



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXANDRE DOS REIS SILVA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM CERVEJA BRASILEIRA

*METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF
PESTICIDE RESIDUES IN BRAZILIAN BEER*





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXANDRE DOS REIS SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM CERVEJA BRASILEIRA**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

***METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF
PESTICIDES RESIDUE IN BRAZILIAN BEER***

Defense exam presented to the Graduate Programm in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586d	<p>Silva, Alexandre dos Reis Determinação de pesticidas em cerveja brasileira / Alexandre dos Reis Silva ; orientador Sandro Navickiene. - São Cristóvão, 2018. 80 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2018.</p> <p>1. Cerveja - Indústria. 2. Cereais. 3. Pesticidas. 4. Pesquisa - Metodologia. I. Navickiene, Sandro. II. Título.</p>
	CDU 54:663.4



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Alexandre dos Reis Silva apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/02/2018.

Sandro Navickiene
Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Lisiane Santos
Profª. Drª. Lisiane dos Santos Freitas
Departamento de Química – UFS

Adalberto Menezes Filho
Prof. Dr. Adalberto Menezes
Instituto Federal de Sergipe - IFS

*Às pessoas que me tornaram o que sou
hoje:
minha mãe Albecy,
meu tio Claudio,
minha avó Maria dos Prazeres
e minha avó Maria do Amparo.*

DEDICO

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Albecy dos Reis, meu tio Claudio dos Reis e minhas avós Maria do Amparo e Maria dos Prazeres (*in memorian*) por serem meus pilares e por todo amor.

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene pelas oportunidades, pelo conhecimento transmitido e dedicação como pesquisador e orientador.

Ao amigo Msc. Fabricio pelos conselhos, conhecimento transmitido e apoio durante essa jornada.

Aos valiosos amigos Diego, Eduardo, Lincoln, Danylo, Yane, Felipe, Mateus e Camilla por toda dedicação, incentivo e confiança no meu crescimento.

Às pessoas que construíram minha motivação com palavras de incentivo e que nunca serão esquecidas Isabella, Sabrina, Luiza, Guilherme, Christean, Ayslan e Luiz.

Aos companheiros do laboratório LCP por toda descontração e conversas essenciais para uma boa convivência.

Aos professores do Departamento de Química por todo conhecimento acadêmico e sobre vida repassados durante todos esses anos de convivência.

A CAPES e a FAPITEC pelo apoio financeiro.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Cerveja.....	14
1.1.1	Cereais não maltados, milho e arroz	16
1.2	Pesticidas.....	18
1.3	QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe).....	29
1.4	Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas	31
1.5	Validação do método cromatográfico	32
1.5.1	Linearidade.....	32
1.5.2	Seletividade	33
1.5.3	Precisão e exatidão	34
1.5.4	Limite de detecção e limite de quantificação	34
1.6	Revisão da literatura	35
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Materiais.....	39
3.2	Reagentes.....	39
3.3	Padrões e Soluções	40
3.4	Equipamentos	40
3.5	Condições cromatográficas de análise.....	40
3.6	Obtenção das amostras	41
3.7	Preparação da amostra.....	41
3.8	Fortificação das Amostras	41
3.9	Extração em QuEChERS	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Seleção dos pesticidas.....	43
4.2	Desenvolvimento do método cromatográfico	43
4.3	Desenvolvimento do método de MRM	46
4.4	Desenvolvimento do método de extração QuEChERS	49
4.5	Validação do método cromatográfico	56
4.5.1	Linearidade	56
4.5.2	Seletividade	57

4.5.3 Exatidão e precisão	60
4.5.4 Limite de quantificação e Limite de detecção.	62
4.6 Aplicação do método em amostras reais	63
5 CONCLUSÕES.....	66
6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	67
7 REFERÊNCIAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG – Cromatografia Gasosa

d-SPE – Dispersive Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida
Dispersiva)

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
(Organização das Nações Unidas para Alimentação e
Agricultura)

HLB – Hydrophilic-Lipophilic Balance

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography-Diode Array
Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de
Arranjo de Diodos)

LC/MS – Liquid Chromatography- Mass spectrometry (Cromatografia
Líquida/Espectrometria de massas)

LC-MS/MS – Liquid Chromatography- Mass spectrometry/Mass
spectrometry (Cromatografia Líquida-Espectrometria de
massas/Espectrometria de massas)

LMR – Limite Máximo de Resíduos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MRM – Monitoramento de Reações Múliplos

OMS – Organização Mundial da Saúde

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos

PSA – Primary-Secondary Amine (Amina primária secundária)

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido,
Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo do processo de fabricação da cerveja. [5]	15
Figura 2 – Fluxograma das etapas do método QuEChERS original. [37]	30
Figura 3 – Etapas do processo de extração QuEChERS.	42
Figura 4 – Cromatograma da corrente total de íons de uma solução padrão dos pesticidas na concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de etila. Para condições cromatográficas ver tópico 3.6.....	45
Figura 5 – Cromatograma da corrente total de íons para os pesticidas no modo MRM.....	47
Figura 6 – Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes PSA + C ₁₈ no passo de <i>clean-up</i>	50
Figura 7 – Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando PSA + C ₁₈ no passo de <i>clean-up</i> com nível de fortificação de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$	51
Figura 8 – Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes Florisil + C ₁₈ no passo de <i>clean-up</i>	52
Figura 9 – Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando Florisil + C ₁₈ no passo de <i>clean-up</i> com nível de fortificação de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$	53
Figura 10 – Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes Florisil + C ₁₈ em tubo de 15 mL no passo de <i>clean-up</i>	54
Figura 11 – Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando Florisil + C ₁₈ no passo de <i>clean-up</i> em tubo de 15 mL com nível de fortificação de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Componentes encontrados na cerveja para cada 100 g [8].....	16
Tabela 2 –	Valores de limites máximos de resíduos para pesticidas nos cereais: milho, arroz e cevada. [27] [28].....	20
Tabela 3 –	Classificação dos pesticidas selecionados para o trabalho quanto ao grupo químico, à classificação toxicológica e o modo de ação. [38].....	22
Tabela 4 –	Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para o trabalho. [38] [9].....	25
Tabela 5 –	Trabalhos reportando a utilização de QuEChERS e cromatografia para análise de pesticidas em cerveja.....	38
Tabela 6 –	Tempos de retenção para os pesticidas analisados.....	44
Tabela 7 –	Valores para as transições mais intensas com suas respectivas energias de colisão.	48
Tabela 8 –	Curvas analíticas para os pesticidas com intervalo de concentração, equações da reta e coeficiente de correlação.....	56
Tabela 9 –	Curvas analíticas para os pesticidas com intervalo de concentração, equações da reta, coeficiente de correlação e razão angular dos coeficientes.....	59
Tabela 10-	Recuperação média e coeficientes de variação do método QuEChERS para determinação de pesticidas em cerveja (n=5)	61
Tabela 11-	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) para o método QuEChERS.....	63
Tabela 12-	Resultados da aplicação do método QuEChERS na análise de pesticidas em amostras reais.	64

RESUMO

A cerveja é produzida a partir da fermentação da cevada e aromatizada pelo lúpulo. No Brasil de acordo com a legislação parte da cevada pode ser substituída por cereais com alto teor de amido como milho e arroz. A fim de atingir altos níveis de produção destes cereais, os pesticidas são utilizados nas lavouras para controle de pragas e evitar perdas nas safras. Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia para determinação de resíduos dos pesticidas acetamiprido, alacloro, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbofurano, carbosulfano, cipermetrina, deltametrina, difenoconazol, esfenvalerato, flutriafol, parationa-metílica e tiametoxam em cerveja. No procedimento QuEChERS foram testados dois adsorventes no passo de *clean-up*, o PSA e o Florisil que apresentaram valores de recuperação 73-101% e 65-103% respectivamente. A fim de validar o método analítico foram testados os parâmetros: linearidade e sensibilidade, que apresentaram resposta linear com coeficientes de correlação entre 0,9024-0,9999 no intervalo de concentração 0,05-2,5 µg mL⁻¹; testes de exatidão e precisão foram realizados resultando em valores de recuperação entre 29-123% e coeficientes de variação entre 0,3-49,5% para as concentrações 0,3, 0,1 e 0,05 µg mL⁻¹; e limites de detecção e limites de quantificação 0,003-0,08 µg mL⁻¹ e 0,01-0,12 µg mL⁻¹, respectivamente. Após a validação o método foi aplicado em amostras reais de cerveja e nenhum resíduo dos pesticidas estudados foi detectado.

Palavras-chave: Cerveja; Cereais; Pesticidas; QuEChERS; GC/MS.

ABSTRACT

Bear is a drink produced from the fermentation of barley and flavored by hops. In Brazil according to the legislation part of the barley can be replaced by cereals with high content of starch like corn and rice. In order to achieve high levels of production of these cereals and to avoid the loss of crops, pesticides are used in crops. This work aims to develop a methodology for the determination of residues of the pesticides acetamiprid, alachlor, ametryn, atrazine, azoxystrobin, carbofuran, carbosulfan, cypermethrin, deltamethrin, diphenoconazole, esfenvalerate, flutriafol, methionine-parathion and thiameethoxam in beer. In the QuEChERS procedure two adsorbents were tested in the clean-up step, PSA and Florisil, which presented recovery values of 73-101% and 65-103%, respectively. In order to validate the analytical method, the following parameters were tested: linearity and sensitivity, which presented linear response with correlation coefficients between 0.9024-0.9999 in the concentration range 0.05-2.5 µg mL⁻¹; Accuracy and accuracy tests were performed resulting in recovery values between 29-123% and coefficients of variation between 0.3-49.5% for the concentrations of 0.3, 0.1 and 0.05 µg mL⁻¹; and limits of detection and quantification limits 0.003-0.08 µg mL⁻¹ and 0.01-0.12 µg mL⁻¹, respectively. After validation, the method was applied in real samples of beer and no residue of the pesticides studied was found.

Keywords: Beer; Cereals; Pesticide; QuEChERS; GC/MS.

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais a indústria cervejeira é um dos mais importantes setores da indústria de alimentos e bebidas. Depois da água e do chá, a cerveja é considerada a bebida mais popular, sendo consumida em todo o mundo [1,2]. No Brasil o mercado de cervejas é dominado por grandes empresas que basicamente comercializam o tipo lager de padrão americano, como em muitos outros países. [3]

A cerveja é produzida pela fermentação controlada do mosto, um líquido rico em açúcares, proveniente da cevada maltada. Como substituintes da cevada na produção de cervejas brasileiras, são empregados cereais como arroz e milho que possuem grande quantidade de amido em sua composição. [4]

Para garantir uma alta produção destes cereais, o uso extensivo de pesticidas é uma prática comum. O uso generalizado de pesticidas em cereais pode ocasionar à presença de resíduos na cerveja. A preocupação com os resíduos de pesticidas em bebidas de malte e cervejas tem aumentado entre os consumidores. A transferência de pesticidas para a cerveja depende do processo utilizado na produção e das propriedades dos pesticidas, tendo em vista que os pesticidas podem estar presentes em qualquer etapa do processamento e alguns destes compostos são acumulados através da cadeia alimentar, podendo causar danos graves para a saúde humana. [5,6]

Por razões de segurança alimentar, as Organizações Internacionais estabeleceram o Limite Máximo de Resíduos (LMR) para pesticidas em alimentos. O LMR é a quantidade máxima de resíduos legalmente permitida em alimentos incluindo a substância ativa e metabólitos e são definidos com base na avaliação rigorosa para cada pesticida [6,7]. Devido às restrições impostas pelas legislações, internacionais e nacionais, envolvendo as quantidades de resíduos de pesticidas em alimentos, o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes, rápidas e simples são objeto de estudo. [8]

O método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) com limpeza de extração de fase sólida dispersiva (d-SPE) é uma técnica de preparação de amostras que permite a análise de pesticidas em matrizes complexas. O QuEChERS é uma das abordagens de preparação de amostra mais populares na área de análise de resíduos de pesticidas nos alimentos. Quando comparado com outras técnicas, tem a capacidade de minimizar o número de etapas de preparação da amostra, uma vez que envolve apenas duas etapas, a primeira extração por partição com acetonitrila e uma mistura de sais e depois etapas de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Outras vantagens do método QuEChERS em comparação com outras técnicas são suas excelentes recuperações, menos tempo para preparação de amostras e menor consumo de solventes [9,10,11].

Os pesticidas nos alimentos são convencionalmente monitorados e quantificados usando cromatografia gasosa. Associado a cromatografia gasosa estão os espectrômetros de massas com analisador triplo-quadrupolo, capazes de operar em modo de monitoração de reações múltiplas (MRM), com alta sensibilidade e alta especificidade para análise multirresíduo de pesticidas. [6,12]

Diante deste contexto, a proposta desse trabalho foi desenvolver um método analítico efetivo, rápido e de baixo custo para determinação de resíduos dos pesticidas acetamiprido, alacloro, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbofurano, carbosulfano, cipermetrina, deltametrina, difenoconazol, esfenvalerato, flutriafol, parationa-metílica, terbufós e tiametoxam em cerveja utilizando as técnicas de extração em fase sólida, QuEChERS e cromatografia a gás/espectrometria de massas sequencial.

1.1 Cerveja

A cerveja é uma bebida fermentada à base de amido e aromatizada pelo lúpulo. Esta definição simples abrange os quatro ingredientes essenciais, malte de cevada, água, lúpulo e fermento (levedura), que são necessariamente utilizados na fabricação. O corpo da cerveja é fornecido pela cevada, mais especificamente malte de cevada e, em geral, algumas centenas de gramas são usadas para um litro de cerveja. [13]

As principais etapas do processo de fabricação da cerveja (Figura 1) incluem brassagem que é a primeira fase, onde existem os processos de moagem do malte, mistura com água, aquecimento, transformação enzimática do amido em monossacarídeos, filtração, adição do lúpulo, fervura do mosto e resfriamento. A fermentação é a etapa que dá continuidade na produção, na qual o mosto, que é uma mistura líquida açucarada, juntamente com as leveduras, são responsáveis por produzir o etanol através do consumo dos açúcares. Seguindo, a maturação é a parte do método em que o produto da fermentação é resfriado a 0 °C, e por decantação as leveduras são separadas e o resto dos carboidratos são consumidos pelas leveduras remanescentes. Como etapas finais da produção o acabamento, que consiste na introdução de estabilizantes na cerveja e o envasamento. [14]

As propriedades, qualidade e quantidades dos ingredientes juntamente com a forma de fases do processo de fermentação afetam fortemente as características da cerveja. A fase de fermentação por microorganismos, por exemplo, define o tipo de cerveja. Enquanto cervejas lager são fabricadas a baixas temperaturas utilizando o processo de fermentação inferior, as cervejas do tipo ale são fermentadas a altas temperaturas e a levedura permanece na superfície do líquido durante o processo. O produto final engarrafado, isto é, a cerveja, quando comparada a outras bebidas obtidas a partir da fermentação, é cerca de seis vezes menos calórica para cada 100 mL. Cada litro de cerveja pode fornecer 400 a 500 calorias, representando em média 1/6 das necessidades calóricas diárias de um adulto. E também é uma mistura complexa contendo vários sais inorgânicos e mais de 800 compostos

orgânicos. Em 100 gramas de cerveja podem ser encontrados diversos componentes (Tabela 1) como proteínas e vitaminas. [15,16,17]

Figura 1 – Resumo do processo de fabricação da cerveja. **FONTE:** A química da cerveja [14]



De acordo com a legislação brasileira, parte da cevada maltada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros (cereais aptos para consumo humano, maltados ou não maltados) e carboidratos (açúcares) de origem vegetal [18]. Por possuir uma maior velocidade na fermentação por leveduras de cerveja do que os açúcares de cevada mais complexos, os açúcares do milho e do arroz são bastante utilizados, acelerando o processo de fermentação e aumentando o teor de álcool com quantidade mínima de ingredientes e um custo mais baixo para as cervejarias [19].

Tabela 1 – Componentes encontrados na cerveja para cada 100 g. **FONTE :** [17]

Componentes	Quantidade (g)
Glicídios	3,8
Proteínas	0,3
Cálcio	5
Fósforo	0,3
Ferro	0,1
Água	88 a 92
Álcool	3 a 8
Gás carbônico	0,3 a 0,6
Riboflavina (Vitamina B2)	0,03
Niacina	0,2
Tiamina (Vitamina B1)	0,002 a 0,006
Ácido Pantotênico (Vitamina B12)	0,04 a 0,08
Ácido Fosfórico	0,05 a 0,07
Glicerol	0,1 a 0,3

1.1.1 Cereais não maltados, milho e arroz

As culturas de cereais compreendem mais de 60% da produção agrícola no mundo. Entre os cereais, o arroz e o milho são dois dos mais importantes. O Brasil é hoje um dos maiores exportadores mundiais de grãos, particularmente para culturas como o milho (*Zea mays*). [20,21]

O milho é o grão mais produzido e consumido no mundo. A produção mundial dos grãos, segundo estimativas para a safra 2015/16, atingiu um total de 985,6 milhões de toneladas, concentrada em três principais produtores: Estados Unidos, China e Brasil. A produção destes países foi de 345,1, 225,0, 79,0 milhões

de toneladas, respectivamente, representando 65,86% da produção mundial. O mercado do milho é dominado por quatro países: EUA, Brasil, Ucrânia e Argentina, que representam aproximadamente 83% das exportações mundiais [22].

Como uma das culturas mais importantes do mundo, o milho é amplamente utilizado nos setores alimentar, químico, farmacêutico, agrícola e industrial, devido ao seu elevado teor de amido. A composição química média do grão de milho é de 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo. O amido de milho, modificado ou clivado, é utilizado na preparação de alimentos tais como a cerveja, produção de drogas, fabricação de papel, indústria têxtil, refinação de petróleo, entre outros usos. [23,24]

O arroz (*Oryza sativa*) é a terceira cultura mais produzida do mundo, ocupando cerca de 13% da área cultivada (164 milhões ha). É um alimento básico muito importante de mais de três bilhões pessoas no mundo, sendo um dos alimentos mais relevantes para a nutrição, especialmente na Ásia que é responsável por 89% da produção mundial, seguida pelo Hemisfério Ocidental (5%), onde o Brasil é líder com 35% da área cultivada na América do Sul. O arroz representa 21% da ingestão energética humana per capita, mas é também uma importante fonte protéica. Os grãos de arroz branco polido, que correspondem à principal forma de consumo deste cereal, têm em média 90% de amido, 0,6% de fibra e 0,5% de minerais e proteínas presentes nos grãos em quantidades variando de 4,3 a 18,2% [25,26]. O processo de polimento do grão integral do arroz resulta na diminuição do teor de nutrientes, com exceção do amido, o que produz diferenças na composição entre o arroz polido e o integral. Outro processo de transformação aplicado aos grãos de arroz é a parbolização, que consiste em uma forma de processamento hidrotérmico onde os grãos são colocados em água com temperatura acima de 58 °C, logo em seguida passam por uma gelatinização parcial ou total do amido e secagem. Como consequência desse procedimento substâncias hidrossolúveis, como vitaminas e minerais, migram para o centro do grão, deixando o arroz parbolizado mais nutritivo que o arroz polido [27].

As áreas plantadas com arroz irrigado são cultivadas intensivamente, ou seja, sem rotação, devido a dificuldades associadas ao uso dessas áreas para outras atividades. Este uso intenso favorece o surgimento e proliferação de pragas, ervas daninhas e doenças, levando à necessidade de aplicação de pesticidas para garantir a rentabilidade da safra. Muitos destes insumos químicos (fertilizantes, herbicidas, inseticidas e fungicidas) são aplicados diretamente na camada de água ou pulverizados nas plantas a partir dos quais podem chegar à água, resultando no transporte de resíduos para áreas fora dos campos, se a aplicação não for gerenciada da maneira recomendada. O risco de os pesticidas serem transportados das culturas para as águas superficiais e os recursos das águas subterrâneas representa uma ameaça para a qualidade da água nas regiões de produção de arroz irrigado. [28]

1.2 Pesticidas

A grande produção de commodities agrícolas no Brasil como cereais traz também a utilização de tecnologias para o controle de doenças e aumento da produtividade, como o amplo uso de pesticidas. De acordo com a Legislação Brasileira, o registro de pesticidas é regulamentado pelo Decreto nº 4074/2002. Isto é uma responsabilidade partilhada entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), e Ministério da Saúde. São caracterizados como pesticidas os produtos que promovem processos químicos, físicos ou biológicos e são utilizados nos setores de manufaturação, estocagem e aprimoramento de produtos agrícolas [29,30,31].

O Ministério da Agricultura atualmente autoriza a utilização 380 ingredientes ativos como pesticidas utilizados em mais de 1.670 produtos fitofarmacêuticos formulados do mercado. Desde 2008, o Brasil lidera o consumo de pesticidas, uma posição anteriormente ocupada pelos Estados Unidos. [32]

Uma das medidas que devem ser atendidas com a finalidade de minimizar possíveis riscos à saúde dos consumidores é o Limite Máximo de Resíduos (LMR) que corresponde à concentração máxima de resíduos de pesticidas, desde sua produção até o consumo, expressa em miligramas do pesticida ou de seus resíduos por quilo do alimento analisado ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). No Brasil de acordo com a legislação, a instituição responsável pela fiscalização desses limites, além de avaliar e classificar toxicologicamente os pesticidas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que coordena o Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA). A instauração de uma lei que prevê a utilização de cada pesticida com seus respectivos intervalos de segurança é de suma importância para um país como o Brasil que além de ser um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas, possui milhares de hectares plantados com cereais [31,33,34]. A Tabela 2 mostra os valores dos LMR definidos pela ANVISA e pelo *Codex Alimentarius* para os pesticidas selecionados nas culturas de grãos, tendo em vista os cereais que podem possivelmente levar a contaminação para a cerveja produzida com cereais não maltados após o processo de fabricação.

A classificação do potencial de risco ambiental de um pesticida é fundamentada em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos. Portanto um pesticida pode ser classificado quanto o perigo ambiental, em classes que variam de I a IV: produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (Tabela 3). [35]

A utilização de diferentes cereais na produção da cerveja brasileira traz junto a problemática dos resíduos de pesticidas que podem ser transferidos dos grãos para o produto final [36]. Além disso estes resíduos podem permanecer na cerveja produzida a partir de outros ingredientes tratados com pesticidas, possivelmente provenientes de outras matérias-primas como o lúpulo e a água utilizada na cadeia produtiva [37].

Tabela 2 – Valores de limites máximos de resíduos para pesticidas nos cereais milho, arroz e cevada. **FONTE :** [38] [39]

Pesticida	LMR (mg kg^{-1})					
	ANVISA			<i>Codex Alimentarius</i>		
	Milho	Arroz	Cevada	Milho	Arroz	Cevada
Acetamiprido	0,05	-	1	0,01	-	-
Alacloro	0,2	-	-	-	-	-
Ametrina	0,04	-	-	-	-	-
Atrazina	0,25	-	-	-	-	-
Azoxistrobina	0,01	1,5	0,6	0,02	5	1,5
Carbofurano	0,1	-	-	0,05	0,1	-
Carbosulfano	0,02	-	-	0,05	0,05	-
Cipermetrina	0,05	2	-	0,05	2	2
Deltameetrina	1	-	1	0,02	-	-
Difenoconazol	0,01	-	0,3	-	-	-
Esfenvalerato	1	-	-	-	-	-
Flutriafol	0,05	-	0,1	0,01	-	-
Parationa-metílica	0,1	-	-	-	-	-
Terbufós	0,05	-	-	0,01	-	-
Tiametoxam	0,02	0,4	0,3	0,05	-	0,4

Tabela 3 – Classificação dos pesticidas selecionados para o trabalho quanto ao grupo químico, à classificação toxicológica e o modo de ação. **FONTE :** [38]

Pesticida	Modo de Ação	Grupo químico	Classificação toxicológica
Acetamiprido	Inseticida	Neonicotinóide	Classe III
Alacloro	Herbicida	Cloroacetanilida	Classe III
Ametrina	Herbicida	Triazina	Classe III
Atrazina	Herbicida	Triazina	Classe III

Azoxistrobina	Fungicida	Estrobiurina	Classe III
Carbofurano	Inseticida Cupinicida, Acaricida e Nematicida	Metilcarbamato de benzofuranila	Classe I
Carbosulfano	Inseticida, Acaricida e Nematicida	Metilcarbamato de benzofuranila	Classe II
Cipermetrina	Inseticida e Formicida	Piretróide	Classe II
Deltametrina	Inseticida e Formicida	Piretróide	Classe II
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	Classe I

Esfenvalerato	Inseticida	Piretróide	Classe II
Flutriafol	Fungicida	Triazol	Classe III
Parationa-metílica	Inseticida e Acaricida	Organofosforado	Classe I
Terbufós	Inseticida e Nematicida	Organofosforado	Classe I
Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	Classe III

Devido a algumas propriedades como persistência, solubilidade em água, bioacumulação e toxicidade potencial, os pesticidas podem estar presentes em diferentes frutas, vegetais e cereais. As propriedades físico-químicas (Tabela 4) podem explicar o curso dos pesticidas e ajudar a conhecer comportamento deles frente a alguns parâmetros que podem ser utilizados no desenvolvimento do método de extração. Algumas propriedades utilizadas neste trabalho foram: solubilidade, coeficiente de partição (K_{ow}), pKa e pressão de vapor. [8,42]

A solubilidade é uma propriedade importante para os processos envolvendo pesticidas, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do pesticida em solubilizar em meio aquoso. [40]

O coeficiente de partição é uma relação medida (no equilíbrio) da massa dissolvida de uma substância entre camadas iguais de n-octanol e água. Os valores de K_{ow} são freqüentemente expressos como $\log K_{ow}$ e os valores variam de -3 a 7. Onde menores valores indicam compostos polares e valores maiores compostos apolares, que por sua vez são bioacumulativos através das gorduras dos seres vivos. [41]

O pKa determina o grau de ionização na água, ou em sistemas biológicos para pesticidas ionizáveis, e por sua vez, sua lipofilicidade. Os pesticidas iônicos se comportam de forma diferente de pesticidas não iônicos. Esse conhecimento também é importante para realizar extrações de pesticidas em meios aquosos. [42]

A pressão de vapor de uma substância é definida como a pressão parcial de um produto químico, na fase gasosa em equilíbrio com o produto químico sólido puro ou líquido. As pressões de vapor são muito dependentes da temperatura. Esses parâmetros governam a distribuição entre o líquido e a fase gasosa. [41]

Tabela 4 –Propriedades físico-químicas dos pesticidas selecionados para o trabalho. FONTE: [38] [39]

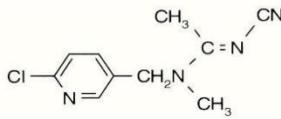
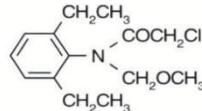
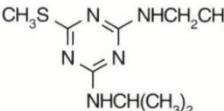
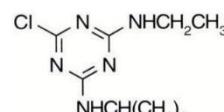
Pesticida	Estrutura Química	Solubilidade (g L ⁻¹)	log K _{ow}	pKa (25 °C)	Pressão de vapor (mPa) (25 °C)
Acetamiprido		Água 0,0042, Acetona, Metanol, Acetonitrila,	0,8	0,7	1,7x10 ⁻⁴
Alacloro		Água 0,242, Acetona, Etanol, Acetato de etila,	3,52	-	2,9
Ametrina		Água 0,200 , Acetona 500, Metanol 450*	2,98	4,10	0,365
Atrazina		Água 0,033*, Metanol 15, Acetato de etila 24,	2,50	1,7*	0,039

Tabela 4 - Continuação

Azoxistrobina		Água 0,006*, Metanol 20, Acetato de etila 130, Acetonitrila 340	2,50	-	$1,1 \times 10^{-7}$
Carbofurano		Água 0,320*, Acetona, acetonitrila	2,32	-	0,031
Carbosulfano		Água 0,0003, Acetona, Acetonitrila	3,30	-	0,041
Cipermetrina		Água 4×10^{-6} , Metanol, Acetona	6,94	-	$2,3 \times 10^{-4}$

Tabela 4 - Continuação

Deltametrina		Em água 1,4x10 ⁻³ , Acetona 6500, Metanol 405	6,20	-	<1,33x10 ⁻²
Difenoconazol		Água 0,016, Etanol 330, Acetona 610*	4,20	1,1*	3,3 x10 ⁻⁵
Esfenvalerato		Água 2x10 ⁻⁶ , Acetona, Acetato de etila, Metanol 70-100*	6,22	-	2x10 ⁻⁴
Flutriafol		Água 0,13*, Acetona 190, Metanol 69*	2,30*	1,9	7,1x10 ⁻⁶

Tabela 4 - Continuação

Parationa-metílica		Água 0,055*, Metanol, Acetato de Etila, Acetonitrila	3,00	7,15	0,2
Terbufós		Água 4,5x10 ⁻³ , Metanol, Acetato de Etila, Acetonitrila	4,52	-	34,6
Tiametoxam		Água 4,1, Acetona 48, Acetato de Etila 7,0, Metanol 13	-0,13	-	6,6x10 ⁻⁶

* 20°C

1.3 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Com o objetivo de sobrepor as limitações dos métodos de análise para resíduos de pesticidas existentes, em meados de 2003, Anastassiades *et al.* introduziram um procedimento de preparo de amostra para extração multirresíduo de pesticidas denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), que de acordo com os autores deve ser pronunciado como catchers. [43]

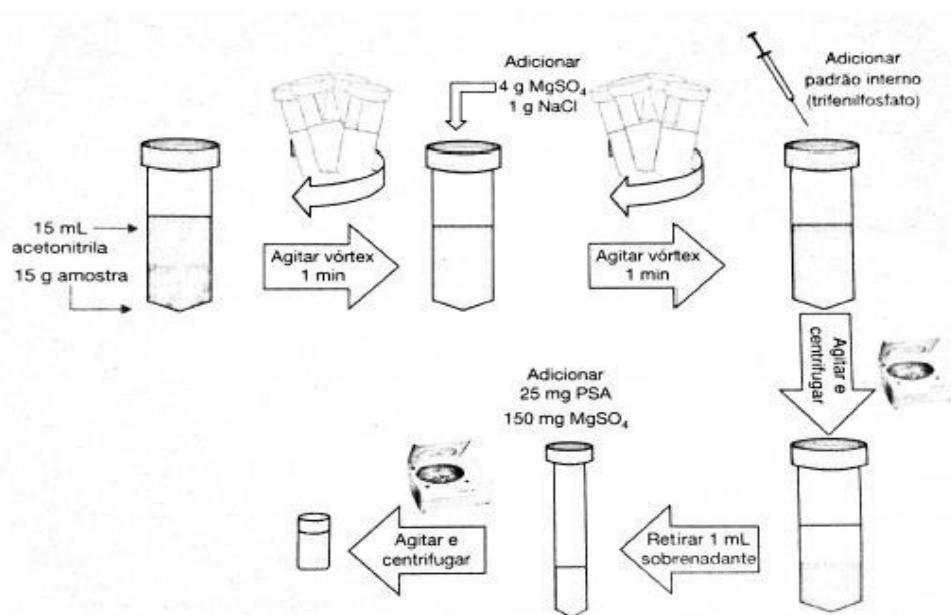
Originalmente, o método QuEChERS foi desenvolvido para a extração de resíduos de pesticidas em frutas e legumes, mas como resultado das vantagens inerentes ao método, se expandiu rapidamente para a extração de diferentes grupos de compostos de matrizes ambientais, agroalimentares e bioanalíticas. A sigla QuEChERS traduzida do inglês significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, mostrando as vantagens sobre a tradicional extração líquido-líquido. [44]

Este método foi baseado na extração em microescala utilizando acetonitrila como solvente extrator, com a absorção de água por sais como MgSO₄, passando por uma a etapa de partição, onde ocorre a separação líquido-líquido utilizando NaCl com intuito de promover o efeito “*salting out*”, e o passo de limpeza em que é aplicado a d-SPE utilizando o adsorvente amina primário-secundário (PSA) [45,46] (Figura 2).

Diferente das metodologias de limpeza envolvendo SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a Extração em Fase Sólida Dispersiva (Dispersive Solid Phase Extraction, d-SPE) que foi desenvolvida juntamente com o QuEChERS, traz a possibilidade de que limpeza e a redução de água residual sejam efetuados rapidamente. A etapa de remoção de água resulta na formação de um extrato mais apolar, facilitando a precipitação de interferentes polares. O PSA é o adsorvente utilizado na etapa de limpeza, e consegue reter os interferentes da matriz. Devido aos grupos amino primário e secundário, a estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, facilitando a retenção de ácidos graxos e

de compostos polares da matriz. Após etapas de agitação e centrifugação o extrato está apto para análise cromatográfica. [43,45]

Figura 2 - Fluxograma das etapas do método QuEChERS original. **Fonte:** Borges, Figueiredo e Queiroz (2015) [45]



Combinando os procedimentos convencionais de extração, isolamento e limpeza numa única etapa, este método evita a homogeneização, a filtração, o grande volume de transferência de solventes, a evaporação/condensação e as trocas de solventes necessárias para a determinação cromatográfica.[45,46]

1.4 Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas

A cromatografia é considerada um método físico-químico de separação, onde os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária que é fixa em grande área superficial, e a outra um fluido que percola através dela, sendo denominada fase móvel [42]. Com a existência de modernos métodos de análise, a cromatografia possui certamente um lugar de destaque no que compete à separação, identificação e quantificação de compostos químicos. [50].

Desde o início dos anos 1970, a determinação mais rotineira de resíduos de pesticidas foi conduzida pela CG com diferentes detectores, captura de elétrons, detector de nitrogênio-fosforo, detector fotométrico de chama, etc. Durante os anos seguintes, estes detectores foram rapidamente substituídos pelo acoplamento da espectrometria de massas, dado que estes equipamentos são muito específicos e fornecem informação estrutural para conseguir a confirmação da identidade do composto. [51]

Nos últimos anos a determinação de resíduos de pesticidas foram realizadas principalmente em espectrometria de massas sequencial. A espectrometria de massas sequencial permite ao espectrômetro de massas isolar um íon e fragmentá-lo para obter seu espectro de massas novamente. Alguns dos espectrômetros de massas capazes de realizar MS/MS somente com massa nominal são o triplo quadrupolo (QqQ), a armadilha de íons (IT). O modo MS para análise quantitativa incluiu o monitoramento de íons selecionados (SIM) e o monitoramento de reações múltiplas (MRM). O modo MRM tem superioridade em comparação com o modo SIM, pois oferece maior sensibilidade devido à melhora nos níveis de ruído com o aumento da relação sinal/ruído e é especialmente usado para analisar amostras de matrizes complexas, como alimentos e plantas. Alternativamente, o GC-MS/MS no modo MRM tem sido usado para a pesquisa e determinação de resíduos de pesticidas, a fim de alcançar alta seletividade e baixos limites de detecção. [51,52]

Na análise MRM, os íons precursores são selecionados no primeiro quadrupolo e fragmentados numa câmara de colisão. Dependendo do analito,

são produzidos íons de produtos únicos a partir da câmara de colisão e apenas são detectados íons do produto selecionados. O padrão de fragmentação e os íons resultantes são dependentes das estruturas químicas dos analitos alvos de modo que a análise de MRM é mais específica do que a SIM que é comumente usada no MS quadrupolo simples. [53]

1.5 Validação do método cromatográfico

A validação de um método é um processo constante que começa desde o início do planejamento da estratégia analítica e continua durante todo o seu desenvolvimento. Um processo de validação bem definido e documentado oferece evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. [54]

Considerada uma parte essencial na avaliação do método, a validação tem o objetivo de determinar se um método analítico é adequado para sua finalidade. Onde após o desenvolvimento do método analítico e antes de sua aplicação na análise de amostras reais é indispensável que o mesmo seja submetido à avaliação de diferentes parâmetros de qualidade, de modo a assegurar que nas condições em que será utilizado, fornecerá informações que demonstrem resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. [54, 55, 56]

Os parâmetros a serem validados variam em função do tipo de procedimento, de acordo com as características a serem estudadas e o método a aplicar. Os conceitos mais importantes para validação do método analítico, em geral, são linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação. [57]

1.5.1 Linearidade

A linearidade representa à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto analisado, dentro de uma faixa de concentração estipulada. Pode ser determinada através da

correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada, é dada pelo coeficiente de correlação do gráfico obtido pela equação da reta de comportamento linear $y = ax + b$. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99, enquanto o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) aceita valores acima de 0,90. [54]

1.5.2 Seletividade

A capacidade de um método em analisar, de forma distinta, as substâncias em foco na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação como outros ingredientes ativos, impurezas e produtos de degradação, bem como diferentes compostos com propriedades similares que possam estar, possivelmente, presentes em uma amostra complexa é chamada de seletividade. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente prejudicados. [54, 55]

Na avaliação da seletividade o efeito da matriz é um importante parâmetro a ser estudado e é considerado uma supressão (inesperada) ou um aumento da resposta do analito devido a constituintes da matriz. O grau do efeito da matriz pode ser influenciado por uma variedade de fatores, que incluem a concentração de analito, as propriedades químicas do analito, a concentração da matriz nos extratos da amostra e as condições operacionais do sistema GC-MS. Na análise de GC-MS, os efeitos da matriz estão relacionados ao bloqueio de sitios ativos por componentes da matriz co-extraídos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises. A redução do número de sitios ativos no sistema de GC conduzem a sinais de analito aumentados na presença da matriz em relação aos padrões em solventes, resultando em quantificações imprecisas. [58, 59]

Para o estudo do efeito matriz podem ser confeccionadas duas curvas analíticas, em uma os analitos são preparados diretamente no extrato da matriz e outra no solvente, onde logo após a aquisição dos valores dos coeficientes angulares das retas é feito o cálculo da razão entre esses valores. Quando a

razão obtida for superior a 1 o efeito da matriz é positivo, enquanto que valores inferiores a 1 indicam que o efeito da matriz é negativo [60]

1.5.3 *Precisão e exatidão*

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade entre uma série de medidas obtidas a partir de várias alíquotas da mesma amostra nas condições prescritas. O processo para determinar precisão de um procedimento analítico é realizado por análise de um número suficiente de replicatas de uma amostra para poder calcular estimativas estatisticamente válidas de desvio padrão ou desvio padrão relativo. Já a exatidão de um método analítico expressa a proximidade entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito e o valor encontrado. É determinada pela aplicação do método a amostras às quais quantidades conhecidas de analito foram adicionadas. Estes devem ser analisados em relação a soluções padrão e em branco para garantir que não exista nenhuma interferência. A precisão é então calculada a partir dos resultados do teste como uma porcentagem do analito recuperado pelo ensaio. [61]

O processo para determinar a precisão neste trabalho foi realizado a partir de ensaios de repetibilidade, onde o mesmo método foi utilizado, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento com análises na modalidade intradia e com os resultados apresentados em termos dos coeficientes de variação obtidos das análises. [62]

1.5.4 *Limite de detecção e limite de quantificação*

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser detectada, não quantificada. É um teste limite que especifica se um analito está ou não abaixo de um determinado valor. Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições operacionais indicadas do método. A determinação de LD e LQ pode ser realizada por três modos diferentes: método visual, método da

relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica; onde a seleção do método a ser utilizado deve levar em consideração à técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária [63, 64].

1.6 Revisão da literatura

Esta revisão descreve alguns trabalhos envolvendo técnicas de extração incluindo SPE e o QuEChERS, aplicadas à cerveja e seus processos de produção para determinação de pesticidas, de acordo com a Tabela 5.

A SPE foi utilizada como método de extração por HACK *et al*/1997 [65] na determinação de 6 pesticidas (atrazina, desetilatrazina, deisopropilatrazina, hidroxiatrazina, terbutilazina e deetanoterbutilazina) em amostras de cerveja por HPLC-DAD e GC-MS, com o intuito de investigar o comportamento destes compostos durante a produção de cerveja.

HENGEL *et al*, 2002 [66] propuseram um método por GC-MS que utilizou SPE como procedimento de extração para a determinação de sete pesticidas (clorfenapir, quinoxifena, tebuconazol, fenarimol, pyridaben e Z-dimethomorph) no lúpulo durante o processo de fabricação da cerveja.

NAVARRO *et al*. 2007 [67] utilizaram HPLC-DAD para avaliar dois herbicidas de dinitroanilina (trifluralina e pendimetalina) e três inseticidas organofosforados (malationa, fenitrotiona e metidationa), em cevada durante a fermentação primária da cerveja. Os resultados deste trabalho mostram que os resíduos de fenitrotiona, malationa e trifluralina afetaram o crescimento e a ação do fermento na fase de fermentação, influenciando a cinética e causando lentidão a partir da fase alta. Por outro lado, a presença de resíduos de metamina e pendimetalina acelerou a taxa de fermentação durante as fases baixa e alta de fermentação. Uma maior quantidade de açúcares residuais (glicose, frutose, maltose e maltotriose) foi encontrada após a fermentação nas amostras tratadas com fenitrotion e trifluralina. Portanto, diferenças significativas no extrato e porcentagem de açúcares convertidos em álcool e CO₂ (atenuação) foram encontradas nas cervejas. Finalmente, o pH e a cor da cerveja diferiram significativamente da amostra em branco.

NAVARRO *et al.*, 2007 [68] utilizaram partição líquido-líquido assistida por ultrassom e GC-MS com o objetivo de determinar 7 pesticidas (pendimetalina, trifluralina, fenitrotion, malationa, nuarimol, myclobutanil, propiconazol) comumente usados na cevada e a transferência destes para o malte utilizado na produção da cerveja. Foi possível concluir que os resíduos de pesticidas solúveis em água na cevada tendem a ser eliminados na maior quantidade após a imersão em água. Por outro lado, os resíduos hidrofóbicos permanecem no grão embebido em água. Os processos de germinação e cozimento também contribuiram para reduzir a concentração de resíduos no malte, embora em menor grau. Finalmente, o armazenamento do malte não reduziu significativamente os resíduos de pesticidas.

NAVARRO *et al.* 2007 [69] reportaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência de fungicidas das classes pirimidina e triazol, durante a fermentação da cerveja.

Com o objetivo compreender o destino de 324 pesticidas que podem estar presentes durante a fabricação de cerveja INOUE *et al.* 2011 [70] utilizaram QuEChERS como metodologia de extração. As amostras foram analisadas por LC-MS/MS em certas etapas do processo de fabricação de cerveja, tais como trituração, fervura e fermentação. Em conclusão, a maioria dos pesticidas reduziu os índices residuais após a infusão e não foram detectados na cerveja. Apenas uma parte desses pesticidas foram identificados.

Kong *et al.*, 2016 [37] aplicaram o QuEChERS para determinar os pesticidas triadimefon, Malationa, diclorvos e seus metabolitos (triadimenol e malaoxon) em produtos de cevada e cerveja durante o armazenamento, maltagem, moagem, trituração, fervura, arrefecimento e fermentação. Triadimefon e a malationa foram degradados para triadimenol e malaoxon no campo antes da colheita, e estes pesticidas exibiram diferentes taxas de degradação. As concentrações de diclorvos e os resíduos de malationa foram significativamente menores na cerveja após o processamento.

A utilização da metodologia QuEChERS foi seguida da aplicação de LC-MS no trabalho de KONG *et al.*, 2016 [71]. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do processo de fabricação comercial (maltagem, moagem, Trituração, fervura, refrigeração e fermentação) nos resíduos de triadimefon e triadimenol e desenvolver uma metodologia de superfície de resposta para otimizar a eficiência de remoção de resíduos dos pesticidas. Além disso, amostras de cerveja de marcas comerciais foram analisadas para resíduos de triadimefon e triadimenol.

Tabela 5 –Trabalhos reportando a utilização de QuEChERS e cromatografia para análise de pesticidas em cerveja.

Referência	Quantidade de matriz	Analito	Método de extração	Adsorvente (g)	Análise instrumental
HACK <i>et al.</i> [65]	5 mL de cerveja	6 triazinas	SPE	Poliestireno-divinilbenzeno	LC-DAD e GC-MS
HENGEL <i>et al.</i> [66]	100 mL de cerveja e mosto	7 pesticidas	SPE	0,5 g de HLB	GC-MS
NAVARRO <i>et al.</i> [67]	250 mL de mosto	2 dinitroanilinas e 3 organofosforados	-	-	LC-DAD
NAVARRO <i>et al.</i> [68]	5 g de cevada e malte	2 dinitroanilinas, 2 organofosfoardos, 1 pirimidina, e 2 triazóis	LLE-Ultrassom	-	GC-MS
NAVARRO <i>et al.</i> [69]	300 mL de mosto	2 pirimidinas e 2 triazóis	-	-	LC-DAD
INOUE <i>et al.</i> [70]	10 g de cerveja e malte	324 pesticidas	QuEChERS	PSA e C ₁₈	LC-MS
KONG <i>et al.</i> [71]	10 mL de cerveja e 5 g de cevada	2 triazóis	QuEChERS	0,05 g de PSA	LC-MS
KONG <i>et al.</i> [37]	10 mL de cerveja e 5 g de cevada	2 organofosforados, 2 triazóis	QuEChERS	0,05 g de PSA	LC-MS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia analítica para determinação de resíduos de pesticidas em cerveja brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os pesticidas utilizados nas culturas de milho e arroz;
- Desenvolver condições cromatográficas para análise dos pesticidas por GC-MS/MS;
- Desenvolver método de extração e *clean-up* para os resíduos de pesticidas em cerveja por QuEChERS;
- Validar o método;
- Aplicar o método em amostras reais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Béquer (100 mL), balão volumétrico (1;2;5;10 e 50 mL), proveta (5, 25 e 100 mL), vial (1; 5; 10 e 40 mL), balão de fundo redondo (50 mL), seringa de vidro (20mL), tubos de polipropileno (2 mL e 50 mL), micropipetas de volumes variados 10-100 μ L e 100-1000 μ L, pipetas volumétricas (10 mL e 50 mL) bastão de vidro, espátula, pinça.

3.2 Reagentes

Acetonitrila grau HPLC (J.T Baker), Metanol grau HPLC (Merck), Acetato de Etila para cromatografia gasosa (Merck), Ácido acético glacial (Tedia), Acetato de sódio anidro grau p.a (Pr Químicos), Sulfato de magnésio hepta hidratado grau p.a (Vetec Química Fina), C₁₈ (Sigma, USA) 200-400 mesh, Florisil (J.T Baker) 100-200 mesh, Alumina neutra (Sorbent Technologies) 50-200 μ m, Silica-gel (Vetec Química Fina) 70-200 mesh.

3.3 Padrões e Soluções

Foram obtidos padrões certificados dos pesticidas: Alacloro (Fluka), Atrazina (Fluka) Ametrina (Riedel-de Haen), Acetamiprido (Riedel-de Haen), Azoxitrobina (Riedel-de Haen), Carbofurano (Fluka), Carbosulfano (Fluka), Cipermetrina (Fluka), Deltametrina (Fluka), Difenoconazol (Accustandard), Esfenvalerato (Fluka), Flutriafol (Accustandard), Terbufós (Fluka), Tiametoxam (Accustandard). A partir dos compostos sólidos soluções estoques foram preparadas na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Em seguida foi preparada uma solução dos padrões com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, que foi utilizada para preparar soluções de trabalho para a curva analítica ($0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e para os ensaios de recuperação. Essas soluções foram armazenadas em freezer.

3.4 Equipamentos

Balança analítica (Sartorius BL 2105), Evaporador rotatório (Fisatom 802D), Sistema para SPE vacum manifold (Varian, Walnut Creek, CA, EUA), cromatógrafo à gás 2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas modelo TQ8040 Shimadzu (Quioto, Japão), Agitador mecânico (IKA), centrífuga (Universal), lavadora ultrassônica (Unique USC-1400).

3.5 Condições cromatográficas de análise

O sistema utilizado foi um cromatógrafo a gás 2010plus acoplado a um espectrômetro de massas TQ8040 Shimadzu (Quioto, Japão), com auto injetor AOC5000 plus e coluna SBL-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm). A temperatura para o injetor foi de 300°C . A rampa de temperatura foi configurada com 100°C (1 min); taxa de aquecimento $15^\circ\text{C min}^{-1}$ até 300°C que perdurou até 25 minutos. O gás de arraste foi He (pureza 99,999%) com vazão de $1,18 \text{ mL min}^{-1}$, modo de injeção splitless e volume de injeção de $1 \mu\text{L}$. Inicialmente o espectrômetro de massas operou no modo SCAN e posteriormente em modo MRM com temperatura da fonte de íons 250°C , temperatura da interface 280°C , tempo de

corte do solvente 5 min e intervalo de 40 – 550 m/z . Fonte de ionização por elétrons.

3.6 Obtenção das amostras

As amostras de cerveja foram adquiridas no comércio do município de Aracaju, Sergipe, e armazenadas no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP) da Universidade Federal de Sergipe sob temperatura ambiente.

3.7 Preparação da amostra

A cerveja foi submetida a um processo de degassificação com auxílio de ultrassom durante 15 minutos a fim de eliminar CO₂ contido na amostra.

3.8 Fortificação das Amostras

A contaminação das amostras de cervejas comerciais foi efetuada em balão volumétrico após o processo de preparação, a fim de aferir maior segurança e menores erros envolvidos com vidrarias descalibradas.

Para o QuEChERS dois níveis de fortificação foram utilizados. Na extração envolvendo PSA no passo de clean-up 10 mL de cerveja foram fortificados com 500 µL da solução dos pesticidas de concentração 1 µg mL⁻¹ antes da etapa de partição com acetonitrila, obtendo uma concentração de fortificação 0,05 µg mL⁻¹. Para a extração com Florisil na etapa de clean-up, 10 mL de cerveja foram fortificados com 300 µL da solução dos pesticidas de concentração 1 µg mL⁻¹ antes da etapa de partição com acetonitrila alcançando 0,03 µg mL⁻¹ como concentração de fortificação.

3.9 Extração em QuEChERS

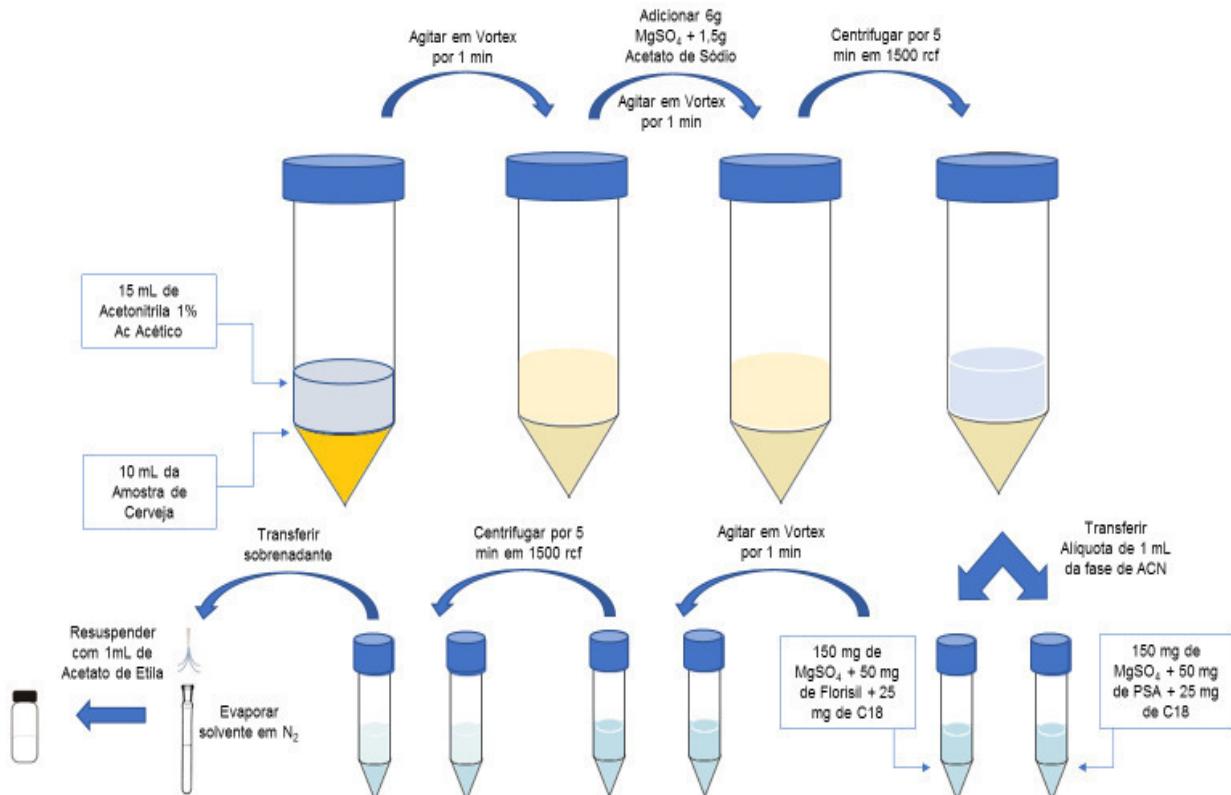
Foram transferidos aliquotas de 10 mL para um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL sequencialmente foram adicionados 10 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético e os tubos foram agitados durante 1 min em vortex. Em seguida, foi adicionado sulfato de magnésio anidro (6,0 g) e acetato de sódio (1,5 g). Após a adição dos sais, os tubos foram agitados durante 1 min e imediatamente centrifugados durante 5 min a 1500 rcf. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf de 2 mL para o passo de *clean-up* por dois procedimentos:

Clean-up 1: 50 mg de PSA, 50 mg de C₁₈ e 150 mg de MgSO₄ anidro.

Clean-up 2: 50 mg de Florisil, 50 mg de C₁₈ e 150 mg de MgSO₄ anidro.

Em ambos os procedimentos de limpeza, a mistura foi agitada durante 1 min e centrifugada durante 5 min a 1500 rcf. Em seguida, o sobrenadante foi evaporado em fluxo lento de N₂ e retomado para 1 mL em acetato de etila para análise em GC-MS/MS. A representação do processo de extração está mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Etapas do processo de extração QuEChERS.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos pesticidas

Os pesticidas envolvidos nesse trabalho são aplicados nas culturas de arroz e milho (Tabela 3) a fim de controlar as pragas nestes cereais. Foram relatados no documento do PARA do ano de 2015 com seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR). [38]

4.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

Experimentos preliminares foram conduzidos com o objetivo de encontrar as melhores condições instrumentais que permitiriam a identificação dos analitos, como os tempos de retenção (t_R) de cada composto (Tabela 6), possibilitando avaliar previamente a separação e os espectros de massas dos pesticidas, a fim de encontrar os picos mais intensos, que foram obtidos em modo de varredura linear (SCAN) para posteriormente serem utilizados no desenvolvimento do modo MRM de análise. A partir de soluções estoque dos padrões, foram preparadas diluições variando em concentrações de $0,05 - 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, levando em consideração as solubilidades (Tabela 4) de cada um dos analitos, que depois foi evaporado em fluxo de N_2 e em seguida as soluções foram retomadas em acetato de etila.

A partir das análises dos padrões individuais, foi observado a presença de mais de um pico para alguns dos pesticidas, que foram: cipermetrina, esfenvalerato e difenoconazol. Para cipermetrina que pertence ao grupo dos piretóides tipo I foram detectados 4 picos, que estão ligados a presença de enantiômeros de ambos diasteroisómeros cis e trans [72]. Onde cada um dos picos foi identificado de acordo com seu tempo de retenção, onde, Cipermetrina 1 está em 16,75 min, Cipermetrina 2 em 16.90 min, Cipermetrina 3 em 17,00 min e Cipermetrina 4 em 17.06 min. O esfenvalerato que faz parte do grupo dos piretróides tipo II apresentou 2 picos referentes a isomerização, sendo nomeados como, Esfenvalerato 1 com tempo de retenção em 18,34 min e Esfenvalerato 2 aparecendo em 18,75 min. [73]

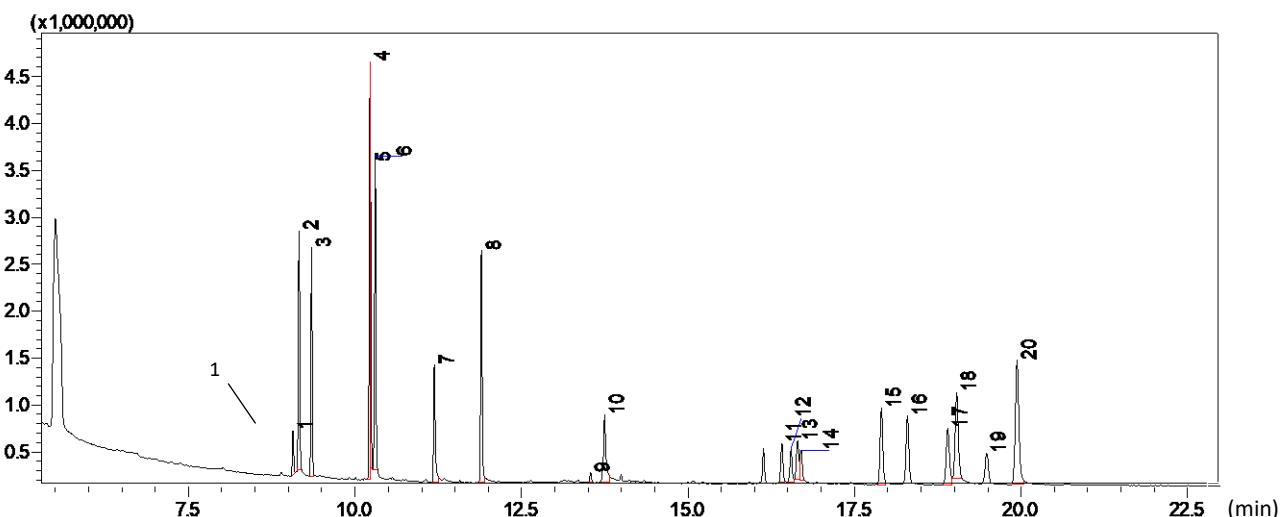
A presença de dois picos referentes ao pesticida difenoconazol está relacionada aos seus isômeros cis e trans [74] que foram identificados como, difenoconazol 1 com tempo de retenção de 19,40 min e difenoconazol 2 em 19,55 min.

Tabela 6 –Tempos de retenção para os pesticidas analisados.

Pesticida	t_R (min)
Carbofurano	9,13
Atrazina	9,23
Terbufós	9,41
Alacloro	10,29
Parationa metílica	10,30
Ametrina	10,38
Tiametoxan	11,26
Flutriafol	11,97
Carbosulfano	13,62
Acetamiprido	13,84
Cipermetrina 1	16,55
Cipermetrina 2	16,69
Cipermetrina 3	16,79
Cipermetrina 4	16,85
Esfenvalerato 1	18,09
Esfenvalerato 2	18,49
Difenoconazol 1	19,11
Difenoconazol 2	19,25
Deltametrina	19,71
Azoxitrobina	20,19

Na Figura 4 pode ser observado o perfil cromatográfico obtido no modo SCAN da análise em GC-MS/MS de uma solução dos pesticidas com concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4 – Cromatograma da corrente total de íons de uma solução padrão dos pesticidas na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de etila. Identificação dos picos: 1) Carbofurano, 2) Atrazina, 3) Terbufós, 4) Alacloro, 5) Parationa metílica, 6) Ametrina, 7) Tiametoxan, 8) Flutriafol, 9) Carbosulfano, 10) Acetamiprido, 11) Cipermetrina 1, 12) Cipermetrina 2, 13) Cipermetrina 3, 14) Cipermetrina 4, 15) Esfenvalerato 1, 16) Esfenvalerato 2, 17) Difenoconazol 1, 18) Difenoconazol 2, 19) Deltametrina, 20) Azoxitrobina. Para condições cromatográficas ver tópico 3.5.



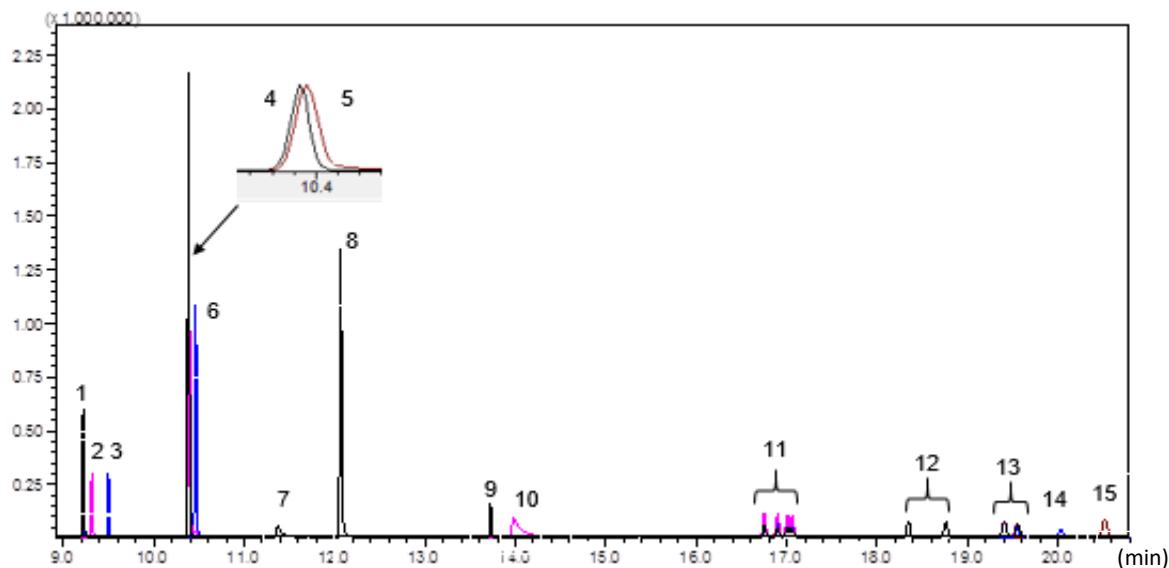
Mesmo apresentando co-eluição do alacloro e parationa metílica os parâmetros cromatográficos de análise foram considerados adequados para o desenvolvimento do método MRM de análise.

4.3 Desenvolvimento do método de MRM

O uso da espectrometria de massas sequencial permite a análise sem separação cromatográfica completa de analitos desde que é incomum encontrar moléculas que eluem no mesmo tempo de retenção e compartilham a mesma transição MS/MS, ainda assim podem ser identificados e quantificados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) devido a diferentes fragmentos de íons. No entanto, se faz necessário um certo grau de separação para permitir a programação de várias transições MRM em diferentes segmentos de tempo ao longo do cromatograma [75]. Geralmente, a transição iônica de baixa intensidade é utilizada para fazer análise qualitativa e a transição iônica de alta intensidade é aplicada à análise quantitativa. No entanto, a transição iônica de alta resposta também pode ser aplicada à análise qualitativa. [76]

Inicialmente a otimização das transições dos íons foi realizada com padrões dos pesticidas em solvente orgânico em modo SCAN a fim de observar os íons com maior intensidade, seguindo, as transições selecionadas foram monitoradas em uma solução contendo uma mistura dos padrões na concentração de 5 µg mL⁻¹ para estimar a viabilidade das transições dos íons selecionados. Após a seleção do íon precursor, o espectro de íons do produto foi adquirido na análise MS/MS de varredura completa. Os íons produto mais intensos foram selecionados para cada íon precursor para compor as transições do MRM, levando a uma melhor sensibilidade, além de melhor resolução e forma de pico. O último parâmetro otimizado foi a energia de colisão, em que valores diferentes foram testados (3-45 V). A seleção de energia de colisão foi baseada na intensidade relativa do íon precursor e os íons produto. Se a energia da colisão for aumentada gradativamente, a intensidade dos íons produzidos será menor do que a intensidade dos íons que são produzidos sob a melhor energia de colisão. A Tabela 8 mostra os valores das três transições mais intensas e valores de energia de colisão (CE) para cada um dos 15 pesticidas.

Figura 5 – Cromatograma em modo MRM para os pesticidas: 1) Carbofurano; 2) Atrazina; 3) Terbufós; 4) Alacloro; 5) Parationa metílica; 6) Ametrina; 7) Tiametoxan; 8) Flutriafol; 9) Carbosulfano; 10) Acetamiprido; 11) Cipermetrina; 12) Esfenvalerato; 13) Difenoconazol; 14) Deltametrina; 15) Azoxistrobina. Condições cromatográficas no item 3.5.



O método MRM mostrou ser eficiente na identificação dos pesticidas alacloro e parationa metílica que coeluem no tempo de 10,38 min (Figura 5), tendo em vista que possibilita uma análise simultânea com boa separação dos picos.

Tabela 7 – Valores para as transições mais intensas com suas respectivas energias de colisão.

Pesticida	Ion 1		Ion 2		Ion 3	
	Transição 1 (m/z)	CE (V)	Transição 2 (m/z)	CE	Transição 3 (m/z)	CE
Carbofurano	164,00>149,10	9	164,00>103,10	27	164,00>131,10	18
Atrazina	200,00>122,10	9	200,00>132,10	9	200,00>71,10	18
Alacloro	188,00>160,10	9	188,00>131,10	24	188,00>146,10	15
Parationa metílica	109,00>79,00	9	109,00>81,10	9	109,00>93,10	9
Ametrina	227,00>185,10	6	227,00>58,10	15	227,00>170,10	12
Tiametoxan	212,00>139,10	12	212,00>182,10	6	212,00>125,10	9
Flutriafol	123,00>95,10	15	123,00>75,10	24	123,00>69,10	30
Carbosulfan	160,00>104,10	9	160,00>57,10	15	160,00>62,00	18
Acetamiprido	152,00>116,10	18	152,00>89,10	27	152,00>125,10	15
Cipermetrina 1	181,00>152,20	24	181,00>127,10	24	181,00>77,20	27
Cipermetrina 2	163,00>127,10	6	163,00>91,10	15	163,00>109,10	18
Cipermetrina 3	181,00>152,20	24	181,00>127,10	27	181,00>151,10	24
Cipermetrina 4	163,00>127,10	6	163,00>91,20	18	163,00>108,90	18
Esfenvalerato 1	125,00>89,10	18	125,00>99,10	21	125,00>63,10	27
Esfenvalerato 2	125,00>89,10	18	125,00>99,10	18	125,00>63,00	27
Difenoconazol 1	265,00>202,00	21	265,00>139,10	27	265,00>209,00	18
Difenoconazol 2	265,00>202,10	18	265,00>139,20	27	265,00>209,00	15
Deltametrina	181,00>152,10	24	181,00>127,10	27	181,00>77,00	30
Azoxitrobina	344,00>329,10	15	344,00>183,10	21	344,00>156,20	30

4.4 Desenvolvimento do método de extração QuEChERS

Este método é baseado em uma extração com acetonitrila e partição com adição de sal. O passo de limpeza com uma extração de fase sólida dispersiva (d-SPE) promove extratos mais limpos. Além do PSA que é o principal adsorvente usado em d-SPE, o Florisil foi testado como alternativa de adsorvente para o passo de limpeza junto com C₁₈.

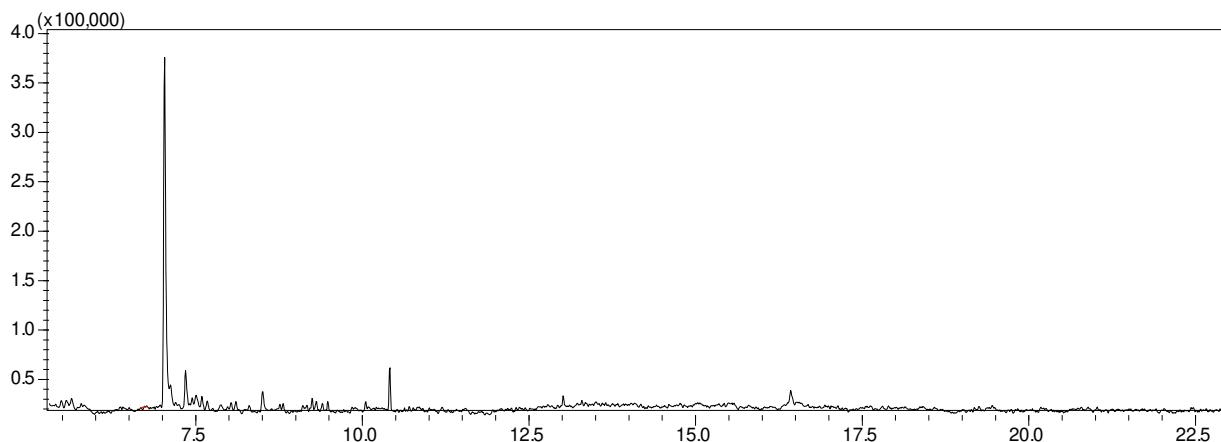
Para os ensaios iniciais foi utilizado um kit da Waters que segue o método de extração da Association of Analytical Communities (AOAC) 2007.01. O Kit é composto de um tubo de polipropileno de 50 mL contendo 6 g de MgSO₄ e 1,5 g de acetato de sódio. Para o passo de *clean-up*, um tubo de polipropileno de 2 mL contendo 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA e 50 mg de C₁₈. Como solvente de extração foi utilizado 15 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético. O volume da amostra foi de 10 mL.

A adição do MgSO₄ na etapa de partição favorece a remoção da água contida na amostra. A reação de hidratação deste sal é exotérmica, alcançando uma temperatura entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição da amostra e este aquecimento favorece a extração dos compostos apolares. A adição do acetato de sódio está ligada diretamente com a formação do tampão com pH entre 4 e 5 junto com o ácido acético adicionado à acetonitrila, tornando a extração mais compatível com o pH da cerveja que é em torno de 4. [77]

A Figura 6 mostra o cromatograma referente ao processo de extração em que foi utilizado PSA junto com o C18 no passo de *clean-up* do extrato. O C18 tem a capacidade de extrair compostos apolares e de média polaridade, efetivo em remover lipídios. O PSA tem a capacidade de remover ácidos orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos [78]. Pode ser observado a eficiência do *clean-up* tendo em vista que apenas um dos interferentes que foram detectados está próximo do tempo de eluição do

alacloro, parationa metílica e ametrina, o qual pode ser excluído com a aplicação do método MRM.

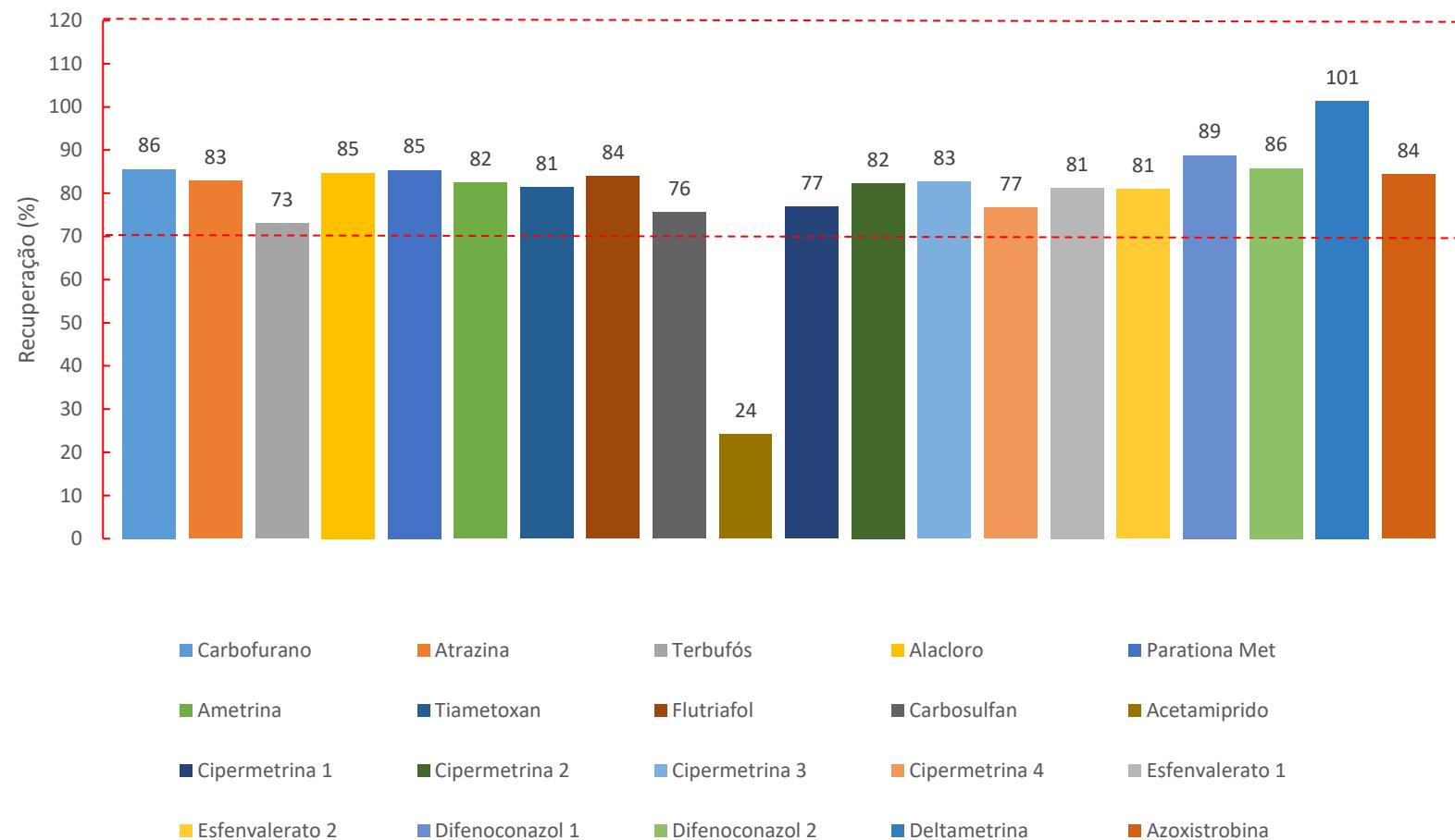
Figura 6 – Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes PSA + C₁₈ no passo de *clean-up*.



Em seguida foi executado o ensaio para testar a recuperação dos pesticidas no nível de fortificação de 0,05 µg mL⁻¹. Os resultados das recuperações são mostrados na Figura 7. Nesse teste foram obtidos valores dentro da faixa (70 %-120 %) para a maioria dos pesticidas com exceção do acetamiprido, que alcançou o valor de 24 %. Esse baixo valor pode estar associado a instabilidade térmica dos carbamatos, fazendo com que o composto degrade devido as altas temperaturas envolvidas na análise em CG. [79]

Outra proposta para o passo de *clean-up* foi utilizar o Florisil como adsorvente no lugar do PSA, tendo em vista suas propriedades polares. A quantidade de Florisil utilizada para este ensaio foi de 50 mg, sendo que os demais parâmetros para o passo de d-SPE não foram alterados.

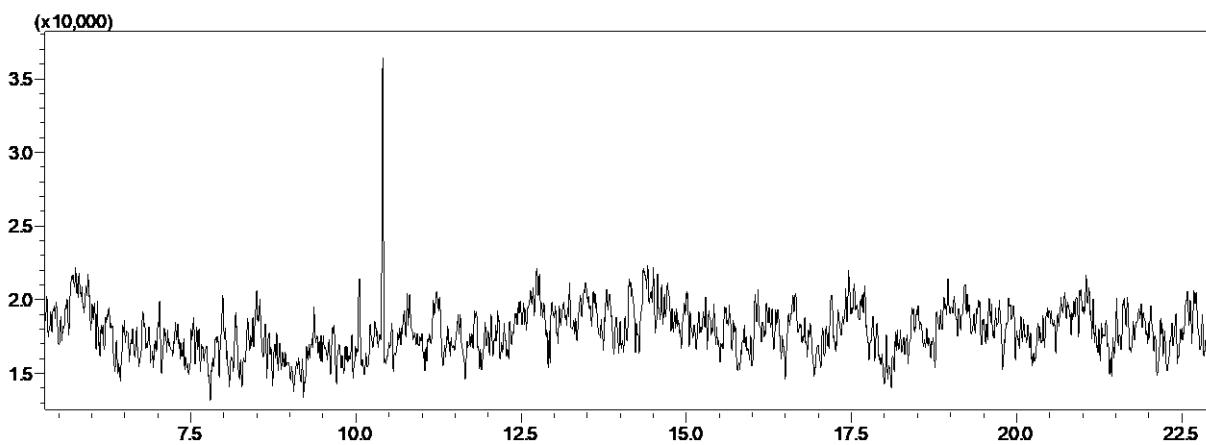
Figura 7 - Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando PSA + C₁₈ no passo de *clean-up* com nível de fortificação de 0,05 µg mL⁻¹.



Conforme foi observado na Figura 8, o Florisil mostrou ser muito eficiente na remoção dos interferentes, efetuando uma limpeza mais efetiva que o PSA, mostrando que sua utilização é satisfatória para a matriz em questão.

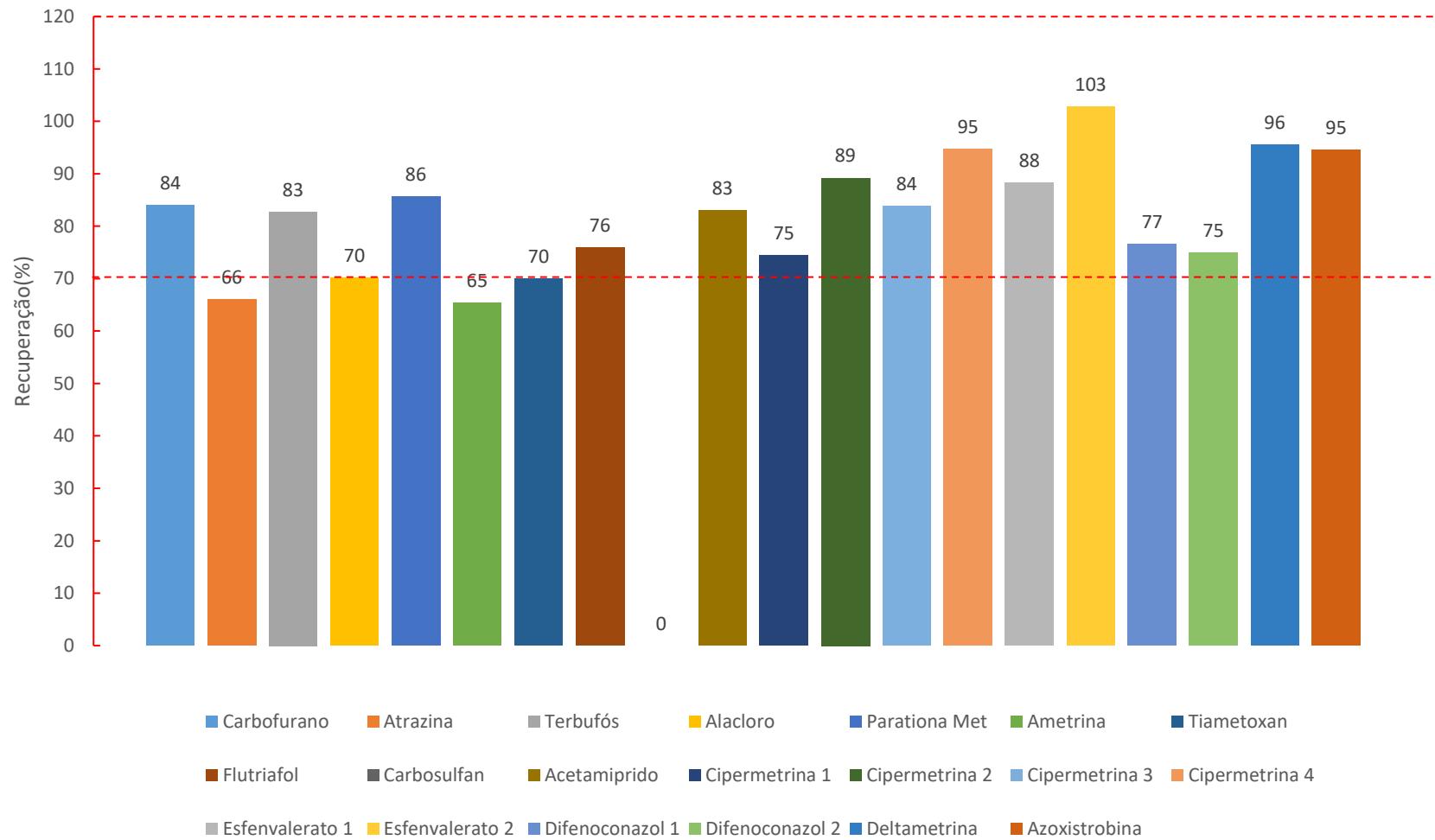
O teste de recuperação envolvendo o Florisil no passo de d-SPE foi executado com nível de fortificação em $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 8 - Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes Florisil + C₁₈ no passo de *clean-up*.



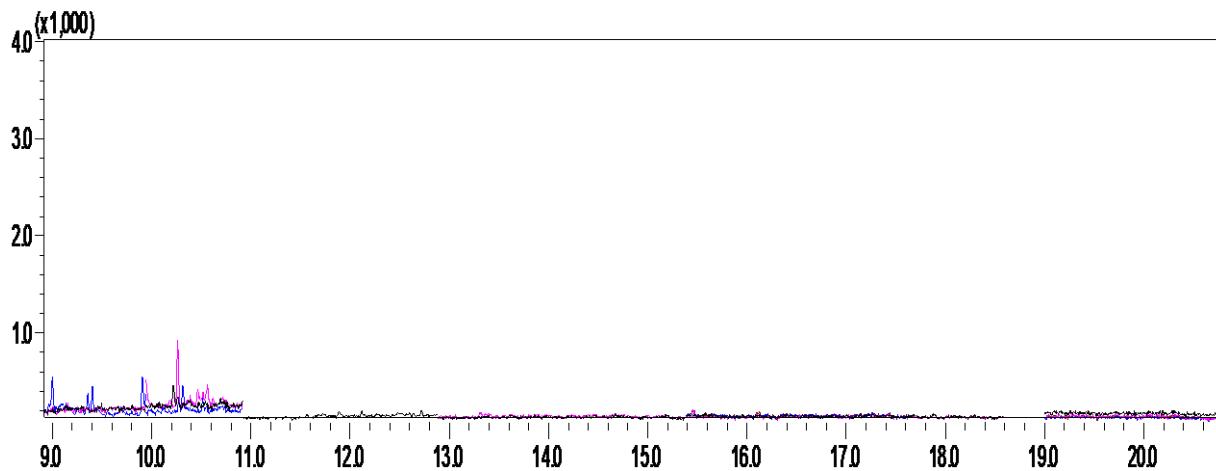
A Figura 9 mostra que a maioria dos compostos alcançaram bons resultados de recuperação. O carbosulfano por sua vez não foi detectado. A atrazina e a ametrina com recuperações de 66 % e 65 %, respectivamente, também não alcançaram o intervalo desejado, que pode estar relacionado ao nível de concentração utilizado.

Figura 9 - Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando Florisil + C₁₈ no passo de *clean-up* com nível de fortificação de 0,03 µg mL⁻¹.



A fim de controlar o volume da amostra que seria utilizada para o processo de secagem em nitrogênio após o processo de extração e antes da análise por cromatografia, tendo em vista que o volume de 1 mL da amostra utilizado no procedimento de clean-up com o tubo de 2 mL não era recuperado totalmente foi realizado um ensaio onde o passo de d-SPE foi modificado. Neste ensaio foi utilizado um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 400 mg de C18, 400 mg de Florisil, 1,2 g de MgSO₄ e 8 mL da amostra foram retiradas do passo de partição para esse procedimento. A figura 10 mostra o cromatograma referente a este ensaio, onde pode ser observado que poucos interferentes são vistos próximos aos tempos de retenção dos pesticidas.

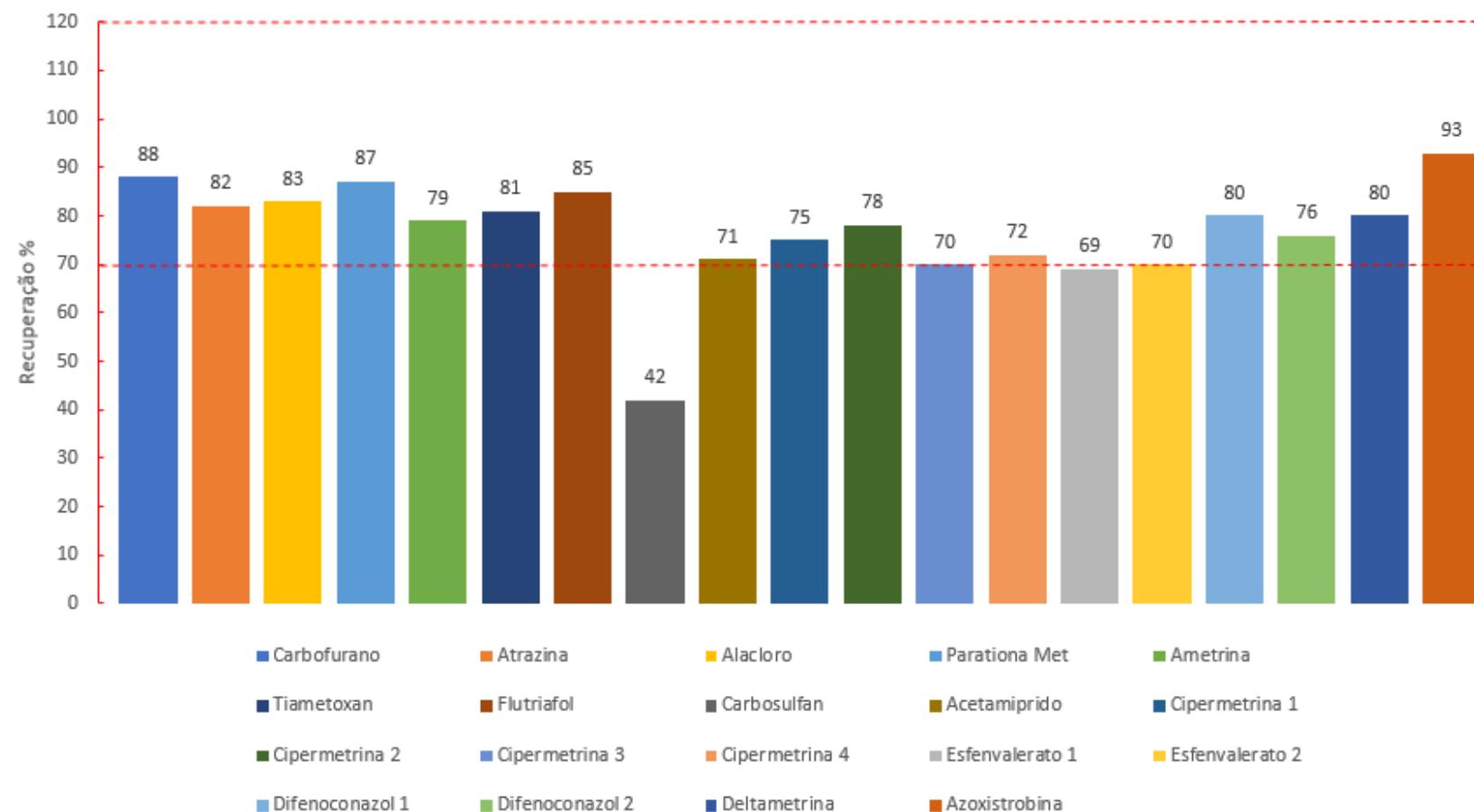
Figura 10 - Cromatograma da extração em QuEChERS da cerveja onde foi empregada a combinação de adsorventes Florisil + C₁₈ em tubo de 15 mL no passo de *clean-up*.



Os valores de recuperação que foram realizados com nível de concentração de 0,05 µg mL⁻¹ para esse teste podem ser observados na figura 11. As recuperações para os pesticidas com exceção do calbosulfano com valor de 45% ficaram dentro do intervalo (70-120%) ideal.

Além de cromatogramas livres de interferentes, bons valores de recuperação foram alcançados tanto para os ensaios utilizando PSA como adsorvente na etapa de limpeza quanto para o Florisil. O QuEChERS apresentou baixo tempo de extração mostrando ser um método eficiente para a matriz alvo deste trabalho.

Figura 11 - Recuperação para extração da cerveja em QuEChERS utilizando Florisil + C₁₈ no passo de *clean-up* em tubo de 15 mL com nível de fortificação de 0,05 µg mL⁻¹.



4.5 Validação do método cromatográfico

4.5.1 Linearidade

Para observar o comportamento dos pesticidas no GC-MS/MS e suas respectivas linearidades em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5 µg mL⁻¹) foram produzidas curvas analíticas em acetato de etila (Tabela 8). Pode ser notado que em sua maioria os pesticidas tiveram uma boa resposta às condições de análise apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,99, com exceção do acetamiprido, difenoconazol 1, difenoconazol 2, deltametrina e azoxistrobina.

Tabela 8 – Curvas analíticas para os pesticidas com intervalo de concentração, equações da reta e coeficiente de correlação.

Pesticida	Concentração (µg mL ⁻¹)	Equação da reta	Coeficiente de correlação
Carbofurano	0,05 - 2,5	y = 51764x - 3130,3	0,9985
Atrazina	0,05 - 2,5	y = 14848x - 119,4	0,9997
Terbufós	0,05 - 2,5	y = 2328,2x + 23,152	0,9923
Alacloro	0,05 - 2,5	y = 56746x + 668,84	0,9991
Parationa metílica	0,05 - 2,5	y = 19838x - 2452,2	0,9926
Ametrina	0,05 - 2,5	y = 39884x - 945,5	0,9999
Tiametoxan	0,05 - 2,5	y = 17742x - 2073	0,9916
Flutriafol	0,05 - 2,5	y = 178313x - 2713,9	0,9999
Carbosulfano	0,05 - 2,5	y = 5874x - 599,52	0,9952
Acetamiprido	0,1 - 1,5	y = 18235x - 3288,5	0,9024
Cipermetrina 1	0,05 - 2,5	y = 13846x - 1423	0,9936
Cipermetrina 2	0,05 - 2,5	y = 15816x - 1784,5	0,9935
Cipermetrina 3	0,05 - 2,5	y = 11810x - 1157,8	0,9966
Cipermetrina 4	0,05 - 2,5	y = 14666x - 1332,9	0,9962
Esfenvalerato 1	0,05 - 2,5	y = 9402,9x - 577,35	0,9941
Esfenvalerato 2	0,05 - 2,5	y = 14614x - 1237,9	0,9956
Difenoconazol 1	0,05 - 2,5	y = 13560x - 1750,3	0,9827
Difenoconazol 2	0,05 - 2,5	y = 15882x - 2516,1	0,9818
Deltametrina	0,05 - 2,5	y = 12923x - 1634,9	0,9876
Azoxistrobina	0,05 - 2,5	y = 26488x - 3501,3	0,9851

4.5.2 Seletividade

Neste trabalho a avaliação do efeito da matriz foi realizada pela construção de duas curvas analíticas: uma a partir da diluição da solução padrão no solvente orgânico Acetato de etila e outra pela diluição em extrato da cerveja obtido a partir do processo de extração por QuEChERS. Os pontos da curva no extrato da matriz foram produzidos através da diluição de 100 µL de solução padrão em 900 µL do extrato, com o intuito de controlar a diluição dos possíveis compostos interferentes e não obter resultados falsos para o estudo. [80]

Os dados obtidos das curvas analíticas podem ser observados na Tabela 9.

Para estabelecer os intervalos de concentração utilizados nas curvas analíticas foi observada a melhor linearidade das curvas, buscando atender os LMR's indicados pela ANVISA e o Codex Alimentarius, reportados na tabela 2.

Com os valores dos coeficientes angulares apresentados na tabela 8 foram calculadas as razões entre os mesmos (RCA). Para os pesticidas alacloro, ametrina, tiame toxan, esfenvalerato 1, esfenvalerato 2, difenoconazol 2, deltametrina e azoxistrobina foram observados valores que mostram uma influência negativa do efeito matriz oriunda da supressão do sinal analítico em decorrência de compostos presentes na cerveja e também da instabilidade térmica de alguns destes pesticidas, fazendo com que esses compostos possam ser perdidos no caminho entre o injetor até a coluna como no caso do piretróide deltametrina. Os elevados valores de efeito matriz estão associados sobretudo com as baixas concentrações em que as curvas analíticas foram preparadas. [59]

Os valores de RCA para os pesticidas carbosulfano, acetamiprido mostram que estes sofrem um grande efeito matriz positivo pela co-eluição de interferentes no mesmo tempo de retenção aumentando o sinal destes compostos. Já os pesticidas carbofurano, atrazina, parationa metílica, flutriafol, carbosulfano, acetamiprido, cipermetrina 1, e difenoconazol 1 sofrem levemente com um efeito matriz positivo.

De modo geral, a intensidade dos sinais analíticos, sofreram aumento/diminuição embora que sutil para a maioria dos pesticidas, mas ainda assim foram adotadas como referência as quantificações dos pesticidas a partir da calibração no extrato da matriz.

Tabela 9 – Curvas analíticas para os pesticidas com intervalo de concentração, equações da reta, coeficiente de correlação e razão dos coeficientes angulares.

	Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta (Matriz)	R^2	Equação da reta (Solvente)	R^2	RCA
Carbofurano	0,02-0,4	$y = 3316,9x + 98,97$	0,9937	$y = 3723x - 46,236$	0,9985	1,12
Atrazina	0,02-0,4	$y = 13000x + 46,277$	0,9943	$y = 14510x + 37,883$	0,9941	1,11
Alacloro	0,02-0,3	$y = 39031x + 234,46$	0,9984	$y = 50267x - 413,23$	0,9981	0,77
Parationa metílica	0,02-0,4	$y = 10947x - 69,698$	0,9804	$y = 9505x - 132,55$	0,9904	1,15
Ametrina	0,02-0,3	$y = 29520x + 79,079$	0,9947	$y = 35146x - 247,25$	0,9917	0,84
Tiametoxan	0,02-0,3	$y = 16059x + 134,86$	0,9920	$y = 27835x - 461,21$	0,9944	0,57
Flutriafol	0,02-0,3	$y = 97160x + 106,23$	0,9933	$y = 87633x - 257,11$	0,9970	1,10
Carbosulfan	0,02-0,4	$y = 6299,9x - 74,541$	0,9906	$y = 3416,5x - 46,656$	0,9939	1,84
Acetamiprido	0,02-0,3	$y = 11308x - 42,327$	0,9900	$y = 8265,1x - 124,3$	0,9958	1,36
Cipermetrina 1	0,02-0,4	$y = 7789x - 59,711$	0,991	$y = 7065,6x - 86,159$	0,9995	1,10
Cipermetrina 2	0,02-0,4	$y = 7271,5x - 71,621$	0,9903	$y = 6843x - 123,15$	0,9993	1,06
Cipermetrina 3	0,02-0,4	$y = 6189,1x - 57,502$	0,9900	$y = 5871,3x - 88,492$	0,9995	1,05
Cipermetrina 4	0,02-0,4	$y = 6571,5x - 87,416$	0,9892	$y = 6497,9x - 129,72$	0,9985	1,01
Esfenvalerato 1	0,02-0,3	$y = 6650,2x + 2,1456$	0,9846	$y = 10815x - 214,78$	0,9894	0,61
Esfenvalerato 2	0,02-0,4	$y = 6765,9x - 37,584$	0,9897	$y = 7691,8x - 71,567$	0,9979	0,88
Difenoconazol 1	0,02-0,4	$y = 13208x - 140,05$	0,9808	$y = 10971x - 155,72$	0,9904	1,20
Difenoconazol 2	0,02-0,3	$y = 10092x - 20,47$	0,9937	$y = 11619x - 212,9$	0,9866	0,87
Deltametrina	0,02-0,4	$y = 5541,9x - 27,139$	0,9920	$y = 6204x - 144,86$	0,9912	0,89
Azoxistrobina	0,02-0,3	$y = 20695x - 152,04$	0,9884	$y = 26410x - 508,49$	0,9956	0,78

4.5.3 Exatidão e precisão

Para os testes de exatidão e precisão foram utilizados os intervalos de concentração definidos no estudo de efeito matriz e com a finalidade de assegurar eficiência de extração para níveis de concentração baixos, o método foi aplicado para as concentrações 0,3; 0,1 e 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Tabela 10 apresenta os valores de recuperação média e dos coeficientes de variação (CV) para cada pesticida.

Os valores de recuperação e coeficientes de variação obtidos para os pesticidas na concentração 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indicam que o método proposto apresenta ótima exatidão e precisão para esse nível de concentração, tendo em vista que os resultados estão dentro da faixa 70-120% e inferior a 20% respectivamente. [54]

Para a maioria dos pesticidas na concentração 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as médias de recuperação tiveram valores entre 70-120% com exceção dos pesticidas cipermetrina 1, cipermetrina 2, cipermetrina 3, cipermetrina 4 e esfenvalerato 1 que obtiveram valores de recuperação abaixo do intervalo, por outro lado, foram obtidos resultados insatisfatórios para o parâmetro coeficiente de variação para maioria dos pesticidas com valores superiores a 20%. Na concentração 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os valores de recuperação encontrados para os pesticidas foram muito abaixo do intervalo desejado.

À medida em que o nível de concentração da fortificação é reduzido são observados baixos valores de recuperação para o menor valor concentração utilizado e elevados valores de CV para a concentração intermediária são observados, esses resultados foram bastante influenciados por uma baixa de sensibilidade no equipamento de cromatografia gasosa que era constantemente utilizado em várias baterias de análise com amostras distintas ocasionando uma saturação de compostos interferentes.

Tabela 10 – Recuperação média e coeficientes de variação do método QuEChERS para determinação de pesticidas em cerveja (n=5).

	Fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação Média %	CV %
Carbofurano	0,3	88	10
	0,1	96*	10,4*
	0,05	95	3,9
Atrazina	0,3	80	0,3
	0,1	82*	19*
	0,05	95	7,7
Alacloro	0,3	83	2,9
	0,1	84*	22*
	0,05	52	6
Parationa metílica	0,3	87	4,5
	0,1	92*	19*
	0,05	90	16
Ametrina	0,3	79	1
	0,1	81*	25*
	0,05	52	3,8
Tiametoxan	0,3	82	2,5
	0,1	83*	25*
	0,05	47	3,6
Flutriafol	0,3	83	1,3
	0,1	87*	21*
	0,05	50	6,3
Acetamiprido	0,3	83	1,8
	0,1	74*	19,6*
	0,05	48	22,8
Cipermetrina 1	0,3	123	15
	0,1	76*	20*
	0,05	39	11,8
Cipermetrina 2	0,3	102	12
	0,1	60*	15,1*
	0,05	59	10
Cipermetrina 3	0,3	97	12
	0,1	57*	15,6*
	0,05	29	4,7
Cipermetrina 4	0,3	117	7,7
	0,1	65*	26,9*
	0,05	28	11,5
Esfenvalerato 1	0,3	108	22,2
	0,1	67*	8,1*
	0,05	41	29

Continuação da tabela 10

Esfenvalerato 2	0,3	112	9,3
	0,1	74*	24*
	0,05	44	26,2
Difenoconazol 1	0,3	87	7,2
	0,1	89*	23,4*
	0,05	50	16,1
Difenoconazol 2	0,3	82	6,4
	0,1	76*	39,05*
	0,05	61	16,8
Deltametrina	0,3	89	6,1
	0,1	95*	7,1*
	0,05	71	33,7
Azoxistrobina	0,3	94	10,5
	0,1	94*	30*
	0,05	55	6,1

*(n=3)

4.5.4 Limite de quantificação e Limite de detecção.

O cálculo dos limites de detecção e quantificação neste trabalho foram realizados utilizando o método baseado em parâmetros da curva analítica, por ser o mais confiável estatisticamente para métodos cromatográficos. Foram utilizados o coeficiente linear (s) e coeficiente angular (S), ambos das curvas analíticas dos pesticidas na matriz utilizadas no estudo do efeito matriz para os cálculos de LD e LQ [64], como pode ser visto nas seguintes equações:

$$LD = 3x\frac{s}{S} \quad LQ = 10x\frac{s}{S}$$

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos dos LD e LQ do método proposto para a determinação dos pesticidas na cerveja.

Tabela 11 – Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) para o método QuEChERS.

	Limite de Detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carbofurano	0,03	0,08
Atrazina	0,01	0,04
Alacloro	0,02	0,06
Parationa metílica	0,02	0,06
Ametrina	0,01	0,03
Tiametoxan	0,025	0,08
Flutriafol	0,003	0,01
Carbosulfano	0,035	0,12
Acetamiprido	0,01	0,04
Cipermetrina1	0,03	0,1
Cipermetrina2	0,03	0,1
Cipermetrina3	0,03	0,1
Cipermetrina4	0,03	0,1
Esfenvalerato1	0,02	0,05
Esfenvalerato2	0,02	0,05
Difenoconazol1	0,03	0,1
Difenoconazol2	0,03	0,1
Deltametrina	0,015	0,05
Azoxitrobina	0,02	0,05

Os limites de detecção e quantificação encontrados para os pesticidas variaram de 0,003-0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,01-0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, os quais podem ser considerados satisfatórios visto que apresentam baixos valores de concentração para cada composto.

4.6 Aplicação do método em amostras reais

Após a validação, o método proposto foi aplicado a 9 rótulos (Antarctica, Bavaria, Brahma, Crystal, Devassa, Itaipava, Schin, Skol) de cervejas produzidas no Brasil com intuito de verificar a presença de resíduos dos

pesticidas utilizados neste trabalho. A tabela 12 mostra os resultados obtidos para cada uma das cervejas.

Tabela 12 – Resultados da aplicação do método QuEChERS na análise de pesticidas em amostras reais.

Os resultados obtidos mostram que não foram encontrados nenhum resíduo dos pesticidas em nenhum dos rótulos de cerveja utilizados nesse trabalho. A ausência dos pesticidas no produto final cerveja pode estar ligada as diversas fases de processamento na produção da bebida, causando eliminação dos resíduos durante a produção. [37,71]

5 CONCLUSÕES

As condições cromatográficas adotadas junto com o desenvolvimento do método de MRM para GC-MS/MS permitiram a obtenção de bons resultados de separação dos compostos em análise, proporcionando uma análise simultânea dos 14 pesticidas em estudo (acetamiprido, alacloro, ametrina, atrazina, azoxitrobina, carbofurano, carbosulfano, cipermetrina, deltametrina, difenoconazol, esfenvalerato, flutriafol, parationa metílica e tiametoxan) com separação eficaz destes analitos e excelente resposta linear com exceção do acetamiprido, difenoconazol, deltametrina e azoxistrobina que apresentaram coeficientes de correlação abaixo de 0,99.

A técnica de extração QuEChERS apresentou valores de recuperação para os pesticidas com concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ na faixa de 73-101% onde foi aplicada a combinação do PSA e C₁₈ na fase de *clean-up*, já para a combinação Florisil e C₁₈ com concentração dos pesticidas de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ a faixa de recuperação foi de 65-103%. Em ambos os casos o carbosulfano apresentou valores muito baixos de recuperação devido à instabilidade térmica dos carbamatos. Estes resultados de recuperação associados com a limpeza proporcionada pelo passo de d-SPE, pouca quantidade de amostra e adsorvente utilizada, baixos volumes dos solventes e rapidez, mostra a aptidão do QuEChERS como método de extração para pesticidas em cerveja.

Os parâmetros de validação estudados apresentaram índices satisfatórios incialmente para assegurar a determinação de resíduos dos pesticidas acetamiprido, alacloro, ametrina, atrazina, azoxitrobina, carbofurano, carbosulfano, cipermetrina, deltametrina, difenoconazol, esfenvalerato, flutriafol,

parationa metílica e tiametoxan por extração em QuEChERS. Devido a problemas na sensibilidade do aparelho de cromatografia gasosa algumas análises foram afetadas, principalmente os ensaios de precisão e exatidão para as concentrações $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ que mostraram valores diferentes dos esperados de recuperação e coeficientes de variação, que estão fora dos limites ideais de 70-120% e abaixo de 20% respectivamente, tornando necessário novos experimentos para esse parâmetro com as condições ideias do aparelho de cromatografia.

Nos testes em amostra real realizados em nove rótulos (Antarctica, Bavaria, Brahma, Crystal, Devassa, Itaipava, Schin, Skol) de cervejas brasileiras nenhum dos pesticidas em estudo foram detectados.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Avaliar a eficiência de adsorvente alternativo na etapa de limpeza do extrato de cerveja.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Allied Market research: Beer Industry Analysis & Global Beer Market Report bt growth & Forecast <<https://www.alliedmarketresearch.com/beer-market>>, Acesso em: 2 de novembro de 2016.
- [2] Statista: Worldeide Beer Production, 2015 <<http://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>, Acesso em: 5 de novembro de 2016.
- [3] Cervbrasil: Anuario 2015 <http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf> Acesso em: 7 de novembro de 2016.
- [4] Kong, Z.; Li, M.; Chen, J.; Gui, Y.; Bao, Y.; Fan, B.; Jian, Q.; Francis, F.; Dai, X. Processing factors of triadimefon and triadimenol in barley brewing based on response surface methodology. *Food Control*, 2016, 64, 81-86
- [5] Preedy, V. Beer in health and diseases prevention. 1st edition, Academic Press, 2008.
- [6] Masiá, A.; Suarez-Varela, M. M.; Llopis-Gonzalez, A.; Picó, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 936, 40-61.
- [7] He, Z.; Wang, L.; Peng, Y.; Luo, M.; Wang, W.; Liu, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chemistry*, 2015, 169, 372–380.
- [8] Ribeiro, M. L.; Lourencetti, C.; Polese, L.; Navickiene, S.; Oliveira, L. C. Pesticidas: Usos e Riscos Para o Meio Ambiente. HOLOS Environment, 2008, 53.
- [9] Yang, X.; Zhang, H.; Liu, Y.; Wang, J.; Zhang, Y. C.; Dong, A. J.; Zhao, H. T.; Sun, C. H.; Cui, J. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass

- spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. Food Chemistry, 2011, 127, 855–865.
- [10] Ferreira, J. A.; Ferreira, J. M. S.; Talamini, V.; Facco, J. F.; Rizzetti, T. M.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; Bottoli, C. B. G. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. Food Chemistry, 2016, 213, 616–624.
- [11] Kiljanek, T.; Niewiadowska, A.; Semeniuk, S.; Gaweł, M.; Borzecka, M.; Posyniak, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. Journal of Chromatography A, 2016, 1435, 100–114.
- [12] David, F.; Devos, C.; Dumont, E.; Yang, Z.; Sandra, P.; Huertas-Pérez, J. D. Determination of pesticides in fatty matrices using gel permeation *clean-up* followed by GC-MS/MS and LC-MS/MS analysis: A comparison of low- and high-pressure gel permeation columns. Talanta, 2017, 165, 201–210.
- [13] Keukeleire, D. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. Química Nova, 2000, 23, 108-112.
- [14] Rosa, N.A; Afonso, J.C. A química da cerveja. Química Nova. 2015. 98-105.
- [15] H.M. Ebinger, Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, Willey-VCH, Darmstadt, 2009.
- [16] Bokulich, N. A.; Bamforth, C. W. The microbiology of malting and brewing. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77, 157–172.
- [17] Bohatch, A. Cerveja: Fabricação em pequena escala. Curitiba: Núcleo de produção gráfica da Emater, 1994. p. 3, 9-17,19-31.
- [18] Brasil. Decreto 6.871, de 4 de junho de 2009. Disponível e: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2009/decreto-6871-4-junho-2009-588673-normaactualizada-pe.pdf>>, Acesso em: 7 de novembro de 2016.

- [19] Brooks, J.R. *et al.* Heavy and light beer: a carbon isotope approach to detect C4 carbon in beers of different origins, styles, and prices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, 6413–6418.
- [20] Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos *Safra 2016/2017 -Primeiro levantamento*, Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_10_07_09_33_35_safra_outubro_1.pdf>, Accessado: 15 de Maio, 2017.
- [21] He, Z.; Wang, L.; Peng, Y.; Luo, M.; Wang, W.; Liu, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method. *Food Chemistry*, 2015, 169, 372–380.
- [22] Lima, R. F.; Dionello, R. G.; Peralba, M. C. R.; Barrionuevo, S.; Radunz, L. L.; Júnior, F. W. R. PAHs in corn grains submitted to drying with firewood. *Food Chemistry*, 2017, 215, 165–170.
- [23] Miano, A. C.; Ibarz, A.; Augusto, P. E. D. Ultrasound technology enhances the hydration of corn kernels without affecting their starch properties. *Journal of Food Engineering*, 2017, 197, 34 e 43.
- [24] MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2006. Disponível em: <http://www.cnpmc.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>, Acesso em: 10 de Maio, 2017.
- [25] Maltchik, L.; Stenert, C.; Batzer, D. P. Can rice field management practices contribute to the conservation of species from natural wetlands? Lessons from Brazil. *Basic and Applied Ecology*, 2017, 18, 50–56.
- [26] Nunes, F. A.; Seferin, M.; Maciel, V. G.; Flôres, S. H.; Ayub, M. A. Z. Life cycle greenhouse gas emissions from rice production systems in Brazil: A comparison between minimal tillage and organic farming. *Journal of Cleaner Production*, 2016, 139, 799 e 809.

- [27] Companhia Nacional de Abastecimento. A cultura do arroz. Disponivel em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf>, Acesso em: 11 de Maio, 2017.
- [28] Vieira, D. C.; Noldin, J. A.; Deschamps, F. C.; Jr, C. R. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. *Chemosphere*, 2016, 162, 48 -54.
- [29] Ministério do meio Ambiente. Disponivel em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 11 de Novembro 2016.
- [30] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponivel em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>>. Acesso em: 11 de Novembro de 2016.
- [31] BRASIL. Lei nº 7.802. Casa Civil, 1989. Disponivel em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2016.
- [32] Barbosa, A. M. C; Solano, M. L. M.; Umbuzeiro G. A. Pesticides in drinking water – the Brazilian monitoring program. *Frontiers in Public Health*, 2015, 3, 246.
- [33] Faroni, L. D. A.; Heleno, F. F.; Ávila M. B. R. Embrapa, 2014. Disponível em :<http://eventos.abrapo.org.br/anais/paperfile/110_20143011_23-50-32_9784.PDF> Acesso em: 13 de Novembro de 2016.
- [34] Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA): Relatório de atividades de 2010* (2011). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6ab-f74ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 15 de maio de 2017.
- [35] Rebelo, R. M.; Caldas, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de pesticidas. *Química Nova*, 2014, 1199-1208.

- [36] Mardegan, S. F.; Andrade, T. M. B.; Neto, E. R S.; Vasconcellos, E. B. C.; Martins, L. F. B.; Mendonça, T. G.; Martinelli, L. A. Stable carbon isotopic composition of Brazilian beers—A comparison between large- and small-scale breweries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, 29, 52–57.
- [37] Kong, Z.; Li, M.; Chen, J.; Gui, Y.; Bao, Y.; Fan, B.; Jian, Q.; Francis, F.; Dai, X. Behavior of field-applied triadimefon, malathion, dichlorvos, and their main metabolites during barley storage and beer processing. *Food Chemistry*, 2016, 211, 679–686.
- [38] ANVISA. Monografias de Pesticidas. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agro toxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 21 de abril de 2017.
- [39] Food and Agriculture of the united nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticides/en/>>, Acesso em: 10 de Maio de 2017.
- [40] Seebunrueng, K.; Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S. Vortex-assisted low density solvent liquid–liquid microextraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits. *Talanta*, 2015, 132, 769–774.
- [41] Cabrera, L.; Costa, F. P.; Primel, E. G. Estimativa de risco decontaminação das águas por pesticidas na região sul do RS. *Química Nova*. 31, 2088, 1982–1986.
- [42] Zacharia, J. T. Identity, physical and chemical properties of pesticides. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/howtoreference/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticides-analysis/identity-physical-and-chemical-properties-of-pesticides>> Acesso em: 12 de julho 2017.

- [43] 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*, 2011, 3, 51-64.
- [44] Gonzalez-Curbelo, M. A.; Socas-Rodriguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; Gonzalez-Salamo, J.; Hernandez-Borges, J.; Rodriguez-Delgado, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71, 169–185.
- [45] Borges, K.; Figueiredo, E. C.; Queiroz, M. E. C. *Preparo de Amostras Para Análise de Compostos Orgânicos*, 1st ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2015.
- [46] Rejczak, T.; Tuzimski, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction *clean-up* using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 2017, 217, 225–233.
- [49] Bonato, P. S.; Braga, G. L.; Collins, C. H. In: Collins, C. H.; Guimarães, L. F. L. J. I. *Fundamentos de Cromatografia*. São Paulo: Unicamp, 2006. p. 273-397.
- [50] Lanças, F. M.; McNair, H. M. *Cromatografia em Fase Gasosa. 1. Teoria Elementar*. Quimica Nova, 1983, 6-13.
- [51] Caballero, B.; Finglas, P. M.; Toldrá, F. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford, 2016, 311-318.
- [52] Jiang, Y.; Zhong, M.; Gou, Y.; Peng, W.; Zhou, J.; Wu, P.; Ma, Y. Development of a more specific and accurate multiple reaction monitoring method based on GC-EI/MS/MS for simultaneously monitoring and determining 34 kinds of pesticides in Qianjinzhidai pills. *Journal of Chromatography B*, 2015, 983–984, 47–54.
- [53] Fang, J.; Wu, Q.; Zhao, Y.; Zhao, H.; Xu, S.; Cai, Z. Comparison of different mass spectrometric approaches coupled to gas chromatography for the analysis of organochlorine pesticides in serum samples. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1040, 180–185.

- [54] Ribani, M.; Bottoli, C. B. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*. 2004, 27, 771-780.
- [55] Lanças, Fernando M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.
- [56] Pano-Farias, N. S.; Ceballos-Magaña, S. G.; Muniz-Valencia, R.; Gonzalez, J. Validation and assessment of matrix effect and uncertainty of a gas chromatography coupled to mass spectrometry method for pesticides in papaya and avocado samples. *Journal of food and drug analysis*, 2016, 1-9.
- [57] Lanças, Fernando M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Editora Rima. São Carlos. 2004
- [58] González, D. M; Durán, J. A; López, B. G; Reyes, J. F. G; Díaz, A. M. Matrix-effect free quantitative liquid chromatography mass spectrometry analysis in complex matrices using nanoflow LC with integrated emitter tip and high dilution factors. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1519, 110-120.
- [59] Tsuchiyama, T.; Katsuhara, M.; Nakajima, M. Compensation of matrix effects in gas chromatography–massspectrometry analysis of pesticides using a combination of matrixmatching and multiple isotopically labeled internal standards. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1524, 233-245.
- [60] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, 2009, 32, 987-995.
- [61] Bhardwaja, S. K.; Dwivedia, K.; Agarwala, D. D. A Review: GC Method Development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 6, 1-7.
- [62] Lanças, F. M. Extração em fase sólida – SPE. São Carlos, SP:RIMA, 2004.
- [63] Ribeiro, F. A.; De, L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S.C.; Da Silva, L. R.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar

figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova, 2008, 31, 164-171.

- [64] Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 2003, 987, 57–66.
- [65] Hack, M.; Nitz, S.; Parlar, H. Behavior of [^{14}C] Atrazine, [^{14}C] Terbutylazine, and Their Major Metabolites in the Brewing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45, 1375-1380.
- [66] Hengel, M. J.; Shibamoto, T. Method Development and Fate Determination of Pesticide-Treated Hops and Their Subsequent Usage in the Production of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, 3412-3418.
- [67] Navarro, S.; Pérez, G.; Navarro, G.; Mena, L.; Vela, N. Variability in the fermentation rate and colour of young lager beer as influenced by insecticide and herbicide residues. *Food Chemistry*, 2007, 105, 1495–1503.
- [68] Navarro, S.; Pérez, G.; Navarro, G.; Vela, N. Decline of pesticide residues from barley to malt. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24, 851–859.
- [69] Navarro, S.; Pérez, G.; Navarro, G.; Mena, L.; Vela, N. Influence of Fungicide Residues on the Primary Fermentation of Young Lager Beer. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, 55, 1295-1300.
- [70] Inoue, T.; Nagatomi, Y.; Suga, K.; Uyama, A.; Mochizuki, N. Fate of Pesticides during Beer Brewing. *J. Agric. Food Chem*, 2011, 59, 3857–3868.
- [71] Kong, Z.; Li, M.; Chen, J.; Gui, Y.; Bao, Y.; Fan, B.; Jian, Q.; Francis, F.; Dai, X. Processing factors of triadimefon and triadimenol in barley brewing based on response surface methodology. *Food Control*, 2016, 64, 81-86.

- [72] Khazri, A.; Sellami, B.; Dellali, M.; Corcellas, C.; Eljarrat, E.; Barceló, D.; Beyrem, H.; Mahmoudi, E. Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 129, 83–88.
- [73] You, Y.; Lydy, M. J. A solution for isomerization of pyrethroid insecticides in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1166, 181–190.
- [74] Hingmire, S.; Oulkar, D. P.; Utture, S. C.; Shabeer, T. P. A.; Banerjee K. Residue analysis of fipronil and difenoconazole in okra by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their food safety evaluation. *Food Chemistry*, 2015, 176, 145–151.
- [75] Xie, W.; Han, C.; Qian, Y.; Ding, H.; Chen, X.; Xi, J. Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 4426– 4433.
- [76] Jiang, Y.; Zhong, M.; Gou, Y.; Peng, W.; Zhou, J.; Wu, P.; Ma, Y. Development of a more specific and accurate multiple reaction monitoring method based on GC–EI/MS/MS for simultaneously monitoring and determining 34 kinds of pesticides in Qianjinzhidai pills. *Journal of Chromatography B*, 2015, 983–984, 47–54.
- [77] Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R. QuEChERS – UM método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 2009, 32, 1620-1634.
- [78] Wilkowska, A.; Biziuk, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 2011, 125, 803–812.

- [79] Nunes, G. S.; Santos, T. C. R. extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por hplc/fluorescência e confirmação por hplc/espectrometria de massas. Química Nova, 2002, 25, 214-220.
- [80] Kruve, A.; Kunnapas, A.; Herodes, k.; Leito, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2008, 1187, 58-66.

ANEXO II