

Eduarda de Omena Oliveira Nascimento

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA MAIS
ECOLÓGICA E SIMPLES PARA A DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ARROZ UTILIZANDO A
COMBINAÇÃO DE SPME E DE DISCO ROTATIVO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do título de Mestra em Química
Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo
Carasek da Rocha

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Nascimento, Eduarda de Omena Oliveira

Desenvolvimento de uma metodologia mais ecológica e simples para a determinação de agrotóxicos em amostras de arroz utilizando a combinação de SPME e disco rotativo / Eduarda de Omena Oliveira Nascimento ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2019.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. GC-MS. 3. SPME. 4. Agrotóxicos em alimentos. 5. Química Verde. I. Carasek da Rocha, Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Eduarda de Omena Oliveira Nascimento

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA MAIS
ECOLÓGICA E SIMPLES PARA A DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ARROZ UTILIZANDO A
COMBINAÇÃO DE SPME E DE DISCO ROTATIVO**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestra
em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-
Graduação em Química.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a. Adriana Neves Dias
Instituto Federal Catarinense

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a. Gabrieli Bernardi
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a Eduardo Lauer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela saúde e determinação concedida ao longo dessa jornada.

À minha família por todo apoio e incentivo ao estudo desde sempre.

Ao meu namorado, Eduardo Lauer, por ter me apoiado desde o início diante das dificuldades e ser o meu suporte, sempre acreditando em mim. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, e por me incentivar a querer ser melhor do que sou. Te amo!

Aos meus sogros Paulo e Clair pelo apoio incondicional durante o mestrado. Obrigada por terem depositado a confiança e terem sido como pais para mim. Sem vocês teria sido muito mais difícil. Agradeço a Deus por vocês!

Aos meus amigos dos tempos de colégio, que até hoje se fazem presente e se alegram com minhas alegrias, sempre me apoiando e dando força em todas as dificuldades mesmo na distância: Patrick, Gabriela, Silas, Suelen, Polly e em especial à Larissa, minha melhor amiga, que esteve sempre comigo nos momentos mais difíceis. Amo vocês!

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia e Espectroscopia de Absorção Atômica por terem sido tão receptivos e prestativos. Vocês fizeram do Lab o melhor ambiente de trabalho, um espaço amigo e alegre. O melhor Lab que eu poderia ter escolhido! Ana Cristine, Anderson, Daniela, Gabi Corazza, Gabi Mafra, Helô Cadorim, Josias, Leila, Leonardo, Mauana, Michela, Sângela e Vanessa. Um agradecimento especial ao Andy, que me ajudou na realização desse trabalho com tanto apoio e carinho. Obrigada a todos pela amizade e que ela continue ao longo dos anos!

Aos amigos do mestrado Diogo, Marina, Lucas Murara, Lucas Morés, Geovanna e Giulie, por todas as conversas construtivas (e conversas fiadas também), cafés da tarde e toda amizade e apoio. Nossa amizade foi muito importante para a realização de uma pós-graduação saudável e alegre, na medida do possível. Para sempre terei vocês no meu coração!

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha, pela oportunidade de fazer o mestrado. Obrigada pelo suporte, pelos ensinamentos e pela paciência. Você é uma inspiração!

A UFSC pelo ensino gratuito e de qualidade. Ao corpo docente do Departamento de Química pelo ensino e aprendizado adquirido. A banca pelo aceite do convite e pelas contribuições a esse trabalho. Obrigada!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq pela bolsa concedida, a CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina – FAPESC entre outros órgãos de fomento pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa de milhares de estudantes. Que mais pessoas possam ser beneficiadas com esse auxílio!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação como estudante e como pessoa ao longo desse caminho, muito obrigada!

RESUMO

Nesse estudo, um novo método foi desenvolvido com o objetivo de superar certas limitações na análise de amostras sólidas de alimentos. Um arranjo experimental baseado em microextração em fase sólida por imersão direta (DI-SPME) acoplado a um dispositivo de disco rotativo foi proposto para a determinação de agrotóxicos com características polares e semi-polares (carbofurano, molinato, atrazina, simazina e tebuconazol) em amostras de arroz. Neste procedimento inovador, uma pequena quantidade de amostra de arroz é inserida na cavidade do dispositivo de disco rotativo, que é então imerso em uma solução aquosa seguida por agitação em alta velocidade. A água é empregada como solvente para lixiviar os analitos da matriz, eliminando a necessidade do uso de solventes orgânicos. Simultaneamente, uma fibra de SPME de 2 cm composta de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano realiza a extração dos analitos da matriz aquosa com subsequente dessorção térmica em um GC-MS. As condições ótimas de extração foram obtidas com 125 mg de arroz, temperatura de extração de 80 °C por 40 min. O desempenho analítico foi satisfatório com coeficientes de correlação superiores a 0,9881 para todos os analitos, limites de detecção variando de 0,46 a 5,9 ng g⁻¹, limites de quantificação de 1,53 a 19,7 ng g⁻¹, recuperação relativa de 76 a 109%, precisão intra-dia (n=3) de 1,3 a 19%, e precisão inter-dia (n=9) de 3,5 a 6,5%. O método proposto representa uma alternativa verde promissora para a análise de alimentos sólidos utilizando SPME, uma vez que não faz uso de solventes orgânicos e o dano à fibra é reduzido pois o contato com a matriz é evitado com a utilização do disco rotativo contendo a amostra sólida.

Palavras-chave: Arroz, agrotóxicos, SPME, disco rotativo, GC-MS.

ABSTRACT

In this study, a new method was developed to overcome certain limitations in the analysis of solid food samples. An experimental setup based on direct immersion solid-phase microextraction (DI-SPME) apparatus coupled to a rotating disk device was proposed for the determination of polar and slightly-polar pesticides including carbofuran, molinate, atrazine, simazine and tebuconazole in rice samples. In this innovative procedure, a small amount of rice sample is inserted into the cavity of the rotating disk device which is then immersed in an aqueous solution followed by high-speed agitation. Water was employed as a green solvent for leaching the analytes from the sample matrix. Simultaneously, a SPME fiber comprised of divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (2 cm length and 50/30 μm film thickness) was immersed in the aqueous solution to extract the polar/slightly polar analytes from the aqueous matrix with subsequent thermal desorption in the injector of a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) instrument. The optimal extraction conditions were obtained using an extraction temperature of 80 °C for 40 min, with 125 mg of rice inserted in the rotating disk. Using the previously optimized extraction conditions, the analytical performance was satisfactory with correlation coefficients higher than 0.9881 for all analytes, limits of detection (LOD) ranging from 0.46 to 5.9 ng g⁻¹, limits of quantification (LOQ) from 1.53 to 19.7 ng g⁻¹, relative recoveries from 76 to 109%, intra-day precision (n=3) from 1.3 to 19%, and inter-day precision (n=9) from 3.5 to 6.5%. The proposed method represents a promising alternative for the analysis of complex solid food samples using SPME, since the SPME fiber damage is substantially decreased when direct contact with the solid matrix is avoided.

Keywords: Rice samples, pesticides, SPME, rotating disk, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtividade do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) e do feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) no Brasil no período de 1985 a 2017.. 24	
Figura 2. Dispositivo da fibra de SPME..... 32	32
Figura 3. Microextração em fase sólida nos modos Imersão Direta e <i>Headspace</i> 36	36
Figura 4. Diagrama para a segunda versão do disco rotativo com cavidade..... 42	42
Figura 5. Dispositivo de disco rotativo com cavidade em nova aplicação..... 43	43
Figura 6. Efeito da quantidade de amostra de arroz na extração dos agrotóxicos selecionados nesse estudo..... 54	54
Figura 7. Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central. A) Tempo de extração versus temperatura de extração; B) Porcentagem de NaCl versus temperatura de extração. 58	58
Figura 8. Procedimento experimental otimizado da metodologia desenvolvida..... 60	60
Figura 9. Gráfico de Lenth para a metodologia desenvolvida nesse trabalho..... 66	66
Figura 10. Cromatogramas dos íons totais para amostra não fortificada e fortificada obtidos através da metodologia proposta. (A) amostra de arroz não fortificada; (B) arroz fortificado com 7500 ng g ⁻¹ de tebuconazol e 1500 ng g ⁻¹ dos outros analitos..... 70	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais agrotóxicos analisados em estudos de monitoramento de resíduos na rizicultura do estado de Santa Catarina.	27
Tabela 2. Estrutura molecular, classe, log P, pressão de vapor e pKa dos analitos estudados nesse trabalho.	28
Tabela 3. Limites máximos residuais permitidos em arroz estabelecidos pela ANVISA e pela Comissão Europeia.	30
Tabela 4. Fibras de SPME disponíveis comercialmente.	38
Tabela 5. Analitos estudados, classe dos agrotóxicos e razões massa/carga.	48
Tabela 6. Planejamento composto central para avaliação do tempo, temperatura e adição de sal no procedimento de extração.	50
Tabela 7. Parâmetros experimentais e respectivas variações para avaliação da robustez do método.	52
Tabela 8. Avaliação estatística utilizando ANOVA: Fator único	56
Tabela 9. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e de quantificação para os analitos.	62
Tabela 10. Recuperação relativa dos analitos e precisão inter-dia e intra-dia para a extração dos agrotóxicos das amostras de arroz orgânico fortificadas.	64
Tabela 11. Efeitos obtidos do planejamento de sete fatores Plackett-Burman.	66
Tabela 12. Comparação do método desenvolvido neste trabalho com outros reportados na literatura para a determinação de agrotóxicos em arroz através de diferentes técnicas de preparo de amostras.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Car – Carboxeno

DI – Imersão direta, do inglês *Direct Immersion*

DMF - Dimetilformamida

DVB – Divinilbenzeno

EC – Comissão Europeia, do inglês *European Comission*

EI – Ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*

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

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HLB - *Hydrophilic-lipophilic balance*

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

ICH – Conferência Internacional da Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MASE – Extração de Vapor Assistida por Micro-ondas, do inglês *Microwave Assisted Steam Extraction*

ME – Margem de erro

MeCN - Acetonitrila

MeOH – Metanol

m-PFC - Limpeza de Filtragem com Multicanais, do inglês *Multiplug Filtration Cleanup*

MRM – Método multiresíduos, do inglês *Multiresidue Methods*

MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass spectrometry*

PARA – Programa de Análise de Resíduos em Alimentos

PCB – *Polychlorinated biphenyl*

PDMS – Dimetil polissiloxano, do inglês *polydimethylsiloxane*

PPDB – Base de Dados de Propriedades de Agrotóxicos, do inglês *Pesticide Properties Database*

PSA - Amina primária-secundária, do inglês *primary secondary amine*

RDSE – Extração Sortiva em Disco Rotativo, do inglês *Rotating Disk Sorptive Extraction*

RPM – Rotações por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

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

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

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Rizicultura	23
2.2	Agrotóxicos	24
2.3	Preparo de amostras	31
2.3.1.1	<i>Fundamentos teóricos da SPME</i>	33
2.3.1.2	<i>Aspectos cinéticos da SPME</i>	34
2.3.1.3	<i>Desenvolvimento de metodologias com SPME</i>	35
2.3.1.3.1	<i>Modo de extração</i>	35
2.3.1.3.2	<i>Recobrimento da fibra de SPME</i>	37
2.3.1.3.3	<i>Tempo de extração</i>	39
2.3.1.3.4	<i>Temperatura de extração</i>	39
2.3.1.3.5	<i>Técnica de agitação</i>	40
2.3.1.3.6	<i>Condicionamento do meio aquoso</i>	40
2.3.2	Extração sortiva em disco rotativo	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	METODOLOGIA	47
4.1	Materiais e reagentes	47
4.2	Amostras de arroz	47
4.3	Instrumentação e condições cromatográficas	48
4.4	Otimização dos parâmetros de extração	49
4.5	Validação da metodologia desenvolvida	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	Otimização dos parâmetros de extração na etapa de preparo de amostra	53
5.1.1	<i>Otimização da massa de amostra de arroz</i>	53

5.1.2	<i>Otimização do tempo e temperatura de extração e de adição de sal</i>	57
5.2	Visão geral do procedimento experimental otimizado	59
5.3	Validação da metodologia desenvolvida	60
5.4	Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura	67
5.5	Aplicação da metodologia desenvolvida.....	69
6	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos continua sendo a alternativa mais utilizada para o controle de pestes na agricultura em todo o mundo. A maioria desses compostos apresenta baixa seletividade e acabam sendo tóxicos também para espécies não-alvo, incluindo os seres humanos (Costa *et al.*, 2008). Dentre os principais danos que podem ser ocasionados pela exposição a agrotóxicos pode-se citar a indução ao estresse oxidativo devido à geração de radicais livres, alterando os mecanismos de defesa antioxidantes (López *et al.*, 2007), prejuízo aos sistemas imune e neurológico (Corsini *et al.*, 2013, Costa *et al.*, 2008), além de ser uma ameaça aos ecossistemas (Yadav, 2010).

A maneira mais comum de exposição dos seres humanos aos agrotóxicos acontece através da alimentação, uma vez que são aplicados diretamente nas plantações de vegetais e grãos em geral. O arroz, um dos alimentos mais consumidos no Brasil e no mundo, é um exemplo onde há resíduos de agrotóxicos acima do permitido. De acordo com Jardim e Caldas (2012), as principais classes de agrotóxicos encontradas na cultura do arroz no Brasil são ditiocarbamatos, organofosforados, triazoles, piretróides e carbamatos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), é a responsável pelo monitoramento de agrotóxicos no Brasil. As amostras são encaminhadas para os laboratórios, onde as análises são realizadas pelo método multiresíduo (MRM, do inglês *Multiresidue Methods*). No entanto, esse método não se aplica para a análise de algumas substâncias, como os ditiocarbamatos por exemplo, sendo necessário a utilização de metodologias específicas (PARA, 2016).

Para o desenvolvimento de novas metodologias, é necessário seguir as etapas do procedimento analítico, e uma das etapas mais importantes é a etapa de preparo de amostras, uma vez que é responsável pela pré-concentração, limpeza e enriquecimento dos analitos, geralmente em baixa concentração na matriz (Borges *et al.*, 2015), aumentando a sensibilidade e minimizando possíveis interferências.

Atualmente, os métodos de preparo de amostras mais utilizados buscam a redução do uso de solventes, substituindo-os por sorventes poliméricos como fase extratora, apresentando uma alta razão área de superfície e volume (Cañas *et al.*, 2014). Desta forma, o presente trabalho propõe um novo método de extração de agrotóxicos em amostras de grãos de arroz através da combinação da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e do dispositivo da técnica de extração sortiva em disco

rotativo (RDSE), duas técnicas de microextração em fase sólida ambientalmente amigáveis que apresentam alta capacidade analítica e desempenho para operação ao nível de resíduos ultra-traços.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rizicultura

O arroz é o produto agrícola de maior valor comercial do mundo (FAOSTAT, 2018). É classificado como um alimento básico para quase metade da população mundial (Fao, 2016) sendo responsável por mais de 20% da ingestão calórica diária (Seck *et al.*, 2012). Atualmente, as colheitas anuais combinadas de arroz, milho e trigo representam 2,5 bilhões de toneladas e, em 2050, essas colheitas devem superar 3,3 bilhões de toneladas (FAO, 2016).

A demanda global por produtos agrícolas aumentou nos últimos anos, o que está associado a um crescimento exponencial da população. Este aumento de produtividade só foi possível devido ao uso de maquinário movido a combustível fóssil e uma série de inovações que ocorreram na Revolução Verde, no final da década de 1960, como irrigação, biotecnologia, engenharia genética e uso de agroquímicos (FAO, 2011).

O uso de agrotóxicos desempenha um papel importante na agricultura, pois a alta produção agrícola cria um ambiente propenso a pragas (FAO, 2016) e uma considerável perda de rendimento devido a danos causados por pragas é esperada se os agrotóxicos não forem aplicados (Elibariki e Maguta, 2017).

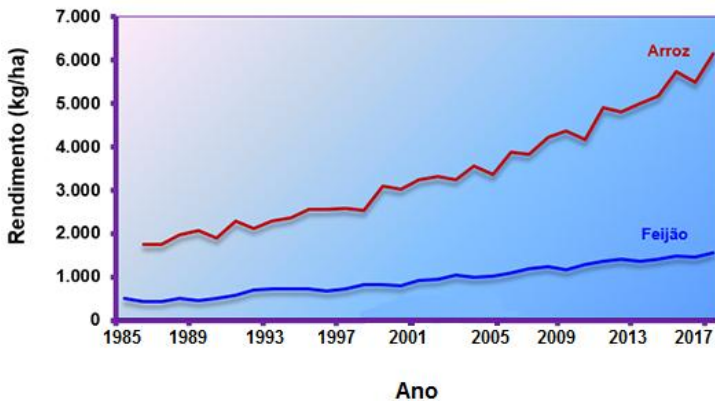
A produção de arroz mundial se destaca no continente asiático, responsável por 90,7 % da produção mundial, seguido de 5,2 % do continente americano, 3,5 % do continente africano e 0,7 % dos demais continentes (FAOSTAT, 2019). O Brasil ocupa o segundo lugar em produção e consumo de arroz no mundo, ficando atrás apenas da Ásia. O país está entre os 10 maiores produtores mundiais, sendo o único país não asiático e responsável por 1,6 % da produção mundial (FAOSTAT, 2019).

De acordo com a plataforma Brazilian Rice, projeto que visa a promoção do comércio de arroz brasileiro no mercado internacional, cerca de 75% da safra brasileira é colhida na região sul do país, sendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul os principais responsáveis por essa produção, que fornecem todo o produto para a exportação (Brazilian Rice, 2019).

A produtividade de arroz vem crescendo nos últimos anos, juntamente com a do feijão, que juntos formam a base da dieta brasileira. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,

no ano de 2017 o valor da Produção Agropecuária foi de R\$ 533,5 bilhões, tendo melhor desempenho que a pecuária, destacando-se as culturas de arroz e cana-de-açúcar. A região Sul liderou o faturamento de 2017, contribuindo com R\$ 140,6 bilhões (MAPA, 2017). A Figura 1 mostra a produtividade do arroz e do feijão no Brasil com rendimento (kg/ha) por ano, de 1985 a 2017.

Figura 1. Produtividade do arroz (*Oryza sativa* L.) e do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil no período de 1985 a 2017.



Fonte: Adaptado de Embrapa Arroz e Feijão, 2018.

2.2 Agrotóxicos

Atualmente, cerca de 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos são utilizados por ano na agricultura (Pretty e Bharucha, 2014) e apesar do interesse econômico associado ao controle de pragas, o uso exorbitante de agrotóxicos está se tornando um perigo para a saúde humana. A exposição a agrotóxicos pode causar desregulação endócrina, efeitos carcinogênicos e alterações nos sistemas imunológico e nervoso. (Kalliora *et al.*, 2018).

O Brasil é um dos países que mais usa agrotóxicos no cultivo agrícola e de acordo com o Censo Agropecuário de 2017, realizado pelo IBGE, seu uso aumentou em 21,1 % nos últimos 11 anos no Brasil (IBGE, 2017). Ainda assim, existe um projeto de lei, PL 6299/2002, que prevê a flexibilização da análise e registro de novos agrotóxicos e, dentre outras medidas, passa essa responsabilidade para o Ministério da Agricultura.

Os principais agrotóxicos utilizados na rizicultura no Brasil foram consultados no relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2015) realizado pela ANVISA. Nas amostras analisadas, os agrotóxicos tebuconazol, pirimifós-metílico e cipermetrina foram os que demonstraram maior número de detecções nas análises. Os principais agrotóxicos utilizados no estado de Santa Catarina também foram apurados, e estão listados na Tabela 1.

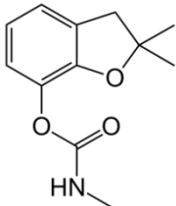
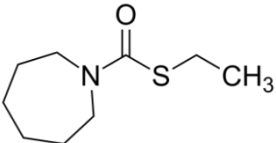
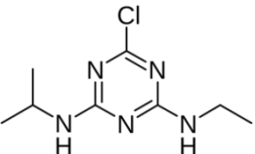
Dentre os agrotóxicos mais utilizados na rizicultura, foram selecionados para este trabalho os agrotóxicos tebuconazol, simazina, atrazina, molinato e carbofurano, por apresentarem propriedades compatíveis com o objetivo do trabalho, visto que são polares e semi-polares e pouco voláteis. As estruturas moleculares, classe de agrotóxicos e algumas características físico-químicas desses compostos está demonstrado na Tabela 2.

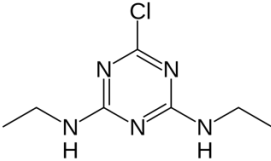
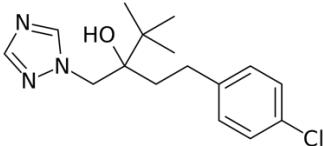
Tabela 1. Principais agrotóxicos analisados em estudos de monitoramento de resíduos na rizicultura do estado de Santa Catarina.

Herbicidas			Inseticidas	Fungicida
Bentazona	Imazapic	Tiobencarb	Carbofurano	Triciclazole
Quincloraque	Penoxsulan	Fenoxaprop	Fipronil	
2,4 D	Pyrazulfuron Etil	Oxyfluorfen		
Nominee 400	Simazina	Oxadiazon		
Ciclosulfamuron	Atrazina	Molinato		
Imazetapir	Propanil	Metsulfuron- metil		

Fonte: Vieira *et al.*, 2016.

Tabela 2. Estrutura molecular, classe, log P, pressão de vapor e pKa dos analitos estudados nesse trabalho.

Analito	Classe	Estrutura molecular	Log P ¹	Pressão de vapor (mPa a 25 °C) ¹	pKa
Carbofurano	Carbamato		1,8	0,08	14,8 ²
Molinato	Carbamato		2,8	500	Não ionizável ²
Atrazina	Triazina		2,7	0,039	1,7 ³

Simazina	Triazina		2,3	$8,1 \times 10^{-4}$	$1,6^4$
Tebuconazol	Triazol		3,7	$1,3 \times 10^{-3}$	$5,0^5$

1 - Pesticide Properties DataBase. 2 - Chemicalize Online Database. 3 - ZARPON, L. *et al.* (2006). 4 - VELAZQUEZ-MANZANARES, M. *et al.* (2008). 5 - ČADKOVÁ, E. *et al.* (2013).

Fonte: Autoria própria, 2019

Diante do uso exacerbado de agrotóxicos no cultivo agrícola, é necessário o controle no uso de agrotóxicos nos alimentos, bem como agências que sejam responsáveis por essa fiscalização. No Brasil, a ANVISA é a responsável pelo monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, através do PARA. A Comissão Europeia também estabelece limites máximos residuais para os alimentos e na Tabela 3 estão listados os limites máximos residuais permitidos para os agrotóxicos estudados nesse trabalho.

Tabela 3. Limites máximos residuais permitidos em arroz estabelecidos pela ANVISA e pela Comissão Europeia.

Agrotóxicos	ANVISA (ng g⁻¹)	Comissão Europeia (ng g⁻¹)
Atrazina	250	50
Carbofurano	200	10
Molinato	100	10
Simazina	20	10
Tebuconazol	1000	1000

Fonte: Autoria própria, 2019.

Fazendo-se um comparativo com os valores permitidos entre a ANVISA e a Comissão Europeia, observa-se que os limites estabelecidos pela Comissão Europeia são consideravelmente menores para alguns analitos. Assim, novas metodologias que possam detectar valores menores, em menores quantidades e com o uso reduzido ou não-uso de solventes orgânicos precisam ser desenvolvidas para manter o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos, particularmente no arroz, dado que este é um alimento básico amplamente consumido. Existem vários métodos analíticos para determinar agrotóxicos em alimentos e a maioria deles envolve amostragem, preparo de amostras, separação, detecção e análise de dados (Samsidar *et al.*, 2018). O principal objetivo do desenvolvimento de métodos analíticos é obter informações precisas a respeito de um analito presente em alguma amostra. Para isso, são necessárias etapas a serem seguidas de modo que o resultado final traga informações verdadeiras. As etapas envolvidas são amostragem, armazenamento e transporte, preparo de amostras, separação, identificação e quantificação, validação analítica e análise de dados e tomada de decisões. A etapa de preparo de amostra quase sempre é

indispensável, diante da sua importância na separação entre analitos e contaminantes (Carasek et al., 2018).

2.3 Preparo de amostras

O preparo da amostra, um dos passos mais importantes na análise química, é realizado principalmente para a extração, limpeza e concentração dos analitos (Borges, 2015). Existem várias técnicas de preparação de amostras disponíveis e a abordagem selecionada deve estar de acordo com as propriedades físico-químicas dos analitos e com o tipo de matriz. Técnicas de extração clássica, como Soxhlet (Luque De Castro e García-Ayuso, 1998), extração líquido-líquido (LLE) (Blasco *et al.*, 2004), extração com solvente assistida por micro-ondas (Camel, 2000) e extração em fase sólida (SPE) (Albero *et al.*, 2004) requerem quantidades substanciais de amostra e solvente, além de envolver etapas laboriosas e demoradas. Os solventes empregados nessas técnicas, na maioria dos casos, são perigosos para o meio ambiente e para a saúde humana (Pareja *et al.*, 2011).

A ANVISA utiliza dois principais métodos de preparo de amostra para a extração dos analitos da amostra: Mini-luke modificado e QuEChERS. Em 1975, Luke *et al.* publicou um método de extração que consiste em 100 g de amostra, 200 mL de acetona, partição líquido-líquido com solventes apolares compostos de éter de petróleo e diclorometano (100 mL cada) e adição de NaCl para favorecer a transferência de compostos polares para a fase orgânica. Em 1981 foi publicada a miniaturização do método original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio. Nesse método são utilizados 15 g de amostra, 30 mL de acetona, éter de petróleo e diclorometano (30 mL cada), com agitações intercaladas (Luke *et al.*, 1981)

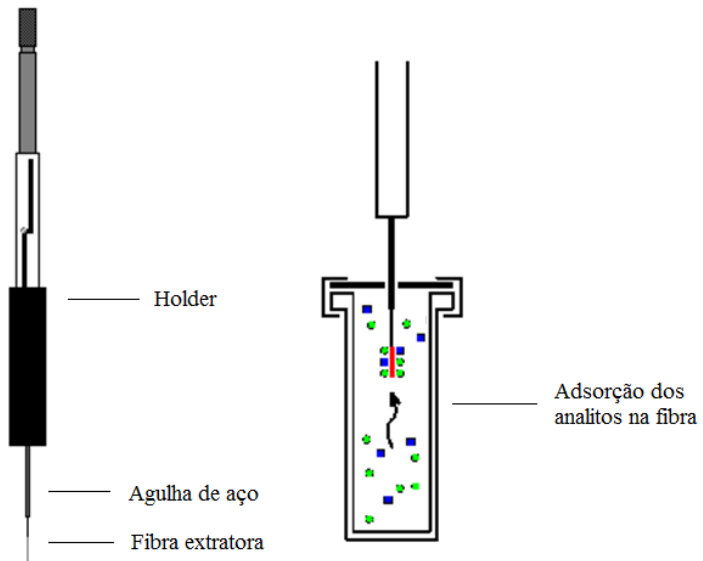
Outro método utilizado amplamente em preparo de amostras é o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*), que foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades e colaboradores. O método original consiste no uso de 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila, 4 g de MgSO₄, 1 g de NaCl, 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA e padrão interno. Apesar de ter demonstrado resultados satisfatórios para vários tipos de amostras, certos analitos apresentam problemas de estabilidade ou recuperação, a depender do pH da matriz, sendo necessárias etapas adicionais para obter valores de recuperação satisfatórios (Borges *et al.*, 2015). Embora sejam métodos amplamente utilizados, também apresentam desvantagens como as técnicas clássicas por serem

laboriosos, com múltiplas etapas e usarem quantidades significativas de solventes.

Devido às preocupações em relação à eliminação de solventes no ambiente, foram propostas técnicas modernas de preparo de amostras com consumo reduzido de solventes. (Carasek e Merib, 2015). Neste sentido, técnicas de microextração têm sido aplicadas como uma alternativa para a determinação de agrotóxicos (Chormey e Bakirdere, 2018). Considerando os princípios da Química Verde, onde “é melhor evitar o desperdício do que tratá-lo ou limpá-lo depois que é formado” (Anastas e Eghbali, 2009), técnicas sem o uso de solventes têm recebido atenção.

Neste sentido, o desenvolvimento de ferramentas analíticas eficientes para a extração de compostos orgânicos com o mínimo consumo de solvente possível é uma tendência (Spietelun et al., 2013). Técnicas baseadas em microextração comumente relatadas incluem microextração em fase sólida (SPME), extração por sorção em barra de agitação (SBSE) e extração por sorção em disco rotativo (RDSE).

Figura 2. Dispositivo da fibra de SPME.



Fonte: Autoria própria, 2019.

2.3.1.1 Fundamentos teóricos da SPME

A SPME ocorre através da exposição do recobrimento da fase extratora presente na fibra na amostra por um determinado tempo. Por ser uma técnica baseada no equilíbrio de partição (ou adsorção, no caso de recobrimentos sólidos) do analito entre a fase extratora e a matriz, o processo é considerado concluído quando o analito atinge esse equilíbrio (Pawliszyn, 2009). O coeficiente de distribuição (K_{fs}) do analito entre a fase extratora da fibra e a amostra é descrito na equação (1).

$$Conc_{amostra} \rightleftharpoons Conc_{fibra} \quad K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad (1)$$

De acordo com a lei de conservação das massas, as condições de equilíbrio para esse sistema podem ser descritas através da equação (2):

$$C_0 V_s = C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f \quad (2)$$

Onde:

C_0 = concentração inicial do analito

V_s = volume da amostra

C_s^∞ = concentração de equilíbrio na amostra

C_f^∞ = concentração de equilíbrio na fase extratora da

fibra

V_f = volume da fase extratora da fibra

As equações (1) e (2) podem ser combinadas e rearranjadas na equação (3), sendo possível calcular a concentração de analito extraído pela fase extratora (C_f^∞):

$$C_f^\infty = C_0 \frac{K_{fs} V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (3)$$

Esse modelo matemático também permite relacionar a concentração do analito na fase extratora da fibra (C_f^∞) com o número de mol de analito extraído pela fase extratora, no equilíbrio (n_f), como demonstrado na equação (4):

$$C_f^\infty = \frac{n_f}{V_f} \quad (4)$$

As equações (3) e (4) podem ser combinadas e rearranjadas na equação (5), que permite calcular o número de mol de analito extraído pela fase extratora no equilíbrio (n_f).

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (5)$$

Esse equilíbrio de partição do analito entre a fase extratora da fibra e a amostra pode ser deslocado por influência da temperatura. A temperatura tem efeito considerável quando, no equilíbrio, a temperatura da amostra e da fibra muda de T_0 para T , fazendo com que o coeficiente de distribuição (K_{fs}) mude de acordo com a seguinte equação:

$$K_{fs} = k_0 \exp \left[\frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (6)$$

Onde:

K_0 = constante de distribuição quando a fibra e a amostra estão em temperaturas T_0 (em Kelvin)

ΔH = variação na entalpia molar do analito quando ele migra da amostra para a fase extratora da fibra

R = constante universal dos gases

Quando o valor do coeficiente de distribuição K_{fs} do analito ultrapassa 1, significa que o analito tem uma energia potencial menor na fase extratora da fibra do que na amostra, sendo então a partição do analito na fibra exotérmica. Assim, o aumento da temperatura diminui o valor do coeficiente de distribuição K_{fs} e, por consequência, a sorção do analito pelo recobrimento da fibra também é diminuída.

2.3.1.2 Aspectos cinéticos da SPME

O tempo necessário para se atingir o equilíbrio do analito entre a amostra e a fase extratora da fibra (t_e), *a priori*, depende da velocidade com a qual os analitos migram pelas fases amostra, fibra e *headspace* ou meio aquoso, e atravessam as interfaces fibra-*headspace*/meio aquoso, fibra-amostra e amostra- *headspace*/meio aquoso. Esse processo de transferência de massa pode ocorrer através de processos de difusão, na

ausência de agitação mecânica, ou convecção, muito mais rápido que difusão e acelerado por agitação mecânica vigorosa (Borges *et al.*, 2015).

Diante disso, o fator limitante para que o equilíbrio seja alcançado passa a ser o espalhamento uniforme dos analitos no recobrimento da fibra. Esse tempo, em teoria, seria infinito e, diante das incertezas associadas à parte experimental com SPME, é considerado um tempo de equilíbrio prático, $t_{95\%}$, correspondente à 95% da quantidade que seria extraída em um tempo infinito de extração.

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(e)^2}{2D_f} \quad (8)$$

Onde:

(e) = espessura do recobrimento.

D_f = coeficiente de difusão do analito no recobrimento

Assim, o tempo de equilíbrio (t_e) é proporcional à espessura do recobrimento da fibra (e) – quanto maior, mais tempo necessário para se atingir o equilíbrio – e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do analito na fibra (D_f). Quando a sensibilidade analítica alcançada é suficiente para análises quantitativas, não é preciso obter o equilíbrio, sendo possível trabalhar em condições de pré-equilíbrio (Pawliszyn, 2009).

2.3.1.3 Desenvolvimento de metodologias com SPME

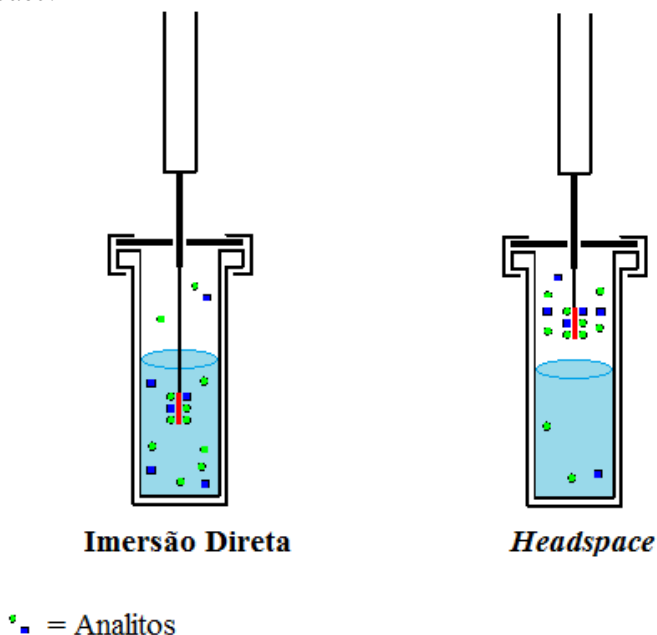
Quando um método de análise utilizando SPME na etapa de preparo de amostras é desenvolvido, é necessário levar em consideração a otimização das condições experimentais, com o objetivo de elevar ao máximo a seletividade e a sensibilidade do procedimento. O desempenho da SPME é geralmente dependente de parâmetros como a natureza da fase extratora, modo de extração, modo de agitação, força iônica, pH da amostra, temperatura e tempo de extração, discutidos a seguir (Souza-Silva *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

2.3.1.3.1 Modo de extração

A extração com a técnica de SPME pode ser realizada através de imersão direta (DI) ou *headspace* (HS). A extração por *headspace* é indicada para analitos voláteis ou semi-voláteis, enquanto a imersão direta é geralmente recomendada para extração em matrizes aquosas sem

material particulado, uma vez que matrizes sólidas ou partículas em solução podem causar danos à fibra e diminuir seu tempo de vida. A Figura 3 ilustra esses dois modos de extração.

Figura 3. Microextração em fase sólida nos modos Imersão Direta e *Headspace*.



Fonte: Autoria própria, 2019.

O tempo necessário para alcançar o equilíbrio entre os analitos na fase estacionária da fibra e a amostra gasosa é menor do que para amostras aquosas, uma vez que o coeficiente de difusão no transporte do analito da fase gasosa para a fibra é maior do que da fase aquosa, fazendo com que o modo *headspace* seja mais recomendado para análise de analitos voláteis. Esse modo de extração é também especialmente recomendado para amostras com uma grande quantidade de impurezas, que poderiam aderir à fibra e reduzir sua capacidade de adsorver os analitos (Prosen, Zupancic-Krajl, 1999; Pawliszyn, 2009).

O procedimento de extração é realizado em duas etapas: a primeira envolve a distribuição dos analitos sobre o revestimento, seja por

imersão direta ou *headspace*; e a segunda é a etapa de dessorção térmica ou líquida realizada antes da determinação analítica (Pawliszyn, 1995).

2.3.1.3.2 Recobrimento da fibra de SPME

A escolha do recobrimento da fibra precisa levar em consideração, especialmente, o tipo de amostra a ser analisada: polaridade e volatilidade são as características principais a serem avaliadas. Dentre as fibras disponíveis comercialmente, os principais materiais disponíveis são polímeros sorventes como polidimetilsiloxano, poliacrilato e polietilenoglicol, ou sólidos adsorventes como Carboxen, poliestireno-divinilbenzeno e carvão ativo microparticulado (Sigma-Aldrich., 2019). A Tabela 4 descreve os principais tipos de fibras de SPME disponíveis comercialmente e suas aplicações.

Tabela 4. Fibras de SPME disponíveis comercialmente.

Recobrimento	Aplicação
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Compostos apolares, voláteis e semivoláteis
Poliacrilato (PA)	Compostos polares (uso geral)
Carbowax/divinilbenzeno (Carbowax/DVB)	Compostos polares e voláteis
PDMS/DVB	Compostos polares
Carboxen/PDMS (CAR/PDMS)	Compostos voláteis, gasosos e para análises-traço
PDMS/DVB/CAR	Compostos de ampla faixa de polaridade (C ₃ a C ₂₀)

Fonte: Borges *et al.*, 2015.

A fibra PDMS/DVB/Car, utilizada neste trabalho, é composta por duas camadas homocêntricas de recobrimento, onde o suporte possui recobrimento de um filme de 25 μm de Carboxen 1006 (carvão ativo macroporoso) o qual é recoberto novamente com uma segunda camada de filme de 15 μm de DVB, sendo ambos dispersos em PDMS. Esse tipo de recobrimento é o mais apropriado para a sorção efetiva de analitos de uma ampla faixa de polaridade e volatilidade, sendo geralmente indicado para análises de amostras complexas (Sigma-Aldrich, 2019; Borges *et al.*, 2015).

2.3.1.3.3 Tempo de extração

O tempo de extração em SPME deve ser otimizado para que seja o mesmo ou esteja bem próximo do tempo de equilíbrio, onde a quantidade de analito extraída seria a máxima e proporcional à concentração de analito presente na matriz. A determinação do tempo de extração ocorre através da relação entre o tempo de extração e a resposta analítica, por meio da massa extraída ou área do pico cromatográfico (Borges *et al.*, 2015).

No entanto, trabalhar em condição de equilíbrio pode não ser possível ou viável. Em alguns casos, o tempo de equilíbrio pode ser demasiadamente grande, o que pode tornar o processo impraticável. Conjuntamente, em muitos casos ocorre decréscimo na massa extraída após tempos muito longos de extração. Isso pode acontecer devido à competição entre as moléculas dos analitos e os sítios ativos, o que além de dificultar a obtenção do equilíbrio, também impede uma correlação verdadeira entre as massas extraídas e as concentrações (Pawliszyn, 2009). Outros fatores que podem ocasionar um decréscimo na quantidade de massa extraída após tempos muito longos de extração são a perda dos analitos por adsorção à superfície ou por difusão através das tampas e septos dos frascos utilizados na extração (Borges *et al.*, 2015).

2.3.1.3.4 Temperatura de extração

A variação da temperatura de extração influencia duplamente: na posição dos equilíbrios envolvidos e na velocidade com que estes são alcançados. Como explicado anteriormente na seção 2.3.1.1, o acréscimo de temperatura aumenta a taxa de transferência de massas entre as fases envolvidas, fazendo com que o equilíbrio seja alcançado mais rapidamente (Prosen, Zupancic-Krajl, 1999). No entanto, apesar de

umentar a difusão dos coeficientes dos analitos, o aumento da temperatura também é responsável por reduzir a constante de distribuição do analito, uma vez que a adsorção é um processo exotérmico, diminuindo a eficiência de extração (Alpendurada, 2000). Assim, o efeito geral da temperatura não é previsível, sendo necessário que a otimização da temperatura seja realizada de forma empírica.

2.3.1.3.5 Técnica de agitação

De acordo com Valente e Augusto, 2000, a otimização da agitação é essencial para a diminuição do tempo de extração, uma vez que maiores agitações facilitam o contato entre analito e fibra. A técnica de agitação mais utilizada é a agitação com barras magnéticas de teflon, por ser mais simples. Na literatura, outra técnica de agitação foi apresentada recentemente por Mendes *et al.* 2018, que descreveu o uso de disco rotativo com barra magnética para análise de amostras de solo.

2.3.1.3.6 Condicionamento do meio aquoso

A variação de pH e concentração de sal em amostras aquosas são dois fatores que podem ter influência no deslocamento da posição dos equilíbrios de extração. O efeito do pH na eficiência de extração é mais considerável em análises de moléculas que tenham características ácidas ou básicas em meio aquoso. As formas iônicas dos compostos orgânicos não podem ser extraídas pois não são volatilizáveis nem solúveis nas fases extratoras usadas em SPME, sendo necessário que as moléculas estejam em sua forma neutra. Para isso, é preciso que o equilíbrio de dissociação seja deslocado no sentido de sua forma não iônica, ajustando-se o pH para 1-2 unidades abaixo do pKa dos analitos ácidos, ou 1-2 unidades acima do pKa para analitos básicos (Pawliszyn, 2009; Kirschner *et al.*, 2017).

O ajuste da força iônica, geralmente realizado com adição de cloreto de sódio, pode favorecer a extração de analitos polares através do chamado efeito *salting out*. Nesse efeito, os íons Na^+ e Cl^- são solvatados pelas moléculas de água, fazendo com que menos moléculas de água estejam disponíveis para solubilizar os analitos, viabilizando a migração destes para o recobrimento extrator da fibra. No entanto, altas concentrações de eletrólitos podem provocar um efeito contrário, onde as interações entre as moléculas dos analitos e os cátions e ânions provenientes do sal passam a ser significativas, causando uma diminuição na mobilidade dos analitos para a fase extratora (Pawliszyn, 2009; Merib, 2016). O aumento da força iônica em amostras aquosas contendo analitos

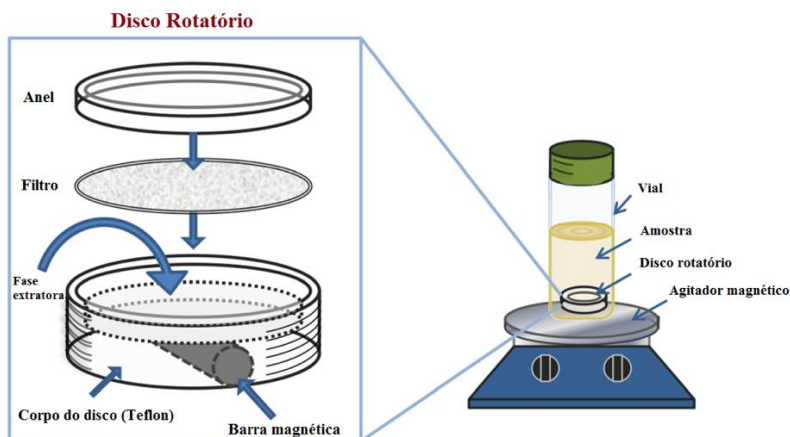
apolares pode ter um efeito contrário, prejudicando a eficiência de sua extração. Esse efeito pode ser explicado através do chamado *oil effect*, onde os analitos são repelidos para a interface água/*headspace*, minimizando a interação com a fibra imersa no meio aquoso (Dias, 2015). A redução da solubilidade causada pelo aumento da força iônica também pode resultar em precipitação ou adsorção dos analitos nas paredes do frasco de vidro. Assim, a influência da força iônica em uma análise também tem caráter imprevisível, sendo necessário que sua determinação seja feita empiricamente.

2.3.2 Extração sortiva em disco rotativo

A técnica de RDSE surgiu para superar uma limitação da técnica de SBSE, que foi introduzida em 1999 e seus princípios são semelhantes aos da SPME (Baltussen *et al.*, 1999). Apesar de sua eficácia e vantagens como uma técnica ecologicamente correta, a SBSE apresenta limitações em relação aos danos físicos causados à fase extratora devido ao contato direto com a parte inferior do frasco quando o dispositivo é agitado no frasco de extração (Liu *et al.*, 2005).

Para superar essa desvantagem, Richter *et al.* utilizou um disco rotativo revestido com PDMS em sua superfície superior, introduzindo assim a técnica de RDSE (Richter *et al.*, 2009). Uma segunda versão do RDSE foi descrita em 2014, onde o disco rotativo de teflon continha uma cavidade preenchida com uma fase sorvente, selecionada de acordo com a polaridade dos analitos. Para evitar o vazamento da fase sorvente, a cavidade é coberta com filtro de fibra de vidro e selada com um anel de teflon, como ilustrado na Figura 4 (Cañas e Richter, 2012).

Figura 4. Diagrama para a segunda versão do disco rotativo com cavidade.



Fonte: Adaptado de Cañas *et al.*, 2014.

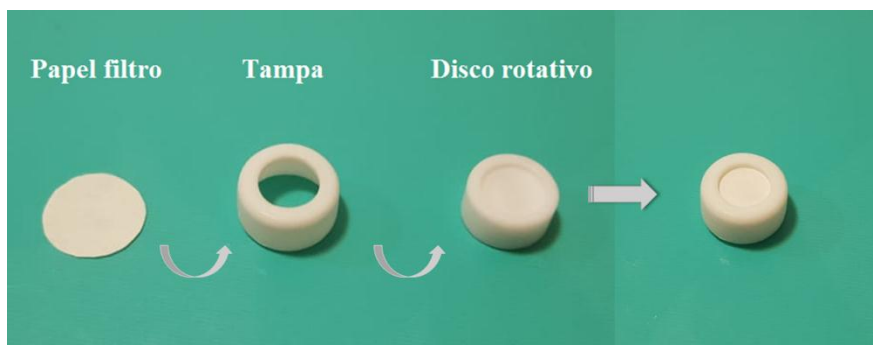
Geralmente os estudos envolvendo o uso de RDSE faz, em sua maioria, análises de amostras aquosas (Carasek *et al.*, 2018). Seu uso associado a cromatografia líquida de ultra eficiência já foi reportado para a quantificação de drogas ácidas em águas residuais, através de um método ambientalmente amigável com o uso reduzido de solventes orgânicos tóxicos (Becerra-Herrera *et al.* 2015). Destaca-se também a proposta de novas fases extratoras, como por exemplo o uso de polímeros molecularmente impressos, apresentada em 2015 por Manzo *et al.* para determinação de diclofenaco e ácido mefenâmico em amostras de águas residuais. Em 2017, o uso de líquidos iônicos intercalados em montmorilonita como fase extratora em RDSE para determinação de bifenilas policloradas (PCBs) em amostras aquosas (Fiscal-Ladino *et al.*, 2017).

Apesar das diversas vantagens associadas aos procedimentos de microextração em comparação às técnicas convencionais de extração, existem limitações em relação à análise de amostras sólidas, especificamente na determinação de compostos de baixa volatilidade. A maioria dos estudos envolvendo o uso de RDSE ainda fazem análise de matrizes aquosas, sendo o disco utilizado como imobilizador da fase extratora (Carasek *et al.*, 2018). Assim, uma terceira aplicação de disco rotativo associada a SPME foi descrita por Mendes *et al.* para a análise

de amostras de solo para determinar compostos não polares, como PCBs (Mendes *et al.*, 2018).

Nesta terceira versão, ilustrada na Figura 5, a cavidade do disco é preenchida com a amostra sólida a ser analisada em vez de um material sorvente, e a água presente no frasco age como solvente de lixiviação. Os analitos são então transferidos da amostra sólida para a água a uma temperatura apropriada, deixados por um tempo suficiente para que o equilíbrio de transferência de massa seja atingido, e então extraídos da água por imersão direta por SPME (DI-SPME).

Figura 5. Dispositivo de disco rotativo com cavidade em nova aplicação.



Fonte: Autoria própria, 2019.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo do trabalho é o desenvolvimento de um método verde e simples para a extração de agrotóxicos em amostras de arroz através do uso combinado do dispositivo utilizado na técnica de extração sortiva em disco rotativo (RDSE) e da microextração em fase sólida (SPME) sem a utilização de solventes orgânicos no procedimento de preparo de amostra.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de extração como massa de amostra, tempo e temperatura de extração e porcentagem de sal;
- Determinar os parâmetros analíticos de mérito tais como a linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão intra-dia e precisão inter-dia;
- Avaliar a robustez da metodologia através do método de Youden;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de arroz obtidas no comércio local.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Padrões analíticos de carbofurano, molinato, atrazina, simazina e tebuconazol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA) e, em seguida, usados para preparar soluções padrão separadamente desses compostos na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol obtido da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). As soluções padrão foram usadas para preparar uma mistura dos compostos em metanol na concentração de 50 mg L^{-1} de tebuconazol e 10 mg L^{-1} dos demais analitos. A água foi acidificada com ácido clorídrico da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA) em pH aproximadamente de 2,2. Cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil) foi utilizado para avaliar a influência da força iônica. O disco rotativo utilizado foi obtido da VWR International (Radnor, PA, EUA). Este dispositivo consiste de um disco de Teflon contendo uma barra magnética de 1,5 cm de diâmetro e uma cavidade de $0,44 \text{ cm}^3$. O anel de teflon usado para selar o disco foi coberto com um papel de filtro qualitativo (tamanho médio dos poros de $14 \mu\text{m}$) obtido da J. Prolab (Paraná, Brasil). Um liquidificador Philips Walita modelo RI2030/00 (Amsterdã, Holanda) foi usado para moer as amostras de arroz, para um tamanho médio de 10 mesh. Um banho termostático (Microquímica Ind. e Com. Ltda, Palhoça, Santa Catarina, Brasil), agitadores magnéticos (Dist, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), frascos de 40 mL da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) foram usados. A fibra de SPME (DVB/Car/PDMS, $50/30 \mu\text{m}$ de espessura, 2 cm de comprimento) foi obtida da Supelco. Água ultrapura foi purificada em um sistema *Mega Purity* (Billerica, EUA) com resistividade de $18 \mu\Omega\cdot\text{cm}$.

4.2 Amostras de arroz

Amostras de arroz provenientes de produtores industriais certificados dos tipos parboilizado e orgânico (ambos do tipo 1) foram adquiridas no comércio local (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). As amostras de arroz foram previamente moídas em um liquidificador para aumentar a área superficial em um tamanho médio de granulometria de 10 mesh. Em seguida, 1,0 g da amostra de arroz foi inserida em um béquer e coberta com diferentes volumes de solução da mistura contendo os analitos para obter diferentes concentrações dos analitos juntamente com cerca de 2 mL de metanol para a total homogeneização. A amostra então

foi agitada e deixada em repouso por pelo menos 24 h até a secagem completa do solvente antes do desenvolvimento do procedimento de extração.

4.3 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás QP-Plus 2010 acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu, Kyoto, Japan). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar Restek (Torrance, CA, USA) modelo Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme), e hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste em fluxo constante de 1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi ajustada em 250 °C e a temperatura do forno foi inicialmente estabelecida em 60 °C, mantida por 1 min, aumentada para 150 °C a uma taxa de 25 °C min⁻¹ e depois aumentada para 270 °C a uma taxa de 15 °C min⁻¹ e mantida por 3,5 min, totalizando 16,10 min de corrida cromatográfica. Todas as injeções foram realizadas manualmente em modo *splitless*.

O espectrômetro de massas foi operado no modo por eletroionização (EI) a 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi ajustada em 250 °C e a interface a 290 °C, com um tempo de corte do solvente de 3 min. Nenhum efeito residual foi observado sob as condições experimentais. A quantificação dos analitos foi realizada em modo de monitoramento de íon selecionado (SIM) utilizando o íon de maior intensidade e as razões massa/carga (*m/z*), que são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Analitos estudados, classe dos agrotóxicos e razões massa/carga.

Analito	Classe	Íons de identificação para método SIM (<i>m/z</i>)*
Carbofurano	Carbamato	164 , 149, 122, 131, 123
Molinato	Carbamato	55, 126 , 41, 42, 56
Atrazina	Triazina	200 , 215, 58, 173, 202
Simazina	Triazina	44, 201 , 186, 43, 173
Tebuconazol	Triazol	125 , 70, 250, 83, 127

*Os íons em negrito foram utilizados para a determinação quantitativa dos analitos

Fonte: Autoria própria, 2019.

4.4 Otimização dos parâmetros de extração

Os parâmetros que podem influenciar a eficiência de extração dos analitos por DI-SPME usando a fibra comercial DVB/Car/PDMS foram avaliados. Primeiramente, foi realizada uma otimização univariada para avaliar a massa de arroz a ser inserida na cavidade do disco rotativo, e nesta etapa foram investigadas as massas de 50, 75, 100 e 125 mg (máximo valor possível de inserir na cavidade), na qual os experimentos foram realizados em triplicata. O tempo de extração (30 a 120 min), a temperatura de extração (20 a 80 °C) e a concentração de cloreto de sódio (0 a 30% (m/v)) foram avaliados simultaneamente através de um planejamento composto central, totalizando 17 experimentos, incluindo uma triplicata no ponto central como mostrado na Tabela 6. As extrações foram realizadas em uma concentração de 2500 ng g⁻¹ de tebuconazol e 500 ng g⁻¹ dos outros analitos nas amostras de arroz. Todas as extrações foram realizadas sob controle de temperatura com o auxílio de um banho termostaticado, com água em pH 2,2. e sob agitação magnética constante de 2300 rpm. Os dados experimentais foram avaliados usando Microsoft Excel 2016, Statsoft Statistica 8.0 e Estatcamp Action Stat.

Tabela 6. Planejamento composto central para avaliação do tempo, temperatura e adição de sal no procedimento de extração.

Experimento	Tempo (min)	Sal (%)	Temperatura (°C)
1	48	6	30
2	48	24	68
3	102	6	68
4	102	24	30
5 (C)	75	15	49
6	48	6	68
7	48	24	30
8	102	6	30
9	102	24	68
10 (C)	75	15	49
11	30	15	49
12	120	15	49
13	75	0	49
14	75	30	49
15	75	15	20
16	75	15	80
17 (C)	75	15	49

Fonte: Aatoria própria, 2019.

4.5 Validação da metodologia desenvolvida

As figuras analíticas de mérito foram determinadas usando as condições de extração previamente otimizadas. Curvas de calibração foram obtidas em cinco diferentes concentrações de cada analito, em que foi possível determinar a faixa linear de trabalho, os coeficientes de correlação (r), limite de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). As curvas de calibração foram construídas plotando a área do pico cromatográfico versus a concentração de analitos adicionados às amostras de arroz em triplicata. Os coeficientes de correlação (r) foram calculados com base nas curvas de calibração. Os valores de LODs e LOQs foram calculados com base nas razões sinal-ruído de 3 ($S/N = 3$) e 10 ($S/N = 10$), respectivamente.

As recuperações relativas ($n=3$) e precisão intra-dia ($n=3$) foram obtidas através da extração de concentrações conhecidas dos analitos nas amostras de arroz, enriquecidas em três níveis (50, 500 e 1500 ng g⁻¹ para o molinato, 50, 2500 e 7500 ng g⁻¹ para o tebuconazol e 10, 500 e 1500 ng g⁻¹ para os outros analitos). A precisão inter-dia ($n=9$) foi avaliada realizando-se as extrações nas amostras de arroz enriquecidas com os analitos (2500 ng g⁻¹ para o tebuconazol e 500 ng g⁻¹ para os outros analitos), em três dias consecutivos.

Além disso, para avaliar a robustez do método desenvolvido, foi realizado o teste de Youden, variando os principais fatores que podem influenciar a resposta do método, que são mostrados na Tabela 7 com suas respectivas variações.

Tabela 7. Parâmetros experimentais e respectivas variações para avaliação da robustez do método.

Parâmetro	Nível		
	Baixo (-)	Nominal	Alto (+)
Temperatura (P1)	78 °C	80 °C	82 °C
Tempo de extração (P2)	38 min	40 min	42 min
Tempo de dessorção (P3)	9 min	10 min	11 min
Fluxo do gás (P4)	0,9 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹	1,1 mL min ⁻¹
Rotação do disco (P5)	2200 rpm	2300 rpm	2400 rpm
Quantidade de amostra (P6)	123 mg	125 mg	127 mg
Temperatura do injetor (P7)	248 °C	250 °C	252 °C

Fonte: Autoria própria, 2019.

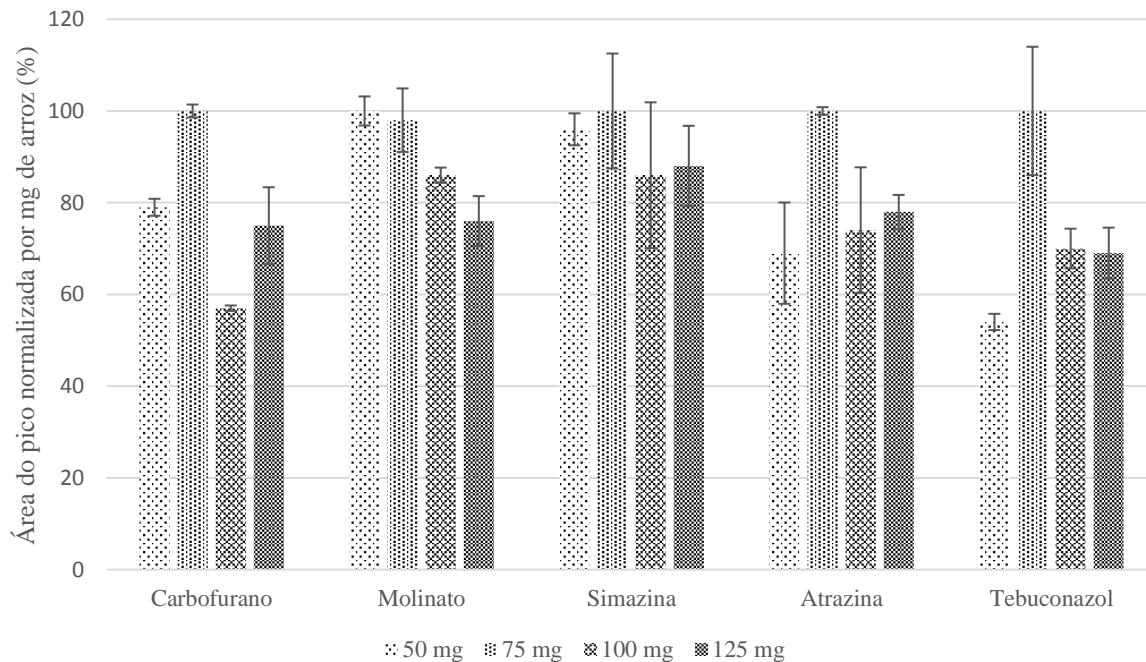
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Algumas condições foram fixadas inicialmente para avaliar o desempenho da metodologia visando a máxima eficiência de extração, sendo assim, a fibra de SPME DVB/Car/PDMS de 2 cm foi a fibra comercial escolhida devido à sua aplicabilidade para a extração de compostos com uma ampla gama de volatilidade e polaridade, além da possibilidade de alcançar baixos valores de LOD e LOQ (Pawliszyn, 2009). O modo de extração de imersão direta foi utilizado devido à baixa volatilidade dos analitos e o pH da água ultrapura foi ajustado para 2,2 de acordo com o pKa dos analitos, sendo necessário que os analitos estejam na forma ionizada para serem facilmente lixiviados da amostra de arroz para a água e então posteriormente serem extraídos para a fibra de SPME. Embora alguns compostos estejam ionizados nesse pH, a eficiência de extração com a fibra de SPME não foi prejudicada como será visto nos resultados das respostas cromatográficas que foram bem satisfatórias. Assim, uma condição de compromisso do pH do meio foi escolhida para todos os analitos avaliados. Outro parâmetro que pode afetar a lixiviação dos analitos para a água é a velocidade de agitação do disco, na qual maiores velocidades de agitação aumentam o transporte de massa e diminuem o tempo de extração (Cañas *et al.*, 2014), sendo assim, a maior velocidade possível foi escolhida considerando a estabilidade do disco no frasco, sendo de 2300 rpm.

5.1 Otimização dos parâmetros de extração na etapa de preparo de amostra

5.1.1 Otimização da massa de amostra de arroz

A massa de amostra de arroz inserida na cavidade do disco é um fator importante para alcançar menores LODs e LOQs da metodologia. Em geral, maiores quantidades de amostra resultam em uma quantidade maior de analitos que pode ser transferida para a fase aquosa e extraída pela fibra de SPME, consequentemente atingindo menores limites. Nesta otimização, massas de arroz na faixa de 50 a 125 mg foram avaliadas, sendo a massa de 125 mg a massa máxima que pode ser inserida na cavidade do disco. Para esta otimização, foram adotadas as áreas de pico cromatográficas normalizadas em relação a massa pesada. Os resultados obtidos nesta avaliação são mostrados na Figura 6.

Figura 6. Efeito da quantidade de amostra de arroz na extração dos agrotóxicos selecionados nesse estudo.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Como as respostas obtidas com diferentes massas foram muito semelhantes para alguns dos analitos, foi realizado um teste estatístico através da ANOVA, que é mostrada na Tabela 8. O teste ANOVA mostrou que o valor de p foi maior que 0,05, portanto, nenhuma diferença significativa nas respostas para os analitos usando diferentes massas de arroz foi notada. Além disso, para avaliar a capacidade máxima da cavidade do disco e o desempenho da extração nessa condição, 125 mg foram escolhidos para os próximos experimentos. Apesar de o valor máximo de massa de amostra (125 mg) ter sido escolhido, ainda é significativamente menor que as quantidades de 5 g e 10 g de arroz usado em outras metodologias previamente relatadas (Nguyen *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2013).

Tabela 8. Avaliação estatística utilizando ANOVA: Fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	5	42434666	8486933	2.98E+14
Coluna 2	5	48124800	9624960	3.6E+14
Coluna 3	5	36848760	7369752	2.12E+14
Coluna 4	5	31266566	6253313	1.47E+14

ANOVA

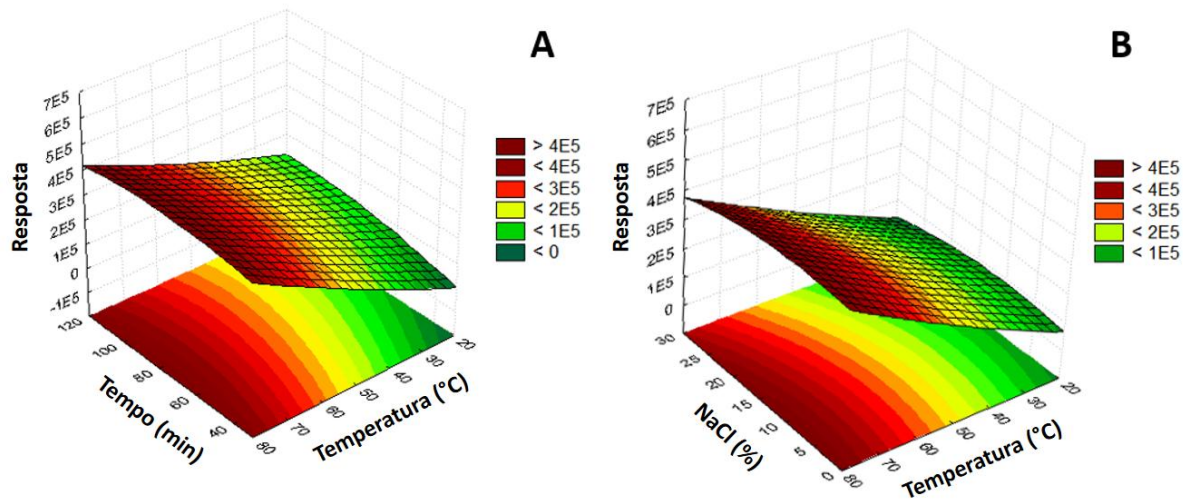
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3.15E+13	3	1.05E+13	0.04137	0.988359	3.238872
Dentro de grupos	4.07E+15	16	2.54E+14			
Total	4.1E+15	19				

Fonte: Autoria própria, 2019.

5.1.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e de adição de sal

Para essa otimização foi utilizado um planejamento composto central para a avaliação simultânea da temperatura de extração, tempo de extração e concentração de sal. As superfícies de resposta obtidas a partir desse planejamento são mostradas na Figura 7 com a resposta correspondente às médias geométricas dos picos cromatográficos dos analitos, que apresentou uma função quadrática com coeficiente de determinação igual a $r^2 = 0,8892$, o que representa um resultado bastante satisfatório para esse tipo de superfície resposta, pois revela uma boa correlação entre os dados experimentais e os valores preditos. Segundo a Figura 7, as melhores condições de extração foram obtidas com um tempo de extração de 40 min a 80 °C e sem a adição de cloreto de sódio no meio aquoso.

Figura 7. Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central, na concentração de 2500 ng g⁻¹ para o tebuconazol e 500 ng g⁻¹ para os demais analitos. A) Tempo de extração versus temperatura de extração; B) Porcentagem de NaCl versus temperatura de extração.



Fonte: Autoria própria, 2019.

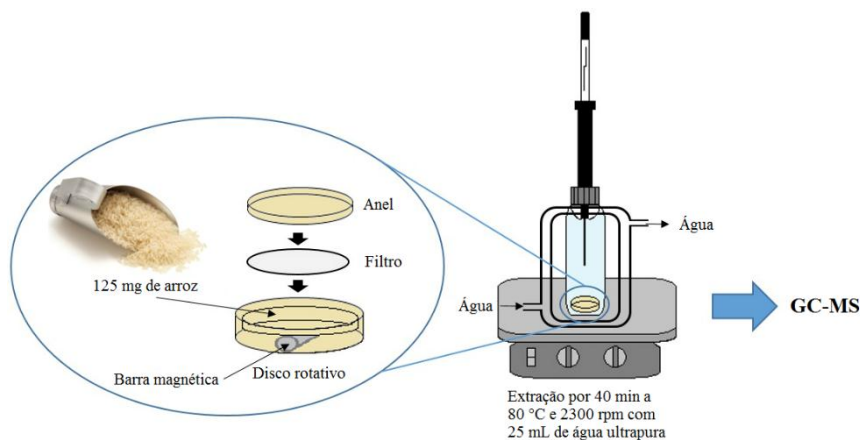
A temperatura é um parâmetro importante a ser avaliado em microextração em fase sólida, uma vez que altas temperaturas podem reduzir significativamente o tempo de equilíbrio, tornando o processo de extração mais rápido (Pawliszyn, 2009). Entretanto, um limite de 80 °C foi estabelecido para evitar a alta pressão interna, devido ao uso de água no sistema de extração (Mendes *et al.*, 2018). Como pode ser visto na Figura 7-A, um aumento na temperatura resultou em uma resposta analítica mais alta, pois maiores temperaturas aumentam a difusão dos analitos, resultando em maiores taxas de transferência de massa dos analitos presentes na matriz para a água e, posteriormente, para a fibra de SPME (Pawliszyn, 2009). Este resultado também explica o tempo de extração reduzido associado a altas temperaturas. O tempo de extração variou de 30 a 120 min e respostas satisfatórias foram obtidas aplicando-se um tempo de 40 min, conforme mostra a Figura 7-A.

O efeito do sal foi estudado variando-se a concentração de cloreto de sódio de 0 a 30% (m/v), que é a porcentagem de saturação de NaCl em água em temperatura ambiente. De acordo com a Figura 7-B, um aumento na concentração de NaCl não promoveu melhora significativa na eficiência de extração, portanto, devido ao comportamento experimental observado, não foi adicionado sal às amostras na etapa de extração.

5.2 Visão geral do procedimento experimental otimizado

O procedimento de preparo de amostra otimizado desenvolvido nesse trabalho está demonstrado na Figura 8. Primeiramente, 125 mg da amostra de arroz com granulometria aproximada de 10 mesh foram inseridos na cavidade do disco e o anel de teflon combinado com papel quantitativo foi utilizado para selar o disco e aprisionar a amostra de arroz no interior do dispositivo. O disco foi então inserido em um frasco de vidro de 40 mL e coberto com 25 mL de água ultrapura de pH 2,2. O frasco foi agitado manualmente e colocado no banho termostático a 80 °C para o procedimento de extração utilizando um agitador magnético a 2300 rpm. Em seguida, a fibra comercial de SPME foi inserida no frasco no modo de imersão direta por 40 min. Após esse período de tempo, a fibra foi então retirada e inserida no injetor do GC-MS para a realização da dessorção térmica por 10 min.

Figura 8. Procedimento experimental otimizado da metodologia desenvolvida.



Fonte: Autoria própria, 2019.

5.3 Validação da metodologia desenvolvida

Após a otimização de todos os parâmetros da metodologia desenvolvida, o método proposto nesse trabalho foi validado a partir da obtenção de curvas de calibração usando amostras de arroz orgânico parboilizado fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos. Como pode ser visto na Tabela 9, uma linearidade satisfatória foi obtida para este método, com coeficientes de correlação variando de 0,9881 para simazina a 0,9998 para carbofurano. Os valores obtidos para os limites de detecção atingiram níveis de partes por trilhão para dois analitos e partes por bilhão para três analitos, representando resultados importantes para a análise de traços. Os LODs variaram de 0,46 ng g⁻¹ para simazina a 5,9 ng g⁻¹ para o tebuconazol e os LOQs variaram de 1,53 ng g⁻¹ para simazina a 19,7 ng g⁻¹ para o tebuconazol. O regulamento da União Europeia (EC) N° 396/2005 estabelece limites máximos de resíduos para estes agrotóxicos em arroz de 10 ng g⁻¹ para o carbofurano, molinato e simazina, 50 ng g⁻¹ para atrazina e 1000 ng g⁻¹ para o tebuconazol (Comissão Europeia, 2018). Portanto, o método proposto neste estudo apresenta excelentes resultados para todos os agrotóxicos avaliados, com

valores de LOD e LOQ abaixo dos valores estabelecidos nas regulamentações para estes compostos em amostras de arroz.

Tabela 9. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e de quantificação para os analitos.

Analito	Faixa linear de trabalho (ng g ⁻¹)	Equação linear	r	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
Carbofurano	10-1500	$y = 18,247x + 389,76$	0,9998	2,5	8,5
Molinato	50-1500	$y = 3182,4x + 378653$	0,9989	3,7	12,2
Atrazina	10-1500	$y = 292,85x + 11325$	0,9963	0,57	1,9
Simazina	10-1500	$y = 149,97x + 23023$	0,9881	0,46	1,53
Tebuconazol	50-7500	$y = 37,105x + 3701$	0,9993	5,9	19,7

Fonte: Autoria própria, 2019.

A exatidão e a precisão da metodologia foram avaliadas com base nas recuperações relativas, em triplicatas, na qual amostras de arroz orgânico parboilizado foram fortificadas com os analitos em três concentrações diferentes, conforme detalhado na metodologia. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 10. A recuperação relativa dos analitos variou de 76% (50 ng g^{-1}) a 109% (500 ng g^{-1}), ambos para o molinato. A precisão intra-dia e inter-dia variou de 1,3% a 19% e de 3,5% a 6,5%, respectivamente. Também pode ser observado que existe uma relação inversa entre solubilidade e recuperação: compostos mais solúveis (carbofurano, 322 mg L^{-1} e molinato, 1100 mg L^{-1} a 20° C [PPDB, 2018]) tendem a permanecer na água em vez de serem extraídos pela fibra do que compostos menos solúveis (tebuconazol, 36 mg L^{-1} ; atrazina, 35 mg L^{-1} e simazina, 5 mg L^{-1} a 20° C [PPDB, 2018]), o que reduz a recuperação relativa. Ambos os resultados estão de acordo com as diretrizes de validação para análise de agrotóxicos SANTE/11945/2015 estabelecidos pela Comissão Europeia, em que as recuperações médias aceitáveis estão dentro da faixa 70-120% com uma repetibilidade associada ou RSD $\leq 20\%$.

Tabela 10. Recuperação relativa dos analitos e precisão inter-dia e intra-dia para a extração dos agrotóxicos das amostras de arroz orgânico fortificadas.

Analito	Fortificação (ng g ⁻¹)	Recuperação Relativa (%) (n=3)	Precisão (RSD %)	
			Intra-dia (n=3)	Inter-dia (n=9)
Carbofurano	10	82	1.3	-
	500	93	3.2	5.1
	1500	86	3.4	-
Molinato	50	76	14	-
	500	109	3.8	5.9
	1500	96	5.3	-
Atrazina	10	100	1.8	-
	500	82	3.4	5.2
	1500	101	7.3	-
Simazina	10	107	5.4	-
	500	89	9.4	6.5
	1500	96	3.6	-
Tebuconazol	50	94	7.8	-
	2500	105	10	3.5
	7500	98	19	-

Fonte: Autoria própria, 2019.

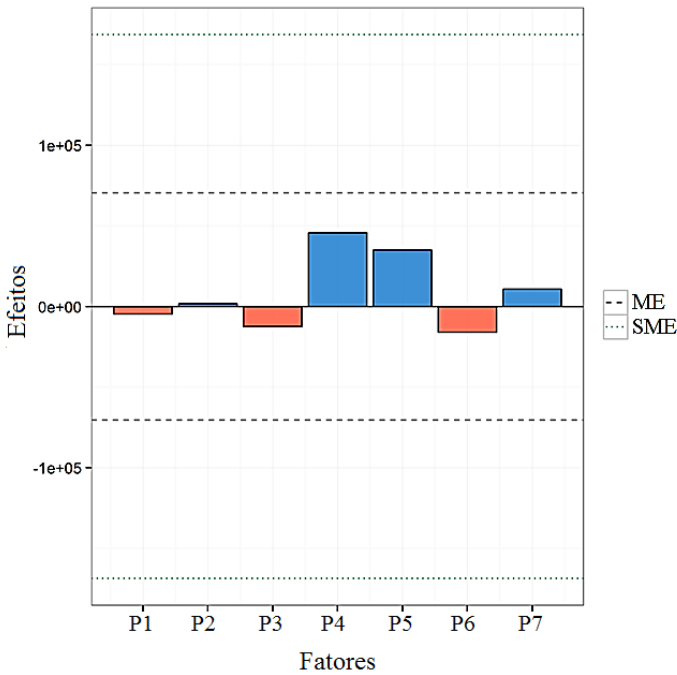
De acordo com a Conferência Internacional da Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonisation*), órgão responsável por diretrizes multidisciplinares (ICH, 2018), a robustez de um procedimento analítico é uma medida de sua capacidade de não ser afetada por variações pequenas, mas deliberadas, nos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade para uso regular. Para avaliar a robustez do método desenvolvido, o teste de Youden foi realizado (Youden, 1972).

Neste teste, os principais fatores que podem influenciar a resposta do método são primeiramente identificados. Para cada um desses fatores, os valores nominais (neste caso, aqueles estabelecidos por meio da otimização) e os valores extremos (alto e baixo) são definidos, simulando uma aplicação de rotina. O experimento é então planejado de acordo com o *design* de dois níveis de Plackett e Burman, que avalia f fatores em $N = f + 1$ experimentos (Leonardi *et al.*, 2015). Sete fatores foram examinados em dois níveis, baixo (-) e alto (+), dando origem a oito experimentos, de acordo com o projeto de Plackett e Burman (Tabela 5). O método Lenth foi aplicado para avaliar os principais efeitos das variáveis (Lenth, 1989). Os efeitos em valores absolutos ($|E_x|$) para cada fator são mostrados na Tabela 11.

Para interpretar os resultados obtidos, o método Lenth foi explicado como uma abordagem estatística. A identificação gráfica dos efeitos relevantes foi realizada com base na Figura 9. Dois critérios são descritos no método Lenth: margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME). ME é um critério de validação para significância estatística quando apenas um efeito é investigado. Quando múltiplos efeitos são testados, como neste estudo, o SME é usado como um limite numérico, e qualquer valor que exceda o SME é considerado como significativo (Bokor *et al.*, 2017).

O SME foi calculado de acordo com Leonardi *et al.* (Leonardi *et al.*, 2015) com um nível de confiança de 95% ($\alpha=0.05$), e o valor obtido foi 168527, como mostrado na Figura 9. Todos os valores absolutos obtidos para os efeitos ($|E_x|$) estão abaixo do SME, indicando que nenhum dos fatores apresenta um efeito significativo. Isso é consistente com a ilustração gráfica dos resultados, indicando que a metodologia desenvolvida nesse trabalho é robusta.

Figura 9. Gráfico de Lenth para a metodologia desenvolvida nesse trabalho.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 11. Efeitos obtidos do planejamento de sete fatores Plackett-Burman.

Fator	Efeitos – Valores absolutos ($ E_x $)
P1	4680
P2	1820.5
P3	12472
P4	456625
P5	35144
P6	160475
P7	108665

Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4 Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura

Os resultados obtidos utilizando o método desenvolvido neste estudo foram comparados com valores obtidos em outros estudos previamente relatados na literatura para a determinação de agrotóxicos em amostras de arroz utilizando diferentes técnicas de preparo de amostras, como mostrado na Tabela 12. Como pode ser visto, nenhum solvente tóxico é usado no método descrito neste trabalho, que é um resultado muito importante em relação aos princípios da Química Verde. Além disso, a quantidade de amostra necessária neste estudo para extrair os agrotóxicos é muito menor do que em outros métodos. Em relação aos LODs e LOQs para o método desenvolvido neste estudo, os valores são satisfatórios, exibindo valores menores que os de outros métodos reportados para os mesmos objetivos deste trabalho. Além disso, a instrumentação utilizada é relativamente simples em comparação com a necessária para a maioria dos outros métodos disponíveis na literatura.

Tabela 12. Comparação do método desenvolvido neste trabalho com outros reportados na literatura para a determinação de agrotóxicos em arroz através de diferentes técnicas de preparo de amostras.

Técnica	Detalhes	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Referência
RDSE modificado/SPME e GC-MS	125 mg de arroz parboilizado, sem solvente, 40 min, 10-7500 ng g ⁻¹	2,5 ^a	8,5 ^a	Este trabalho
		3,7 ^b	12,2 ^b	
		0,57 ^c	1,9 ^c	
		0,46 ^d	1,53 ^d	
		5,9 ^e	19,7 ^e	
QuEChERS, d-SPE e GC-MS/MS	5 g de arroz, 10 mL de MeCN, >73 min, 10-200 ng g ⁻¹	2,7 ^a	8,8 ^a	(Hou <i>et al.</i> , 2013)
		7,1 ^c	23,8 ^c	
		5,8 ^d	19,2 ^d	
QuEChERS modificado, d-SPE, m-PFC e GC- MS/MS	2 g de casca de arroz, 5 mL de MeCN, >11 min, 0,1-5 ng g ⁻¹	0,45 ^a	1,51 ^a	(Han <i>et al.</i> , 2018)
		0,49 ^c	1,64 ^c	
		0,53 ^d	1,77 ^d	
		0,19 ^e	0,62 ^e	
MSPE e HPLC	1 g de arroz, 112.5 mL de ciclohexano, 50 mL de DMF, 27 mL de hexanol, >25 min, 2-1000 ng g ⁻¹	0,04 ^c	0,14 ^c	(Liang <i>et al.</i> , 2018)
MASE-SPE e HPLC-MS/MS	1 g de arroz, 5 mL de MeCN, 30 mL de MeOH, >16min, 1,1-4,2 ng g ⁻¹	1,7 ^a	5,7 ^a	(Song <i>et al.</i> , 2014)

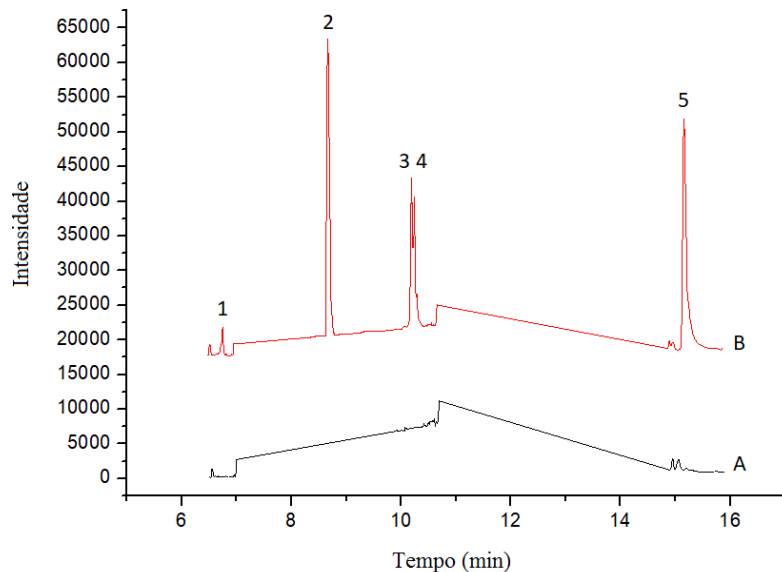
Legenda: a - carbofurano; b - molinato; c - atrazina; d - simazina; e - tebuconazol.

Fonte: Autoria própria, 2019.

5.5 Aplicação da metodologia desenvolvida

O método desenvolvido foi aplicado em quatro diferentes amostras de arroz parboilizado adquiridas em mercados locais da cidade de Florianópolis, Brasil. As análises dessas amostras não apresentaram a presença dos agrotóxicos ou a concentração dos mesmos estavam presentes nas amostras em uma concentração abaixo do LOD da metodologia desenvolvida. Os cromatogramas obtidos para os agrotóxicos extraídos de uma das amostras de arroz enriquecido (7500 ng g⁻¹ para tebuconazol e 1500 ng g⁻¹ para os outros analitos) e de uma amostra de arroz não enriquecido são mostrados na Figura 10.

Figura 10. Cromatogramas dos íons totais para amostra não fortificada e fortificada obtidos através da metodologia proposta. (A) amostra de arroz não fortificada; (B) arroz fortificado com 7500 ng g⁻¹ de tebuconazol e 1500 ng g⁻¹ dos outros analitos.



Legenda: 1 - carbofurano, 2 - molinato, 3 - atrazina, 4 - simazina e 5 – tebuconazol.

Fonte: Autoria própria, 2019.

6 CONCLUSÕES

Um método livre de solvente para a determinação de agrotóxicos polares e semi-polares em amostras de arroz utilizando disco rotativo simultaneamente com DI-SPME em uma única etapa foi desenvolvido com êxito, pela primeira vez, para analisar amostras de alimentos sólidos. Os resultados obtidos para as figuras analíticas de mérito são satisfatórios, com alta eficiência e boa robustez. Apenas pequenas quantidades de amostra são necessárias e os valores de LODs e LOQs alcançados são menores do que os da maioria dos procedimentos relatados na literatura para a determinação de agrotóxicos em amostras de arroz.

A abordagem verde também é uma característica notável neste estudo, uma vez que o método desenvolvido utiliza água como solvente de lixiviação, o que torna a amostra sólida compatível com o SPME para a determinação de compostos polares e de baixa volatilidade. Além disso, esse método mostra-se promissor para aplicação em outras matrizes alimentares como feijão, soja, trigo e/ou milho. De maneira geral, o método desenvolvido apresenta grande potencial para a extração e determinação de diferentes classes de agrotóxicos em amostras de alimentos sólidos.

REFERÊNCIAS

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5828-5835, 2004.

ALPENDURADA, M. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v.39, p. 301-312, 2010.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **J AOAC Int.** v. 86, n.2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.** Relatório 2013-2015. Acessado em: 12-09-18. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Brasília: ANVISA, 2016.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

AUGUSTO, F. *et al.* Design and Validation of Portable SPME Devices for Rapid Field Air Sampling and Diffusion-Based Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 481-486, 2001.

BALTUSSEN, E. *et al.* Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p. 737-747, 1999.

BECERRA-HERRERA, L. M. *et al.* Ultra-high-performance liquid chromatography - Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater, **Journal of Chromatography A**, v. 1423 p. 96–103, 2015.

BLASCO, C. *et al.* Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1, p. 155-160, 2004.

BOJKO, B. *et al.* SPME – Quo vadis? **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 132-151, 2012.

BOKOR, I.; SDRAULIG, S.; SANAGOU, M. Robustness testing of an in-situ caesium extraction unit. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 178-179, p. 426-429, 2017.

BORGES, K. B. QUEIROZ, M. E. FIGUEIREDO, E. C. **Preparo de Amostras Para Análise de Compostos Orgânicos**. LTC, 2015. ISBN 9788521626947.

BRAZILIAN RICE. **Sobre o Brasil**. Acessado em: 08-01-19. Disponível em: <http://brazilianrice.com.br/br/sobre-o-brasil/>. 2019.

ČADKOVÁ, E. *et al.* pKa constant determination of two triazole herbicides : Tebuconazole and Penconazole. **Journal Solution Chemistry**, v. 42, p. 1075-1082, 2013.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229-248, 2000.

CAÑAS, A.; RICHTER, P. Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating disk: Determination of hexachlorobenzene in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 743, p. 75-79, 2012.

CAÑAS, A.; VALDEBENITO, S.; RICHTER, P. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2205-2210, 2014.

CARASEK, E. *et al.* Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 19, e00060, 2018.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8-25, 2015.

Chemicalize Online Database. Disponível em: < <http://www.chemicalize.com> >. Acessado em: 12-10-18. 2018

CHORMEY, D. S.; BAKIRDERE, S. Chapter Seven - Principles and Recent Advancements in Microextraction Techniques. In: CHORMEY, D. S.; BAKIRDERE, S., *et al* (Ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**: Elsevier, v.81, 2018. p.257-294. ISBN 0166-526X.

COMISSÃO EUROPEIA, E. U. **Regulation (EC) No 396/2005. EU Pesticide Database.** Acessado em 10-10-18. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN>. 2018.

CORSINI, E. *et al*. Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, p. 123– 135, 2013.

COSTA, L. G. *et al*. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p.1240-1249, 2008.

DIAS, A. N. **Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva**/Adriana Neves Dias; orientador, Eduardo Carasek – Florianópolis, SC, 2015. 151 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

ELIBARIKI, R.; MAGUTA, M. M. Status of pesticides pollution in Tanzania – A review. **Chemosphere**, v. 178, p. 154-164, 2017.

Embrapa. **Arroz e Feijão.** Acessado em: 12-01-19. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/docs/arroz/produtividadearrozefeijao.htm>. 2018.

FAO. **Save and Grow in Practice: Maize, Rice and Wheat, a Guide to Sustainable Cereal Production.** Acessado em 10-10-18. Disponível em:

<http://www.fao.org/3/a-i4009e.pdf> . Rome: 2016. ISBN 978-92-5-108519-6. 2016

FAO. **Save and Grow: A policymaker's guide to the sustainable intensification of smallholder crop production.** Acessado em 10-10-18. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/014/i2215e/i2215e.pdf> Rome: 2011. ISBN 978-92-5-106871-7. 2018.

FAOSTAT. Online statistical database. **Agri-Environmental Indicators - Pesticides.** Acessado em 10-01-19. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>. 2019

FAOSTAT. Online statistical database. **Production - Value of Agricultural Production.** Acessado em 21-11-18. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> 2018.

FISCAL-LADINO, M. J. A., et al. Ionic liquids intercalated in montmorillonite as the sorptive phase for the extraction of low-polarity organic compounds from water by rotating-disk sorptive extraction, **Analytica Chimica Acta**, v. 953, p. 23–31, 2017.

HAN, Y. *et al.* Simultaneous determination of 124 pesticide residues in Chinese liquor and liquor-making raw materials (sorghum and rice hull) by rapid Multi-plug Filtration Cleanup and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 241, p. 258-267, 2018.

HOU, X. *et al.* A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1198-1205, 2013.

IBGE. **Censo Agro 2017.** Acessado em: 08-01-19. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/resultados-censo-agro-2017.html>. 2019.

ICH. **ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2B.** Available online: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Acessado em 13-08-18. Disponível em: < <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> >.

JARDIM, A. N.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

KALLIORA, C. *et al.* Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 346, p. 58-75, 2018.

KIRSCHNER, N. *et al.* Novel approach to high-throughput determination of endocrine disruptors using recycled diatomaceous earth as a green sorbent phase for thin-film solid-phase microextraction combined with 96-well plate system. **Analytica Chimica Acta**, v. 996, p. 29-37, 2017.

LENTH, R. V. Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469-473, 1989. ISSN 00401706. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/1269997> >.

LEONARDI, F. *et al.* A step towards accreditation: A robustness test of etching process. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 102, p. 93-97, 2015.

LIANG, L. *et al.* Magnetic solid-phase extraction of triazine herbicides from rice using metal-organic framework MIL-101(Cr) functionalized magnetic particles. **Talanta**, v. 179, p. 512-519, 2018.

LIU, W. *et al.* Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, n. 1, p. 1-7, 2005.

LÓPEZ, O. *et al.* Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, v. 171, p. 146–153, 2007.

LUKE, M.A. *et al.* Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal - Association of Official Analytical Chemists.**, v. 58, n.5, p. 1020-1026, 1975.

LUKE, M.A. *et al.* Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 64, n. 5, p. 1187-1195, 1981.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1, p. 1-10, 1998.

MANZO, K. V. et al. A molecularly imprinted polymer as the sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device for the determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p.130–137, 2015.

MAPA. **Valor de produção de 2017**. Acessado em 08-01-29. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-da-producao-de-2017-e-de-r-533-5-bilhoes.2017>.

MENDES, L. D. *et al.* Development of an eco-friendly method for the determination of total polychlorinated biphenyls in solid waste by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2018.

MERIB, J. O. **Desenvolvimento e aplicação de estratégias alternativas para a microextração em gota única e microextração em fase sólida utilizando líquidos iônicos poliméricos**/Josias de Oliveira Merib; orientador, Eduardo Carasek – Florianópolis, SC, 2016. 196 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde.

NGUYEN, T. D. *et al.* A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 1, p. 67-74, 2008.

PAREJA, L. *et al.* Analytical methods for pesticide residues in rice. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 270-291, 2011.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Beijing: Chemical Industry Press of China, 2009.

PAWLISZYN, J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 113-122, 1995.

PPDB. **Pesticide Properties DataBase. University of Hertfordshire.** Acessado em 21-05-18. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>. 2018.

PRETTY, J.; BHARUCHA, Z. P. Sustainable intensification in agricultural systems. **Annals of Botany**, v. 114, n. 8, p. 1571-1596, 2018.

PROSEN, H.; ZUPANCIC-KRAJL, L. Solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, 1999.

RICHTER, P. *et al.* Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 49, p. 8598-8602, 2009.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 188-201, 2018.

SECK, P. A. *et al.* Crops that feed the world 7: Rice. **Food Security**, v. 4, n. 1, p. 7-24, March 01 2012. ISSN 1876-4525. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0168-1> >.

SIGMA-ALDRICH. **Selection Guide for Supelco SPME Fiber.** Acessado em 13-04-19. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html#tips> >.

SONG, W. *et al.* A fast, simple and green method for the extraction of carbamate pesticides from rice by microwave assisted steam extraction coupled with solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 143, p. 192-198, 2014.

SPIETELUN, A. *et al.* Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1321, p. 1-13, 2013.

VELAZQUEZ-MANZANARES, M. *et al.* Triazine Herbicides Transfer at the Water/1,2Dichloroethane Interface. **J. Electrochem. Soc.** V. 155, Issue 10, p. F218-F222. 2008.

VIEIRA, D. C. *et al.* Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**, v. 162, p. 48-54, 2016.

XU, C.-H. *et al.* Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 12-29, 2016.

YADAV, S. K. *et al.* Pesticide Applications-Threat to Ecosystems. **Journal of Human Ecology**, v. 32, p. 37-45, 2010.

YOU DEN, W. J. **Statistical Technique for Collaborative Tests**. Washington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1972.

ZARPON, L. *et al.* Montmorillonite as an adsorbent for extraction and concentration of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, n. 1, p. 81-87, 2006.