dissertação de Mestrado

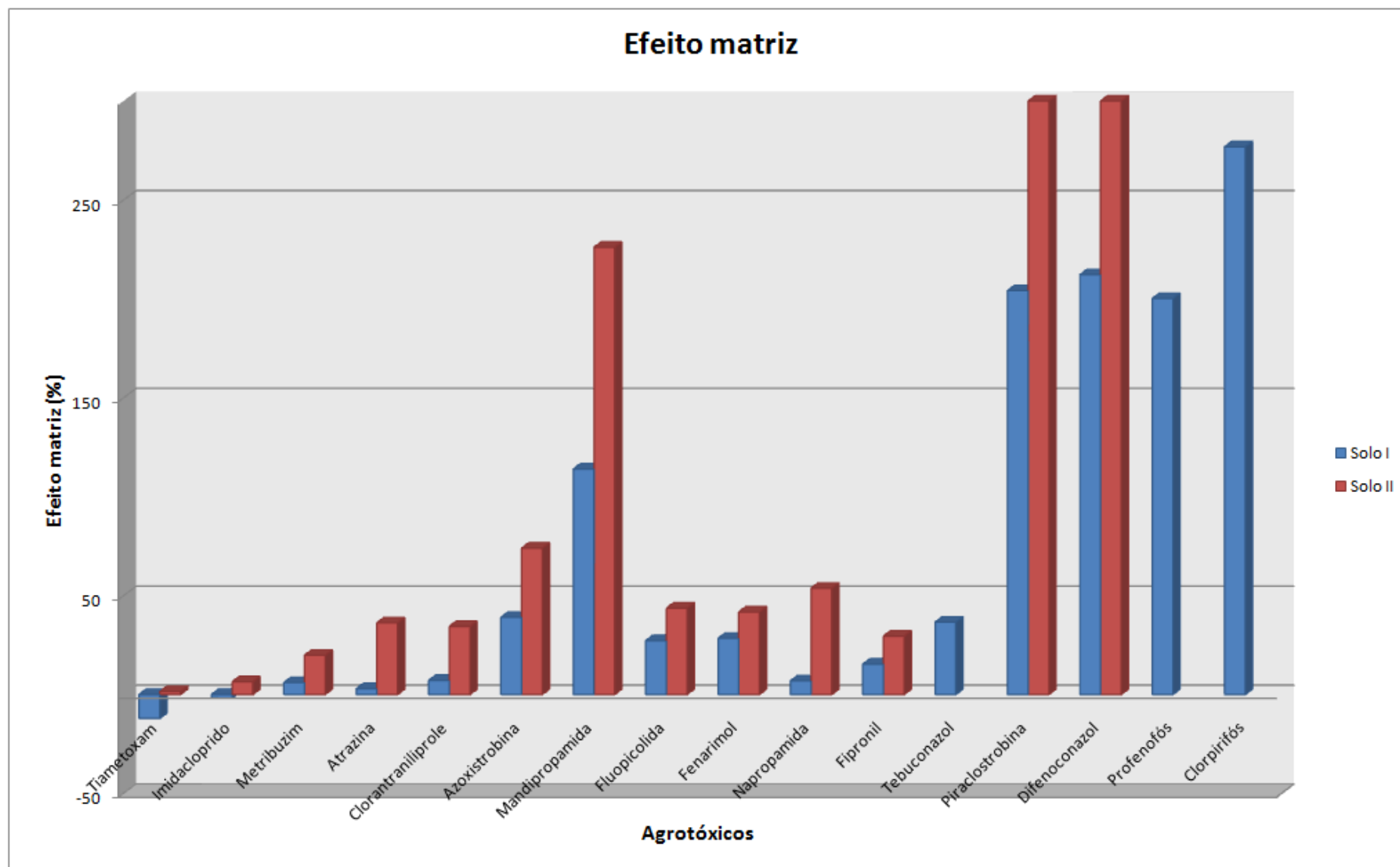


Figura 24: Porcentagem de efeito matriz para os agrotóxicos estudados.

Dissertação de Mestrado

Tabela 27: Níveis de fortificação e as respectivas concentrações dos agrotóxicos. Matriz Solo I.

	Concentração: 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível I	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Clorpirifós; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina; Profenofós; Tebuconazol.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível II	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Clorpirifós; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina; Profenofós; Tebuconazol.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível III	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Clorpirifós; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina; Profenofós; Tebuconazol.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 70 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 140 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível IV	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Clorpirifós; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina; Profenofós; Tebuconazol.	Imidacloprido e Tiametoxam

Tabela 15: Níveis de fortificação e as respectivas concentrações dos agrotóxicos. Matriz Solo II.

	Concentração: 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível I	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível II	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível III	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina.	Imidacloprido e Tiametoxam
	Concentração: 70 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Concentração: 140 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Nível IV	Atrazina; Azoxistrobina; Clorantraniliprole; Difenconazol; Fenarimol; Fipronil; Fluopicolida; Mandipropamida; Metribuzim; Napropamida; Piraclostrobina.	Imidacloprido e Tiametoxam

Nas **Tabelas 29 e 30** estão descritos os valores de LOQ, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para a matriz Solo I e Solo II, respectivamente. Para os dois tipos de solo, a exatidão e a precisão foram adequadas para a maioria dos agrotóxicos, segundo o guia SANTE 2015, ou seja, exatidão entre 70 – 120% e precisão com $CV \leq 20\%$.

Para o Solo I, os valores de exatidão (recuperação) ficaram entre 71 – 119%, com repetibilidade $CV \leq 20\%$ para a maioria dos agrotóxicos, com exceção do fenarimol ($100 \pm 23\%$) do fipronil ($100 \pm 25\%$) e do clorpirifós ($84 \pm 23\%$), mas em todos os casos os valores de recuperação foram satisfatórios. Na análise de precisão intermediária, apenas para o clorpirifós o CV ficou fora da especificação, possivelmente, devido a sua menor polaridade e efeito matriz pronunciado ($EM > 250\%$), como pode ser observado na **Figura 24**. Apesar dos resultados de recuperação terem sido inferiores a 100%, esses valores foram relativamente discrepantes entre uma réplica e outra, gerando valores elevados de CV.

Para o Solo II, como pode ser verificado na **Figura 22**, devido à presença de interferentes nos tempos de retenção do clorpirifós, profenofós e tebuconazol, os resultados para estes agrotóxicos não foram reportados por não serem confiáveis. Os valores de recuperação ficaram entre 67 – 131%, com repetibilidade em termos de $CV \leq 20\%$, com exceção do fipronil que apresentou CV de 21%. Segundo o guia SANTE 2015 valores não contemplados no intervalo de 70 – 120% de recuperação podem ser aceitos desde que se tenha precisão, $CV \leq 20\%$,⁹³ que seriam os casos do clorantraniliprole ($67 \pm 3\%$), no qual pode ter ocorrido perdas na fase aquosa na etapa de partição, da azoxistrobina ($131 \pm 10\%$) e da piraclostrobina ($121 \pm 9\%$). O efeito matriz, devido ao aumento do sinal analítico, pode ter ocasionado superestimação da recuperação. A precisão intermediária em todos os casos foi inferior a 20%.

Comparando os resultados da validação nas duas amostras de solo, pode-se verificar que a quantidade de matéria orgânica influenciou no efeito matriz, sendo o aumento do sinal analítico mais pronunciado para os agrotóxicos no Solo II, mas não teve influência na exatidão e na precisão para a maioria dos analitos, o que mostra a eficácia e versatilidade do método QuEChERS “Acetato” frente à amostras complexas e heterogêneas, como o solo.

Dissertação de Mestrado

Tabela 29: Valores de LOQ, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), matriz Solo I.

Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Níveis de fortificação							
		Nível I		Nível II		Nível III		Nível IV	
		Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)
Tiametoxam	20	n.q.	n.q.	81 (7)	96 (6)	83 (5)	89 (3)	74 (6)	79 (6)
Imidacloprido	4	86 (11)	102 (13)	-	-	93 (3)	101 (2)	90 (4)	96 (6)
Metribuzim	2	85 (8)	74 (9)	-	-	103 (3)	101 (3)	99 (4)	101 (3)
Atrazina	2	82 (4)	71 (13)	-	-	105 (4)	111 (4)	95 (4)	109 (3)
Clorantraniliprole	10	n.q.	n.q.	77 (13)	85 (7)	88 (8)	99 (5)	75 (4)	85 (5)
Azoxistrobina	10	n.q.	n.q.	81 (8)	87 (5)	87 (5)	106 (5)	76 (2)	90 (7)
Mandipropamida	10	n.q.	n.q.	83 (7)	86 (4)	86 (6)	92 (5)	76 (3)	82 (7)
Fluopicolida	2	89 (7)	97 (12)	-	-	95 (1)	101 (2)	89 (3)	94 (2)
Fenarimol	10	n.q.	n.q.	100 (23)	116 (12)	113 (6)	119 (9)	107 (9)	110 (7)
Napropamida	2	89 (3)	91 (4)	-	-	94 (3)	103 (3)	87 (4)	94 (4)
Fipronil	10	n.q.	n.q.	100 (25)	108 (10)	86 (10)	98 (3)	84 (7)	87 (5)
Tebuconazol	2	83 (6)	79 (9)	-	-	98 (6)	105 (3)	94 (3)	102 (2)
Piraclostrobina	10	n.q.	n.q.	80 (12)	88 (12)	89 (10)	97 (3)	76 (6)	87 (8)
Difenoconazol	10	n.q.	n.q.	88 (12)	98 (10)	95 (6)	112 (5)	89 (8)	101 (11)
Profenofós	10	n.q.	n.q.	87 (10)	86 (9)	87 (6)	94 (5)	86 (6)	87 (20)
Clorpirifós	10	n.q.	n.q.	85 (23)	81 (30)	70 (20)	79 (33)	71 (13)	74 (50)

n.q. = não quantificado;

Rec = Recuperação;

Rep = Repetibilidade;

PInter= Precisão Intermediária;

Em negrito os valores não contemplados pelo guia Sante 2015.

Dissertação de Mestrado

Tabela 30: Valores de LOQ, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), matriz Solo II.

Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Níveis de fortificação							
		Nível I		Nível II		Nível III		Nível IV	
		Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)	Rec (Rep) (%)	Rec (PInter) (%)
Tiametoxam	20	n.q.	n.q.	93 (12)	88 (6)	80 (2)	93 (4)	70 (8)	88 (4)
Imidacloprido	20	n.q.	n.q.	92 (8)	105 (3)	90 (4)	95 (2)	84 (4)	96 (3)
Metribuzim	2	n.q.	n.q.	100 (1)	103 (2)	103 (1)	101 (1)	100 (1)	101 (1)
Atrazina	2	92 (5)	113 (16)	-	-	90 (9)	110 (4)	85 (3)	109 (2)
Clorantraniliprole	10	n.q.	n.q.	93 (16)	114 (10)	81 (13)	108 (4)	67 (3)	106 (4)
Azoxistrobina	10	n.q.	n.q.	112 (10)	131 (10)	92 (8)	116 (9)	86 (8)	113 (2)
Mandipropamida	10	n.q.	n.q.	110 (7)	111 (8)	95 (8)	99 (3)	90 (3)	96 (3)
Fluopicolida	2	91 (8)	113 (19)	-	-	93 (5)	105 (4)	91 (2)	105 (3)
Fenarimol	10	n.q.	n.q.	96 (16)	107 (5)	88 (10)	103 (3)	85 (9)	104 (3)
Napropamida	2	89 (9)	91 (9)	-	-	89 (7)	95 (2)	88 (2)	95 (1)
Fipronil	10	n.q.	n.q.	104 (21)	118 (9)	80 (8)	103 (9)	72 (6)	87 (5)
Piraclostrobina	10	n.q.	n.q.	101 (12)	121 (9)	84 (9)	101 (5)	84 (9)	98 (5)
Difenoconazol	10	-	-	100 (11)	105 (10)	79 (5)	95 (4)	79 (5)	93 (4)

n.q = não quantificado;

Rec = Recuperação;

Rep = Repetibilidade;

PI= Precisão Intermediária;

Em negrito os valores não contemplados pelo guia Sante 2015.

4.6 Dissipação de produtos formulados de agrotóxicos em solo

Nos testes de dissipação dos produtos formulados pode-se observar que, tanto para o Solo I como para o Solo II, as dissipações dos agrotóxicos nas amostras submetidas à iluminação artificial foram semelhantes, para a maioria dos analitos, independente da presença ou ausência de umidade. Os valores experimentais, foram obtidos por comparação das áreas correspondentes aos resíduos extraíveis do solo (qualitativamente), foram praticamente equivalentes durante o período de 30 dias. As amostras secas apresentaram dissipações ligeiramente superiores às amostras úmidas. Os resultados mostraram que os agrotóxicos estudados são relativamente estáveis à fotodegradação e à hidrólise, o que é desejável, uma vez que, em sua maioria, esses compostos são preparados em caldas (misturados em água) e também estão sujeitos à irrigação e às águas das chuvas e, no caso da fotodegradação, os mesmos são, geralmente, aplicados durante o dia e devem permanecer ativos por um tempo que seja compatível com a finalidade a que se destinam.

Por outro lado, essa persistência pode ocasionar a contaminação do solo e, conseqüentemente, das águas subterrâneas e superficiais, dependendo das propriedades físico-químicas de cada agrotóxico, segundo a **Tabela 3**.

Solubilidade em água:

- ✚ Apenas o imidacloprido, o tiametoxam e o metribuzim são altamente solúveis em água, os demais agrotóxicos possuem baixa solubilidade;

Volatilidade:

- ✚ Os agrotóxicos que possuem maior tendência em permanecerem no solo são azoxistrobina, clorantraniliprole, imidacloprido, piraclostrobina, tiametoxam e o difenoconazol, sendo os demais voláteis;

Mobilidade:

- ✚ Tiametoxam possui alta mobilidade, sendo os demais agrotóxicos de mobilidade moderada (metribuzim, azoxistrobina, clorantraniliprole e imidacloprido) e de fraca mobilidade (clorpirifós, tebuconazol, fipronil, mandipropamida, piraclostrobina e difenoconazol);

Persistência (DT50 campo):

Dissertação de Mestrado

- ✚ Clorpirifós, mandipropamida, metribuzim são considerados não persistentes. Moderadamente persistentes (difenoconazol, fipronil, piraclostrobina, tebuconazol e tiametoxam) e persistentes (azoxistrobina, clorantraniliprole e imidacloprido);

Probabilidade de lixiviação:

- ✚ Improvável a lixiviação do clorpirifós, difenoconazol e piraclostrobina. Potencial de lixiviação marginal (azoxistrobina, fipronil, mandipropamida e metribuzim) Susceptível a lixiviação (clorantraniliprole, imidacloprido, tebuconazol e tiametoxam);

Os resultados de DT50, conforme mencionado anteriormente, foram estimados qualitativamente por meio da comparação da área máxima e o tempo necessário, em dias, para que esse valor atingisse a metade.

Correlacionando os resultados obtidos nos testes de dissipação com as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, pode-se observar que, apesar da heterogeneidade das propriedades, o comportamento de dissipação no solo, de modo geral, foi semelhante, porém esses resultados podem não condizer com a realidade em campo, uma vez que as condições ambientais são diferentes, principalmente com relação à iluminação, temperatura e umidade. Com relação à solubilidade em água/polaridade observou-se que os analitos mais polares (tiametoxam e imidacloprido) foram os que se dissiparam com maior velocidade, principalmente na presença de umidade. A piraclostrobina apesar de suas propriedades físico-químicas não favorecerem a sua dissipação (baixa solubilidade, volatilidade e probabilidade de lixiviação e de persistência moderadas) em ambos os solos, na presença de umidade a sua dissipação foi rápida, DT50 estimado de 13-15 dias. De modo geral, a presença de umidade foi o fator que mais influenciou na dissipação dos agrotóxicos. Os gráficos de dissipação para a azoxistrobina se encontram nas **Figuras 25-28** para o Solo I e nas **Figuras 29-32** para o Solo II. Os gráficos para os demais agrotóxicos encontram-se no Capítulo VII – Apêndice.

Esperava-se uma dissipação mais rápida dos agrotóxicos no Solo II, por conter maior quantidade de matéria orgânica (ácidos húmicos), o que não foi observado e sim uma dissipação semelhante nos dois tipos de solo. Rodríguez-Liébaña *et al.*¹⁰¹ estudaram a influência da quantidade de matéria orgânica na dissipação dos agrotóxicos fenarimol e triacloprido em solos verificaram que quanto maior a quantidade de carbono orgânico maior a sorção desses agrotóxicos. A presença de uma maior quantidade de argila no Solo I também não se mostrou determinante na dissipação dos agrotóxicos estudados, uma vez, como dito anteriormente, o tempo de dissipação foi semelhante em ambos os tipos de solo.

Dissertação de Mestrado

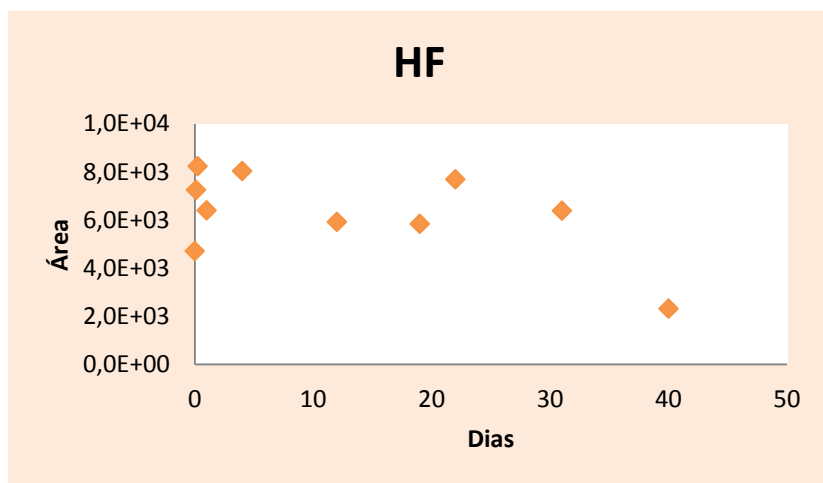


Figura 25: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na presença de luz artificial e de umidade.

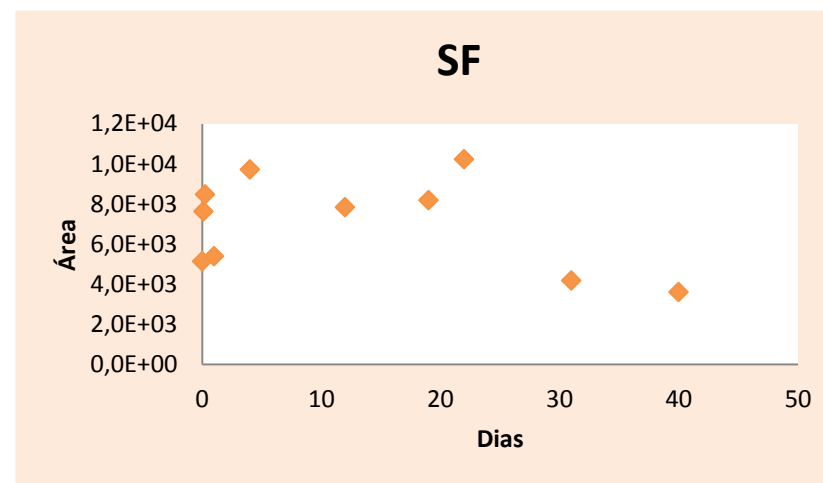


Figura 26: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na presença de luz artificial e na ausência de umidade.

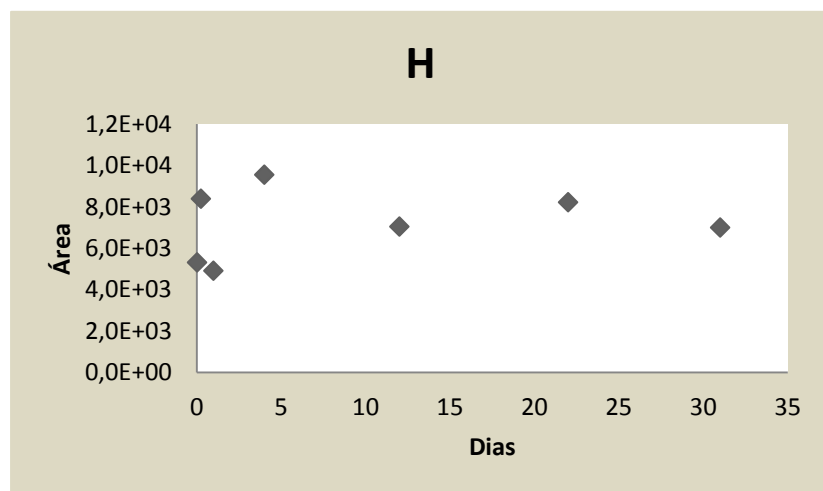


Figura 27: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na ausência de luz artificial e na presença de umidade.

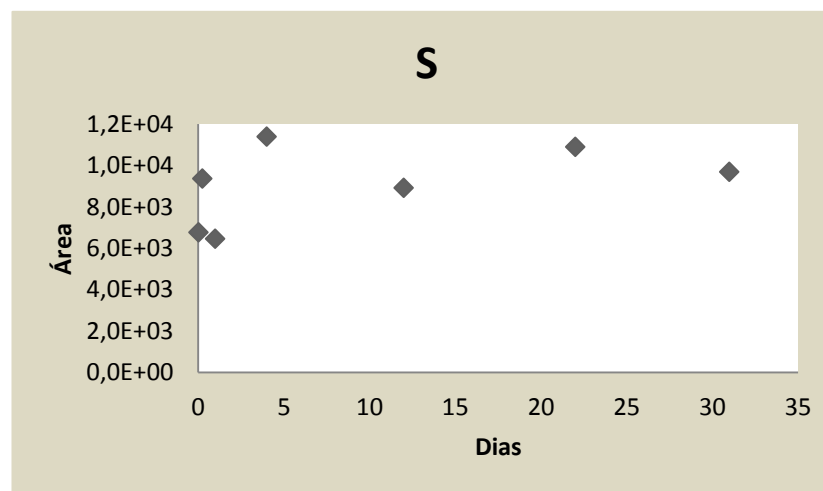


Figura 28: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo I, na ausência de luz artificial e de umidade.

Dissertação de Mestrado

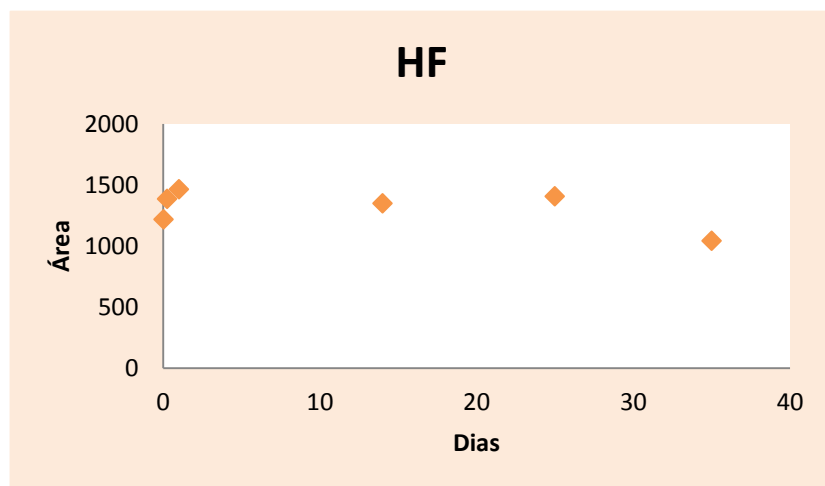


Figura 29: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na presença de luz artificial e de umidade.

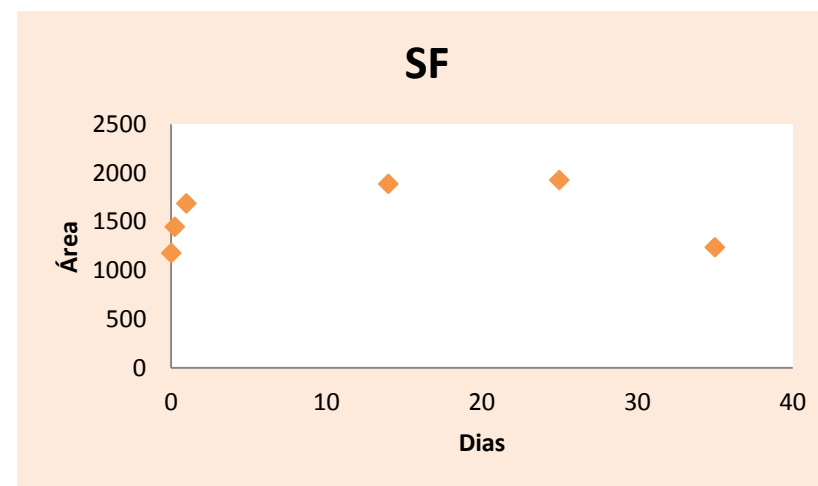


Figura 30: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na presença de luz artificial e na ausência de umidade.

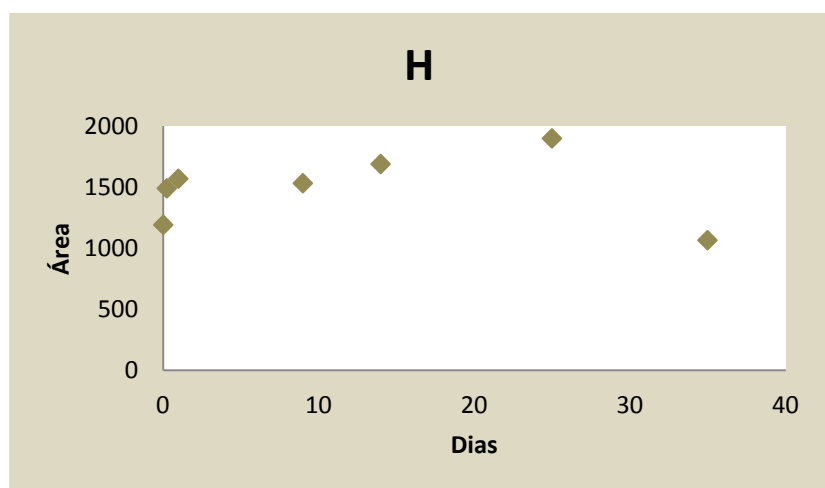


Figura 31: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na ausência de luz artificial e na presença de umidade.

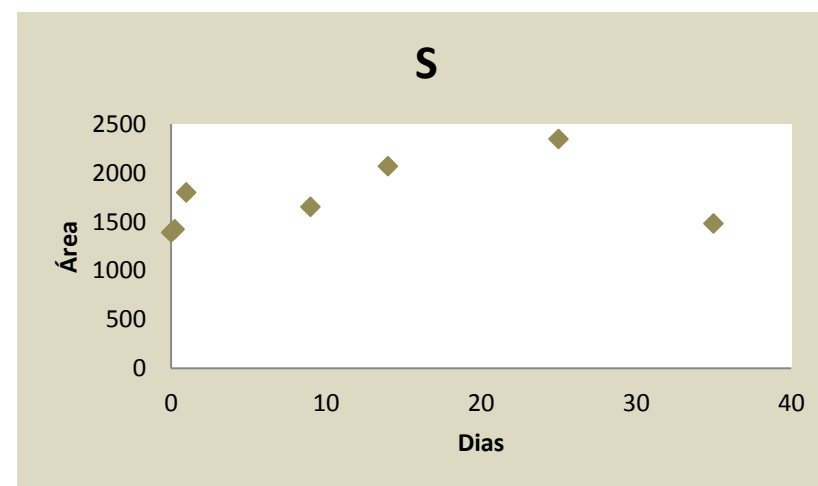


Figura 32: Gráfico da dissipação da azoxistrobina no Solo II, na ausência de luz artificial e de umidade.

No caso do Solo II foi aplicada uma quantidade 4 x menor de produtos formulados dos agrotóxicos do que no Solo I, porém, não foi observada uma degradação mais acentuada, o que pode não ter ocorrido devido à maior adsorção desses agrotóxicos na matéria orgânica do solo, pois estudos indicam que a concentração do produto aplicado também infere grande influência na dissipação, dependendo do tipo de solo. De acordo com Papadopoulou *et al.*¹⁰², em um solo com característica arenosa pode-se observar que em testes de dissipação realizados em laboratório, os agrotóxicos clorpirifós e tebuconazol apresentaram elevada persistência, dependendo da concentração aplicada, o que, no entanto, não foi observada em campo, devido à presença de microorganismos. Nesse estudo também foi observado que quanto maior a hidrofobicidade maior a adsorção do agrotóxico no solo, sendo o clorpirifós o de maior adsorção.

Além da concentração aplicada, o tipo de formulação também pode influenciar na dissipação do agrotóxico, além do princípio ativo aos agrotóxicos comercializados, são adicionados ingredientes inertes, cuja função é diluir o ingrediente ativo e facilitar sua dispersão ou penetração no organismo-alvo¹⁰³. Khan e Brown¹⁰⁴ estudaram a lixiviação dos agrotóxicos azoxistrobina (concentrado em emulsão e em suspensão), ciproconazol, propizamida e tridimenol nas formulações comerciais e os padrões dos mesmos e verificaram que a lixiviação foi maior para os produtos comerciais em todos os casos e que esse efeito aumenta com o aumento da solubilidade da substância ativa em água. Para azoxistrobina, a formulação em emulsão foi mais lixiviada que em suspensão.

Os testes foram realizados em um tempo relativamente curto, cerca de 40 dias para o Solo I e de 35 dias para o Solo II, dificultando a estimativa do DT50 de alguns analitos. Os valores estimados encontram-se na **Tabela 31**. Zhang *et al.*¹⁰⁵ em um estudo para a verificação da dissipação da piraclostrobina em solo (em campo) e em amendoins constataram que a dissipação foi mais rápida nas plantas do que no solo, sendo o tempo de meia vida de 10,3–11,2 dias para o amendoim e de 13,1–16,5 dias, valor análogo ao obtido nos testes na presença de iluminação e de umidade, 15 dias. Em outro estudo de dissipação em diversas matrizes (solo, água e palha de arroz), elaborado por Zhang *et al.*⁷³, constatou-se que o tempo de meia vida para o clorantraniliprole foi de 16 dias em campo, resultado também análogo ao obtido no experimento na presença e iluminação e de umidade, 15 dias (Solo II). Comparando os resultados obtidos com os dados da literatura realizados em campo pode-se notar que apesar das limitações dos experimentos, os resultados foram semelhantes para determinados

Dissertação de Mestrado

analitos, indicando que esses valores são uma boa estimativa da realidade em campo em alguns casos, apesar de fatores como a degradação microbiana não estarem presentes.

Com relação aos dados de DT50 da **Tabela 3**, pode-se verificar que os valores foram distintos tanto para os ensaios em laboratório quanto em campo. Essa divergência pode ter sido ocasionada pelos tempos dos ensaios, para alguns analitos terem sido menores do que o necessário para estimar o DT50 e pelas faltas de informações sobre as condições em que foram realizados os experimentos, não há indicação da presença ou ausência de umidade nos valores de DT50 em laboratório. Em ambos os casos não se tem informações sobre a formulação utilizada ou se foram empregados padrões analíticos, a concentração empregada e se foram utilizados apenas um analito ou uma mistura, o tipo de solo, esses fatores podem interferir nos valores obtidos.

Tabela 31: Valores de DT50 (dias) estimados qualitativamente para as amostras de Solo I e Solo II.

Agrotóxicos	Solo I				Solo II			
	HF	H	SF	S	HF	H	SF	S
Azoxistrobina	35	30	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Clorantraniliprole	30	NE	30	NE	15	NE	35	NE
Clorpirifós	30	NE	30	NE	15	15	30	30
Difenoconazol	35	NE	35	NE	35	35	35	35
Fipronil	35	NE	35	NE	30	25	NE	NE
Imidacloprido	12	12	20	NE	10	10	30	30
Mandipropamida	30	NE	30	NE	30	30	NE	NE
Metribuzim	40	NE	40	NE	NE	NE	NE	NE
Piraclostrobina	15	15	30	NE	13	13	NE	NE
Tebuconazol	NE	NE	NE	NE	25	30	NE	NE
Tiametoxam	20	27	25	NE	15	12	NE	NE

NE= Não Estimado.

4.7 Aplicação do método QuEChERS versão “Acetato” em amostras de solo provenientes de diferentes tipos de cultivos

As concentrações dos agrotóxicos encontrados nas amostras de solo provenientes de diferentes culturas determinadas por meio do método desenvolvido e validado encontram-se na **Tabela 32**, na qual foi adotada a numeração Pn para indicar cada produtor, a fim de se preservar a identidade dos produtores rurais. Foram coletadas 2 amostras de solo de diferentes cultivos para se verificar o uso do mesmo princípio ativo em culturas diferentes, com exceção para o P1, para o qual não foi possível a análise da segunda amostra e para o P8 que cultivava apenas tomates.

Dissertação de Mestrado

Para as análises dos resíduos de agrotóxicos foram observadas as características do solo para selecionar o solo que fosse mais semelhante, Solo I ou II, para fazer a quantificação. Dessa forma, o Solo I foi utilizado para construir a curva analítica para as amostras provenientes de todos os produtores, com exceção do produtor P5, para o qual a quantificação foi realizada empregando o Solo II. Na aplicação do método em amostras de solos provenientes do município de Atibaia, pode-se observar que comumente o mesmo resíduo de agrotóxico foi encontrado nas duas amostras de cultivos diferentes coletadas no mesmo produtor, o que sugere a aplicação do mesmo princípio ativo independente do cultivo. Nesses casos, muitas vezes, como se tratam de CSFIs, esses agrotóxicos não estão registrados para essas culturas e resultam em amostras insatisfatórias com agrotóxicos não permitidos.

Como mencionado anteriormente, apenas o P5 foi quantificado pelo Solo II, devido a sua maior porcentagem de matéria orgânica, observada apenas de forma visual, sendo a Amostra 1 pertencente ao produtor P7 e a Amostra 2 ao produtor P2. De acordo com as análises de solo, constatou-se que a quantidade de matéria orgânica nas duas amostras não foi significativamente diferente e em ambos os casos foram inferiores aos obtidos para o Solo II, sendo aceitável a quantificação pela matriz Solo I. Para os demais solos, devido as características serem semelhantes, a quantificação procedeu da mesma forma.

Embora os limites de quantificação do método tenham sido relativamente baixos, a maioria dos agrotóxicos estavam com valores abaixo do limite de quantificação, com exceção da azoxistrobina, clorantniliprole, difenoconazol, fipronil, piraclostrobina, tebuconazol que puderam ser quantificados em algumas amostras. Dos agrotóxicos estudados não foram detectados resíduos de atrazina, fenarimol, fluopicolida, mandipropamida, napropamida e profenofós.

Apesar dos resultados indicarem uma razoável utilização de agrotóxicos pelos produtores da região, os mesmos poderiam ter sido melhores avaliados, empregando um escopo maior de agrotóxicos e variando a época das coletas, uma vez que os produtores, em sua maioria, cultivam no tempo, ou seja, sem o chamado cultivo protegido (com o uso de estufas), o que pode influenciar na determinação dos agrotóxicos, devido às perdas por lixiviação causadas pelas chuvas, pois as coletas foram realizadas no período de chuvas (novembro e dezembro).

Os agrotóxicos com maior número de detecções foram o tebuconazol (fungicida) que esteve presente em todas as amostras, o clorpirifós (inseticida) e o metribuzim (herbicida).

Dissertação de Mestrado

Tabela 32: Concentrações (mg kg⁻¹) e estimativa do desvio padrão absoluto dos agrotóxicos encontrados nas amostras de solo.

Agrotóxicos	P1	P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8
	Abob	Esp	Couve	Alface	Salsa	Almeirão	Alface	Coentro	Abob	Vagem	Jiló	Coentro	Esp.	Tomate
Atrazina														
Azoxistrobina		< LOQ		< LOQ							< LOQ	27,8 (4,7)	17,3 (1,9)	52,7 (0,6)
Clorantroliprole		38,7 (0,5)	< LOQ			< LOQ					< LOQ			< LOQ
Clorpirifós	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			< LOQ
Difenoconazol		< LOQ	< LOQ							16,7 (0,7)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	19,4 (0,4)
Fenarimol														
Fipronil													101,0 (5,4)	
Fluopicolida														
Imidacloprido			< LOQ			< LOQ	< LOQ			< LOQ				< LOQ
Mandipropamida														
Metribuzim	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	< LOQ						
Napropamida														
Piraclostrobina	< LOQ	< LOQ										15,3 (3,3)	13,8 (1,4)	
Profenofós														
Tebuconazol	< LOQ	17,8 (0,8)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	62,0 (2,8)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Tiametoxam				< LOQ										< LOQ

Abob= Abobrinha; Esp= Espinafre;
Em negrito as amostras quantificadas.

O tebuconazol é um dos exemplos da consequência da Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 16 de junho de 2014 que aumentou, consideravelmente, o escopo de culturas nas quais este agrotóxico passou a ser indicado, sendo permitido para as culturas de abobrinha, almeirão, couve e jiló, entre outras que anteriormente não estavam registradas, além da alface e do repolho que já estavam registrados. O clorpirifós não se encontra registrado para nenhuma das culturas analisadas, no entanto foi o segundo agrotóxico mais detectado, sendo relatado o seu uso por alguns produtores (que infelizmente desconhecem que não deve ser utilizado em suas plantações), mas não em todos os casos de detecção. O metribuzim, que possui registro apenas para o cultivo de tomates, foi encontrado em solos com diferentes cultivos. Nesse caso, além de não se ter uma conformidade, dependendo da cultura e da aplicação pode ocorrer fitointoxicação das plantas, uma vez que esse herbicida é sistêmico e seletivo para folhas largas.

Pode-se observar que a maioria das detecções foi de agrotóxicos não autorizados, e dos agrotóxicos que foram quantificados, o fipronil foi o que apresentou maior concentração, mesmo não sendo permitido para cultura do espinafre e, segundo o agricultor, o produto foi aplicado mesmo sabendo que o mesmo não poderia ter sido usado, mas alegou não possuir outro agrotóxico com a mesma eficiência para o combate das pragas. A cultura cujo solo apresentou a maior quantidade de resíduos de agrotóxicos quantificados foi o de espinafre, no qual, dos resíduos de agrotóxicos encontrados nenhum estava registrado para essa cultura o que demonstra a carência do registro de princípios ativos. O solo das demais culturas, vagem e coentro também apresentaram irregularidades no que diz respeito à utilização de princípios ativos não registrados e em quantidades elevadas, apenas o solo do cultivo de tomate apresentou resíduos de agrotóxicos permitidos para o cultivo, porém, também em concentrações altas, cerca de 100 vezes o LMR para a azoxistrobina e de 200 vezes o LMR para o difenoconazol, conforme descrito na **Tabela 33**.

Na maioria dos casos, constatou-se que os produtores não possuem informações sobre a proibição de determinados agrotóxicos ou utilizam mesmo tendo conhecimento dessa proibição, alegando melhor custo benefício e, muitas vezes, aplicam dosagens acima do recomendado, ocasionando contaminação de seus produtos e do meio ambiente, além de prejudicarem a sua saúde, pois muitos produtores também desconhecem ou ignoram a necessidade do uso de EPIs e do descarte adequado das embalagens. Pode-se observar que apesar da existência dos fatores ambientais para a dissipação desses agrotóxicos como a degradação biológica, os agrotóxicos quantificados estavam em concentrações elevadas o que indica que essa aplicação indevida pode acarretar na contaminação do solo.

Dissertação de Mestrado

Tabela 33: Resíduos de agrotóxicos detectados em solo (mg kg^{-1}) e seus respectivos LMR (mg kg^{-1}) para as diferentes culturas analisadas.

Agrotóxicos	Culturas									
	Espinafre	Vagem	Couve	Abobrinha	Almeirão	Alface	Salsa	Jiló	Coentro	Tomate
Azoxistrobina	17,3 (NA)					< LOQ (1,0)		< LOQ (NA)	27,8 (NA)	52,7 (0,5)
Clorantraniliprole	38,7 (NA)		< LOQ (0,7)		< LOQ (NA)			< LOQ (NA)		< LOQ (0,3)
Clorpirifós	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)
Difenoconazol		16,7 (NA)	< LOQ (NA)					< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	19,4 (0,1)
Fipronil	101,0 (NA)									
Imidacloprido		< LOQ (NA)	< LOQ (2,0)		< LOQ (0,01)	< LOQ (0,5)				< LOQ (0,5)
Metribuzim	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)	< LOQ (NA)		< LOQ (NA)	< LOQ (NA)		< LOQ (NA)	
Piraclostrobina	13,8 (NA)			< LOQ (NA)					15,3 (NA)	
Tebuconazol	17,8 (NA)	62,0 (NA)	< LOQ (2,0)	< LOQ (0,5)	< LOQ (3,5)	< LOQ (3,5)	< LOQ (NA)	< LOQ (0,2)	< LOQ (NA)	< LOQ (0,3)
Tiametoxam						< LOQ (1,0)				< LOQ (1,0)

NA= Não Autorizado;

Em negrito as amostras quantificadas.

*Capítulo V: Conclusões e
Sugestões de trabalhos
futuros*

5. Conclusões

As melhores condições cromatográficas para a determinação dos agrotóxicos selecionados foram obtidas utilizando a fase móvel composta por metanol/água e ácido fórmico como aditivo em ambos os solventes, vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição por gradiente com 40% de solvente orgânico no início, que resultaram em picos mais simétricos, com boa resolução e, conseqüentemente, melhor desempenho cromatográfico.

A análise visual dos extratos obtidos empregando as três versões do método QuEChERS – “Acetato”, “Citrato” e “Original” na presença ou na ausência da etapa de *clean up* mostrou que independentemente do emprego da etapa de *clean up* todos os extratos se apresentaram límpidos. Entretanto, com o emprego da etapa de *clean up*, devido a uma maior remoção dos interferentes, foram obtidos extratos com menor coloração, para o Solo I. Os extratos do Solo II após a extração com a versão “Acetato” apresentaram uma coloração ligeiramente amarelada, devido, possivelmente, à presença de maior conteúdo de matéria orgânica dentre outros interferentes.

As três versões do método QuEChERS analisadas apresentaram resultados satisfatórios para a maioria dos analitos e a ausência de etapa de *clean up* gerou recuperações inferiores quando comparada com suas respectivas versões nas quais foi empregada a etapa de *clean up*, com exceção da versão “Original” com a qual, para os compostos de menor polaridade, observou-se maior recuperação sem o uso de *clean up*. A etapa de *clean up* com PSA foi eficiente para a remoção de interferentes de maior polaridade, porém, o seu uso concomitante com C18 ocasionou supressão do sinal para os agrotóxicos de média a baixa polaridade, prejudicando as recuperações dos mesmos. Os agrotóxicos ciromazina, diafentiurom, α -cipermetrina e lufeniurom não foram empregados na etapa de validação devido à recuperação da ciromazina ser inferior a 70% e as elevadas concentrações necessárias para as análises dos demais agrotóxicos.

A versão “Acetato” utilizando apenas PSA e o MgSO_4 anidro na etapa de *clean up* foi a que apresentou os melhores resultados, com recuperações satisfatórias para a maioria dos agrotóxicos estudados e menor custo, quando comparada com a versão “Citrato”. O emprego do PSA na etapa de *clean up* além de melhorar a recuperação quando comparada com a versão sem limpeza, permitiu maior versatilidade ao método em seu emprego em solos com maior porcentagem de matéria orgânica (ácidos húmicos), Solo II.

Dissertação de Mestrado

Nos estudos de validação do método desenvolvido verificou-se que a relação da concentração com a área foi linear para todos os agrotóxicos na faixa de trabalho utilizada e que os LOQ foram adequados ao tipo de análise a ser realizado (baixas concentrações), garantindo confiabilidade nos resultados de recuperação. O efeito matriz foi significativo para a maioria dos agrotóxicos estudados em ambos os tipos de solo, conforme esperado, devido à complexidade da matriz, sendo necessária a construção da curva analítica no extrato da matriz. Para o Solo I os valores de exatidão (recuperação) ficaram no intervalo de 71 – 119%, com repetibilidade, $CV \leq 20\%$ para a maioria dos agrotóxicos, com exceção do fenarimol ($100 \pm 23\%$), do fipronil ($100 \pm 25\%$) e do clorpirifós ($84 \pm 23\%$), mas em todos os casos os valores de recuperação foram satisfatórios, apenas o clorpirifós apresentou precisão intermediária $CV \geq 20\%$. Para o Solo II, os valores de recuperação ficaram entre 67 – 131%, com repetibilidade $CV \leq 20\%$, com exceção do fipronil com CV de 21%, em todos os casos a precisão intermediária foi inferior a 20%.

Os testes de dissipação dos produtos formulados em laboratório mostraram ser uma boa alternativa para ensaios preliminares aos testes em campo, pois apesar das limitações das condições simuladas em laboratório, os resultados podem auxiliar na compreensão da dinâmica de dissipação dos agrotóxicos no solo. Apesar da heterogeneidade das amostras Solo I e Solo II, das diferentes propriedades físico-químicas dos analitos e da diversidade de concentração empregada, o comportamento de dissipação dos agrotóxicos foi semelhante. Apenas a presença ou ausência de iluminação e de umidade geraram diferenças na dissipação, sendo ligeiramente mais rápida na presença de iluminação e umidade.

O método desenvolvido e validado foi aplicado com sucesso na determinação dos agrotóxicos estudados em amostras de solos provenientes do cultivo convencional de hortaliças não folhosas e folhosas. Os agrotóxicos detectados mais frequentemente foram o tebuconazol (fungicida), que esteve presente em todas as amostras, o clorpirifós (inseticida) e o metribuzim (herbicida) e o fipronil (inseticida), o qual foi encontrado em maiores concentrações. Constatou-se que os produtores utilizam o mesmo princípio ativo para diferentes cultivos e na maioria dos casos utilizam princípios ativos não autorizados e que muitos desconhecem a sua proibição ou a ignoram em detrimento do custo benefício, gerando insegurança alimentar, contaminação ambiental e danos à saúde do trabalhador, do consumidor e de animais.

5.1 Sugestões de trabalhos futuros

- ✚ Aumento do escopo de agrotóxicos a serem analisados;
 - ✚ Validação do método QuEChERS “Acetato” em outros tipos de solo;
 - ✚ Avaliação da dissipação de produtos formulados em campo;
 - ✚ Avaliação da potencialidade de contaminação de águas subterrâneas pelos agrotóxicos estudados;
 - ✚ Avaliação do impacto ambiental na microbiota do solo causado pela contaminação do solo por agrotóxicos.
-

Capítulo VI: Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- 1 ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10–11, p. 772-789, 2004.
- 2 TSIPI, D.; BOTITSI, H.; ECONOMOU, A. **Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.
- 3 **Agriculture and Consumer Protection- International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4544e/y4544e00.htm>> Acesso em: dez. 2015.
- 4 RATHORE, H. S.; NOLLET, L. M. L. **Pesticides Evaluation of Environmental Pollution**. Boca Raton, Filadélfia CRC Press, 2012.
- 5 **Anvisa (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) - Lei proíbe agrotóxico DDT em todo país**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/200509.htm>> Acesso em: dez. 2015.
- 6 **IBAMA-Ministério do Meio Ambiente: Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambientalppa/pagina-4>> Acesso em: abr. 2016.
- 7 **IUPAC - PPDB Pesticide Properties Database**. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>> Acesso em: set. 2015.
- 8 STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the Modern World- Trends in Pesticides Analysis**. InTech, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/how-to-link/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticides-analysis>> Acesso em: out. 2015.
- 9 STEPHENSON, G.; RFERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG. Glossary of terms relating to pesticides. **Pure and Applied Chemistry**., v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.
- 10 ARCHANGELO, E. R.; KARAM, D.; FERREIRA, F.A.; PRATES, H.T.; FERREIRA, L.R.; CARDOSO, A.A. Sorção, dessorção e potencial de lixiviação de dimethenamid em solos brasileiros. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 467-477, 2004.
- 11 **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal - SINDIVEG**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/?p=764>> Acesso em: mar. 2016.
- 12 **Sindiveg: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolas-registra-queda-nas-vendas-em-2016/>> Acesso em: jan. 2018.
- 13 **Censo Agropecuário de 2006- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf> Acesso em: nov. 2017.

- 14 **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 16 de junho de 2014.** Disponível em < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/INC01_16_06_2014_pdf.pdf> Acesso em: dez. 2017.
- 15 **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Relatório das Análises de amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015** Brasília - DF 25 de novembro de 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8> Acesso em: dez. 2017.
- 16 **CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** Disponível em: < <http://solo.cetesb.sp.gov.br/> > Acesso em: jan. 2016.
- 17 MANAHAN, S. E. **Química Ambiental.** 9 ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.
- 18 **Food and Agriculture Organization of the United Nations - International Year of Soils 2015.** Disponível em: < <http://www.fao.org/globalsoilpartnership/iys-2015/en/> > Acesso em: 21 mar. 2016.
- 19 ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J.; MEJUTO, J. C.; GARCÍA-RÍO, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, n. 4, p. 247-260, 2008.
- 20 POSE-JUAN, E.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J.; ANDRADES, M. S.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S.; HERRERO-HERNÁNDEZ, E. Pesticide residues in vineyard soils from Spain: Spatial and temporal distributions. **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 351-358, 2015.
- 21 JACOBSEN, C. S.; HJELMSO, M. H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 15-20, 2014.
- 22 CYCOŃ, M.; WÓJCIK, M.; BORYMSKI, S.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multi-approach analysis. **Applied Soil Ecology**, v. 66, p. 8-18, 2013.
- 23 ZHANG, B.; ZHIHUI, B.; HOEFEL, D.; TANG, L.; WANG, X.; ZUMING, L.; ZHUANG, G. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1915-1922, 2009.
- 24 WANG, F.; YAO, J.; CHEN, H.; CHEN, K.; TREBŠE, P.; ZARAY, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos and its oxon derivatives to soil microbial activity by combined methods. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 319-326, 2010.
- 25 FERREIRA, E. P. D. B.; DUSI, A.N.; COSTA, J. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Assessing insecticide and fungicide effects on the culturable soil bacterial

- community by analyses of variance of their DGGE fingerprinting data. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 5–6, p. 466-472, 2009.
- 26 **Ministério da Saúde: PORTARIA Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: abr. 2016.
- 27 **National Primary Drinking Water Regulations- United States Environmental Protection Agency/ US EPA.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-06/documents/npwdr_complete_table.pdf> Acesso em: mar. 2018.
- 28 **CETESB - DECISÃO DE DIRETORIA Nº 256/2016/E, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2016.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016Intranet.pdf>> Acesso em: jan. 2018.
- 29 **Resolução CONAMA nº 420/2009 - Disposição sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e suas providências.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>> Acesso em: 02 jan. 2018.
- 30 **Dutch Target and Intervention Values.** Disponível em: <<http://esdat.net/Environmental%20Standards/Dutch/ENGELSE%20versie%20circulaire%20Bodemsanering%202009.pdf>> Acesso em: mar. 2018.
- 31 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- 32 MORAIS, L. S. R. D. **Desenvolvimento e Validação de Métodos para a Determinação de Agrotóxicos em Água e Solo das Áreas de Recarga do Aquífero Guarani, na Região das Nascentes do Rio Araguaia, MG/GO.** 2009. (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 33 RODIL, R.; POPP, P. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1–2, p. 82-90, 2006.
- 34 VERA, J.; CORREIA-SÁ, L.; PAÍGA, P.; BRAGANÇA, I.; FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. QuEChERS and soil analysis. An overview. **Sample Preparation**, p. 54-77, 2013.
- 35 NAEENI, M. H.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, n. 3, p. 219-226, 2011.
- 36 CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 191-219, 2008.

- 37 WANG, Z.; ZHAO, X.; XU, X.; WU, L.; SU, R.; ZHAO, Y.; JIANG, C.; ZHANG, H.; MA, Q.; LU, C.; DONG, D. An absorbing microwave micro-solid-phase extraction device used in non-polar solvent microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 760, p. 60-68, 2013.
- 38 SHEN, G.; LEE, H. K. Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n. 1–2, p. 167-174, 2003.
- 39 SUN, L.; LEE, H. K. Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1014, n. 1–2, p. 165-177, 2003.
- 40 WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, n. 2, p. 211-222, 2007.
- 41 GARCÍA-LÓPEZ, M.; CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 3, p. 963-974, 2008.
- 42 CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; STAMPACHIACCHIERE, S.; VENTURA, S.; LAGANA, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186-193, 2015.
- 43 CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; GIANSAANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2521-2532, 2010.
- 44 CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LAGANÀ, A.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 53-66, 2013.
- 45 WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; MA, Y.; XU, S.; ZHANG, Z.; NIU, Z.; CHOO, J. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled to micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of triazines in soil, fruit, and vegetable samples. **Electrophoresis**, v. 33, n. 15, p. 2454-2463, 2012.
- 46 SALEMI, A.; SHAFIEI, E.; VOSOUGH, M. Optimization of matrix solid phase dispersion coupled with gas chromatography electron capture detection for determination of chlorinated pesticides in soil. **Talanta**, v. 101, p. 504-509, 2012.
- 47 RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.
- 48 SAITO, Y.; JINNO, K. Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 53-67, 2003.
- 49 PASTOR-BELDA, M.; GARRIDO, I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HELLÍN, P.; FLORES, P.; FENOLL, J. Dispersive liquid–liquid microextraction for the

- determination of new generation pesticides in soils by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1394, p. 1-8, 2015.
- 50 HOU, L.; LEE, H. K. Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 37-42, 2004.
- 51 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.
- 52 LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, 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, 2005.
- 53 ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TAŞDELEN, B.; ŠTAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: (Ed.). **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. cap. 46. p.439-458.
- 54 PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- 55 BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. D.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de Amostras para Análises de Compostos Orgânicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- 56 LESUEUR, C.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 284-293, 2008.
- 57 PICÓ, Y.; RODRÍGUEZ, R.; MAÑES, J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 133-151, 2003.
- 58 LIU, N.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; CHEN, Z.; TAO, Y.; PAN, X.; CHEN, X.; ZHENG, Y. Stereoselective determination of tebuconazole in water and zebrafish by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 28, p. 6297-303, 2015.
- 59 TAO, Y.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; CHENG, Y.; LIU, N.; CHEN, Z.; ZHENG, Y. Green and sensitive supercritical fluid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the separation and determination of flutriafol enantiomers in vegetables, fruits, and soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11457-11464, 2014.
- 60 CHEN, Z.; DONG, F.; LI, S.; ZHENG, Z.; XU, Y.; XU, J.; LIU, X.; ZHENG, Y. Response surface methodology for the enantioseparation of dinotefuran and its chiral metabolite in bee products and environmental samples by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1410, p. 181-189, 2015.

- ⁶¹ CHEN, Z.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; CHENG, Y.; LIU, N.; TAO, Y.; PAN, X.; ZHENG, Y. Stereoselective separation and pharmacokinetic dissipation of the chiral neonicotinoid sulfoxaflor in soil by ultraperformance convergence chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 26, p. 6677-6690, 2014.
- ⁶² DOST, K.; JONES, D. C.; AUERBACH, R.; DAVIDSON, G. Determination of pesticides in soil samples by supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, n. 10, p. 1751-1755, 2000.
- ⁶³ DEL CARMEN SALVATIERRA-STAMP, V.; CEBALLOS-MAGANA, S. G.; GONZALEZ, J.; IBARRA-GALVAN, V.; MUNIZ-VALENCIA, R. Analytical method development for the determination of emerging contaminants in water using supercritical-fluid chromatography coupled with diode-array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 14, p. 4219-4226, 2015.
- ⁶⁴ PICÓ, Y. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. In: (Ed.). **Food Toxicants Analysis : Techniques, Strategies and Developments**. 1: Elsevier Science, 2007. cap. 14, p.509-559.
- ⁶⁵ MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.
- ⁶⁶ **Figura adaptada -University of Bristol.** Disponível em: < <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html> > Acesso em: out. 2017.
- ⁶⁷ MALLET, A. I.; DOWN, S. **Dictionary of Mass Spectrometry**. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009.
- ⁶⁸ MORENO-GONZÁLEZ, D.; LARA, F. J.; DEL OLMO-IRUELA, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. **Trends in Multiresidue Analysis**. Encyclopedia of Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-39. 2015.
- ⁶⁹ HURTADO-SANCHEZ, M. C.; ROMERO-GONZALEZ, R.; RODRIGUEZ-CACERES, M. I.; DURAN-MERAS, I.; FRENICH, A. G. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 193-202, 2013.
- ⁷⁰ MEI, M.; DU, Z.-X.; CEN, Y. QuEChERS-Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Five Currently Used Herbicides. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1659-1664, 2011.
- ⁷¹ SUN, J.; FENG, N.; TANG, C.; QIN, D. Determination of cyantraniliprole and its major metabolite residues in pakchoi and soil using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 845-852, 2012.

- 72 ZHANG, F.; WANG, L.; ZHOU, L.; WU, D.; PAN, H.; PAN, C. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 116-122, 2012.
- 73 ZHANG, J. M.; CHAI, W. G.; WU, Y. L. Residues of chlorantraniliprole in rice field ecosystem. **Chemosphere**, v. 87, n. 2, p. 132-136, 2012.
- 74 LI, Y.; DONG, F.; LIU, X.; XU, J.; LI, J.; KONG, Z.; CHEN, X.; SONG, W.; WANG, Y.; ZHENG, Y. Simultaneous enantioselective determination of fenbuconazole and its main metabolites in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6667-6674, 2011.
- 75 CARNEIRO, R. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; MADUREIRA, F. D.; SILVA, G.; DE SOUZA, W. R.; LOPES, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 413-423, 2013.
- 76 OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273-1281, 2015.
- 77 MARCHIS, D.; FERRO, G. L.; BRIZIO, P.; SQUADRONE, S.; ABETE, M. C. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 270-273, 2012.
- 78 HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 66, p. 270-282, 2016.
- 79 CHOI, S.; KIM, S.; SHIN, J. Y.; KIM, M.; KIM, J. H. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1236-1242, 2015.
- 80 WANG, X.-C.; SHU, B.; LI, S.; YANG, Z.G.; QIU, B. QuEChERS followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. **Talanta**, v. 162, p. 90-97, 2017.
- 81 KVICALOVA, M.; DOUBRAVOVA, P.; JOBANEK, R.; JOKESOVA, M.; OCENASKOVA, V.; SUSSENBKOVA, H.; SVOBODOVA, A. Application of different extraction methods for the determination of selected pesticide residues in sediments. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 21-26, 2012.
- 82 CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 11918-11926, 2011.

- 83 FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V.C.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 2, p. 376-382, 2013.
- 84 MANTZOS, N.; KARAKITSOU, A.; ZIORIS, I.; LENETI, E.; KONSTANTINO, I. QuEChERS and solid phase extraction methods for the determination of energy crop pesticides in soil, plant and runoff water matrices. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 15, p. 1566–1584, 2013.
- 85 CORREIA-SÁ, L.; FERNANDES, V. C.; CARVALHO, M.; CALHAU, C.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. Optimization of QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in soils with diverse organic matter. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 12, p. 1521-1530, 2012.
- 86 KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B.; JANKOWSKA, M.; HRYNKO, I. Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction. **Talanta**, v. 152, p. 127-136, 2016.
- 87 DANKYI, E.; GORDON, C.; CARBOO, D.; FOMSGAARD, I. S. Quantification of neonicotinoid insecticide residues in soils from cocoa plantations using a QuEChERS extraction procedure and LC-MS/MS. **Science of The Total Environment**, v. 499, p. 276-283, 2014.
- 88 PANG, N.; WANG, T.; HU, J. Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 190, n. Supplement C, p. 793-800, 2016.
- 89 MASÍÁ, A.; VÁSQUEZ, K.; CAMPO, J.; PICÓ, Y. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. **Journal of Chromatography A**, v. 1378, p. 19-31, 2015.
- 90 MASÍÁ, A.; CAMPO, J.; VÁZQUEZ-ROIG, P.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 263, n. Part 1, p. 95-104, 2013.
- 91 **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fd6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b> Acesso em: dez. 2017.
- 92 **Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – Julho de 2011.** Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf> Acesso em: dez. 2017.
- 93 **European Commission- Directorate General for Healph and Food Safety. SANTE/ 11945/2015- Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.** Disponível em: <<http://www.eurl->

- pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_SANTE_2015_11945.pdf> Acesso em: abr. 2016.
- 94 RIBANI, M.; CARLA BEATRIZ GRESPAN 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, 2004.
- 95 **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários.** Disponível em < <https://bibliotecaquimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/guia-de-validac3a7c3a3o-e-controle-de-qualidade-analc3adtica.pdf> > Acesso em: dez. 2017
- 96 FENG, X.; HE, Z.; WANG, L.; PENG, Y.; LUO, M.; LIU, X. Multiresidue analysis of 36 pesticides in soil using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method by liquid chromatography with tandem quadruple linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, p. 1-8, 2015.
- 97 VICARI, M. C. D. **Desenvolvimento de Método para a Determinação Simultânea de Resíduos de Agrotóxicos e Medicamentos Veterinários em Solo por UHPLC-MS/MS.** 2013. (Doutorado). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- Rio Grande do Sul.
- 98 LEHOTAY, S. J.; MAÛTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, 2005.
- 99 CAMPOS, R. S. D.; CARNEIRO, C. D. R. Geologia da região de Atibaia e possíveis causas das inundações de 2009 e 2010. **Terra**, v. 10, n. (1-2), p. 21-35, 2015.
- 100 **Mapa Pedológico do Estado de São Paulo.** Disponível em: < http://www.iac.sp.gov.br/solosp/pdf/mapa_pedologico_Solos_Estado_de_Sao_Paulo.pdf > Acesso em: nov. 2017.
- 101 RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J. A.; MINGORANCE, M. D.; PEÑA, A. Pesticide sorption on two contrasting mining soils by addition of organic wastes: Effect of organic matter composition and soil solution properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 435, n. Supplement C, p. 71-77, 2013.
- 102 PAPADOPOULOU, E. S.; KARAS, P. A.; NIKOLAKI, S.; STORCK, V.; FERRARI, F.; TREVISAN, M.; TSIAMIS, G.; MARTIN-LAURENT, F.; KARPOUZAS, D. G. Dissipation and adsorption of isoproturon, tebuconazole, chlorpyrifos and their main transformation products under laboratory and field conditions. **Science of The Total Environment**, v. 569-570, n. Supplement C, p. 86-96, 2016.
- 103 **Defensivos Agrícolas - Como evitar danos à saúde e ao meio ambiente.** Disponível em: < https://www.ifc.org/wps/wcm/connect/4a761f00437b4db7b3afbb869243d457/IPAM_Del15+_Agrochemical+booklet.pdf?MOD=AJPERES > Acesso em: jan. 2018.

Dissertação de Mestrado

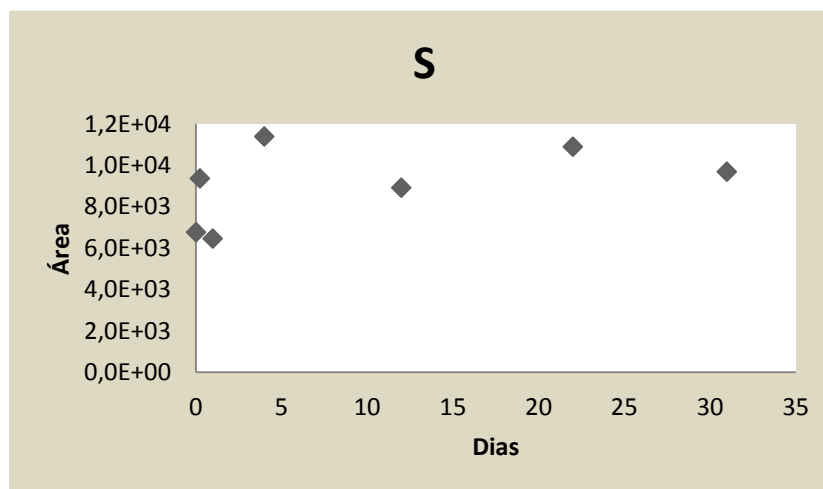
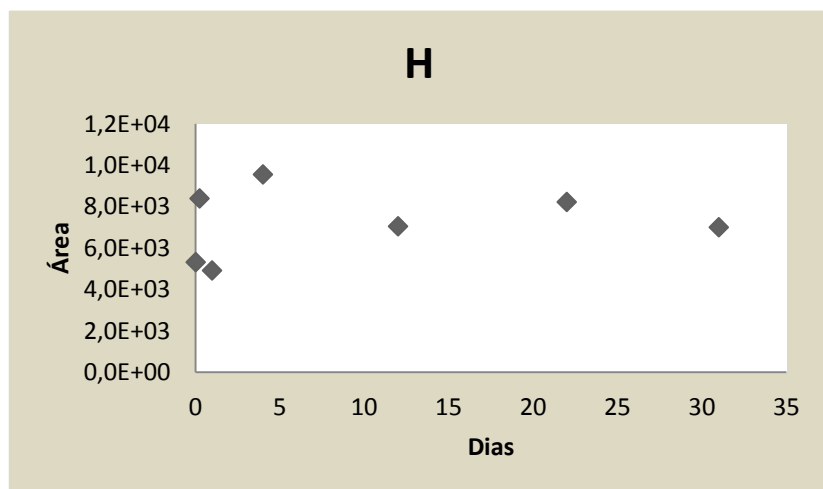
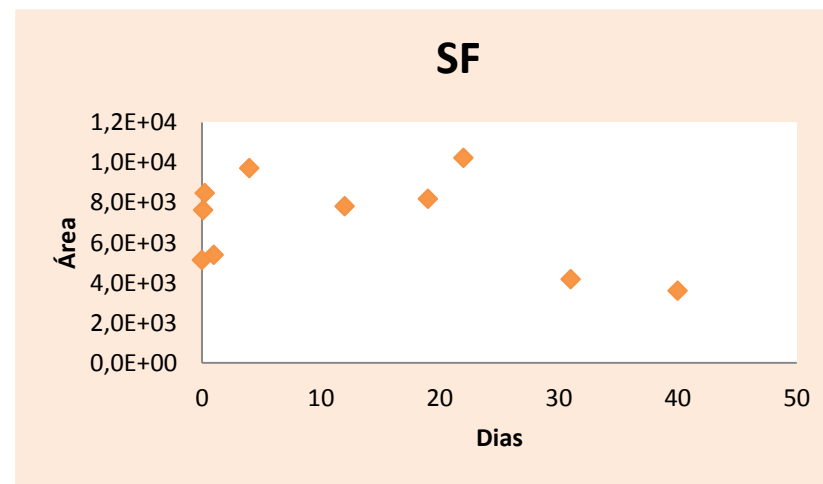
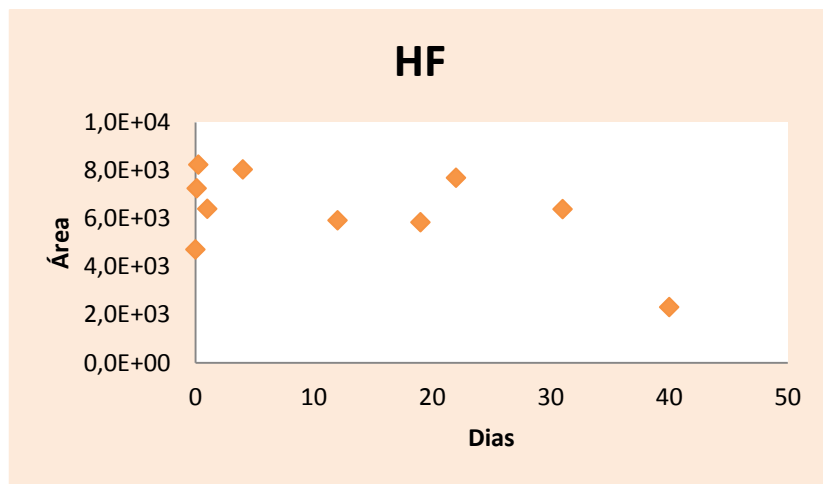
- ¹⁰⁴ KHAN, M. A.; BROWN, C. D. Influence of commercial formulation on leaching of four pesticides through soil. **Science of The Total Environment**, v. 573, n. Supplement C, p. 1573-1579, 2016.
- ¹⁰⁵ ZHANG, F.; WANG, L.; ZHOU, L.; WU, D.; PAN, H.; PAN, C. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 116-122, 2012.
-

Capítulo VII: Apêndice

*Gráficos de dissipação de produtos
formulados: Matriz Solo I*

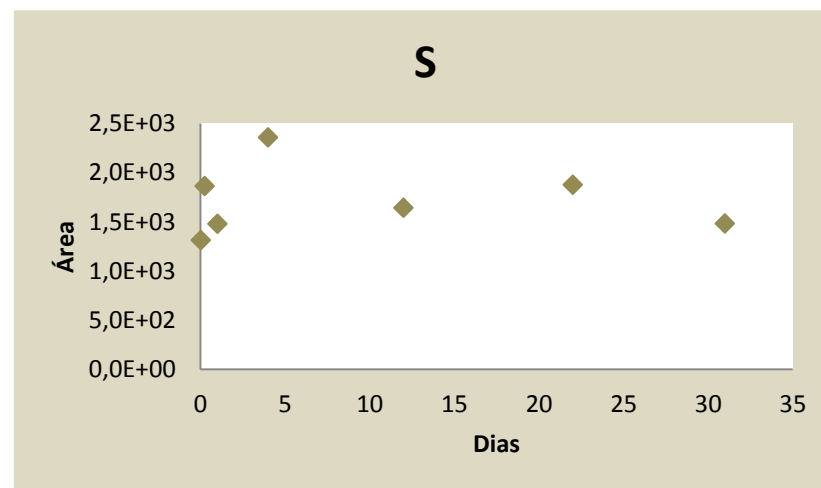
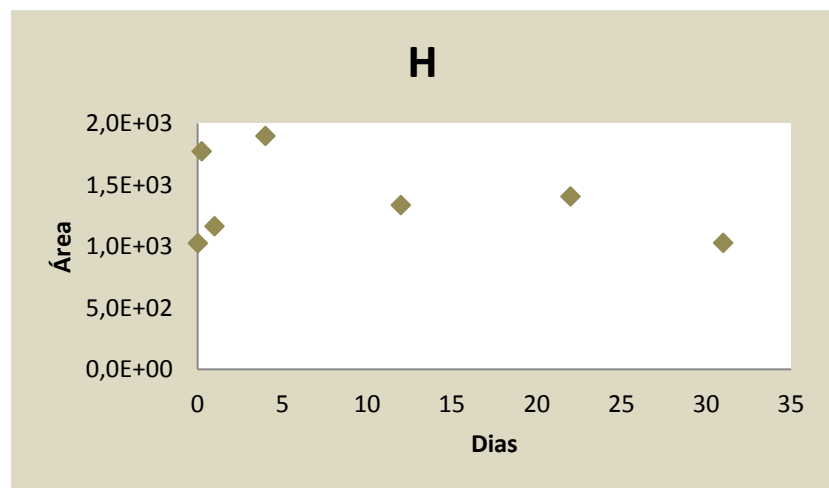
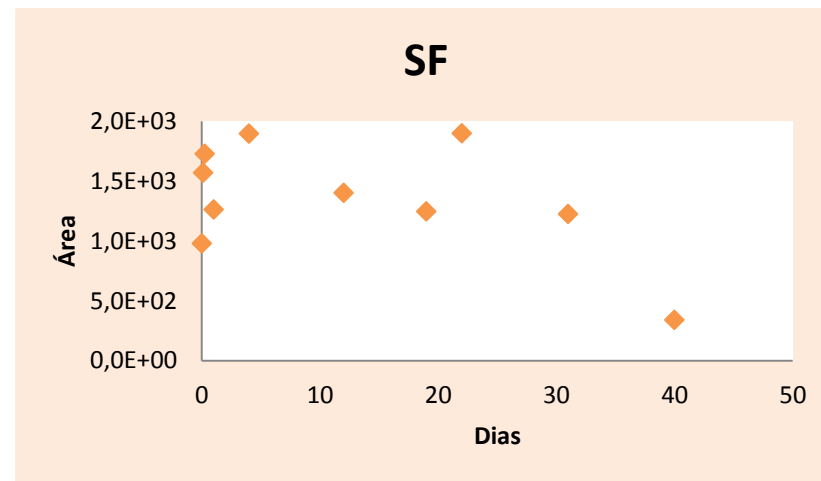
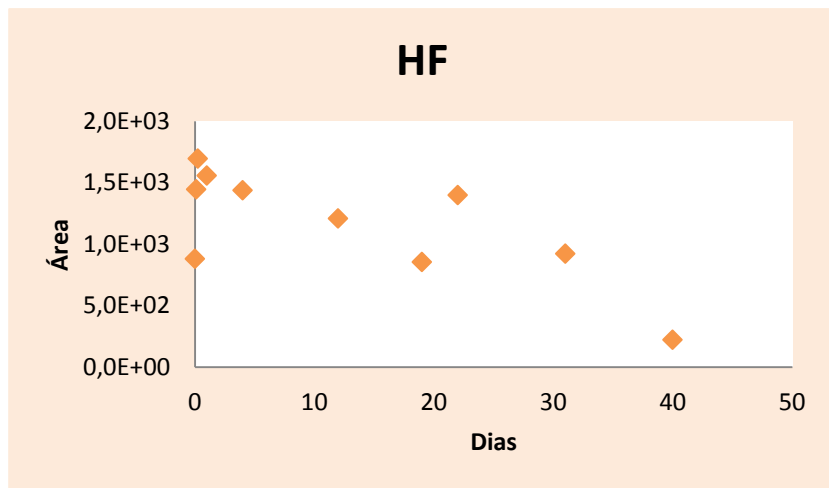
Dissertação de Mestrado

Azoxistrobina



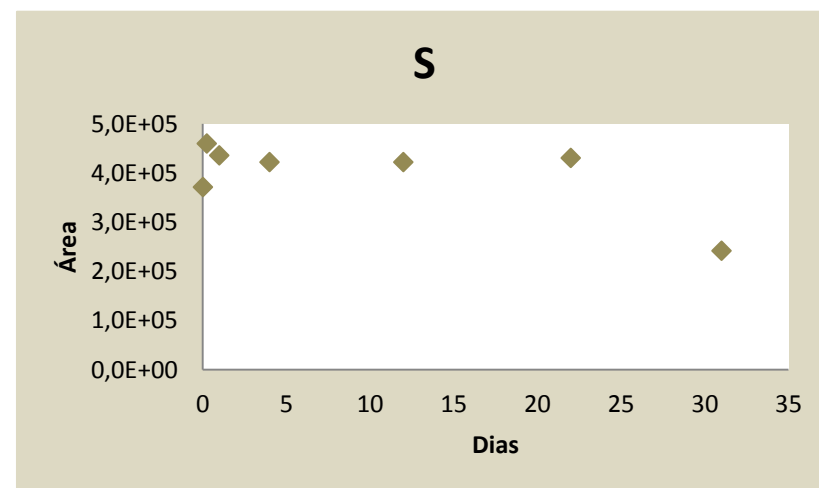
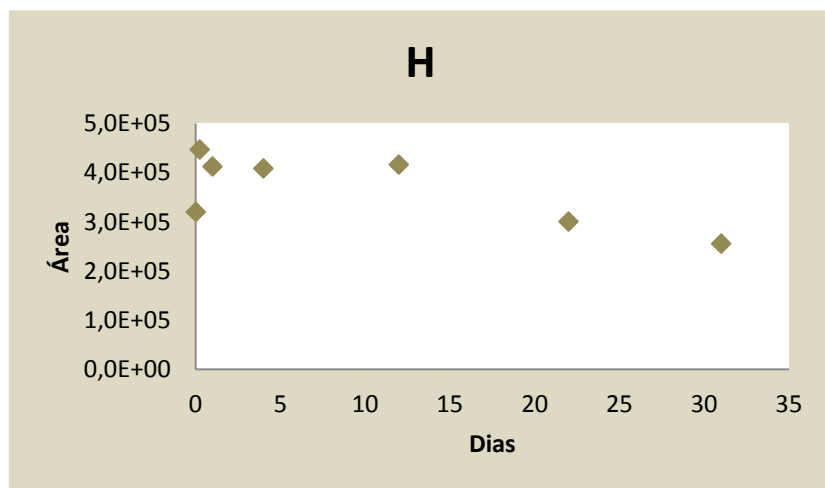
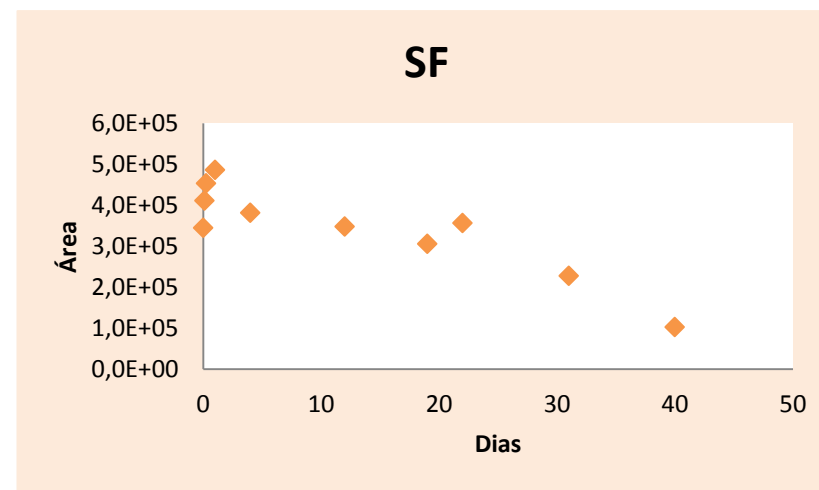
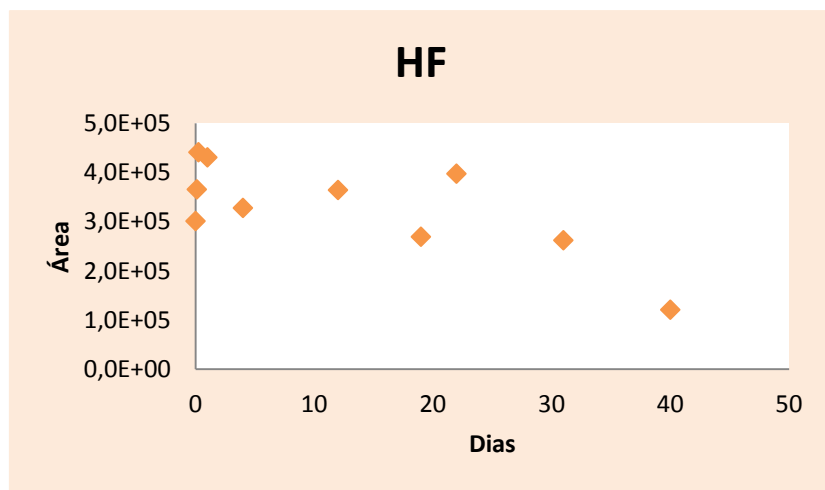
Dissertação de Mestrado

Clorantraniliprole



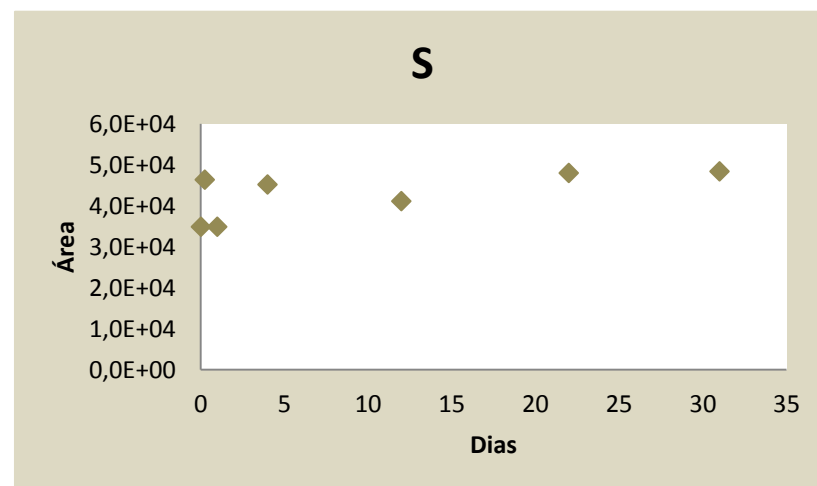
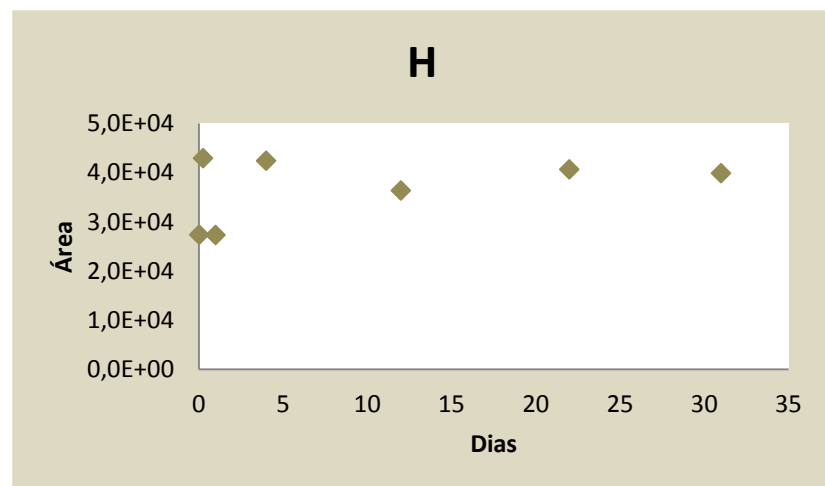
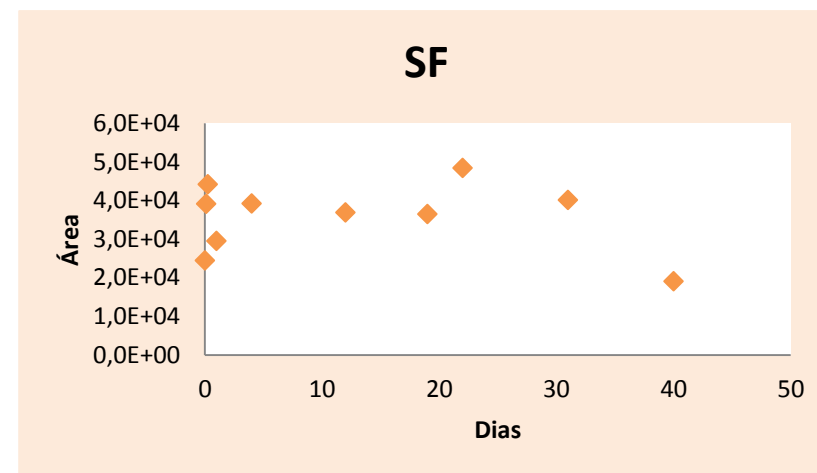
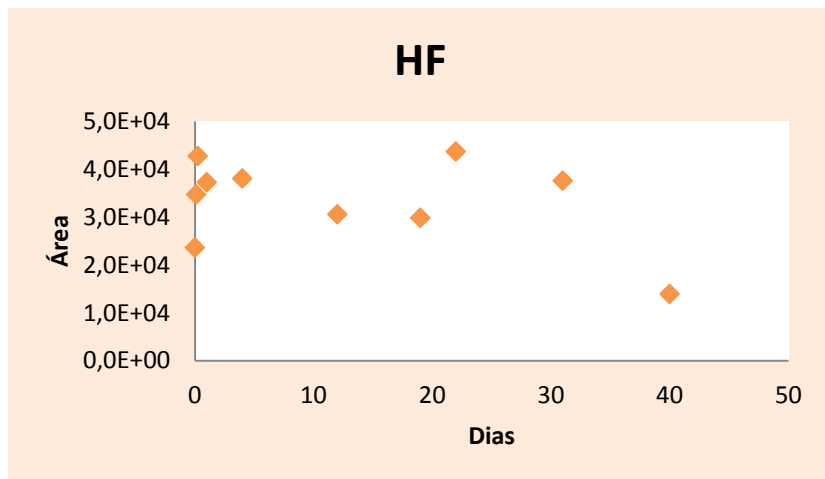
Dissertação de Mestrado

Clorpirifós



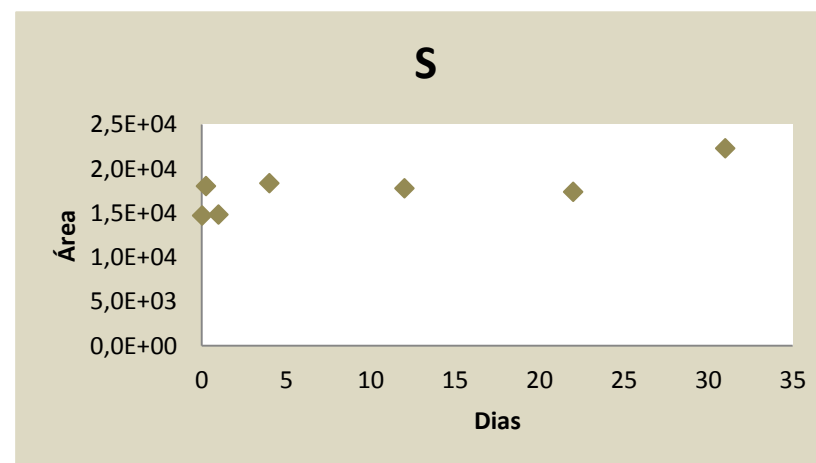
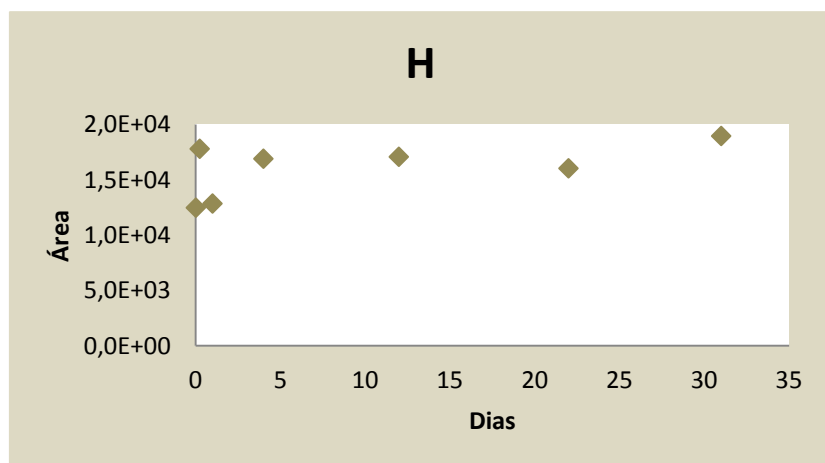
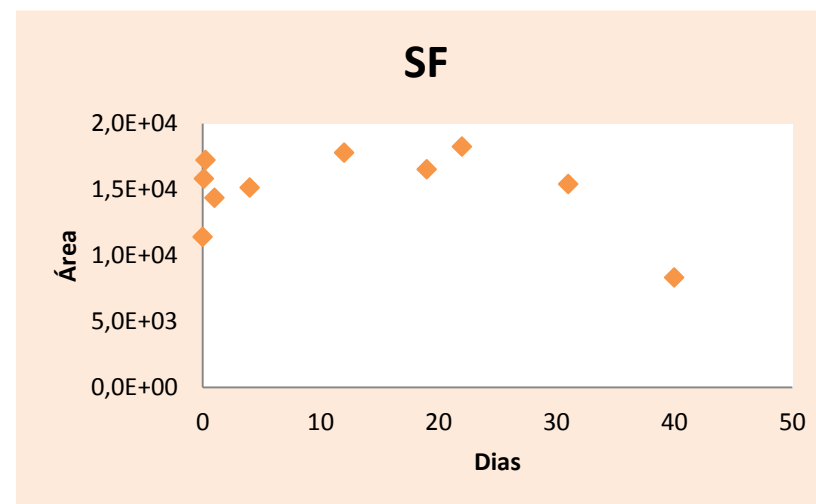
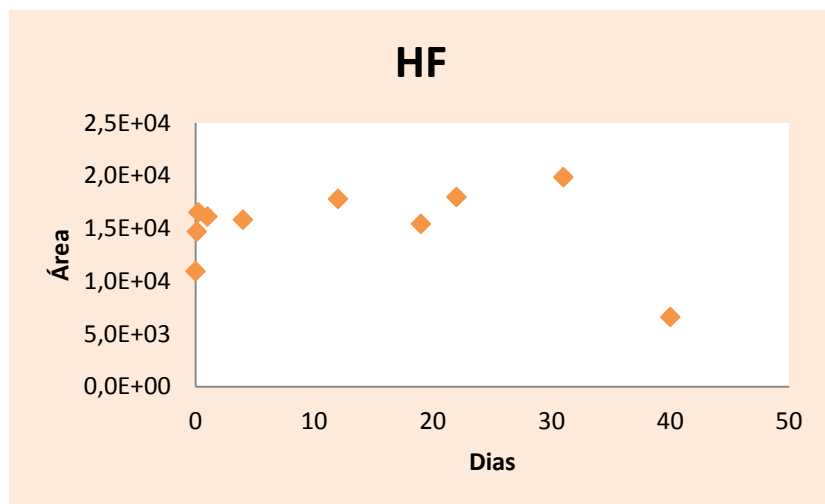
Dissertação de Mestrado

Difenoconazol



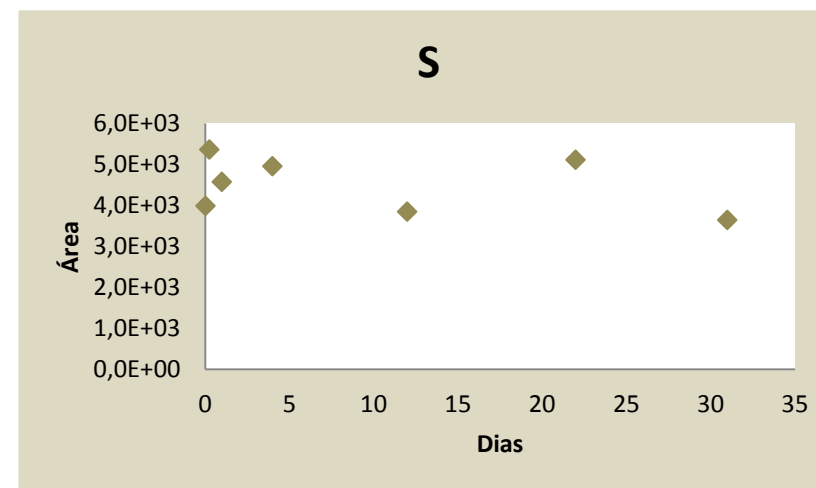
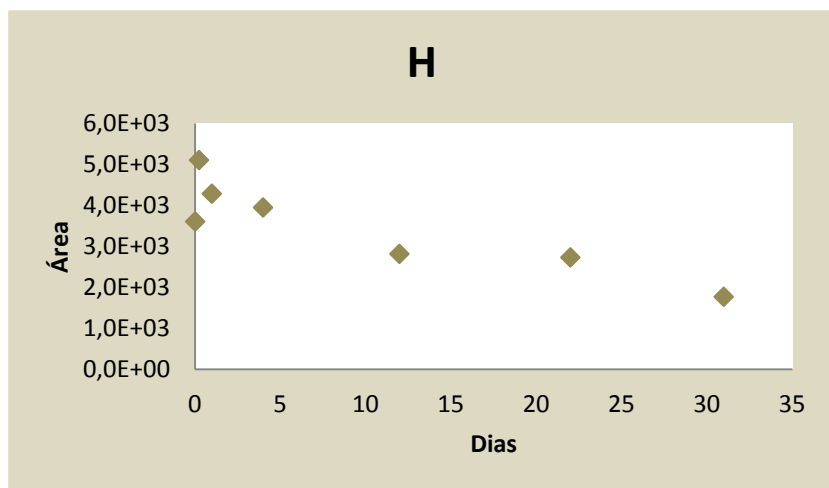
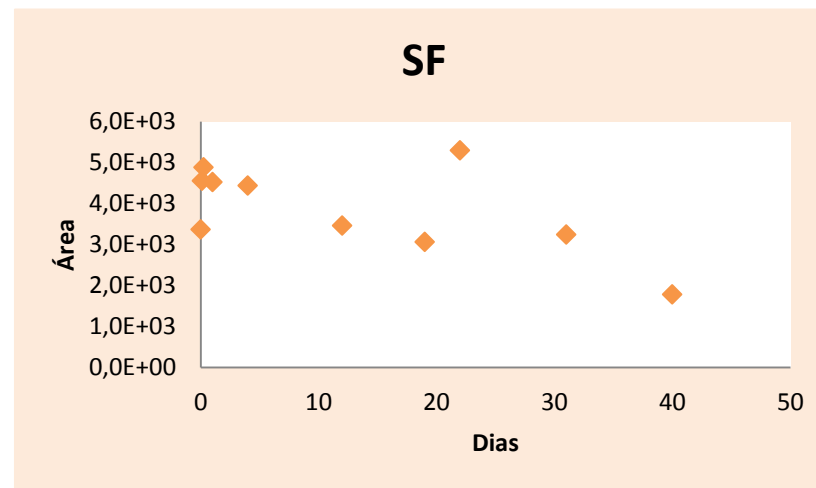
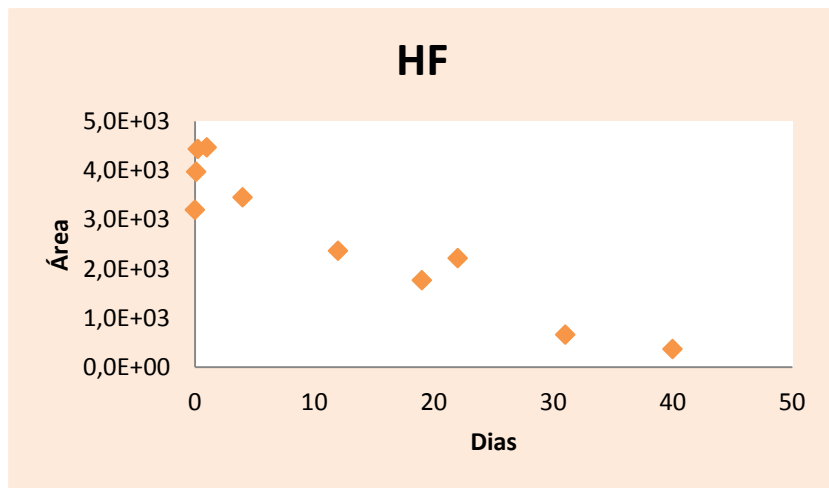
Dissertação de Mestrado

Fipronil



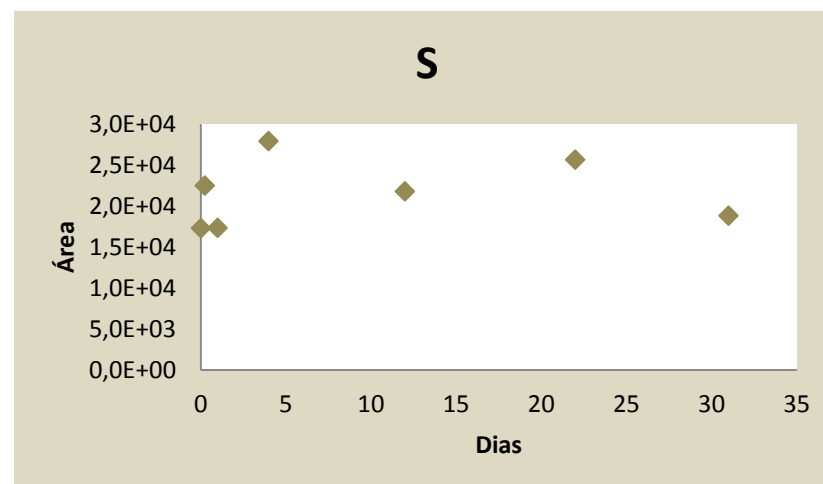
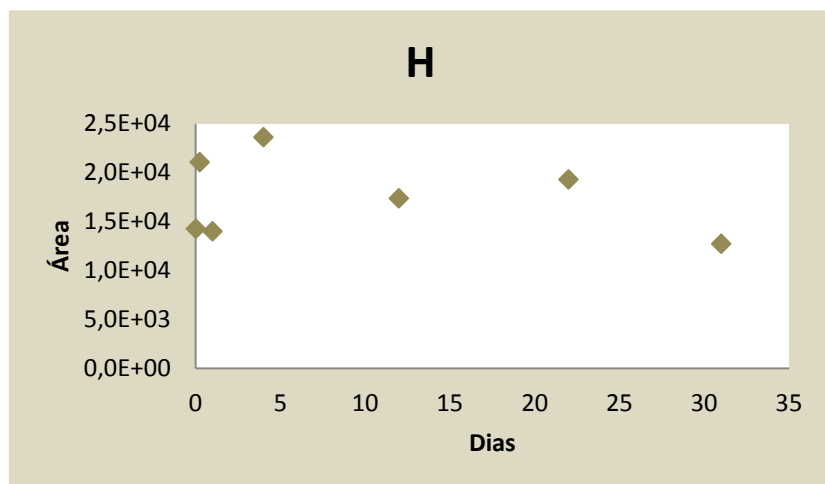
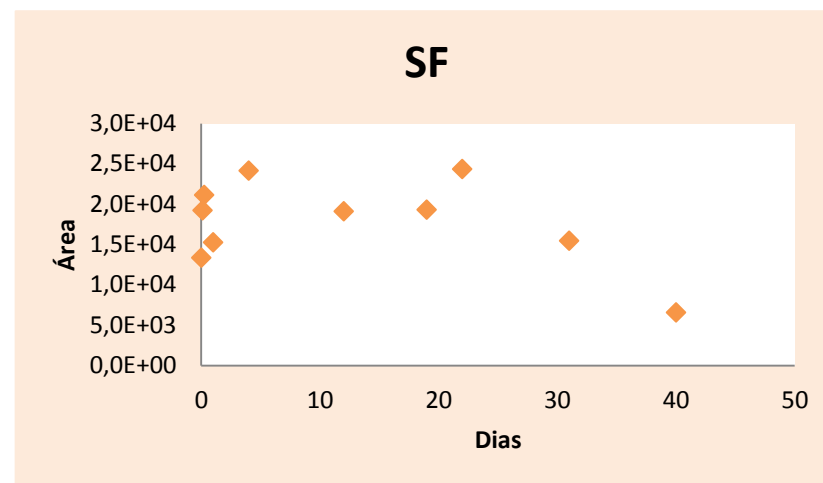
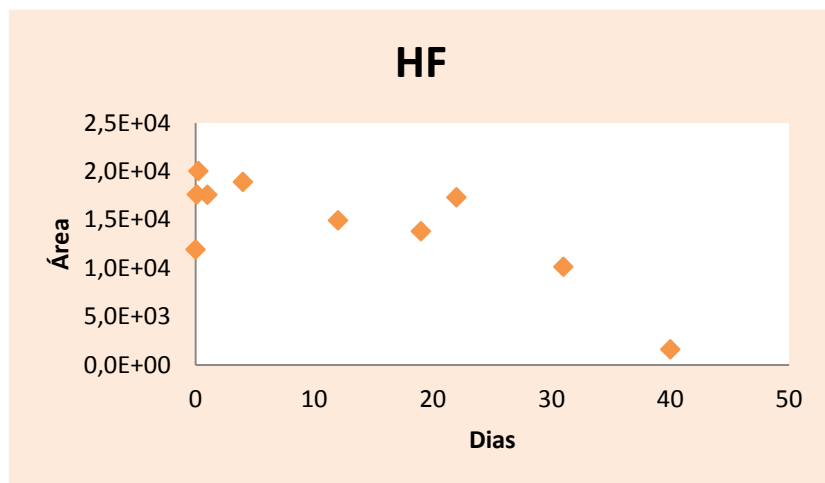
Dissertação de Mestrado

Imidacloprido



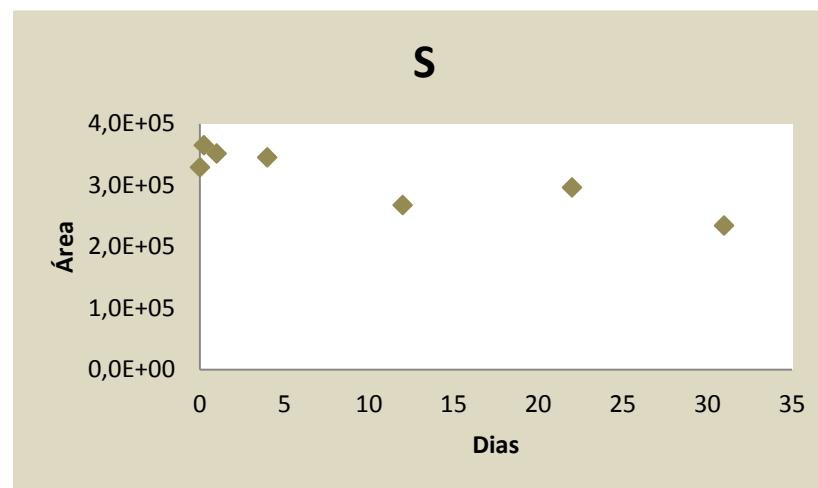
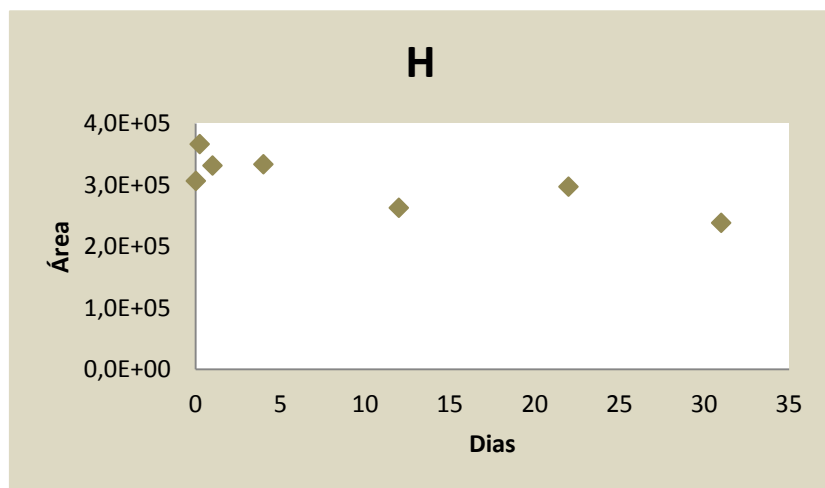
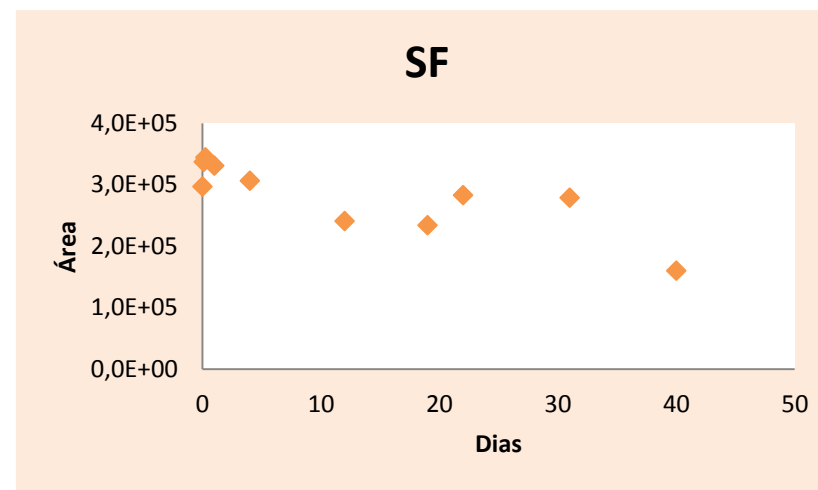
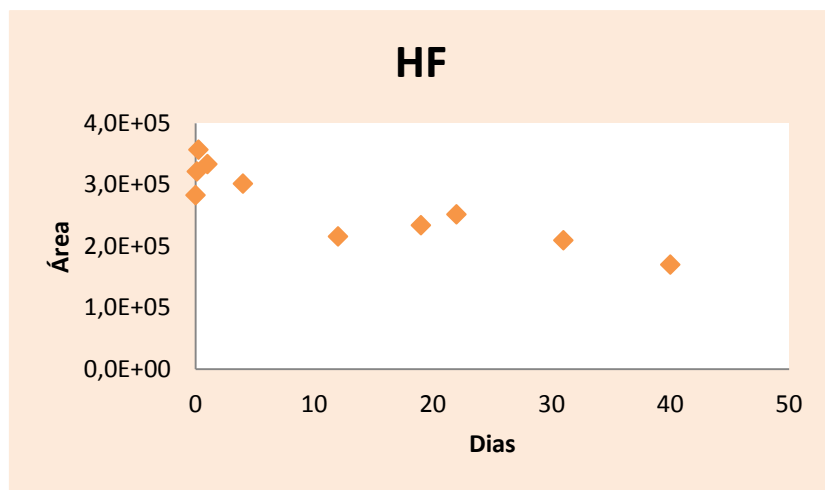
Dissertação de Mestrado

Mandipropamida



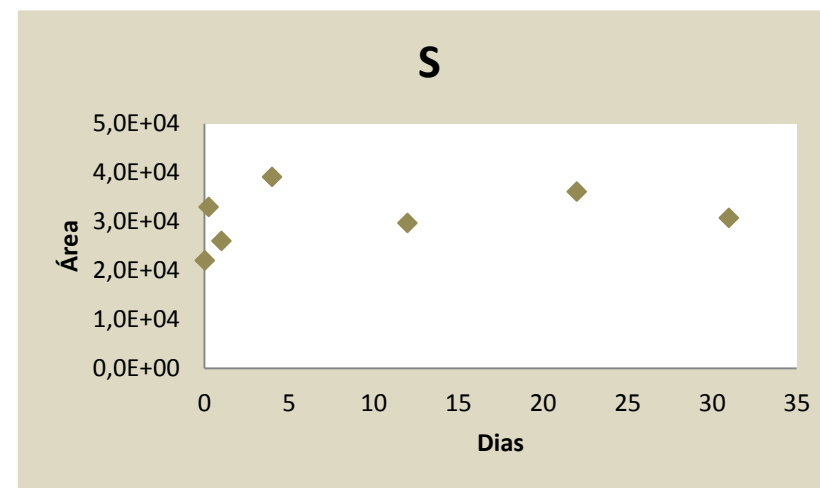
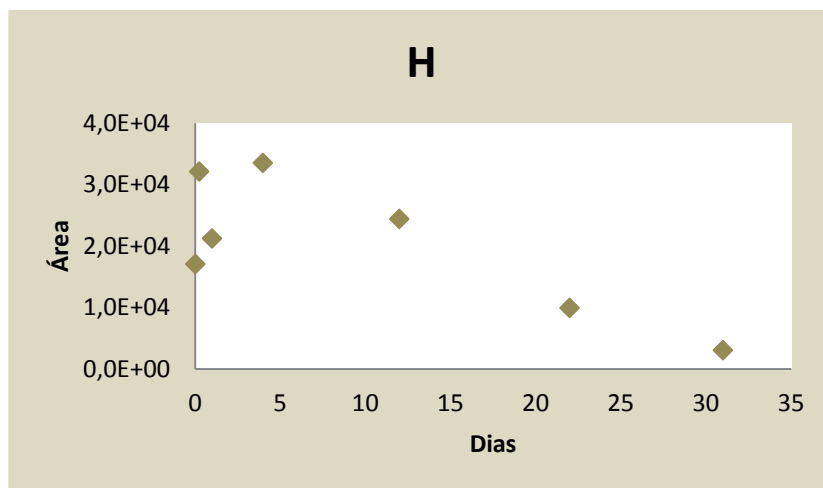
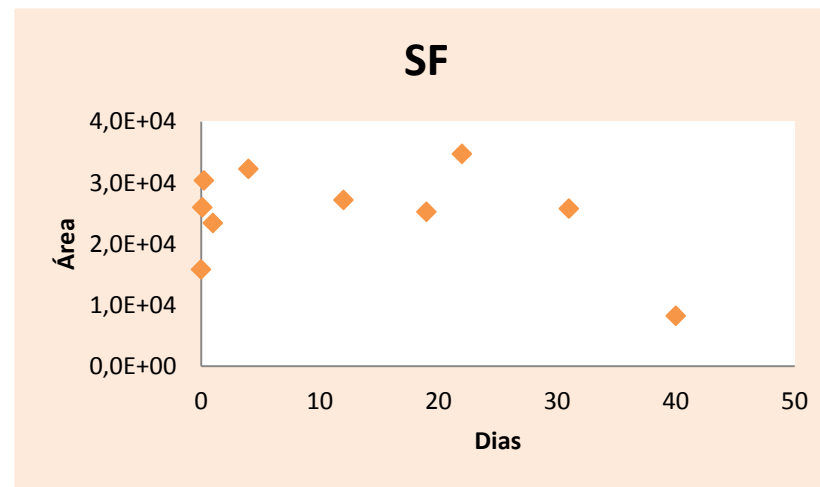
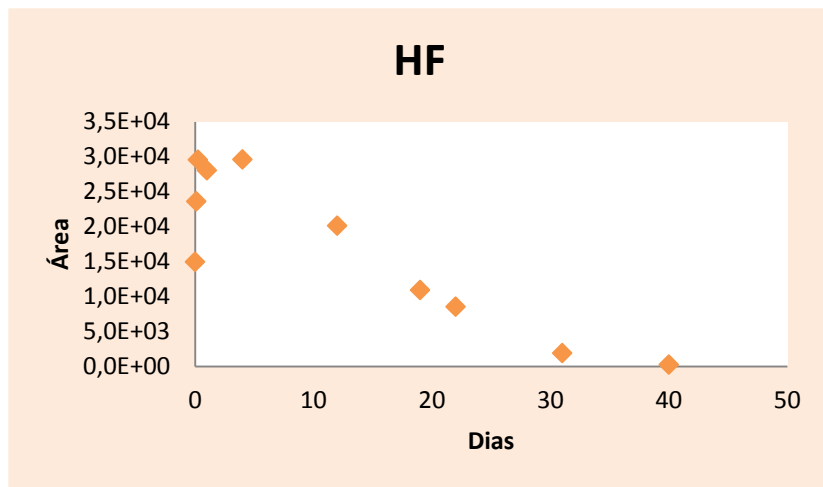
Dissertação de Mestrado

Metribuzim



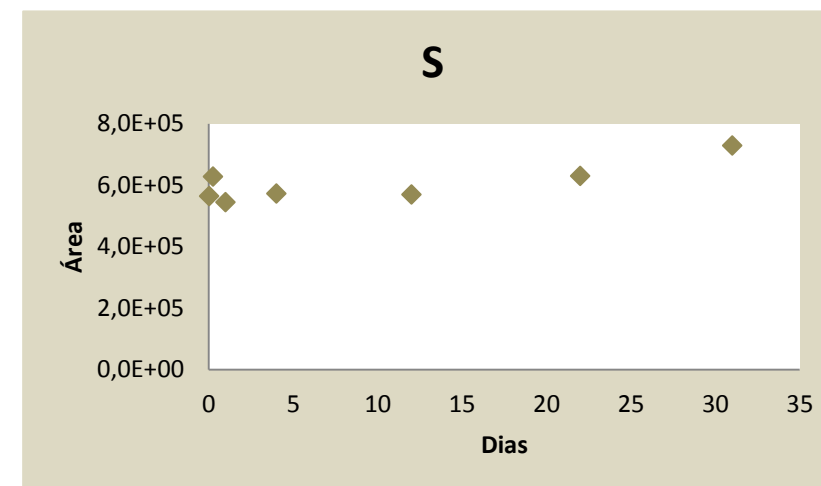
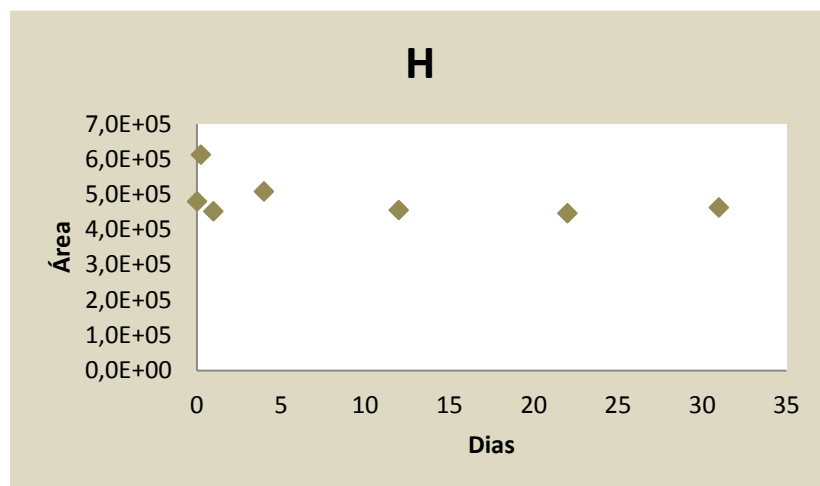
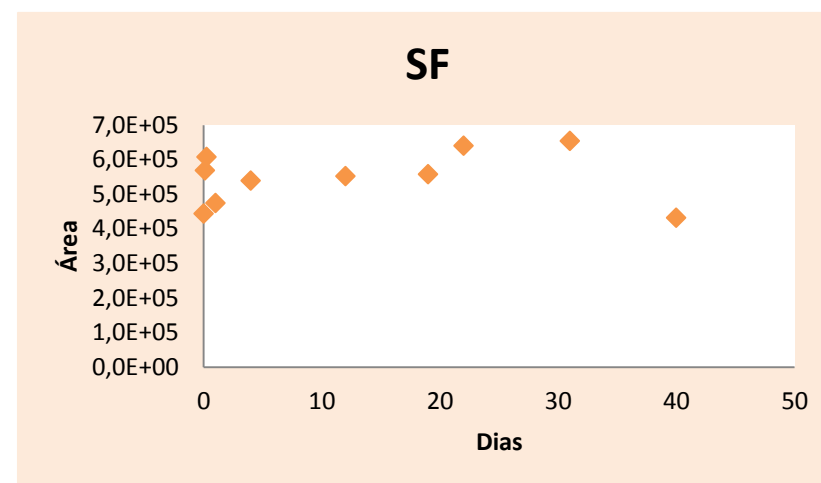
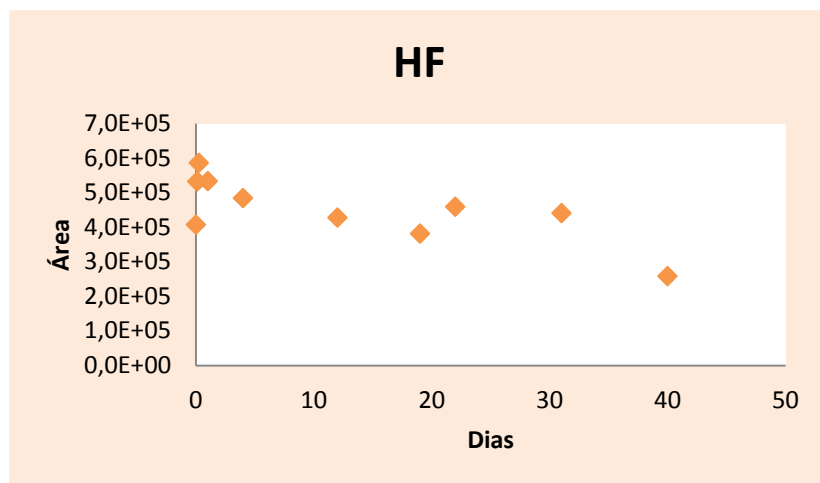
Dissertação de Mestrado

Piraclostrobina



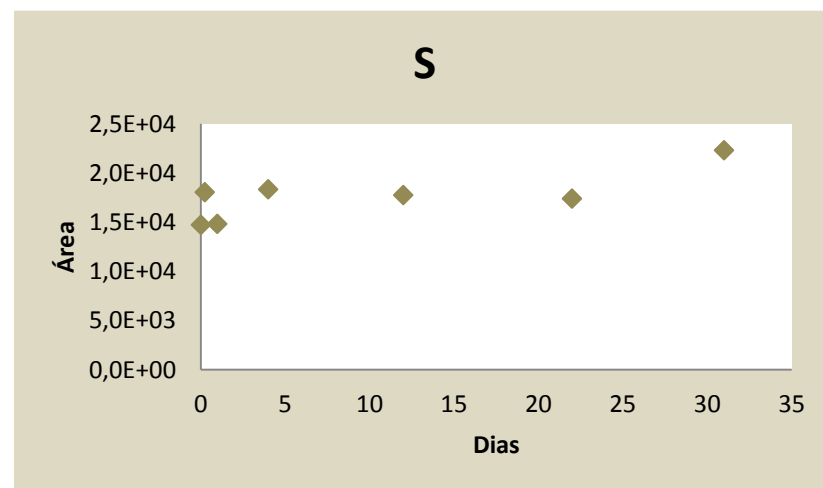
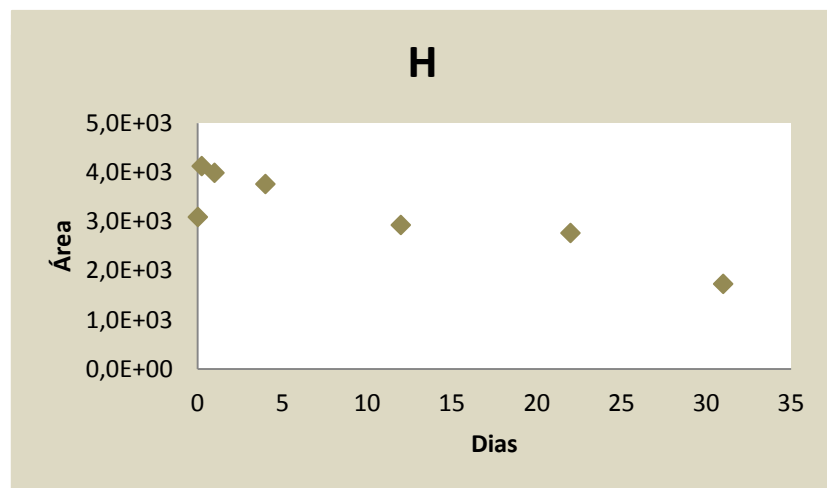
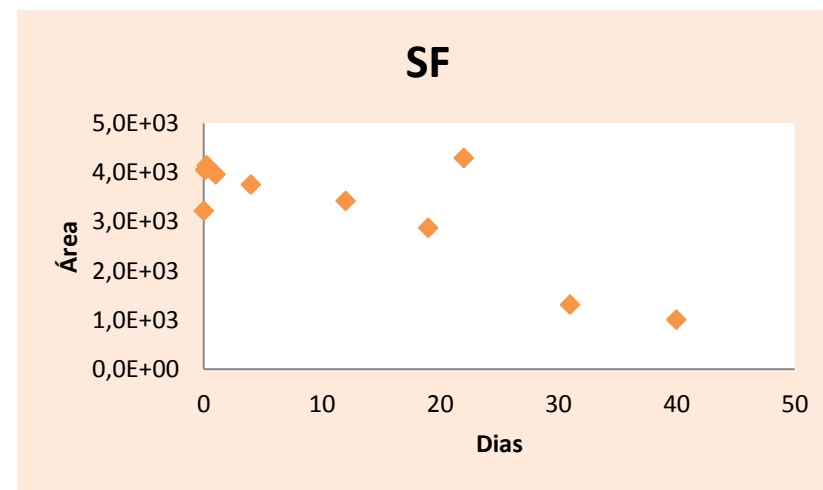
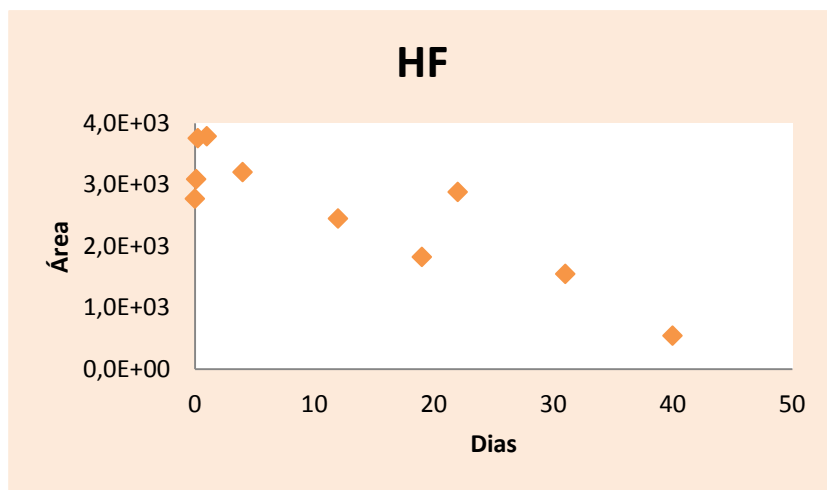
Dissertação de Mestrado

Tebuconazol



Dissertação de Mestrado

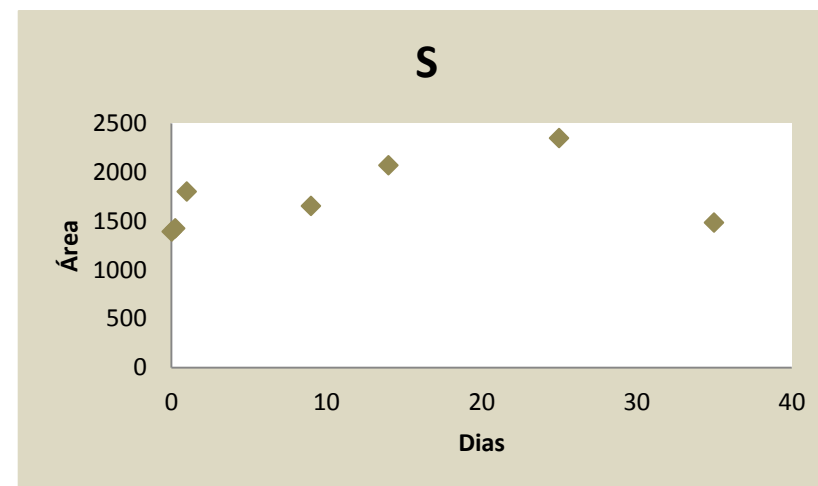
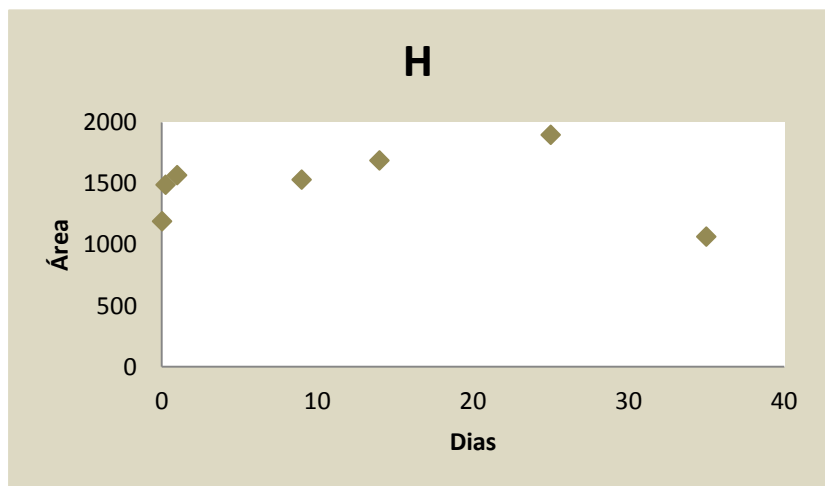
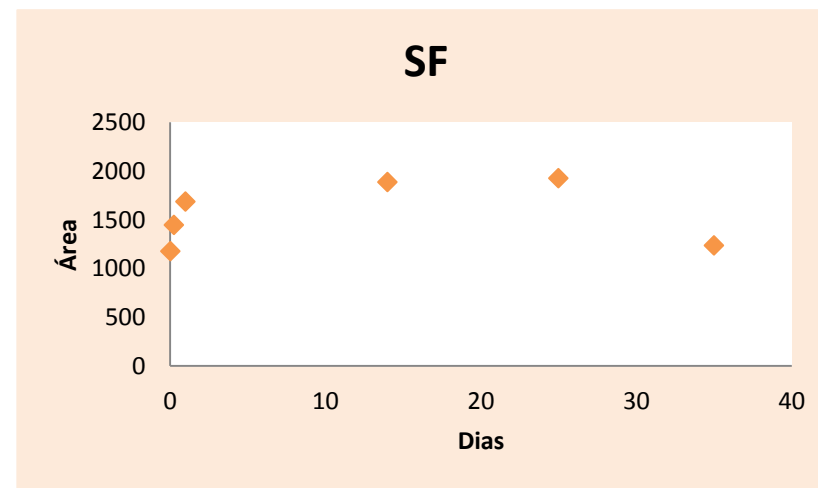
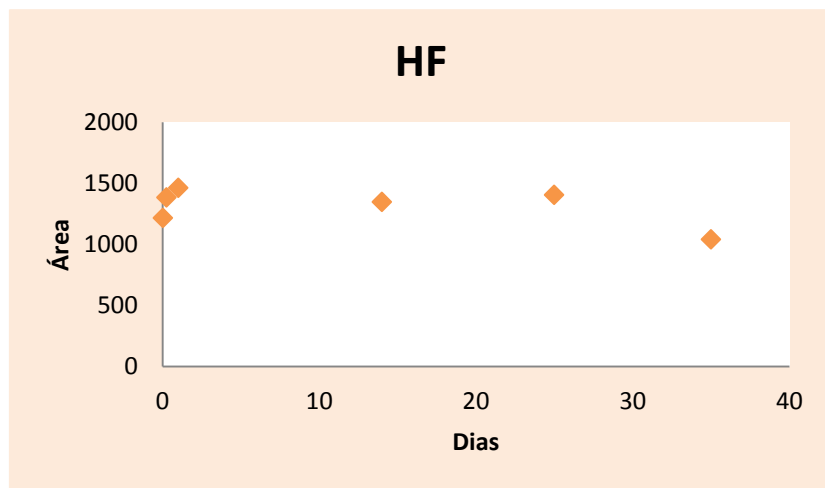
Tiametoxam



*Gráficos de dissipação de produtos
formulados: Matriz Solo II*

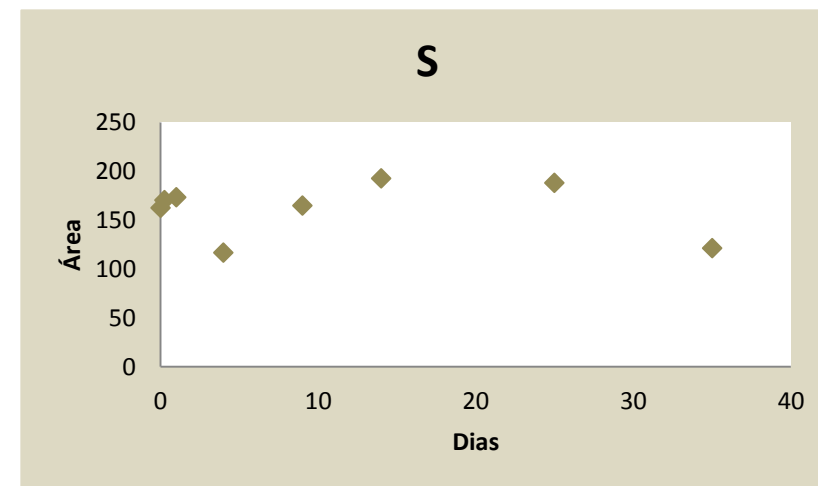
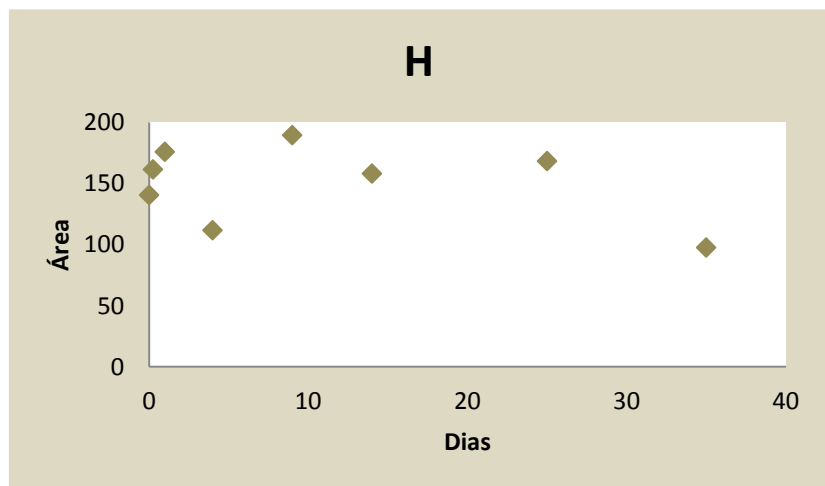
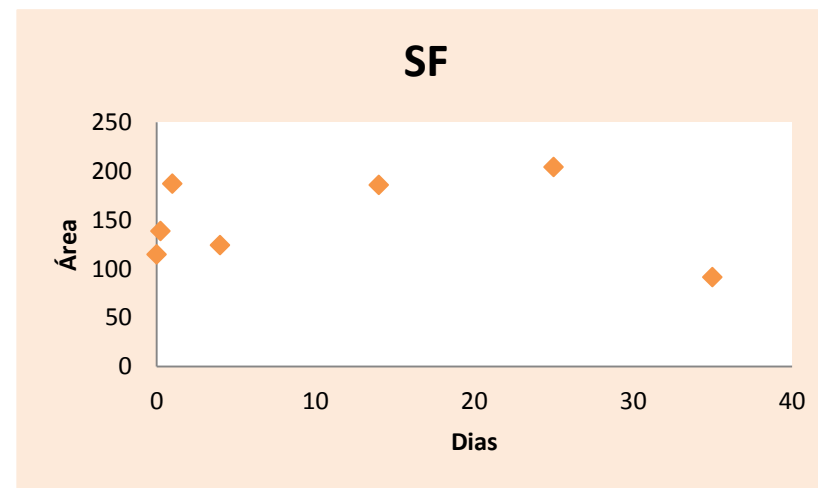
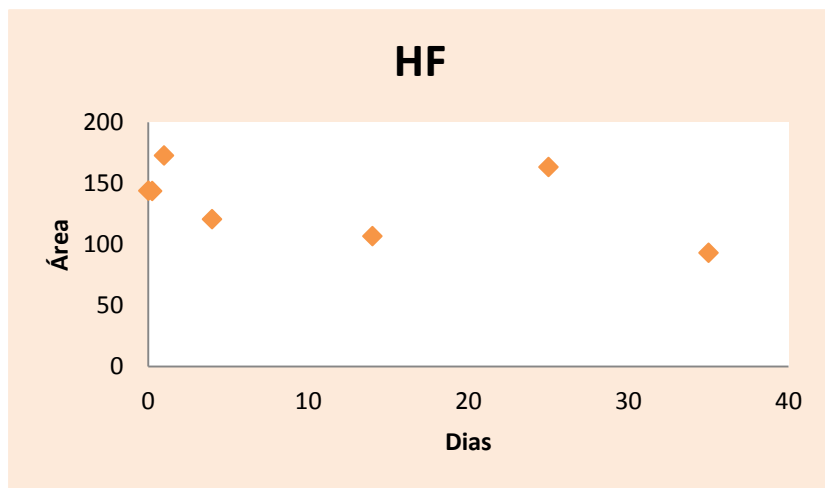
Dissertação de Mestrado

Azoxistrobina



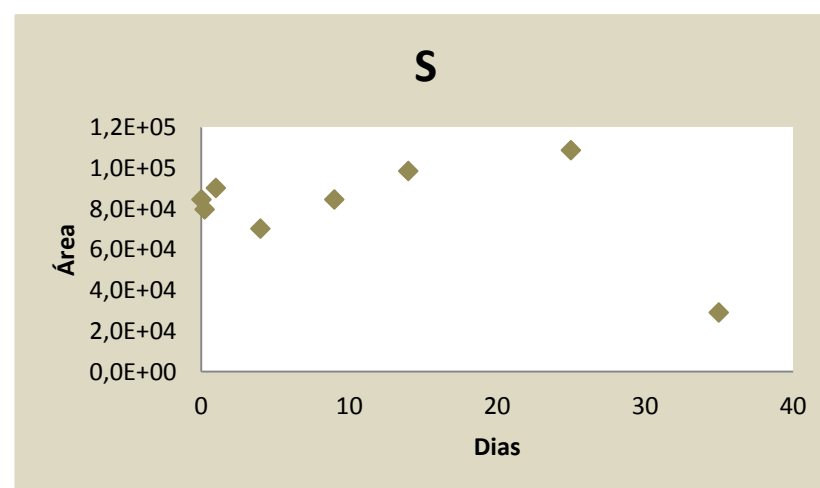
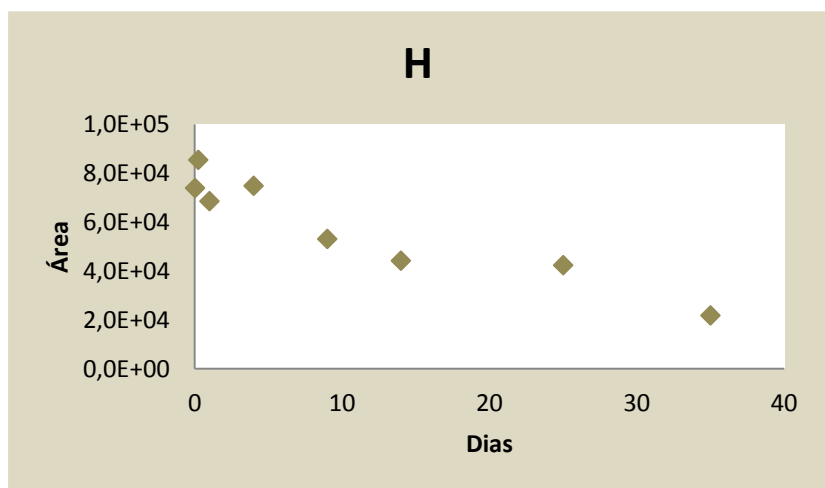
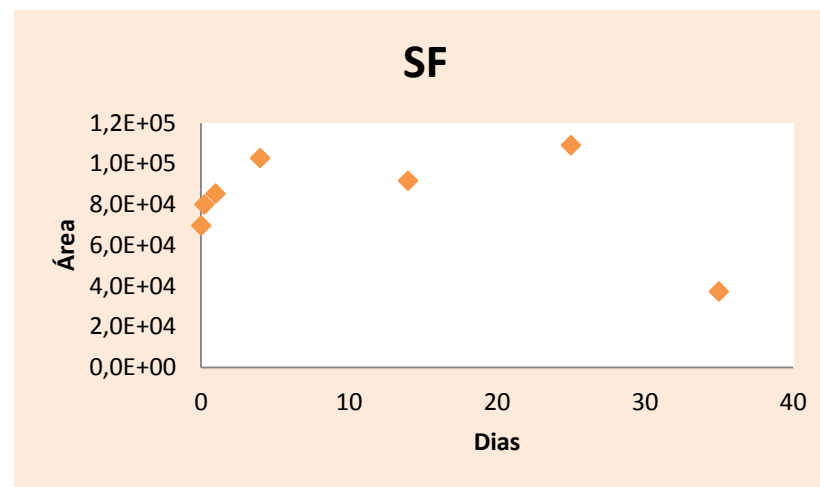
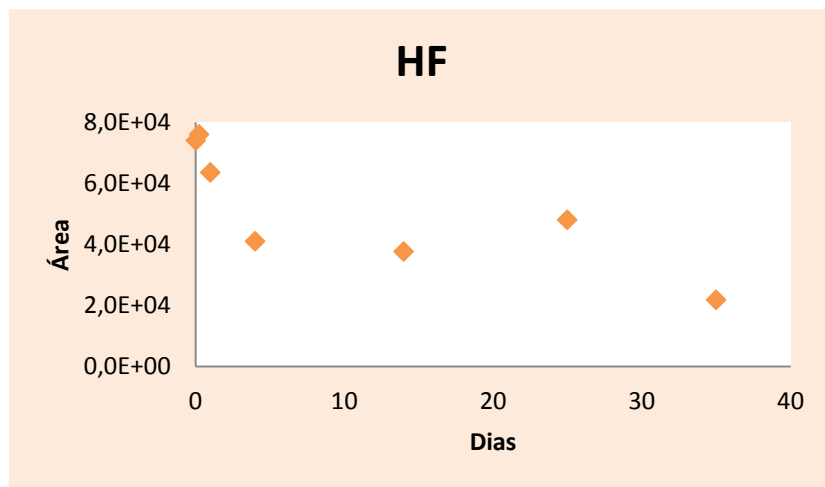
Dissertação de Mestrado

Clorantraniliprole



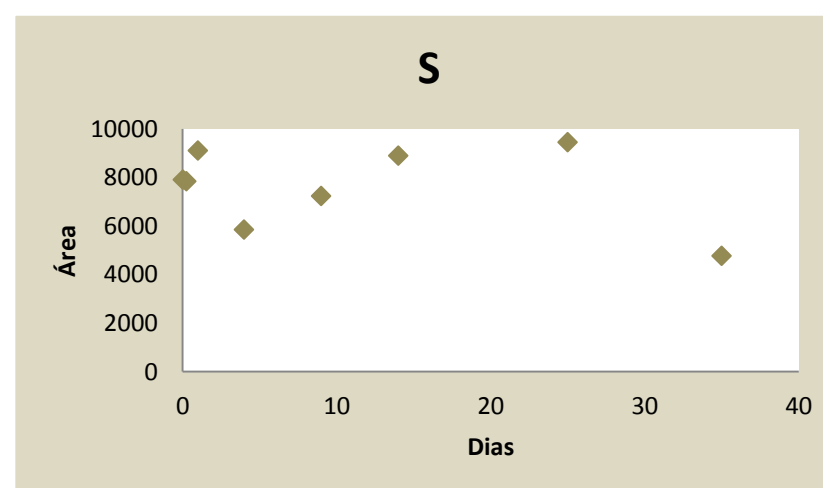
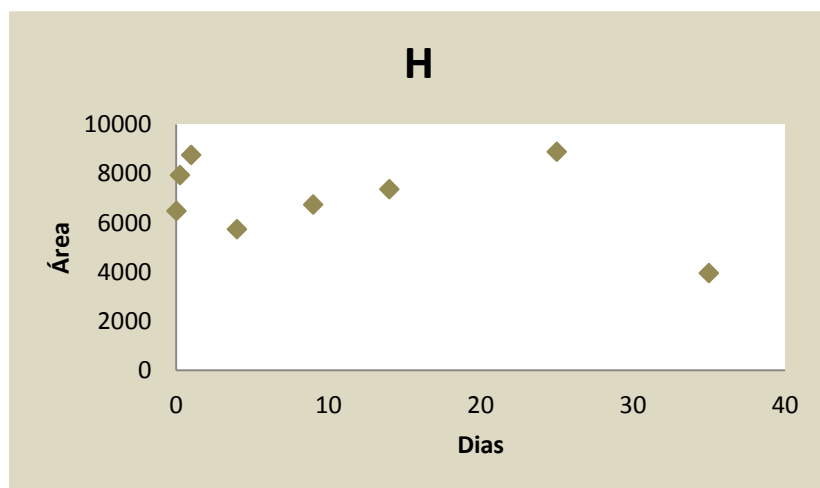
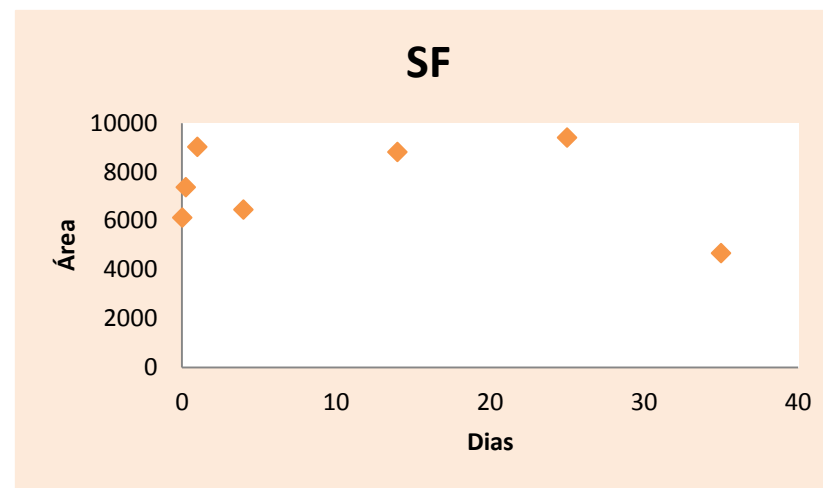
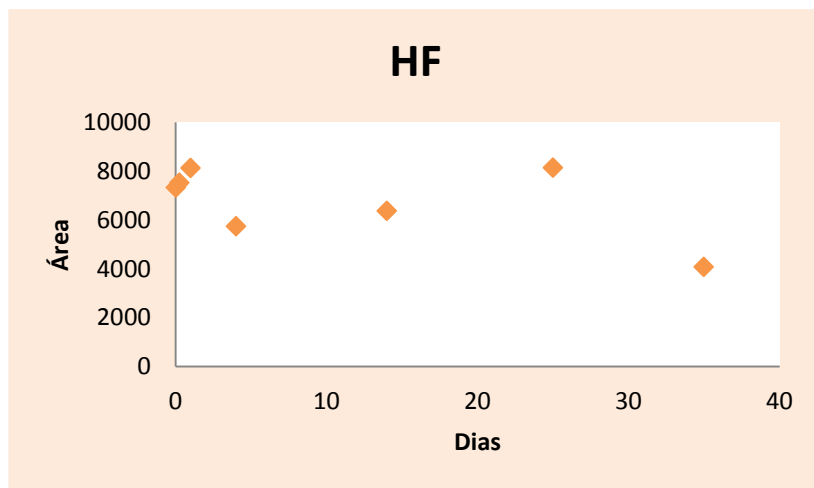
Dissertação de Mestrado

Clorpirifós



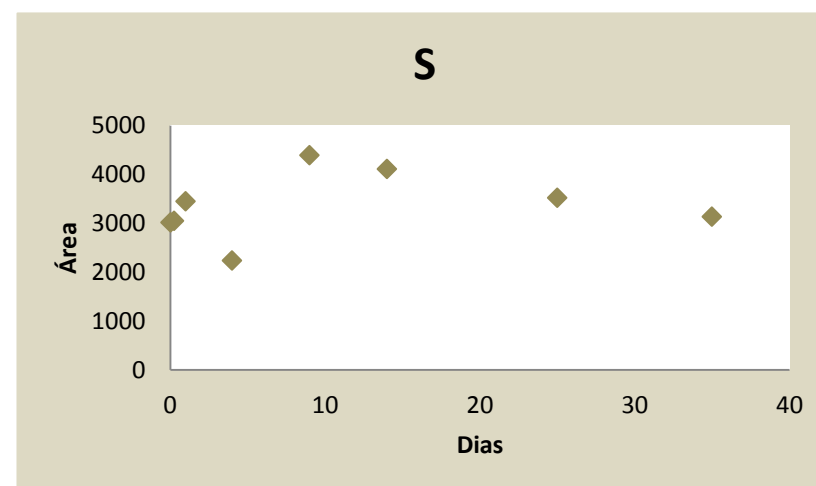
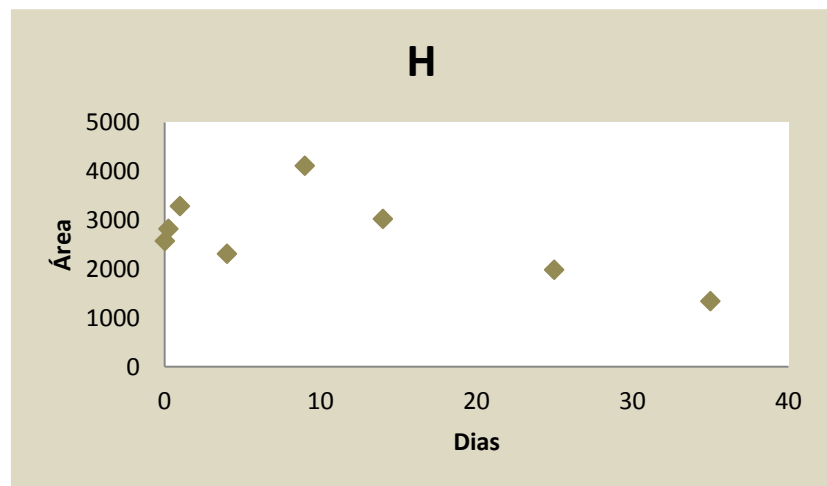
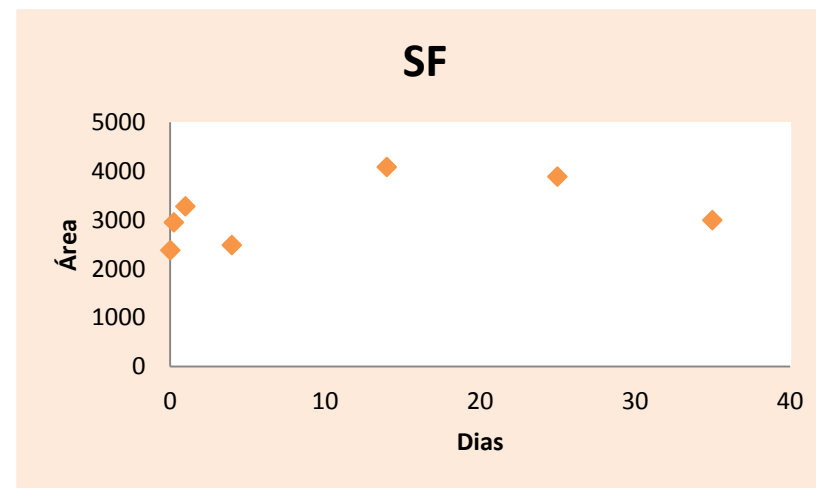
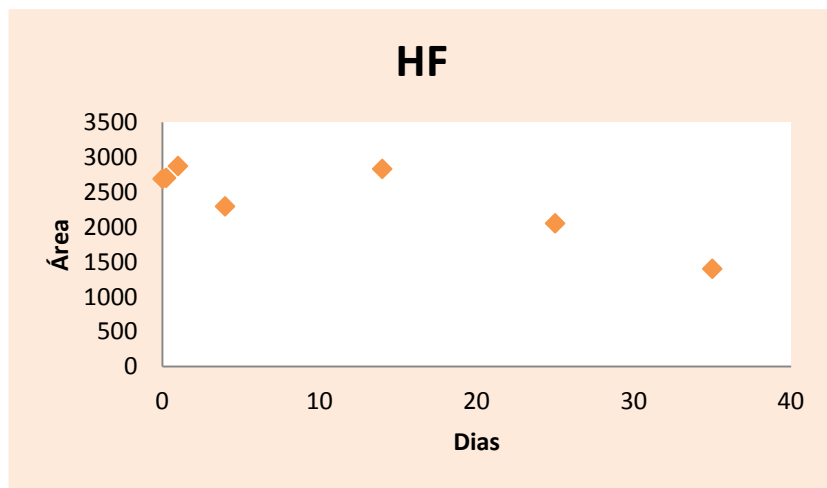
Dissertação de Mestrado

Difenoconazol



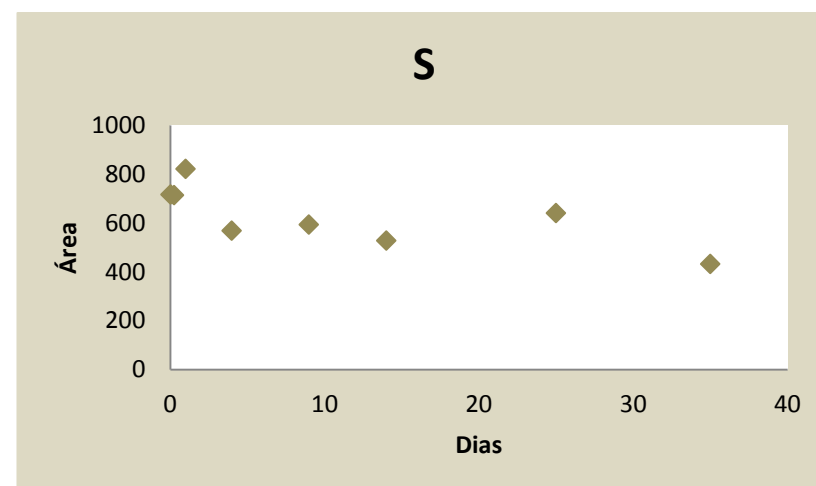
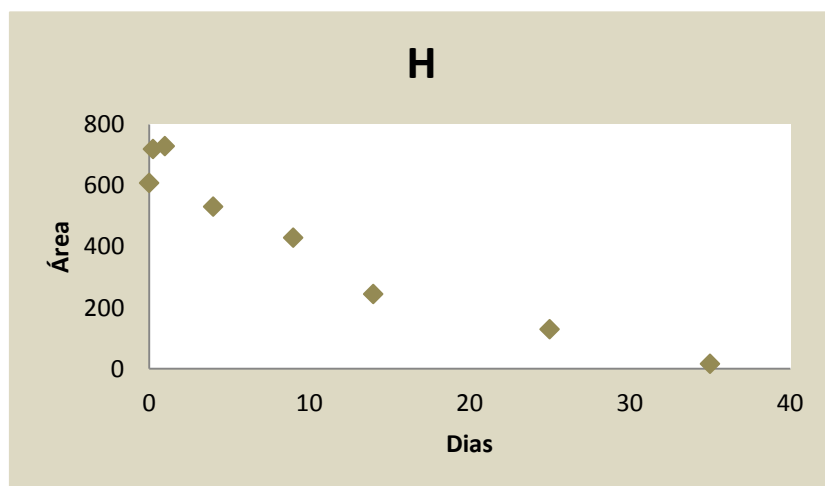
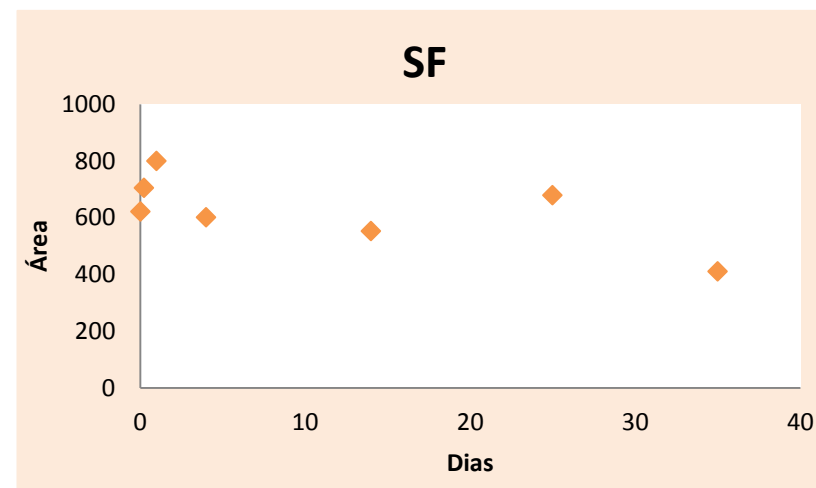
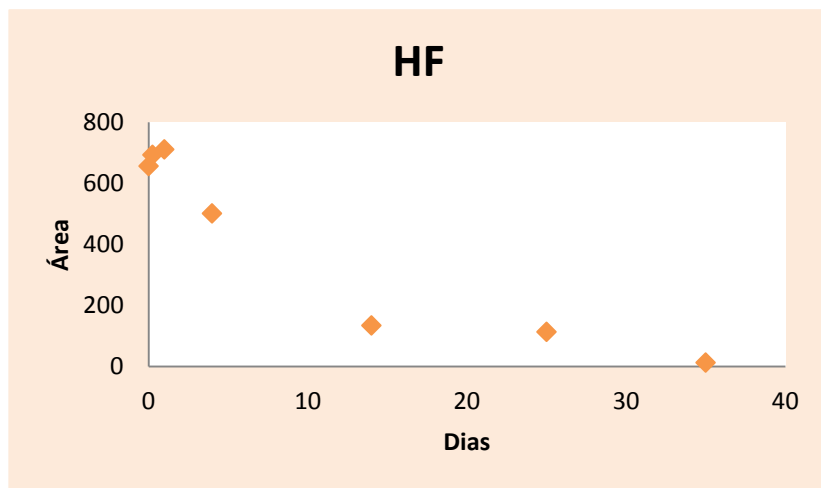
Dissertação de Mestrado

Fipronil



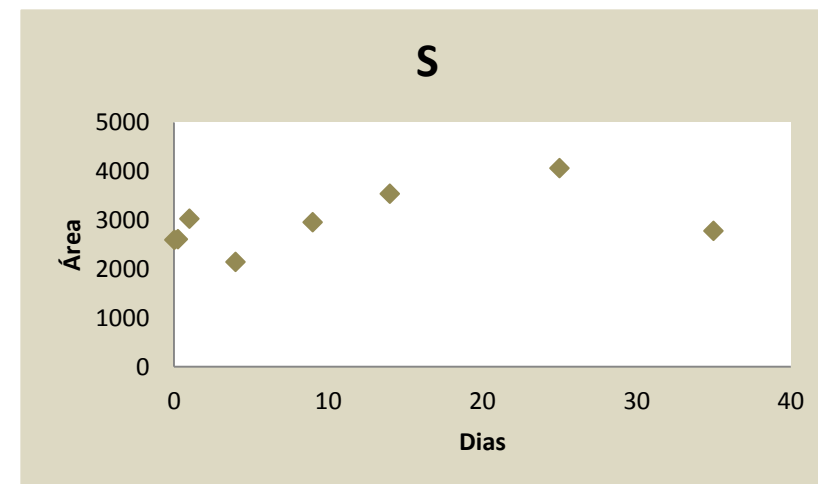
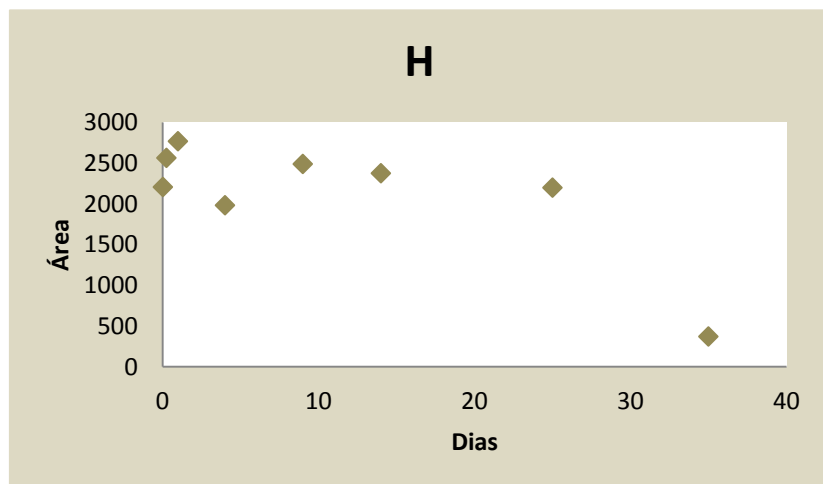
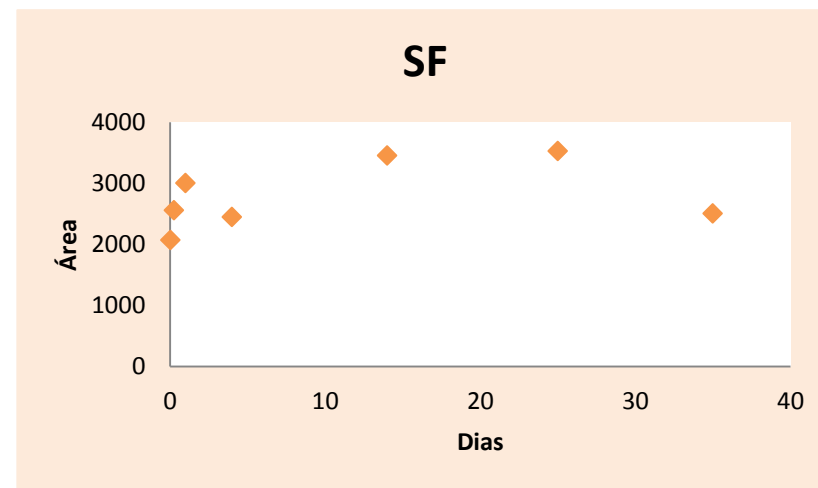
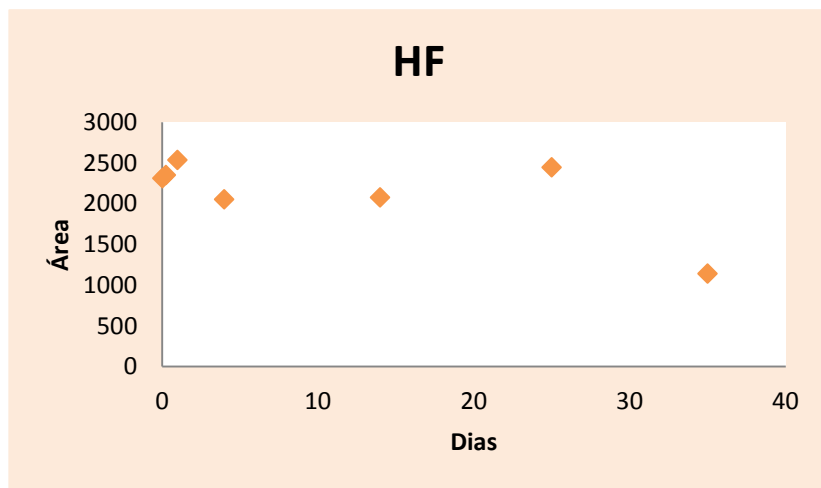
Dissertação de Mestrado

Imidacloprido



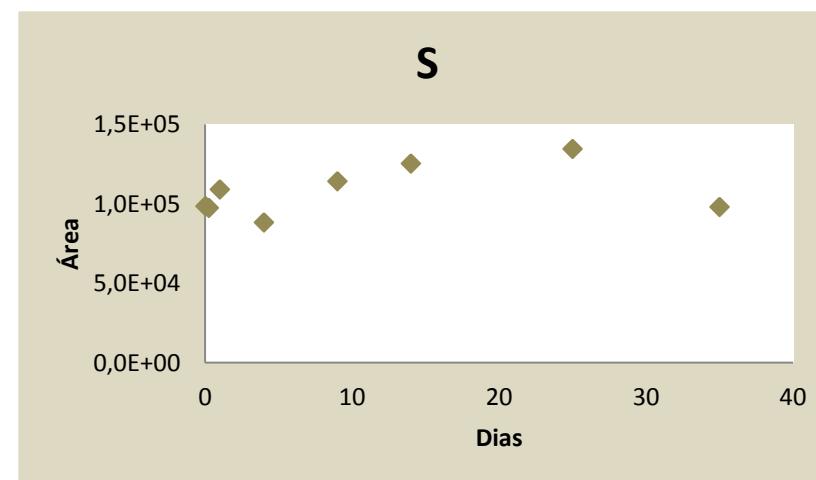
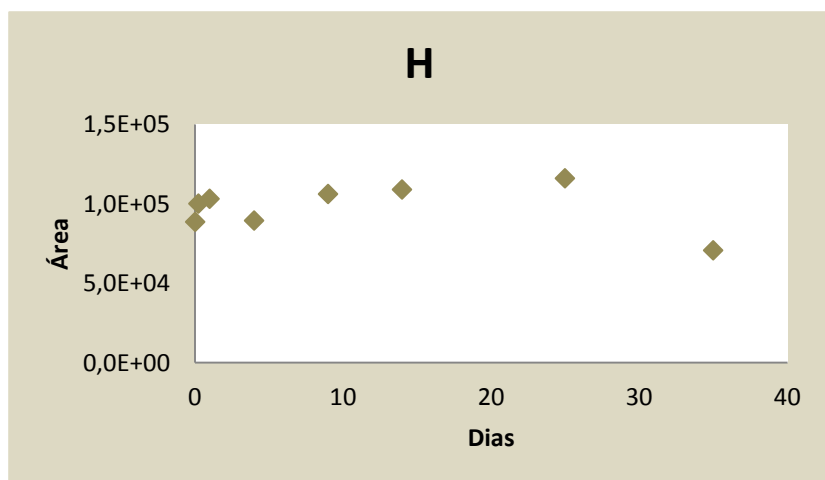
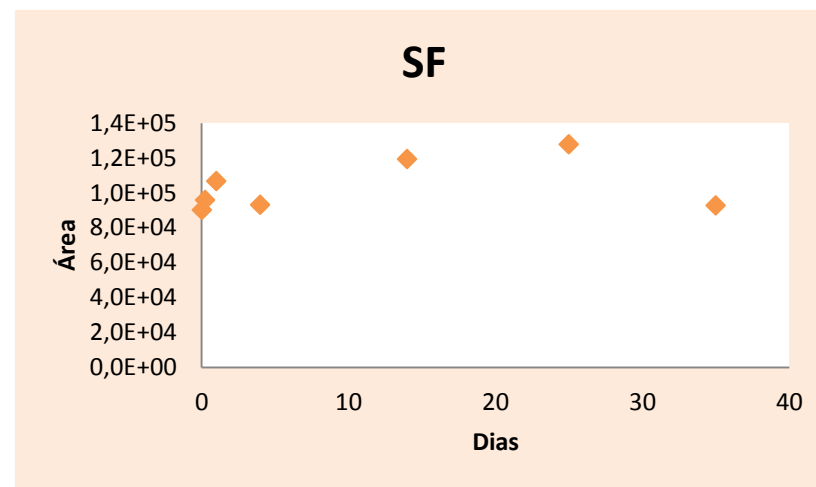
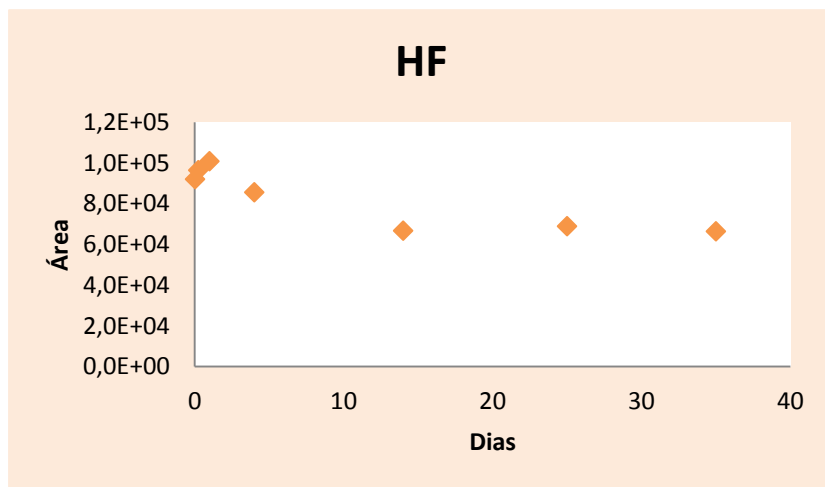
Dissertação de Mestrado

Mandipropamida



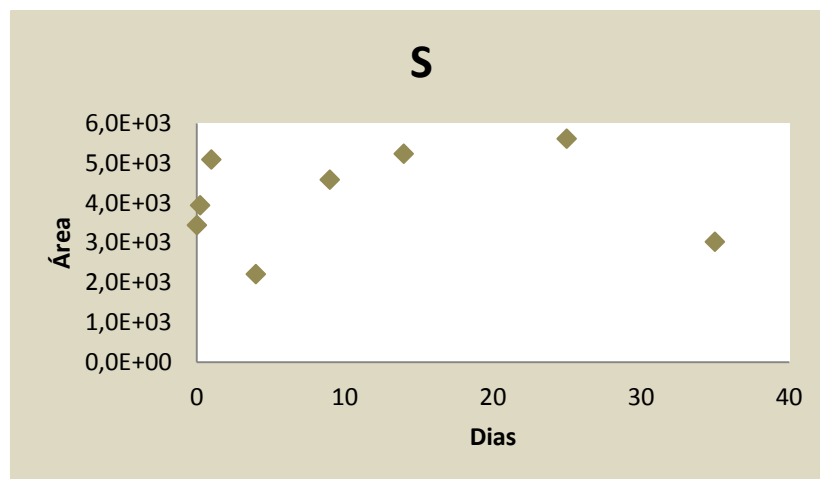
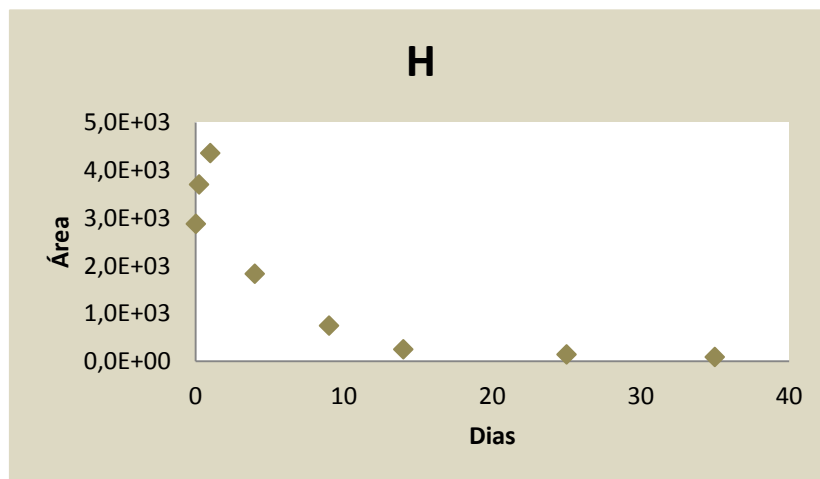
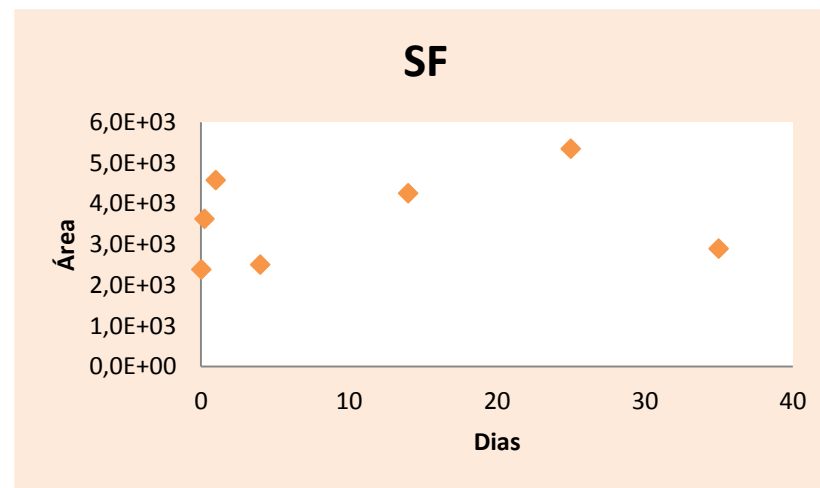
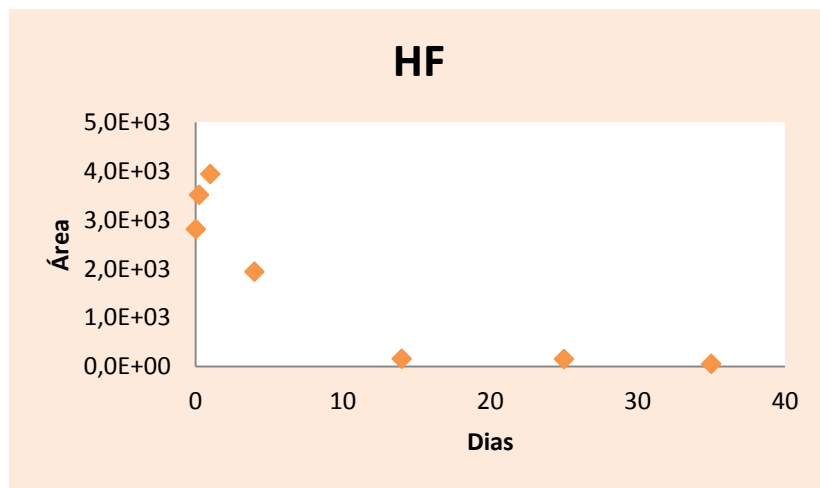
Dissertação de Mestrado

Metribuzim



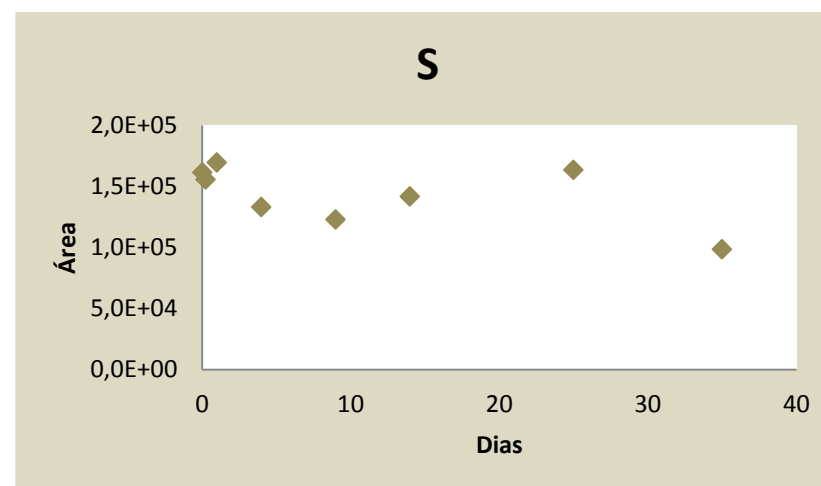
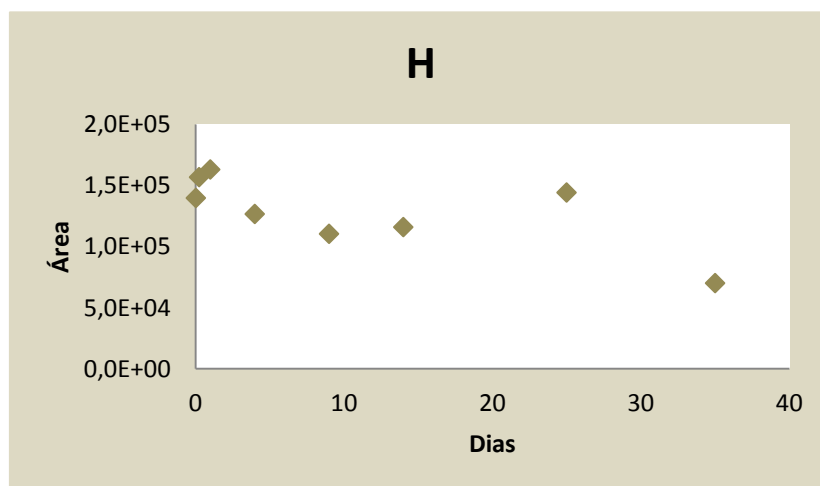
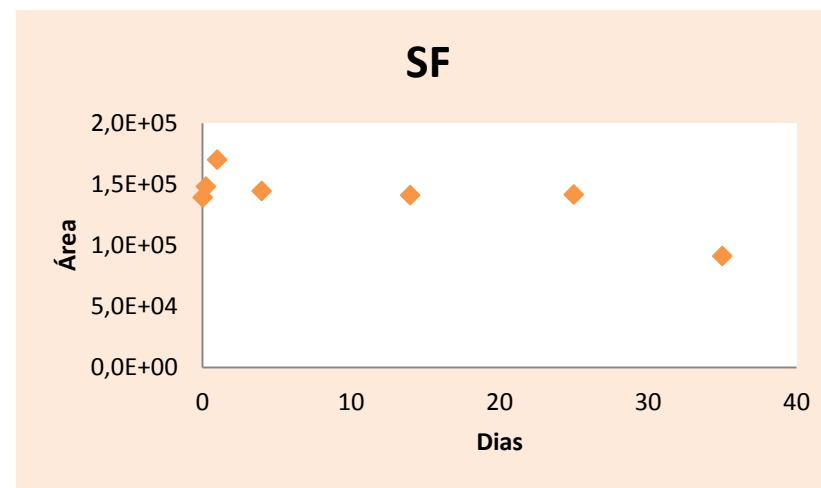
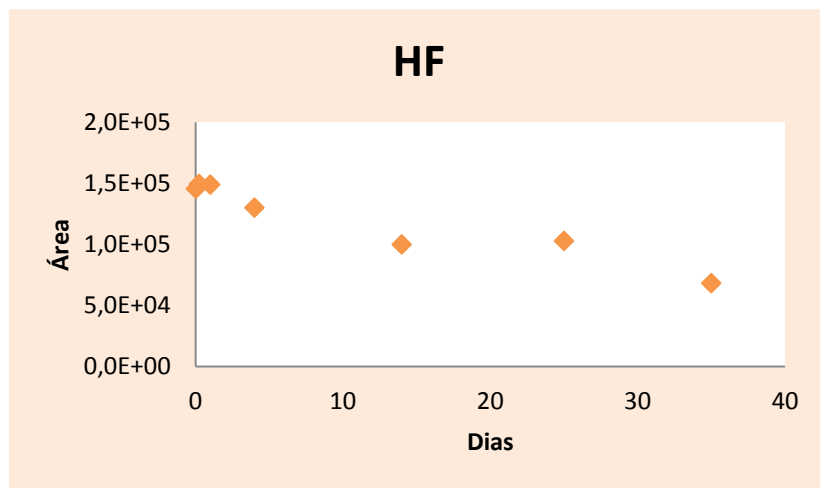
Dissertação de Mestrado

Piraclostrobina



Dissertação de Mestrado

Tebuconazol



Dissertação de Mestrado

Tiametoxam

