



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ - REITORIA DE PÓS - GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROSEANE DOS SANTOS NASCIMENTO

**USO DE SPE E LC-MS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
PESTICIDAS DE 12 GRUPOS QUÍMICOS EM CERVEJA PILSEN
UTILIZANDO BIOCARVÃO COMO UM PROMISSOR MATERIAL
ADSORVENTE**

***USE OF SPE AND LC-MS IN THE DETERMINATION OF
PESTICIDE RESIDUES FROM 12 CHEMICAL GROUPS IN
PILSEN BEER USING BIOCHAR AS A PROMISING ADSORBENT
MATERIAL***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ - REITORIA DE PÓS - GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROSEANE DOS SANTOS NASCIMENTO

**USO DE SPE E LC-MS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
PESTICIDAS DE 12 GRUPOS QUÍMICOS EM CERVEJA PILSEN
UTILIZANDO BIOCARVÃO COMO UM PROMISSOR MATERIAL
ADSORVENTE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós –
Graduação em Química, da
Universidade Federal de
Sergipe, para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

***USE OF SPE AND LC-MS IN THE DETERMINATION OF
PESTICIDE RESIDUES FROM 12 CHEMICAL GROUPS IN
PILSEN BEER USING BIOCHAR AS A PROMISING ADSORBENT
MATERIAL***

Master dissertation presented
to the PostGraduate Program
in Chemistry of the Federal
University of Sergipe to obtain
MSc. in Chemistry.



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECACENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

N244u Nascimento, Roseane dos Santos
Uso de SPE e LC-MS na determinação de resíduos de pesticidas de 12 grupos químicos em cerveja pilsen utilizando biocarvão como um promissor material adsorvente / Roseane dos Santos Nascimento ; orientador Sandro Navickiene.- São Cristóvão, SE, 2022.
144 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Inseticidas. 2. Cereais. 3. Bebidas fermentadas. 4. Adsorção. 5. Carvão vegetal. I. Navickiene, Sandro orient. II. Título.

CDU 54

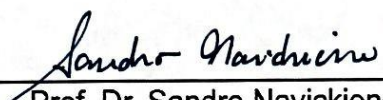


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

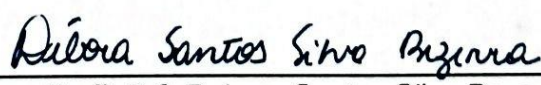
Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Roseane dos Santos Nascimento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 29/07/2022.



Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS



Prof.^a Dr.^a Eliana Midori Sussuchi
Departamento de Química - UFS



Prof.^a Dr.^a Debora Santos Silva Bezerra
ITPS - Laboratório de Química inorgânica/SE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado dando forças para seguir, concedendo sabedoria e nunca deixando desistir dos meus objetivos.

Sou grata aos meus pais Josefa e José e ao meu irmão Rogério por todo apoio e por sempre acreditarem no meu potencial. Agradeço também ao meu amor Josuel, por sempre apoiar minhas decisões e por acreditar na minha capacidade.

Agradeço infinitamente ao professor Dr. Sandro Navickiene por toda orientação, paciência, ensinamentos, disposição e acolhimento durante toda essa trajetória. Saiba o quanto foi importante para meu crescimento acadêmico e profissional.

Também agradeço ao Dr. Luis Fabrício por todo auxílio, orientação, questionamentos, paciência, momentos de descontração e por todos os ensinamentos, os quais foram um alicerce para todo meu amadurecimento durante essa jornada.

Sou extremamente grata aos meus amigos do LCP: Miliana, Pricilia, Maria Danielly, Álvaro e Pâmela. Não tenho palavras para dizer o quanto aprendi com vocês e o quanto foram essenciais durante toda minha trajetória. Posso afirmar que sem todos os ensinamentos as dificuldades seriam ainda maiores. Obrigada também por todos os momentos de descontração. E agradeço em especial a Miliana, seus esforços, paciência, dedicação e comprometimento só reforçam o quanto será uma profissional extraordinária.

Gratidão aos amigos que estão comigo desde a graduação, em especial Mirele, Harlley, Lucas e Zeca obrigada por partilharem também nessa trajetória.

Jamais poderia esquecer a extrema gratidão que tenho pela minha duplinha de mestrado: Cassia Sousa Ferreira. Obrigada por acreditar tanto em mim, por sempre se fazer presente nos meus momentos de surtos e por nunca ter deixado desistir de tudo isso. Saiba que todas as suas palavras de motivação, forças e sempre falar que ia dar tudo certo fizeram com que realmente pudesse acreditar no meu potencial. Jamais esquecerei de toda sua amizade.

Também agradeço aos meus amigos Adeilson e Bianca por sempre torcerem e vibrarem comigo. Vocês sabem o quanto são importantes na minha vida.

Gratidão aos professores do Programa de Pós – Graduação em Química por compartilharem seus conhecimentos.

À Universidade Federal de Sergipe, departamento de Química e Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes por proporcionar o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) da Universidade Federal de Sergipe por disponibilizar a infraestrutura analítica.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

RESUMO

A cerveja é a terceira bebida alcoólica mais consumida no mundo e para proporcionar um sabor mais leve, muitos cervejeiros utilizam adjuntos como o milho e o arroz para substituir ou complementar a cevada durante o processo de malteação. Por outro lado, como forma de acelerar a produção desses cereais e eliminar pragas que afetam a produção são utilizados pesticidas que podem permanecer nos cereais até a obtenção do produto final, a cerveja. Esses pesticidas podem prejudicar a saúde do consumidor. Assim, esse trabalho objetivou desenvolver um método para determinação de resíduos de pesticidas em cerveja Lager do tipo Pilsen. Para isso, foi utilizada a técnica de extração em fase sólida com o intuito de preparar a amostra e isolar os analitos. Em seguida, a técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas foi utilizada para identificar a abamectina, acetamiprido, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, carbossulfano, clorpirifós, deltametrina, diurom, esfenvalerato, epoxiconazol, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, terbufós, tiametoxam, tiofanato-metílico e simazina. Foram testados os adsorventes comerciais: sílica, florisil, PSA (Amina primária e secundária), alumina neutra e C18, além dos adsorventes alternativos: biocarvão do sabugo de milho, biocarvão de aguapé e biocarvão da semente de uva. Assim como metanol, acetonitrila, acetato de etila e mistura de metanol e diclorometano em diferentes proporções utilizados como solvente de extração. Os melhores resultados de extração para o adsorvente comercial foram utilizando as condições de 150 mg do C18, 10 mL de amostra com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 3 mL de metanol e diclorometano (90:10, v/v) e para o adsorvente alternativo 150 mg do biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 3 mL de metanol e diclorometano (60:40, v/v) como solvente de eluição. O método foi validado com o biocarvão de aguapé e mostrou linear $r^2 > 0,99$, exato, preciso (repetibilidade $\leq 19\%$ e precisão intermediária $\leq 9\%$). O limite de detecção foi entre $0,009 - 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite de quantificação entre $0,02 - 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método foi aplicado em 13 amostras de cerveja, mas não foram detectados resíduos dos pesticidas estudados nas condições estabelecidas para o método.

Palavras-chave: SPE. Inseticidas. Cereais. Bebida fermentada. C18. Adsorvente alternativo.

ABSTRACT

Beer is the third most consumed alcoholic beverage in the world and to provide a lighter flavor, many brewers use adjuncts such as corn and rice to replace or complement barley during the malting process. On the Other hand, as a way of accelerating the production of these cereals and eliminating pests that affect production, pesticides are used that can remain in the cereals until the final product, beer, is obtained. Theses pesticides can harm consumer health. Thus, this work aimed to develop a method for the determination of pesticide residues in Lager Pilsen beer. For this, the solid phase extraction technique was used in order to prepare the sample and isolate the analytes. Then the liquid chromatography/mass spectrometry technique was used to identify abamectin, acetamiprid, ametryn, atrazine, azoxystrobin, carbendazin, carbosulfan, chlorpyrifos, deltamethrin, diuron, esfenvalerate, epoxiconazole, flutriafol, haloxyfop, lufenuron, malation, propanil, terbuphos, thiamethoxam, thiophanate-methyl and simazine. Commercial adsorbents were tested: sílica, florisil, PSA (primary and secondary amine), neutral alumina and C18, in addition to alternative adsorbents: corn cob biochar, water hyacinth biochar and grape seed biochar. As well as metanol, acetonitrile, ethyl acetate and mixture of metanol and dichloromethane in diferente proportions used as extraction solvent. The best results for the commercial adsorbent were using the conditions of 150 mg of C18, 10 mL of sample with a fortification level of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 3 mL of methanol and dichloromethane (90:10) and for the alternative adsorbent 150 mg of water hyacinth biochar, 10 mL of sample with a fortification level of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 3 mL of methanol and dichloromethane (60:40) as elution solvante. The method was validated with hyacinth biochar and showed linear $r^2 > 0,99$, exact, precise (repeatability $\leq 19 \%$ and intermediate precision $\leq 9\%$). The detection limit was between $0,009 - 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the quantification limit was between $0,02 - 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The method was applied to 13 beer samples, but no residues of the studied pesticides were detected under the conditions established for the method.

Keywords: SPE. Insecticides. Cereals. Fermented beverage. C18. Alternative adsorbent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Etapas do procedimento de Extração em Fase Sólida.....	21
Figura 2-	Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo.....	49
Figura 3-	Cromatograma da solução padrão conjunta dos pesticidas preparada na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.....	56
Figura 4-	Espectros de massas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparada na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$	57
Figura 5-	Cromatogramas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparada na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SIM com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.....	60
Figura 6-	Cromatogramas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparada na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.....	61
Figura 7-	Fluxograma com a condição instrumental otimizada para separação e identificação dos pesticidas.....	62
Figura 8-	Fórmula estrutural dos respectivos adsorventes comerciais avaliados.....	64
Figura 9-	Percentuais de recuperação ($n = 3$) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500 mg dos adsorventes alumina neutra, florisil, sílica, PSA e C18 com 5 mL de metanol como solvente de eluição.....	65
Figura 10-	Avaliação da eficiência de recuperação com a etapa de secagem do cartucho contendo 500 mg de C18 ($n=3$) com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 5 mL de metanol como solvente de eluição.....	68
Figura 11-	Percentuais de recuperação ($n = 3$) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500, 300 e 150 mg de C18 com 5 mL de metanol como solvente de eluição.....	70
Figura 12-	Percentuais de recuperação ($n = 3$) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500, 300 e 150 mg de C18 e variando com 5, 7 e 10 mL de metanol como solvente de eluição.....	72
Figura 13-	Percentuais de recuperação ($n = 3$) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500, 300 e 150 mg de florisil com 5 mL de metanol como solvente de eluição.....	75

Figura 14-	Percentuais de recuperação (n = 3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 500, 300 e 150 mg de florisil e variando com 5, 7 e 10 mL de metanol como solvente de eluição.....	76
Figura 15-	Percentuais de recuperação (n = 3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg de C18 e 7 mL de acetonitrila como solvente de eluição.....	80
Figura 16-	Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg de C18 e ao utilizar 7 mL de metanol e diclorometano em diferentes proporções.....	82
Figura 17-	Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg de C18 e avaliando o volume de 7, 5 e 3 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v) como solvente de eluição.....	84
Figura 18-	Cromatogramas do extrato branco de cerveja por SPE, utilizando 150 mg de C18, 10 mL de amostra e 3 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v). Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.....	85
Figura 19-	Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150, 100 e 75 mg de biocarvão com 3 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v) como solvente de eluição.....	90
Figura 20-	Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg do biocarvão do sabugo de milho e 3 mL de diferentes solventes de eluição.....	92
Figura 21-	Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé e 3 mL de diferentes solventes de eluição.....	96
Figura 22-	Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de 1 µg mL ⁻¹ , utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé e semente de uva e 3 mL de MeOH:DCM(60:40, v/v).....	99
Figura 23-	Cromatogramas do extrato branco de cerveja por SPE, utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra e 3 mL de MeOH:DCM (60:40, v/v). Para	100

	condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.....	
Figura 24-	Fluxograma com a condição otimizada para o procedimento de extração dos analitos.....	101
Figura 25-	Cromatograma da corrente total de íons em modo positivo e espectro de massas obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de cerveja por SPE utilizando 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra e 3 mL de metanol e diclorometano (60:40)....	107
Figura 26-	Cromatogramas (A) modo SIM, (B) SCAN para a cerveja R2, (C) SIM para a solução conjunta dos pesticidas, (D) SIM para o branco dos reagentes.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Componentes encontrados na cerveja.....	14
Tabela 2-	Trabalhos reportando a utilização de diferentes técnicas de extração e instrumentais para análise de pesticidas em cerveja.....	31
Tabela 3-	Condições instrumentais de análise no LC/MS.....	39
Tabela 4-	Informações gerais sobre os pesticidas em estudo.....	42
Tabela 5-	Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo.....	44
Tabela 6-	Comparativo das áreas dos sinais do analitos em presença do formiato de amônio e em presença do ácido fórmico.....	54
Tabela 7-	Tempos de retenção, modo de ionização, relação m/z e porcentagem de metanol dos pesticidas, obtidos através da análise exploratória de soluções padrão dos pesticidas.....	59
Tabela 8-	Força eluotrópica da mistura dos solventes em diferentes proporções.....	82
Tabela 9-	Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão do sabugo de milho, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 µg L ⁻¹ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH:DCM (90:10,v/v).....	88
Tabela 10-	Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 µg L ⁻¹ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH/DCM (90:10).....	94
Tabela 11-	Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 µg L ⁻¹ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH:DCM (60:40).....	97

Tabela 12-	Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) dos pesticidas estudados.....	102
Tabela 13-	Intervalo de concentração, equações da reta para o extrato da matriz e solvente, coeficientes de determinação e razões entre coeficientes angulares para os pesticidas.....	105
Tabela 14-	Valores de Recuperação (%) e desvio padrão relativo (DPR %) avaliados para o ensaio de exatidão e precisão realizados para validação.....	109
Tabela 15-	Valores de Recuperação (%) e desvio padrão relativo (DPR %) avaliados para ensaio de precisão intradia e interdia realizados para validação.....	112
Tabela 16-	Valores de limite de detecção e quantificação obtidos pelo método da curva de calibração com concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$	114
Tabela 17-	Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas por SPE como método de preparo de amostras para cerveja.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN –	Acetonitrila
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI –	Ionização Química a Pressão Atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
BC -	Biocarvão
C18 -	Octadecilsilano
CV –	Coeficiente de Variação
DCM -	Diclorometano
DLLME –	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
EMBRAPA –	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI –	Ionização por Eletronebulização (<i>Electronebulization Ionization</i>)
GC –	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS –	Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (<i>Gas Chromatography/Mass spectrometry</i>)
HPLC –	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC –	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC –	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS –	Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas (<i>Liquid Chromatography/Mass spectrometry</i>)
LLE –	Extração Líquido- Líquido (<i>Liquid Liquid Extraction</i>)
LMR –	Limite Máximo de Resíduos
LOD –	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
Log Kow -	Coeficiente de distribuição octanol/água
LOQ –	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantification</i>)
MeOH -	Metanol
MSPD –	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
m/z –	Relação massa/carga
pKa -	Constante de dissociação ácida
PPDB –	Base de Dados de Propriedades dos Pesticidas (<i>Pesticides Properties Data Base</i>)
PSA -	Amina primária e secundária
RSD –	Desvio Padrão Relativo
SCAN -	Modo de Aquisição por Varredura de Íons

SIM –	Monitoramento do Íon selecionado (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE –	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME –	Microextração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TICC -	Cromatograma da Corrente Total de íons (<i>Total Ion Current Chromatogram</i>)
t_R –	Tempo de Retenção
FTIR -	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1. Produção da cerveja	11
2.1.1. Tipos de Cerveja	14
2.1.2. Lager	15
2.1.2.1. Pilsen	15
2.2. Cereais	15
2.3. Pesticidas.....	17
2.4. Método de preparo da amostra	19
2.4.1. Extração em fase sólida.....	19
2.4.2. Aplicação da SPE para determinação de pesticidas em cerveja	21
2.4.3. Adsorventes comerciais utilizados na SPE	22
2.4.4. Adsorventes alternativos utilizados na SPE	23
2.5. Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas	24
2.6. Validação do método	26
2.7. Revisão da Literatura	27
3. OBJETIVO	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Materiais	36
4.2. Reagentes	36
4.3. Padrões analíticos dos pesticidas	36
4.4. Equipamentos.....	36
4.5. Preparo de soluções padrão dos pesticidas	37
4.6. Obtenção das amostras	37
4.7. Pré-tratamento da amostra.....	37

4.8. Fortificação da amostra	37
4.9. Procedimento de extração por SPE com adsorvente comercial	38
4.10. Procedimento de extração por SPE com adsorvente alternativo	38
4.11. Condições instrumentais de análise	39
4.12. Limpeza da vidraria	40
4.13. Descarte de Resíduos	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Seleção de pesticidas dentre os autorizados pela ANVISA	40
5.2. Otimização das condições instrumentais de análise	53
5.3. Desenvolvimento do método por SPE	62
5.3.1. Seleção do adsorvente	62
5.3.2. Influência do processo de secagem do cartucho	67
5.4. Seleção da quantidade de C18	69
5.4.1. Seleção do volume do solvente de eluição	71
5.5. Seleção da quantidade de florisil	74
5.5.1. Seleção do volume de solvente de eluição para o florisil	75
5.6. Teste utilizando acetonitrila como solvente de eluição	79
5.7. Testes avaliando metanol e diclorometano em diferentes proporções	81
5.8. Avaliação de biocarvões de diferentes biomassas como adsorvente para SPE	86
5.8.1. Teste com o biocarvão do sabugo de milho	86
5.8.1.1. Seleção da quantidade do biocarvão de sabugo de milho	87
5.8.1.2. Testes variando o solvente de eluição	91
5.8.2. Teste com biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo	93
5.8.2.1. Teste com modificação no solvente de eluição	95
5.8.3. Avaliação do biocarvão da semente de uva	98
5.9. Validação do Método Analítico	101
5.9.1. Linearidade e sensibilidade	101
5.9.2. Seletividade (Efeito Matriz)	103

5.9.3. Exatidão e Precisão	108
5.9.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	113
5.10. Aplicação do método	117
6. CONCLUSÕES	121
7. PERSPECTIVAS DO TRABALHO	122
8. REFERÊNCIAS.....	122
9. APÊNDICE.....	134

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais apreciadas e consumidas no mundo com elevada produção nacional respondendo por quase 64% do volume total de bebidas alcoólicas produzidas e comercializadas em 2018 [1]. A introdução da cerveja no Brasil se deu pelos holandeses em 1637 e atualmente o país é o terceiro maior produtor do mundo com faturamento de 77 bilhões de reais no setor cervejeiro, correspondendo a 2% do PIB brasileiro e com uma produção de 13,3 bilhões de litros por ano [2,3].

A cerveja é formada basicamente por grãos de cereais dando origem ao malte que é obtido através da germinação desses cereais proporcionando aroma, cor e sabor. Além disso, é adicionado o lúpulo durante a formação do mosto para proporcionar o amargor à bebida [4].

Para obtenção da cerveja, é possível acrescentar adjuntos cervejeiros triturados, que são os carboidratos não maltados, advindos do milho e arroz, por serem de menor custo, além de proporcionar uma característica mais específica ao substituir e/ou complementar cereais como a cevada que são fontes de açúcares e sofrem fermentação alcoólica [5]. Esse processo de fermentação ocorre de formas distintas de acordo com o tipo de cerveja que se deseja produzir. No tipo *ale*, as leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, ficam na superfície do mosto durante a etapa fermentativa, que dura de 4 a 8 dias na temperatura em torno de 18 °C. Nas do tipo *lager* de baixa fermentação, ficam as leveduras do tipo *Saccharomyces uvarum* ou *Saccharomyces calshbergensis* nas partes inferiores do fermentador. Esse processo demora entre 8 a 9 dias em uma temperatura aproximada de 12 °C. Devido a menor temperatura e aos cereais utilizados na produção, os sabores e aromas das *lagers* costumam ser mais leves que os das *ales* [6,7].

Por outro lado, para aumentar a produção desses cereais é realizada a aplicação de pesticidas em diferentes etapas da produção para o controle de pragas, e conseqüentemente diminuir as perdas na produção [8]. Eventualmente, resíduos

destes pesticidas podem estar presentes nestes cereais e persistirem durante todo processo de produção, podendo ocasionar a contaminação da cerveja [9].

Desta forma, é importante dispor de métodos eficientes para a determinação de resíduos de pesticidas em cerveja para garantir a qualidade do produto no tocante à presença destes contaminantes, que podem causar danos à saúde dos consumidores.

Vários métodos de preparo da amostra foram desenvolvidos e são utilizados como forma de isolar o analito, e avaliar a presença de pesticidas em diferentes matrizes. Assim, desenvolver um método analítico adequado é essencial, levando em conta o tipo de amostra e o objetivo definido, além da facilidade de manuseio, rapidez, eficiência e seletividade que se deseja obter [10].

Dentre os métodos de extração disponíveis na literatura, a extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) são ideais ao trabalhar com amostras líquidas sem precisar necessariamente de um tratamento prévio complexo no preparo da amostra antes do processo de extração. A SPE emprega adsorventes em cartuchos e o mecanismo de retenção é semelhante ao que ocorre na cromatografia líquida em coluna [11-15]. O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) dentre suas inúmeras vantagens é caracterizado também por utilizar uma menor quantidade de solventes durante a etapa de extração dos analitos [16]. Além desses métodos, a microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction*, SPME) também é empregada devido a simplificação das etapas de extração e limpeza do extrato [17,18].

Além do preparo da amostra como etapa inicial para extração dos analitos, condições cromatográficas foram desenvolvidas com o intuito de separar os analitos presentes na amostra, e quando utilizadas juntamente com a espectrometria de massas, permitem a identificação e quantificação dos analitos [19]. Consequentemente existe uma necessidade de realizar o estudo da presença de pesticidas em diversas matrizes e para isso é necessário utilizar técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar esses compostos mesmo que presentes em baixas concentrações garantindo confiabilidade dos resultados obtidos.

Assim, a proposta desse trabalho foi desenvolver um método analítico utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida/espectrometria de massas para determinação dos pesticidas abamectina, acetamiprido, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, carbossulfano, clorpirifós, deltametrina, diurom, esfenvalerato, epoxiconazol, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, terbufós, tiametoxam, tiofanato-metílico e simazina em cerveja Lager do tipo Pilsen.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Produção da cerveja

Os principais ingredientes que constituem a cerveja são o malte de cevada, água, lúpulo e fermento (levedura). Parte do malte pode ser substituído por adjuntos como o arroz e milho por serem fontes de carboidratos mais baratos que o malte de cevada ou por ainda proporcionar um sabor mais leve e específico [6]. A água é o ingrediente presente em maior quantidade representando cerca de 90% de composição da cerveja. Logo, é de extrema importância que a água utilizada para produção seja isenta de turbidez, possua pH controlado de forma que seja possível regular a atividade enzimática, responsável pela quebra do amido, e possuir teor adequado de sais minerais que permite a atuação da levedura durante o processo de fermentação [7,20].

O processo de produção da cerveja ocorre em quatro etapas: brassagem, fermentação, maturação e filtração. A brassagem é a primeira fase em que as matérias-primas são misturadas à água e dissolvidas, visando a obtenção do mosto que ocorre através da moagem do malte, demais ingredientes e adição do lúpulo. A segunda etapa é a fermentação, no qual a levedura consome os carboidratos produzindo etanol e dióxido de carbono. É nessa fase que define o tipo de cerveja que será obtida. Em seguida, ocorre a maturação através do resfriamento da cerveja a 0 °C e a levedura é separada por decantação como forma de aprimorar o sabor. Por fim, a cerveja passa pelo processo de filtração para remover partículas em suspensão, seguida do

acabamento em que recebe estabilizantes e antioxidantes, com intuito de aumentar seu tempo de validade e posteriormente segue para o envasamento [7].

De acordo com o Decreto nº 9.902 de 8 de julho de 2019 da Legislação Brasileira [21]:

“a cerveja é considerada como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”.

Os adjuntos são carboidratos não maltados que complementam ou suplementam o malte da cevada [20]. A Instrução Normativa nº 54 do MAPA, descreve adjuntos cervejeiros como [22]:

Matérias-primas que substituam parcialmente o malte ou o extrato de malte na elaboração da cerveja. Seu emprego não poderá, em seu conjunto, ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo. Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os cereais, malteados ou não malteados, aptos para o consumo humano [...].

Geralmente arroz e milho acabam sendo usados por serem mais baratos que o malte de cevada e por conferirem uma propriedade desejada para uma cerveja mais leve [6]. O arroz é um dos adjuntos mais utilizados. De acordo com Sleiman *et al.*, 2010 [23], 4,3% das cervejas Pilsen comerciais brasileiras tinham esse cereal na composição. O arroz é preferido por alguns cervejeiros, pois apresenta um menor teor de óleo em comparação aos *gritz* de milho (grãos de milho moído em grânulos pequenos), além do malte apresentar todas as enzimas necessárias para obter um mosto fermentável [24,25] e, devido ao seu aroma e sabor neutro, resulta em uma cerveja leve de sabor seco e limpo [26]. Mas nem todas as variedades são adequadas para a produção cervejeira, pois alguns fatores como limpeza, temperatura de gelatinização, viscosidade, umidade, óleo e teor de proteínas influenciam na qualidade desses grãos [25].

Comumente é empregado o milho como adjunto na produção da cerveja, garantindo um sabor mais encorpado. Mas, é utilizado na forma de carboidratos não

maltados, sendo que as enzimas do malte (alfa e beta amilases) são responsáveis por hidrolisar o amido presente no milho em açúcares fermentescíveis [27].

A cevada, antes de ser utilizada na elaboração de cerveja, também passa por um processo de conversão do amido presente no seu endosperma em açúcares fermentescíveis, que são necessários para a produção da bebida. Esse processo é chamado de malteação e ocorre através das etapas de maceração, germinação e secagem. Os grãos do cereal germinam em condições ambientais controladas e a fim de produzir enzimas, que serão utilizadas na conversão das matérias-primas em mosto cervejeiro. O grão de cevada, um dos mais importantes ingredientes para a produção de cerveja, é o quinto cereal de interesse econômico em escala mundial, de uso quase exclusivo da indústria cervejeira [28], com uma quantidade anual estimada em 140 milhões de toneladas; perdendo em produção para o arroz, o milho, o trigo e a soja [29].

Além da presença desses adjuntos, a cerveja é uma mistura complexa constituída de uma variedade de sais inorgânicos, proteínas e vitaminas, que apresentam determinado valor nutricional, entretanto esses valores são dependentes de cada composição. Esses dados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Componentes encontrados na cerveja.

Nutriente	Necessidade diária	Teor por litro de cerveja
Energia (cal)	2550	150 – 1100
Proteína (g)	63	3 – 5
Vitamina C (mg)	60	≤ 30
Tiamina (mg)	1,3	0,003 – 0,08
Riboflavina (mg)	1,5	0,02 – 0,8
Niacina (mg)	19	3 -8
Vitamina B6 (mg)	2,0	0,07 – 1,7
Folato (µg)	200	40 – 600
Vitamina B12 (µg)	2	3 - 30
Biotina (µg)	30 - 100	2 - 15
Cálcio (mg)	800	40 - 140
Fósforo (mg)	800	90 - 400
Magnésio (mg)	350	60 - 200
Potássio (mg)	Não informado	330 - 1100
Sódio (mg)	Não informado	40 - 230
Ferro (mg)	10	0,1 – 0,5
Zinco (mg)	15	0,01 – 1,48
Selênio (µg)	70	0,4 – 7,2

Adaptado [30]

2.1.1. Tipos de Cerveja

A classificação das cervejas ocorre pelo teor de álcool e extrato, pelo malte ou de acordo com o tipo de fermentação. As cervejas de alta fermentação apresentam um sabor forte, ligeiramente ácido e com teor alcoólico entre 4% e 8%. Mas a maior parte das cervejas é de baixa fermentação, conhecidas como Lager e os tipos mais conhecidos são as Pilsener, Munchener, Vienna, Dortmund, Einbeck, Bock, Export e Munich. Mudanças no processo de fabricação e emprego de outros ingredientes, além dos básicos como a água, lúpulo, cevada e malte, acabam produzindo uma variedade de tipos de cerveja [31].

A Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, classifica as cervejas com base na proporção de matérias-primas e para ser denominada cerveja, deve apresentar 55% de cevada malteada e no máximo 45% de adjuntos cervejeiros sendo denominado puro malte, apenas quando o extrato primitivo for proveniente da cevada, e caso seja empregado outro cereal malteado, é preciso informar qual é o nome desse cereal [32].

2.1.2. Lager

A Lager que é originária da Europa Central no século XIV forma uma família de cervejas conhecidas como as mais leves, refrescantes e menos alcoólicas (teor alcoólico entre 4 e 5%), além de ser a mais comum no Brasil e consumida no mundo. É um tipo de cerveja caracterizada por apresentar cereais não maltados como o arroz e milho na sua composição como adjuntos do malte, e também é caracterizada por ser de baixa temperatura (5 a 10 °C) e, principalmente, baixa fermentação, já que as leveduras permanecem na parte inferior do tanque durante o processo de fermentação [7,31,33].

2.1.2.1. Pilsen

A cerveja Pilsen é originária da cidade de Pilsen, na Boêmia, República Checa, 1842, e continua sendo a mais consumida que representou 55% do mercado brasileiro no ano de 2018, e atualmente representa um consumo de 98% [3]. É considerada a mais leve, devido à utilização de milho e arroz durante seu processo de fermentação. É um tipo de cerveja que apresenta coloração dourada clara e baixo teor alcoólico (cerca de 4%) [6,31].

2.2. Cereais

Os cereais fazem parte de um grupo de alimentos mais produzidos e consumidos no mundo. Além de serem empregados em diversas finalidades alimentícias, os cereais são fermentados através da adição de leveduras que consomem os carboidratos e utilizados na produção de bebidas alcoólicas [8].

Dentre os cereais que são utilizados durante a fermentação para produção de bebidas alcoólicas como a cerveja, os cervejeiros costumam empregar arroz e o milho

durante o processo de malteação de suas cervejas, dando um sabor mais característico à sua bebida.

O arroz é o cereal que representa a terceira cultura no mundo, ocupando cerca de 164 milhões de hectares da área agrícola mundial e o Brasil apresenta 35% dessa área [34]. Seus grãos são compostos por cerca de 80% de amido, 10% de proteína, 9% de umidade e 1% de lipídio. A proteína é o segundo componente mais abundante e representa um grande papel como importante nutriente do grão, além de sua composição influenciar na qualidade do arroz [35]. Como as áreas plantadas com arroz irrigado são cultivadas intensivamente, devido dificuldade em utilizar essa área para outras atividades, esse cereal como qualquer outra cultura agrícola está sujeito a diversos fatores que influenciam no seu rendimento, e dentre eles, pode-se mencionar o ataque de pragas que causa efeitos adversos durante seu crescimento, desenvolvimento e produção [36].

O milho é o grão mais amplamente produzido e consumido correspondendo a produção 85 milhões de toneladas na safra 2020/21 e esperando um aumento da produção mundial em 5,8% para 2021/22. A China é o segundo maior produtor e consumidor de milho no planeta e Estados Unidos da América (EUA), Brasil e Argentina são os três maiores exportadores mundiais [37]. A grande produção é decorrente desse cereal ser bastante empregado na indústria alimentícia, indústria de ração animal, química e farmacêutica, devido ao seu alto teor de amido [38]. A composição química dos grãos de milho é estimado em 72% de amido, 9% proteínas, 9% fibras, 6% de lipídeos, 4% minerais. É considerado um alimento energético por ser composto predominantemente por carboidratos e lipídeos, além do amido de milho ser empregado na produção de cerveja, indústrias químicas, indústria têxtil e refinação de petróleo [39].

Dentre os cereais maltados tem-se a cevada, que é o quarto cereal mais plantado no mundo, e o terceiro da América Latina. O principal destino desse cereal no Brasil é para a produção do malte, no qual todo o grão é aproveitado nesse processo. Pois após a etapa de malteação a casca permanece no grão do malte e serve como um filtro durante a produção do mosto [40]. Apesar da grande produção no sul do país, o Brasil ainda é um grande importador deste grão para suprir a demanda da indústria cervejeira [41]. A composição da cevada varia entre a integral

e descascada, sendo que a integral apresenta elevada composição de amido e proteínas, além da presença em menores concentrações de fibras, lipídeos e minerais, enquanto que a descascada apresenta redução na concentração da proteína [42]. O fato de a cevada apresentar um alto teor de amido e armazenamento de proteínas faz com que acabe atraindo insetos para seus grãos [11].

Para reduzir a presença de pragas e ervas daninhas nessas culturas, além de aumentar a produção são adicionados pesticidas com diversas finalidades que quando presentes acima do limite máximo de resíduos permitido (LMR) podem contaminar esses cereais [43,44].

2.3. Pesticidas

Com base no projeto lei 6299/02 houve uma redução no prazo para o registro dos pesticidas, além de oficializar a substituição da nomenclatura agrotóxico para pesticidas e quando usados em florestas ou ambientes hídricos passam a ser denominados produtos de controle ambiental [43]. De acordo com o decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, pesticidas e afins são definidos como [44]:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os pesticidas são agentes de processos físicos, químicos ou biológicos que são usados em diversos ecossistemas, de modo que seja capaz de alterar a flora ou fauna com o intuito de preservá-la de seres nocivos que venha a danificá-los [44,45]. Uso indiscriminado de pesticidas, tem despertado grande preocupação com a saúde e segurança dos consumidores [45,46].

Com base na categorização de pesticidas emitidos pela ANVISA [47], esses compostos são classificados em diversas classes químicas, e apresentam ações de inseticidas, fungicidas e herbicidas, a depender da finalidade de cada substância. Dentre os grupos químicos que distinguem, os pesticidas organofosforados e carbamatos apresentam maior suscetibilidade à degradação quando comparados aos

organoclorados. Porém, muitos apresentam maior toxicidade aguda para vários seres vivos [46]. Inseticidas e herbicidas são utilizados em diferentes combinações em vários estágios do cultivo de cereais, além da possibilidade de serem utilizados durante o processo de armazenamento pós-colheita [11].

Os pesticidas desempenham funções de melhoria na eficiência agrícola, já que são utilizados com o propósito de controlar pragas e, com isso, é utilizada uma variada quantidade desses compostos nas lavouras. Mas com a finalidade de garantir uma maior segurança, são adotados regulamentos mais rígidos, quanto ao emprego e destino dos pesticidas. E alguns países como o Japão, na garantia de segurança da matéria-prima e das cervejas, as cervejarias são monitoradas através de análises para verificar possível contaminação por pesticidas na cerveja [48].

Os produtores de cevada e lúpulo protegem suas safras de pragas usando pesticidas para obter maior rendimento e qualidade. Os herbicidas também são usados para tratar o solo e controlar o crescimento de ervas daninhas. Quando não são obedecidos os métodos de aplicação, os resíduos podem passar para o mosto e, posteriormente, para a cerveja. Estudos de Miyake *et al.*, 2002 [49], sugeriram que os cervejeiros deveriam prestar atenção aos resíduos de pesticidas hidrofílicos no malte, já que a maioria dos pesticidas são hidrofílicos, com valores baixos de $K_{ow} < 4$ (K_{ow} -coeficiente de partição entre n-octanol e água) e que podem permanecer no malte após o processo de maltagem, sendo posteriormente transportados para a cerveja.

Uso de herbicidas triazínicos formam um amplo grupo de substâncias utilizadas para o controle de ervas daninhas, e sua determinação em alimentos e bebidas é importante para garantir um maior controle da presença desses compostos [50]. Não existe legislação específica para resíduos dos pesticidas na cerveja, mas é preciso ressaltar a importância de monitorar e avaliar a presença de diferentes grupos químicos desses contaminantes, que quando presentes nas culturas dos cereais como arroz, milho e cevada, podem contaminar a bebida e podem prejudicar a saúde do consumidor [47].

Ainda com base na Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019, proíbe a presença na cerveja de “resíduo de agrotóxico não autorizado ou em concentração superior ao autorizado para o vegetal empregado como matéria-prima

na produção da bebida, calculado em função da proporção de fruta ou vegetal utilizado” [32]. Mas durante as etapas de processamento da cerveja como maltagem, mosturação e ferverdura, os pesticidas oriundos dos cereais podem passar para o mosto e a depender do processo utilizado acabam permanecendo até a obtenção da cerveja [51].

No entanto, existem poucos estudos sobre a contaminação por pesticidas em amostras de cerveja, tanto no Brasil, quanto nas demais partes do mundo. O que ressalta a importância de realizar estudos capazes de monitorar possíveis contaminações nessa matriz.

2.4. Método de preparo da amostra

O processo de preparação da amostra é considerado a fase mais crítica de um método analítico, devido à diversidade de substâncias que poderão ser extraídas [52]. E isso pode acabar gerando ineficiência no processo de extração e dificultando a obtenção de dados confiáveis.

Um procedimento que emprega poucos passos durante a etapa de preparo da amostra acaba reduzindo as perdas de analitos e fontes de contaminação, o que irá diminuir possíveis erros e reduzir custos durante o procedimento [53]. É necessário um processo de preparo da amostra que favoreça a extração dos analitos, como a remoção de possíveis interferentes da própria matriz [54,55].

Algumas técnicas como extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) são utilizadas para pré-concentrar os analitos, de forma a garantir melhor eficiência no processo de extração. O uso de procedimentos adequados, é capaz de limitar interferências causadas por outros compostos oriundos da matriz, que podem interferir de forma significativa na avaliação dos resultados [11-13].

2.4.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction –SPE*) surgiu em 1976 e se tornou um dos principais métodos de preparo de amostra. Dentre as vantagens apresentadas pela SPE, as mais relevantes são o menor consumo de solvente

orgânico, a não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, poucos resíduos tóxicos e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e adsorventes para SPE. Dentre as desvantagens do método, pode-se mencionar o alto custo dos cartuchos e dos dispositivos comerciais (*manifolds*), além da dificuldade em selecionar o adsorvente adequado para aplicação desejada [56].

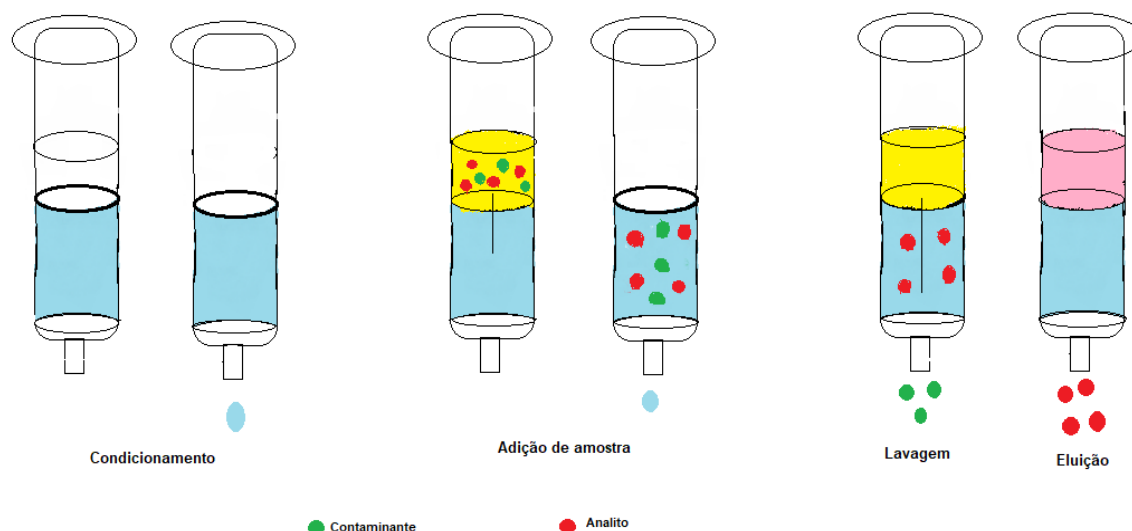
Nesse método, os analitos presentes em uma matriz líquida são adsorvidos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo adsorvente. Um solvente orgânico é utilizado para remover os interferentes e, em seguida, outro solvente é usado para eluir os analitos [57].

Os adsorventes ou fase sólida que são empregados na SPE são similares àsquelas utilizadas em cromatografia líquida em coluna e, conseqüentemente, os mecanismos de separação também são similares. Logo, os principais mecanismos são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho, que estão associados aos processos químicos e físicos que ocorrem durante a etapa de separação. Dentre as principais interações químicas existentes são caracterizadas pela ocorrência das ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas [56,59].

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido usada para extrair analitos não voláteis de amostras líquidas, mas também pode ser usada em amostras sólidas desde que sejam pré-extraídas com solventes [58]. Pode ser usada para extração e/ou concentração do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Em que no primeiro caso, os analitos ficam retidos para posterior eluição, e no segundo caso, os interferentes da matriz ficam retidos, tendo o *clean-up* da amostra e não a concentração do analito [56].

Esse procedimento de extração ocorre em quatro etapas, conforme é apresentado na Figura 1: 1) condicionamento do adsorvente; 2) introdução da amostra, ocorrendo a retenção do analito e de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 4) eluição do analito [18,59].

Figura 1- Etapas do procedimento de Extração em Fase Sólida.



Fonte: Autoria própria. Adaptado [59].

2.4.2. Aplicação da SPE para determinação de pesticidas em cerveja

HACK *et al.*, 1997 [60] empregaram a extração em fase sólida (SPE) utilizando um cartucho contendo terra diatomácea, juntamente com HPLC-DAD e cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC - MS) para avaliar algumas triazinas (atrazina, desetilatrazina, deisopropilatrazina, hidroxiatrazina, terbutilazina e deetanoterbutilazina) durante toda etapa de produção da cerveja. Os resultados mostraram persistência desses compostos durante todas etapas avaliadas, ressaltando a importância de investigar a presença desses pesticidas na cerveja.

JONES *et al.*, 1988 [61] utilizaram a SPE com HPLC – DAD para desenvolver um método capaz de identificar a presença do 1-naftol que é um produto da hidrólise do carbaril, inseticida empregado na cultura de cevada. Os resultados mostraram a persistência desse metabólito na cerveja e isso justificou o sabor adstringente observado em algumas amostras da bebida.

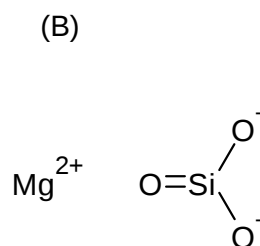
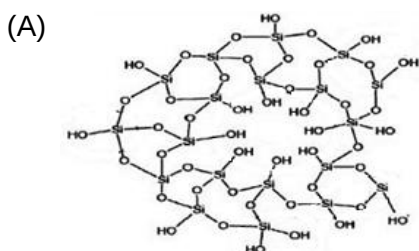
HENGEL *et al.*, 2002 [62] propuseram um método por GC-MS que utilizou SPE como procedimento de extração para a determinação de seis pesticidas (clorfenapir, quinoxifena, tebuconazol, fenarimol, piridabem e dimetomorfe) no mosto e na cerveja. A amostra foi inicialmente diluída e os resultados mostraram que o método

desenvolvido foi eficiente para determinação dos pesticidas acima citados e dentre eles, apenas o dimetomorfo foi encontrado na cerveja, mas abaixo do limite de quantificação.

NAGATOMI *et al.*, 2013 [15] desenvolveram um método utilizando LC-MS/MS para a análise de glifosato, glufosinato e três produtos metabólitos (ácido aminometilfosfônico, ácido 3-metilfosfônico propiônico e N-acetilglufosinato) em cerveja, chá de cevada e seus ingredientes (malte e milho). Tal método desenvolvido foi aplicado em 15 amostras de cerveja e em 4 delas apresentaram resíduos do glifosato.

2.4.3. Adsorventes comerciais utilizados na SPE

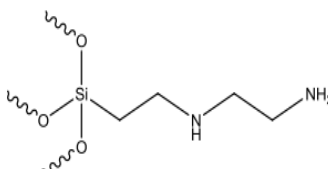
A sílica ((SiO₂)_nOH) (A) e o silicato de magnésio (conhecido como (Florisil® MgAl(SiO₄)_n) (B) apresentam características polares. A retenção dos analitos ocorre pela adsorção e são adequados para extração de analitos polares, voláteis e de baixa massa molar. Além disso, são silicatos com estruturas porosas e os grupos hidroxila em sua estrutura podem interagir com os analitos através de uma forte ligação de hidrogênio [63].



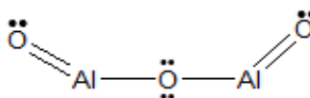
O C18 é um adsorvente que apresenta característica apolar e a retenção dos analitos ocorre por partição fornecendo uma alta capacidade para extração de analitos apolares e de baixa polaridade. Esse adsorvente é caracterizado pelo fato das interações de Van der Waals atuarem entre as moléculas do analito e do próprio C18 [63].



A amina primária e secundária (PSA) é um adsorvente trocador aniônico fraco que interage fortemente com compostos ácidos, caracterizado pela capacidade de remover mais coextrativos da matriz, devido a presença da amina primária e secundária [16]. Coextrativos na matriz estão sujeitos a competir com os pesticidas durante a etapa de adsorção interferindo na recuperação dos analitos [64].



De acordo com Lanças, 2004, a alumina neutra é um adsorvente anfótero sendo capaz de interagir tanto com compostos ácidos quanto compostos básicos, trabalhando dessa forma com pesticidas de diferentes classes químicas e colaborando para um processo adequado de extração de resíduos de pesticidas em variadas matrizes [59].



2.4.4. Adsorventes alternativos utilizados na SPE

Nos últimos anos o uso de adsorventes alternativos vem sendo desenvolvido devido aos custos elevados apresentados pelos adsorventes comerciais. Polímeros de coordenação, nanotubos de carbono e biocarvão são utilizados com frequência nos métodos de preparo de amostra e extração de contaminantes em diferentes matrizes [65].

O biocarvão (BC) é um material atrativo para ser utilizado na SPE por ser obtido de diferentes biomassas e por apresentar elevada área superficial, além de ser rico em carbono e grupos funcionais já que é produzido com presença parcial ou ausência de oxigênio e isso favorece o processo de adsorção. Além disso, durante a sua produção o aumento da temperatura de pirólise pode aumentar a porosidade do biocarvão facilitando a adsorção de produtos químicos como pesticidas [66,67]. Esse material também apresenta a capacidade de sofrer interações de Van der Waals,

ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo, dentre outras interações que favorecem o processo de adsorção para diversos contaminantes [68].

Consequentemente, a capacidade de adsorção do biocarvão depende das interações eletrostáticas entre a superfície do BC e a entidade química dos pesticidas, nos quais o comportamento isotérmico de adsorção de cada pesticida, estrutura e polaridade são parâmetros diretamente relacionados ao desempenho desse adsorvente [69].

Srikhaw *et al.*, 2022 [69], acima citado, desenvolveram um trabalho no qual utilizaram biocarvão derivado de cavacos de madeira de eucalipto para remoção dos pesticidas imidacloprido, acetamiprido e metomil da água. As capacidades de adsorção foram 14,75, 4,87 e 32,42 mg g⁻¹, respectivamente e as interações de maior ocorrência entre a superfície do BC e os pesticidas foram as ligações de hidrogênio e interações π - π , nos quais indicaram uma melhor capacidade de adsorção para o BC dessa biomassa e para esses pesticidas avaliados.

Para o desenvolvimento desse trabalho foram avaliados o biocarvão de aguapé produzido pelos integrantes do Laboratório de Petróleo e Energia da Biomassa (PEB) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sobre coordenação do Prof. Dr. Alberto Wisniewski Júnior e o biocarvão de sabugo de milho e da semente de uva produzido pelos integrantes do Laboratório de Análises Cromatográficas (LAC) também da UFS sobre coordenação da Professora Dra. Lisiane dos Santos Freitas.

2.5. Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas

Escolher uma técnica adequada para análise de pesticidas é importante, já que se está trabalhando com compostos de propriedades físicas e químicas bastante diversas. O ideal é optar por técnicas que possam gerar maior seletividade durante a análise e ao mesmo tempo que seja capaz de analisar um variado número de compostos em um curto período de tempo.

Utilizar técnicas cromatográficas juntamente com a espectrometria de massas (MS) permite a obtenção de resultados seletivos, satisfatórios e com exatidão já que a cromatografia líquida (LC) e/ou cromatografia gasosa (GC) é capaz de garantir a separação dos analitos em um determinado tempo de análise, enquanto que a espectrometria de massas permite a identificação dos compostos pela relação massa/carga (m/z). O conjunto dessas duas técnicas através da seleção dos

parâmetros adequados é capaz de apresentar resultados satisfatórios com o tipo de análise que deseja obter.

A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida têm sido técnicas bastante selecionadas para análise de resíduos de pesticidas em bebidas alcoólicas [70,71]. O uso de LC com a espectrometria de massa (LC-MS) aumentou a sensibilidade e rapidamente se tornou aceita na análise de resíduos de pesticidas.

A técnica LC-MS é muito atraente para a análise de pesticidas, devido aos recursos como separação altamente eficiente e, principalmente, identificação e quantificação de analitos de diferentes polaridades, permitindo detectar uma ampla quantidade de pesticidas já que é possível empregar a LC para determinar resíduos em matrizes complexas [72,73].

A seleção da fonte de ionização adequada para a análise de pesticidas depende dos tipos de analitos investigados [74]. O principal modo de ionização utilizado na análise de pesticidas por LC-MS é baseado em processo de ionização a pressão atmosférica (API), que inclui a ionização por electrospray (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI), que se complementam em relação à polaridade, massa molar dos analitos e condições cromatográficas [75,76]. A maior eficiência da ESI depende da composição do eluente na qual poderá melhorar o sinal analítico e apresentar um melhor desempenho, por exemplo, na análise de herbicidas catiônicos e aniônicos [74]. A APCI é muito sensível para a classe de pesticidas neutros e básicos como, por exemplo, triazinas, carbamatos e fenilureias. Mas a APCI é uma fonte mais energética que a ESI já que o efluente é nebulizado por um fluxo de nitrogênio e evaporado em temperatura elevada devido a descarga corona [74,76].

A ESI é uma técnica de ionização suave em que o *spray* é formado carregando eletricamente o líquido com uma tensão alta. O líquido carregado na ponta do capilar torna-se instável à medida que é forçado a reter mais carga até atingir um ponto crítico no qual não pode mais reter carga elétrica e as gotículas explodem por repulsão coulombiana em moléculas carregadas. O capilar é mantido em alta tensão na pressão atmosférica para gerar o spray e em contrapartida, o funcionamento da ESI pode ser afetado por grandes gotas com alta tensão superficial, baixa volatilidade, forte solvatação iônica e alta condutividade [74,75].

Na APCI, um spray é gerado pelo aquecimento de um aerossol e os íons são formados por uma descarga corona, gerando um plasma que ioniza as espécies e essa fonte é mais adequada para pesticidas não iônicos de massa molecular moderada. Os íons provenientes dessa fonte correspondem a moléculas protonadas $[M + H]^+$ e moléculas desprotonadas $[M - H]^-$. Além disso, a interface APCI pode produzir degradação térmica de compostos termolábeis [74,76].

2.6. Validação do método

Um método analítico deve ser validado para que apresente resultados confiáveis e, posteriormente, possa ser aplicado em amostras reais. Para que tal método seja considerado como adequado deve apresentar resultados satisfatórios para diferentes parâmetros. Dentre esses parâmetros podem ser mencionados a linearidade, seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez dentro do que é permitido para análise de pesticidas, exatidão (em termos de recuperação) e precisão (em termos de repetibilidade) [77].

Embora o limite de detecção (LOD) possa determinar a concentração mais baixa a ser detectada através do método proposto com distinção entre ruído e sinal utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas dos analitos, deve ser levado em conta a possibilidade em obter resultados falsos positivos e falsos negativos [78-81]. Mas na maioria das vezes esse parâmetro acaba sendo dito como válido ao apresentar resultados com baixo LOD, não levando em conta que o analito pode estar presente em uma concentração baixa de modo que não seja possível detectar [78].

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas [79,81,83]. A determinação do LOQ também está relacionada à precisão, veracidade ou recuperação do método em variados níveis de concentração, apresentando uma menor incerteza relativa tornando mais confiável que o LOD [78]. E os mesmos critérios empregados no LOD como método visual com a distinção entre relação sinal-ruído e inclinação da curva analítica em níveis mais próximos, pode ser aplicado [81].

A linearidade de um método está relacionada à capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra [67,69]. Enquanto que a seletividade está relacionada à capacidade de um método em medir a quantidade de analito que se afirma ser medido, ou seja, identificar ou quantificar o analito, além de ser capaz de garantir a presença de forma insignificante de interferentes no sinal dos analitos obtidos [78,79,81].

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado e deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro [79,81].

A robustez busca enfatizar que o método analítico não apresente alterações em presença de variações, como em relação à constituição da fase móvel, alteração de temperatura da coluna e tempo de uso, dentre outras alterações, ou seja, mede a sensibilidade que o método apresenta diante de pequenas variações [78,79,81].

2.7. Revisão da Literatura

Estudos voltados para a determinação de pesticidas em cerveja despertou interesse pela comunidade científica visto que as matérias-primas utilizadas na sua elaboração são tratadas com esses compostos de forma a aumentar a produção e reduzir perdas devido ao ataque de pragas [11,23,33,35]. Diante disso, esses resíduos que apresentam elevada toxicidade podem não ser eliminados durante a etapa de fermentação, permanecendo no mosto e continuando até o produto final [9]. Revisões têm contemplado esses estudos de forma a desenvolver métodos capazes de identificar a presença desses resíduos na cerveja e, para obtenção de um embasamento científico capaz de auxiliar no desenvolvimento desse trabalho, foram realizadas buscas na literatura por estudos que utilizaram diferentes técnicas de extração e análise instrumental e que foram adequadas para determinação de resíduos de pesticidas nessa matriz.

NAVARRO *et al.*, 2005 [9] desenvolveram um procedimento de extração líquido-líquido (LLE) com cromatografia gasosa e detector por captura de elétrons

para a análise dos fungicidas miclobutanil, propiconazol e nuarimol no mosto da cerveja e no seu produto final, em que o limite de detecção (LOD) do método foi 2, 2,5 e 0,25 pg e o limite de quantificação (LOQ) de 2, 2,5 e 0,25 ng/g com recuperações entre 92,3 – 103,2% e foi possível observar uma diminuição na concentração dos resíduos na cerveja. Enquanto que estudos de OMOTE *et al.*, 2006 [84] empregaram LLE para análise simultânea de 277 pesticidas em malte e cerveja através do LC-MS/MS, no qual foi constatado a presença de 12 pesticidas, dentre eles azoxistrobina, clorpirifós e malationa dentro do limite máximo que é estabelecido para a cultura de cevada.

VELA *et al.*, 2007 [85] desenvolveram um método utilizando sonicação com solvente e cromatografia gasosa para determinação de 9 pesticidas de variados grupos químicos (dinitroanilinas, organofosforados, triazóis e pirimidinas) tendo, dentre eles, a malationa. Os resultados mostraram dentre os pesticidas avaliados a presença do fenarimol na cerveja, enquanto que os demais pesticidas apresentaram próximos ao limite de detecção.

BOLAÑOS *et al.*, 2008 [10] desenvolveram um método alternativo para análise de 50 pesticidas em amostras de vinho e cerveja, utilizando a microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) juntamente com UHPLC-MS/MS. Os resultados mostraram ausência dos pesticidas avaliados na cerveja e presença de carbaril, triadimenol, espiroxamina, epoxiconazol, triflumizol e fenazaquina em algumas amostras de vinho que foram analisadas.

INOUE *et al.*, 2011[34] utilizaram o QuEChERS com uma etapa de limpeza utilizando d-SPE com PSA e C18, seguida de análises por cromatografia líquida/espectrometria de massas com ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS) para análise de 324 pesticidas durante a produção da cerveja (dentre eles o acetamiprido, atrazina, azoxistrobina, clorpirifós, deltametrina, diurom, epoxiconazol, flutriafol, simazina) e os resultados indicaram uma redução de alguns desses resíduos após a etapa de fermentação sendo que o tiametoxam, imidacloprido, dentre outros permaneceram na cerveja.

Estudos de KONG *et al.*, 2016 [86,87] utilizaram o QuEChERS para determinação de triadimefon, malationa, diclorvos e seus metabólitos (triadimenol e

malaoxon) em produtos de cevada e durante o processo de produção da cerveja. A técnica analítica empregada foi LC-ESI-MS e LC-ESI-MS/MS no modo positivo e o LQ foi $1 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, enquanto que o LD foi $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ nos quais os resultados mostraram que após a etapa de processamento os resíduos permaneceram até o produto final, mas em níveis menores de concentração. Enquanto que estudos de ZHOU et al., 2016 [88] precisaram utilizar uma etapa adicional de limpeza ao método com C18 e PSA (aminas primárias e secundárias) para extração de carbendazim e os resultados obtidos constatarem a presença dos resíduos desse pesticida na cerveja. O limite de quantificação para o método desenvolvido foi $0,01 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

WUETHRICH et al., 2016 [89] utilizaram como método de preparo da amostra para extração dos analitos a concentração e separação por eletroforese simultânea (SECI *simultaneous electrophoresis separation*) como um campo elétrico conduzido (CE), onde o concentrado é diretamente transferido para análise sem precisar de etapas como secagem e reconstituição, seguida por LC-MS/MS para verificar a presença de herbicidas aniônicos (glufosinato, glifosato e AMPA) e herbicidas catiônicos de amônio quaternário (paraquat e diquat) em amostras de cerveja.

BEDASSA et al., 2017 [90] desenvolveram um método de extração líquido-líquido assistida por salting-out (SALLE) juntamente com a cromatografia líquida (LC–UV/Vis) para verificar a presença de atrazina, ametrina, terbutrina, carbaril e clorotalonil em cerveja e vinho. O limite de detecção foi $1,3 - 3,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação $4,5 - 12,8 \mu\text{g L}^{-1}$, mas nenhum desses analitos foram detectados nas amostras analisadas.

DUSEK et al., 2018 [91] empregaram o método QuEChERS com d-SPE utilizando uma mistura de PSA, C18 e o adsorvente zircônio para simular 58 pesticidas no lúpulo que poderiam ser transferidos para cerveja. Os resultados demonstraram que 33 dos 58 pesticidas foram transferidos em um menor nível de concentração e dentre os pesticidas avaliados a azoxistrobina, imidacloprido e tiametoxam foram transferidos em maiores taxas do lúpulo para a cerveja. Enquanto que estudos de SILVA et al., 2019 [92] desgaseificaram inicialmente a cerveja no ultrassom e, em seguida, empregaram o QuEChERS como método de extração utilizando uma otimização do processo de limpeza da d-SPE com sulfato de sódio, C18 e silicato de magnésio com GC-MS/MS para avaliar a presença dos resíduos de acetamiprido,

terbufós, alacloro, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbofurano, carbossulfano, cipermetrina, deltametrina, difenoconazol, esfenvalerato, flutriafol, tiametoxam e parationa metílica oriundos do malte em nove marcas de cervejas Pilsen brasileiras e não foram encontrados resíduos desses pesticidas nas amostras analisadas.

LOPEZ *et al.*, 2020 [93] empregaram um procedimento simples e rápido para a análise de 14 pesticidas altamente polares, nos quais também foram avaliados o glifosato, glufosinato, etefon e fosetil em leite, cerveja e vinho. Não foi necessário empregar nenhum procedimento de limpeza, apenas uma diluição inicial da amostra com acetonitrila, agitação e uma etapa de centrifugação. Em seguida, uma alíquota foi analisada no LC-MS/MS.

PIRES *et al.*, 2021[94] otimizaram a abordagem D&S (*Dilute and shoot*) para extração de 32 pesticidas, dentre eles azoxistrobina, deltametrina, clorpirifós, imidacloprido, lufenuron e 7 micotoxinas em malte e cerveja, seguido por LC-MS/MS. Após validação, o método foi aplicado em 40 amostras reais sendo que 36 apresentaram algum tipo de contaminação, tendo a presença dos resíduos com concentrações elevadas nas amostras de malte e alguns dos pesticidas como azoxistrobina próximo ao limite de quantificação foi identificado nas cervejas.

Dentre os trabalhos avaliados, Jones *et al.*, 1988 [61] utilizaram a SPE e a cromatografia líquida com detector UV para determinação de um inseticida (carbaril) na cerveja, mas precisou realizar algumas etapas prévias de tratamento da amostra com o intuito de obter melhores resultados. Logo, existe alguns trabalhos para essa matriz com técnicas variadas, mas até esse momento não foi encontrado trabalho utilizando a SPE com o biocarvão como adsorvente alternativo para determinação de pesticidas de diferentes grupos químicos para essa matriz. A Tabela 2 apresenta dados adicionais para melhor compreensão dos métodos analíticos que estão descritos na literatura para determinação de pesticidas em cerveja.

Tabela 2-Trabalhos reportando a utilização de diferentes técnicas de extração e instrumentais para análise de pesticidas em cerveja.

Referência	Matriz	Analitos	Técnica de Extração	Adsorvente	Quantidade de matriz	Solvente de Condicionamento	Solvente de Eluição	Técnica Instrumental
HACK <i>et al.</i> , 1997 [60]	Cerveja	6 pesticidas	SPE	Terra diatomácea	5 mL	CH ₃ OH; H ₂ O	Acetato de etila/ 2-propanol (80/20)	HPLC-DAD GC-MS
JONES <i>et al.</i> , 1988 [61]	Cerveja malte	1 pesticida	SPE	cicloexil	50 mL	CH ₃ OH; H ₂ O	CH ₃ OH	HPLC-DAD
HENGEL <i>et al.</i> , 2002 [62]	Cerveja, mosto	7 pesticidas	SPE	0,5 g de HLB	100 mL	Acetato de etila; CH ₃ OH	Acetato de etila: hexano	GC-MS
NAGATOMI <i>et al.</i> , 2013 [15]	Cerveja	2 herbicidas, 3 metabólitos	SPE	troca aniônica	1 mL	CH ₃ OH; H ₂ O	Ácido clorídrico/ CH ₃ OH	LC-MS/MS
NAVARRO <i>et al.</i> , 2005 [9]	Mosto cerveja	3 fungicidas	LLE- Ultrassom	-	20 mL	-	Iso-octano; tolueno	GC-MS
OMOTE <i>et al.</i> , 2006 [84]	Malte, cerveja	277 pesticidas	LLE	-	10 g	-	C ₄ H ₈ O ₂	LC-MS/MS
VELA <i>et al.</i> , 2007 [85]	Cerveja, malte	9 pesticidas	Sonicação no ultrassom	-	20 mL, 5 g	-	C ₆ H ₁₄ / CH ₂ Cl ₂	GC-ECD

Tabela 2: Continuação

Referência	Matriz	Analitos	Técnica de Extração	Adsorvente	Quantidade De matriz	Solvente de Condicionamento	Solvente de Eluição	Técnica Instrumental
BOLAÑOS <i>et al.</i> , 2008 [10]	Vinho e cerveja	50 pesticidas	HF-LPME	-	15 mL	1- octanol	CH ₃ OH	UHPLC-MS/MS
INOUE <i>et al.</i> , 2002 [34]	Cerveja, malte	324 pesticidas	QuEChERS	PSA e C18	10 mL	-	-	LC-MS
KONG <i>et al.</i> , 2016 [86]	Cerveja, cevada	2 triazóis	QuEChERS	0,05 g de PSA	10 mL 5g	-	-	LC-MS
KONG <i>et al.</i> , 2016 [87]	Cerveja, cevada	2 organofosforados, 2 triazóis	QuEChERS	0,05g de PSA	10 mL 5 g	-	-	LC-MS
ZHOU <i>et al.</i> , 2016 [88]	Cevada, Cerveja	1 pesticida	QuEChERS	C18 e PSA	-	-	-	LC-MS/MS

Tabela 2: Continuação

Referência	Matriz	Analitos	Técnica de Extração	Adsorvente	Quantidade de matriz	Solvente de Condicionamento	Solvente de Eluição	Técnica Instrumental
WUETHRICH <i>et al.</i> , 2016 [89]	Cerveja	5 herbicidas	SEC	-	20 mL	-	-	LC-MS/MS
BEDASSA <i>et al.</i> , 2017 [90]	Vinho, cerveja	5 pesticidas	SALLE	C18	2,5 mL	CH ₃ CN; H ₂ O	CH ₃ CN	HPLC-DAD
DUSEK <i>et al.</i> , 2018 [91]	Lúpulo Cerveja	58 pesticidas	QuEChERS	-	1 g 10 mL	-	-	LC-HR-MS/MS
SILVA <i>et al.</i> , 2019 [92]	Cerveja	15 pesticidas	QuEChERS	Florisil/ PSA	10 mL	-	-	GC-MS/MS
LOPES <i>et al.</i> , 2020 [93]	Leite, cerveja e vinho	14 pesticidas	-	-	2 g	-	CH ₃ CN:H ₂ O (6:4)	LC-MS/MS
PIRES <i>et al.</i> , 2021 [94]	Malte, cerveja e grãos	32 pesticidas 7 micotoxinas	D&S	-	5 g 2,5 mL	-	-	LC-MS/MS

SPE= extração em fase sólida; HF-LPME= Microextração em fase líquida de fibra oca; LC-HRMS= cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução; GC-MS/MS= cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem; GC-ECD= Cromatografia gasosa com captura de elétrons; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem; UPLC= cromatografia líquida de ultra eficiência; PSA= amina primária e secundária; CH₃OH= metanol; CH₃CN= acetonitrila; H₂O= água; CH₂Cl₂=diclorometano; HCOOH= ácido fórmico; C₄H₈O₂= acetato de etila; SEC= Separação eletroforética simultânea; SALLE= Extração líquido-líquido assistida por salting-out; D&S= *Dilute and shoot*.

Com base nos trabalhos apresentados pela literatura, existem estudos utilizando LC-MS ou LC-MS/MS juntamente com algumas técnicas de extração para avaliação da presença de pesticidas em cerveja. A fonte de ionização mais empregada é a ESI devido capacidade de trabalhar com compostos de média a alta massa molecular e permitir melhor a ionização dos analitos [10,34,86,87,88,93,95]. O LC-MS/MS também foi utilizado na maioria dos trabalhos devido à capacidade de obter mais informações e tornar a confirmação da identidade da substância de forma mais segura, já que se está trabalhando com matrizes complexas [7,84,85,88,91,93,95].

O sistema LC-MS é uma técnica bastante presente já que permite análise de uma grande quantidade de substâncias com diversas características de polaridade e massa molecular [34,86,87]. Portanto, essa técnica foi selecionada como método instrumental de análise para desenvolvimento do método analítico proposto nesse trabalho.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método utilizando o biocarvão como adsorvente alternativo para determinação de resíduos de pesticidas pertencentes a doze grupos químicos em cerveja do tipo Pilsen.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar os pesticidas que são comumente utilizados nas culturas de arroz, milho e cevada;
- Obter as condições instrumentais de análise para determinação dos pesticidas selecionados por cromatografia líquida/espectrometria de massas;
- Desenvolver o método de extração por extração em fase sólida;
- Propor adsorvente alternativo para extração dos pesticidas;
- Validar o método analítico;
- Aplicar o método validado em amostras de cerveja do tipo Pilsen.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Béquers, balão volumétrico, proveta, vial, balão de fundo redondo, seringa de vidro, tubos de polipropileno, micropipetas de volumes variáveis, pipetas volumétricas, bastão de vidro, espátula, pinça, cartuchos de fase C18 para SPE (Silicycle 500 mg/6mL).

4.2. Reagentes

Acetato de Etila grau LC (Merck), Água ultrapurificada Milli-Q (Millipore Corporation), Formiato de amônio (Sigma – Aldrich, pureza 99,0 %), Metanol grau HPLC (Merck), Metanol grau LC-MS (FlukaAnalytical, Sigma-Aldrich), Acetonitrila grau HPLC (J.P. Barker), Diclorometano (Qhemis, pureza 99,8%, Brasil), Florisil (100-200 Mesh; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), Alumina neutra (Vetec, RJ, Brasil), C18 (Agilent Technologies, EUA), Sílica gel (70-230 Mesh; Sílica Flash G60, Silicycle, Quebec, Canadá), PSA (Sigma-Aldrich; Supelclean).

4.3. Padrões analíticos dos pesticidas

Foram obtidos padrões certificados dos pesticidas: Abamectina (Sigma Aldrich), Atrazina (Fluka Analytical) Ametrina (Riedel-de Haen), Acetamiprido (Riedel-de Haen), Azoxistrobina (Riedel-de Haen), Carbendazim (Fluka Analytical), Carbosulfano (Fluka Analytical), Clorpirifós (Fluka Analytical), Deltametrina (Fluka Analytical), Diurom (Fluka Analytical), Epoxiconazol (Fluka Analytical), Esfenvalerato (Fluka Analytical), Flutriafol (Accustandard), Haloxifope (Fluka Analytical), Imidacloprido (Riedel-de Haen), Lufenuron (Fluka Analytical), Malationa (Accus Standard), Propanil (Riedel-de Haen), Simazina (Fluka Analytical), Terbufós (Fluka Analytical), Tiametoxam (Accustandard), Tiofanato-metílico (Fluka Analytical). Todos os padrões certificados apresentam pureza superior a 98%.

4.4. Equipamentos

Balança analítica AL 204 (Mettler Toledo, Ohio, EUA), Evaporador rotatório 802D (Fisatom, São Paulo, Brasil), Sistema para SPE vácuo manifold (Varian, WalnutCreek, CA, EUA), Agitador mecânico (IKA), lavadora ultrassônica (Unique USC-1400), cromatógrafo líquido Nexera UC (Shimadzu, Quioto, Japão) composto por: Módulo de comunicação CBM-

20A, sistema binário de bombas LC-10ADXR, Bomba para CO₂ LC-30ADSF, Desgaseificador DGU-205R, Auto injetor SIL-30AC, Controlador de Pressão SFC-30, Forno de colunas CTO-20AC, Detector PDA SPD-M20A, Espectrômetro de massas MS-2010, Coluna Analítica C18 (150 x 2,1 mm x 2,5 µm, Shim-Pack, Califórnia, EUA) com coluna de guarda contendo a mesma fase estacionária da coluna e software de gerenciamento LabSolution.

4.5. Preparo de soluções padrão dos pesticidas

Foram medidas as massas dos padrões sólidos a fim de se obter soluções individuais dos pesticidas com uma concentração de 1000 µg mL⁻¹ em 10 mL de metanol grau HPLC. A partir destas soluções foi obtida uma solução intermediária conjunta da mistura dos pesticidas com uma concentração de 10 µg mL⁻¹ e, em seguida, diluída para 1 µg mL⁻¹. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro com tampa com rosca e mantidas sob refrigeração.

4.6. Obtenção das amostras

As amostras de cerveja foram adquiridas e armazenadas no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), da Universidade Federal de Sergipe, sob refrigeração a -2 °C.

4.7. Pré-tratamento da amostra

Uma quantidade de 40 mL da cerveja foi submetida a um processo de desgaseificação com auxílio de ultrassom durante 6 minutos a fim de eliminar CO₂ contido na amostra.

4.8. Fortificação da amostra

A fortificação das amostras de cervejas comerciais foi efetuada em uma proveta antes do processo de desgaseificação. Para o SPE, 40 mL de cerveja foram fortificadas com 400 µL da solução dos pesticidas de concentração 10 µg mL⁻¹, obtendo um nível de fortificação 1 µg mL⁻¹ após concentração dos analitos. A extração foi realizada em triplicata.

4.9. Procedimento de extração por SPE com adsorvente comercial

No sistema para SPE, com fluxo de aproximadamente $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o cartucho contendo 150 mg de adsorvente C18 foi condicionado por meio da percolação de 2 mL de metanol/diclorometano (90:10) seguido de 2 mL de água ultrapurificada. Em seguida, foi realizada a percolação de 10 mL de cerveja. O cartucho foi seco por 5 minutos e, em seguida, os analitos foram eluídos com 3 mL de uma mistura metanol/diclorometano (90:10), coletando o eluato em um balão de fundo redondo, que foi concentrado em um evaporador rotatório (50 °C e 120 rpm) até quase a secura. O volume do eluato foi ajustado através da reconstituição com adição de metanol em um balão volumétrico de 1 mL e filtrado com uma membrana de nylon 0,22 μm para análise em LC-MS.

4.10. Procedimento de extração por SPE com adsorvente alternativo

No sistema para SPE, com fluxo de aproximadamente $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o cartucho contendo 150 mg do adsorvente biocarvão de aguapé foi condicionado por meio da percolação de 2 mL de metanol/diclorometano (60:40) seguido de 2 mL de água ultrapurificada. Em seguida, foi realizada a percolação de 10 mL de cerveja. O cartucho foi seco por 5 minutos e, em seguida, os analitos foram eluídos com 3 mL de uma mistura metanol/diclorometano (60:40), coletando o eluato em um balão de fundo redondo, que foi concentrado em um evaporador rotatório (50 °C e 120 rpm) até quase a secura. O volume do eluato foi ajustado através da reconstituição com adição de metanol em um balão volumétrico de 1 mL e filtrado com uma membrana de nylon 0,22 μm para análise em LC-MS.

4.11. Condições instrumentais de análise

A Tabela 3 apresenta as condições instrumentais de análise para o cromatógrafo líquido/espectrômetro de massas.

Tabela 3- Condições instrumentais de análise no LC/MS.

Condições do Cromatógrafo Líquido
Fase estacionária analítica: Shim-Pack UC-X RP C18 2,5 μm (150 x 2,1 mm)
Fluxo da fase móvel: 0,5 mL min ⁻¹
Modo de eluição: Eluição Gradiente, 30%B (0,00-0,01 min), 100%B (0,01-10 min), 100%B (10-15 min), 30%B (15-18 min), tempo de controle (18-20 min)
Fase móvel: A: Água (5 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₂); B: Metanol (5 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₂)
Temperatura do Forno de colunas: 40 °C
Volume de injeção: 5 μL
Condições do Espectrômetro de Massas MS-2020
Interface: Electrospray (ESI)
Modo MS: SIM, Modos positivo e negativo
Temperatura da interface: 350 °C
Temperatura da DL: 250 °C
Fluxo do gás de nebulização: N ₂ , 1,5 L min ⁻¹
Fluxo do gás de secagem: N ₂ , 10 L min ⁻¹
Voltagem da fonte de ionização: 3,5 kV

4.12. Limpeza da vidraria

A lavagem da vidraria seguiu procedimento padrão utilizado no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), como segue:

- Enxágue com água corrente, por três vezes;
- Lavagem com água destilada;
- Lavagem com água ultrapura;
- Enxágue com acetato de etila;
- Secagem em estufa a 100°C (exceto as vidrarias volumétricas).

4.13. Descarte de Resíduos

Os solventes e resíduos sólidos utilizados nas análises foram armazenados em recipientes de descarte devidamente identificados para posterior coleta realizada por empresa responsável.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de pesticidas dentre os autorizados pela ANVISA

Os ingredientes ativos permitidos para uso agrícola no país estão listados no painel de monografias autorizadas pela ANVISA [33]. Ao realizar uma pesquisa dos pesticidas utilizados nas culturas de arroz, milho e cevada, pode-se encontrar uma lista com 167 ingredientes ativos para essas culturas. Dessa relação foram escolhidos 22 pesticidas com base na disponibilidade desses padrões no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP).

Os pesticidas utilizados nessas culturas podem estar presentes nos cereais que são utilizados como adjuntos cervejeiros e, conseqüentemente podem permanecer durante o processo de produção da bebida, persistindo até o produto final que é a cerveja. A possibilidade de contaminação da cerveja torna necessária a avaliação da presença desses pesticidas. Logo, foram selecionados os pesticidas abamectina, acetamiprido, ametrina,

azoxistrobina, atrazina, carbendazim, carbossulfano, clorpirifós, deltametrina, diurom, epoxiconazol, esfenvalerato, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, simazina, terbufós, tiametoxam e tiofanato-metílico.

Após a seleção dos pesticidas é importante conhecer as características dos analitos em estudo. Para isso foram obtidas informações gerais e suas propriedades físico-químicas, as quais estão apresentadas nas Tabelas 4, 5 e Figura 2.

Tabela 4- Informações gerais sobre os pesticidas em estudo. Fonte: ANVISA; IUPAC PPDB [33,96].

Pesticida	Grupo Químico	Fórmula Molecular	Modo de Ação	Utilização na Cultura Agrícola	Classe Toxicológica	LMR ₁ (mg kg ⁻¹)
Abamectina	Avermectinas	C ₉₅ H ₁₄₂ O ₂₈	Inseticida	Milho	III	0,005
Acetamiprido	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	Inseticida	Arroz; Milho; Cevada	III	0,05 0,3* 1,00**
Ametrina	Triazina	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	Herbicida	Milho	III	0,04
Azoxistrobina	Estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Fungicida	Cereais	III	0,01 0,7* 0,6**
Atrazina	Triazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	Herbicida	Milho;	III	0,250
Carbendazim	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	Fungicida	Milho; Arroz; Cevada	III	0,05 0,05* 0,200**
Carbossulfano	Carbamato	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	Inseticida	Milho; Arroz	III	0,02
Clorpirifós	Organofosfato	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Inseticida	Milho; Cevada; Trigo	III	0,100 0,100**
Deltametrina	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	Inseticida	Milho; Arroz; Cevada	III	1,00 1,00*
Diuron	Felilamida	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	Herbicida	Cereais;	III	0,05
Epoxiconazol	Triazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	Fungicida	Arroz; Milho;	III	0,05 0,3* 1,00*

Tabela 4: Continuação

Esfenvalerato	Piretróide	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	Inseticida	Arroz; Milho; Trigo	III	1,00 1,00*
Flutriafol	Triazol	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	Fungicida	Arroz; Milho	III	0,05 0,1*
Haloxifope	Ariloxifenoxipropionato	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	Herbicida	Milho	III	0,1* 0,01
Imidacloprido	Neonicotinóide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	Inseticida	Arroz; Milho; Cevada	III	0,20* 0,50** 0,50
Lufenuron	Benzoilureia	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	Inseticida	Milho	III	0,05
Malationa	Organofosfato	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Inseticida	Arroz; Milho	III	8,00 8,00*
Propanil	Anilida	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	Herbicida	Arroz; Trigo	III	2,00*
Simazina	Triazina	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	Herbicida	Milho	III	0,02
Terbufós	Organofosfato	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	Inseticida	Milho	III	0,05
Tiametoxam	Neonicotinóide	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	Inseticida	Arroz; Milho; Cevada	III	0,02 1,00* 0,300**
Tiofanato– metílico	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	Fungicida	Arroz; Milho; Cevada	III	2,00 0,5* 0,200**

*LMR para culturas de arroz.; ** LMR para culturas de cevada.

Tabela 5- Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo. Fonte: ANVISA; IUPAC PPDB; PubChem [33,96,97].

Pesticida	MM (g mol ⁻¹)	Temperatura de ebulição (°C)	Solubilidade em H ₂ O (mg L ⁻¹)	Solubilidade solvente orgânico (mg L ⁻¹)	pKa	LogK _{ow}
Abamectina	1732,1	941	0,0078	Acetona (1,5x10 ⁵) Metanol(2,1x10 ⁴)	12,47	4,30
Acetamiprido	222,67	222	2,9x10 ³	Acetona (2,0x10 ⁵) Diclorometano (2,0x10 ⁵) Metanol (1,5x10 ⁵)	0,7	0,8
Azoxistrobina	403,4	360	6,7	Metanol (2,0x10 ⁴) Hexano (57)	ND	2,5
Atrazina	215,68	205	35	Acetato de Etila (2,4x10 ⁴) Hexano (1,1x10 ²)	1,7	2,70
Ametrina	227,12	337	200	Acetona (5,69x10 ⁴) Hexano (1,40x10 ³)	10,07	2,63

Tabela 5 - Continuação

Carbendazim	191,2	-	8,0	Etanol (3x10 ²) Acetato de etila (1,4x10 ²)	4,2	1,48
Carbossulfano	380,5	219,3	0,11	Metanol (2,5x10 ⁵)	2,32	7,42
Clorpirifós	350,59	375,9	1,05	Hexano (7,7x10 ⁵) Metanol (2,9x10 ⁵) Acetato de etila (4x10 ⁶)	ND	NE
Deltametrina	505,20	300	0,0002	Acetona (4,5x10 ⁵) Metanol (8,15x10 ³)	10,65	4,6
Diurom	233,09	356	35,6	Acetona (5,36x10 ⁴) Acetato de Etila (2,1x10 ⁴)	13,18	2,87
Epoxiconazol	329,8	-	7,1	Acetato de etila (1x10 ⁵) Acetona (1,4x10 ⁵)	2,00	3,58
Esfenvalerato	419,9	356	1x10 ⁻³	Metanol (8,2x10 ⁴) Acetona (5,0x10 ⁵)	10,64	6,24

Tabela 5 - Continuação

Flutriafol	301,3	99	-	Metanol (1,1x10 ⁵) Acetona (1,16x10 ⁵)	2,3	2,3
Haloxifope	361,70	-	1,6	Acetona (1,0x10 ⁶) Acetato de etila (5,1x10 ⁵) Hexano (170)	4,27	NE
Imidacloprido	255,66	-	0,061	Diclorometano (6,4x10 ⁴) Isopropanol(2,3x 10 ⁴) Tolueno (6,9x10 ²)	1,56	0,57
Lufenuron	511,7	-	4,6x10 ⁻²	Acetato de etila (3,3x10 ⁵) Acetona (4,6x10 ⁵)	10,2	5,12
Malationa	330,4	-	143	Metanol (2,5x10 ⁵) Acetona (2,5x10 ⁵)	ND	2,75
Propanil	218,1	351	130	Metanol (6,5x10 ⁵) Acetona (1,7x10 ⁶)	13,90	2,29

Tabela 5: Continuação

Simazina	201,66	-	5	Acetona (6,6x10 ⁵) Metanol (4,0x10 ²)	1,62	2,3
Terbufós	288,4	69	5,7	Etanol (5,7x10 ²)	ND	4,48
Tiametoxam	291,7	-	4100	Acetona (1,5x10 ³) Metanol (13) Acetato de etila (7,0) Diclorometano (110)	0,40	-0,13
Tiofanato- metílico	342,4	-	18,5	Acetona (3,0x10 ⁵)	7,38	1,4

MM= Massa Molar; pKa= constante de acidez; Kow= constante de partição octanol-água; ND= não se dissocia; NE=não encontrado.

As propriedades dos pesticidas são fatores que devem ser avaliados, pois auxiliam na compreensão do comportamento desses compostos no ambiente. O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) está relacionado à afinidade da molécula com a fase polar (água) e fase apolar (octanol), definindo se o composto é hidrofóbico (caso apresente valores elevados e não tenham afinidade com água) ou hidrofílico (com baixos valores de K_{ow} e solúveis em água) [98].

Com base ainda no coeficiente de partição octanol-água, compostos não polares possuem geralmente $\log K_{ow} > 4$ e os compostos polares apresentam o $\log K_{ow} < 1,5$, enquanto que os compostos de polaridade intermediária apresentam $\log K_{ow}$ entre 1,5 e 4 [99].

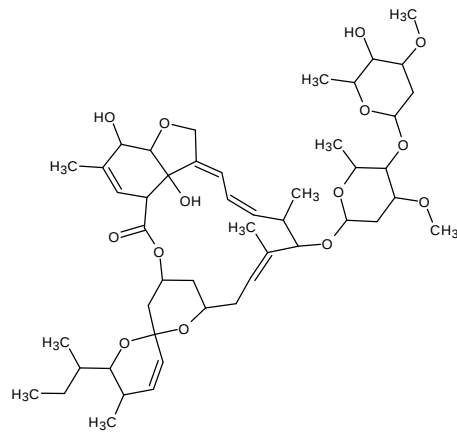
Dessa forma a grande maioria dos pesticidas estudados são hidrofílicos e moderadamente polares como é o caso do propanil, simazina, malationa, flutriafol, epoxiconazol, diurom, ametrina, atrazina e azoxistrobina. Destacando também compostos não polares como terbufós, lufenuron, deltametrina e abamectina, altamente polar como é o caso do tiametoxam e imidacloprido e dois deles são polares como o carbendazim e tiofanato-metílico.

Esse parâmetro também é um indicativo para avaliar a bioacumulação do composto no ambiente, uma vez que substâncias com $\log K_{ow}$ maior que 3 apresentam tendência acumulativa [99]. Os pesticidas como carbossulfano, esfenvalerato e lufenuron apresentam valores elevados de $\log K_{ow}$, indicando que são compostos com grande capacidade de bioacumulação [100].

O pKa indica o caráter ácido do analito. De modo geral, quanto menor o pKa mais forte será o ácido e maior a probabilidade de ser ionizado [99].

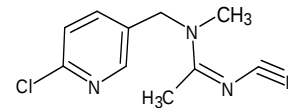
A solubilidade em água de forma elevada indica a tendência do composto ser removido do solo, assim os compostos como acetamiprido, ametrina e tiametoxam possuem maior probabilidade de serem carregados pela chuva. Mas nem sempre a elevada solubilidade está relacionada com a maior mobilidade no solo, pois o composto pode também apresentar elevada capacidade de retenção, além de diferentes interações [101].

Figura 2- Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo. Fonte: ANVISA; IUPAC PPDB [33,96].

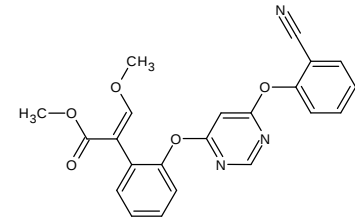


Abamectina:

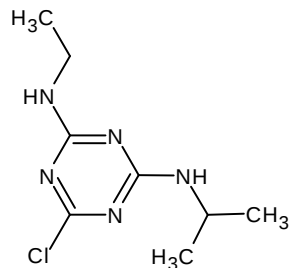
(1'R,2R,3S,4'S,6S,8'R,10'E,12'S,13'S,14'E,16'E,20'R,21'R,24'S
-2-[(2S)-butan-2-il]-21',24'-dihidroxi-12'-[(2R,4S,5S,6S)-5-
[(2S,4S,5S,6S)-5-hidroxi
-4-methoxi-6-methiloxan-2-il]oxi-4-methoxi-6-methiloxan-2-
il]oxy-3,11',13',22'
-tetrametilespiro[2,3-dihidropiran-6,6'-3,7,19-
trioxatetraciclo[15.6.1.14,8.020,24]
pentacosa-10,14,16,22-tetraeno]-2'-ona



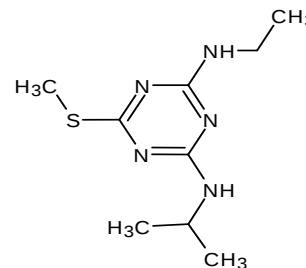
Acetamiprido: N-[(6-cloropiridin-3-il)
metil]- N'-ciano-N-metiletanimidamida



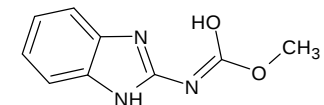
Azoxistrobina: metil (E) -2- [2- [6-
(2- cianofenoxi) pirimidin-4-il]
oxifenil] -3- metoxi prop-2-enoato



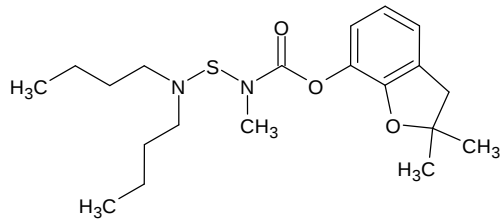
Atrazina: 2-cloro-4etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-
triazina



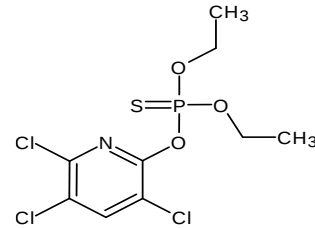
Ametrina: 4- N -etil-6-metilsulfanil-2- N -
propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina



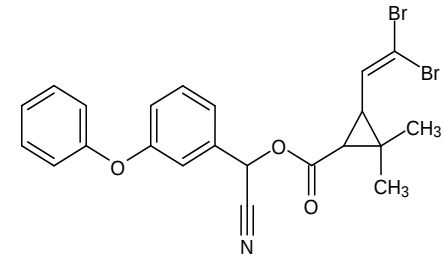
Carbendazim: metil N - (1 H -
benzimidazol-2-il) carbamato



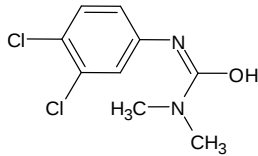
Carbossulfano: (2,2-dimetil- 3*H* -1-benzofuran-7-il) *N*- (dibutilamino) sulfanil- *N*- metilcarbamato



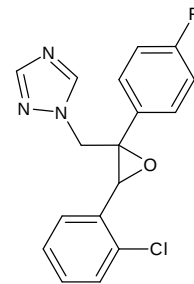
Clorpirifós: dietoxi-sulfanilideno- (3,5,6-tricloropiridin-2-il) oxi- λ^5 fosfano



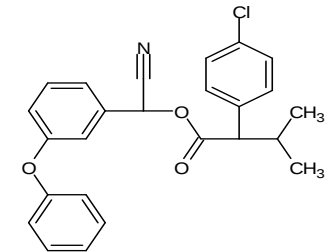
Deltametrina:[(*S*) -ciano- (3-fenoxifenil) metil] (*1R* , *3R*) -3-(2,2-dibromoetenil) -2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato



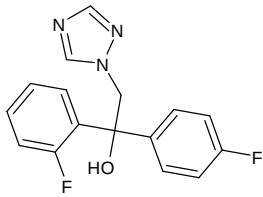
Diuron:3- (3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilureia



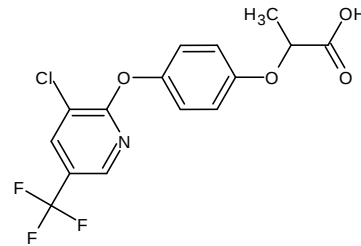
Epoxiconazol: 1 - [[3- (2-clorofenil) -2-(4-fluorofenil) oxiran-2-il] metil] -1,2,4-triazol



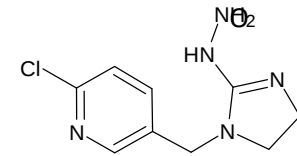
Esfenvalerato:[(*S*) -ciano- (3-fenoxifenil) metil] (*2S*) -2-(4-clorofenil) -3-metilbutanoato



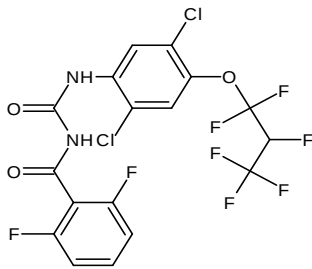
Flutriafol: 1- (2-fluorofenil) -1- (4-fluorofenil) -2- (1,2,4-triazol-1-il) etanol



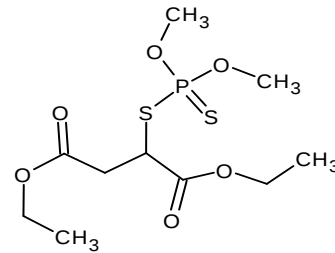
Haloxifope: Ácido 2- [4- [3-cloro-5- (trifluorometil) piridin-2-il] oxifenoxi] propanóico



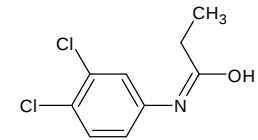
Imidacloprido: (*N E*) - *N* - [1 - [(6-cloropiridin-3-il) metil] imidazolidin-2-ilideno] nitramida



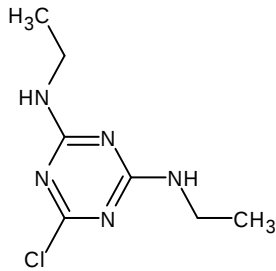
Lufenuron: *N* - [[2,5-dicloro-4- (1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi) fenil] carbamoil] -2,6-difluorobenzamida



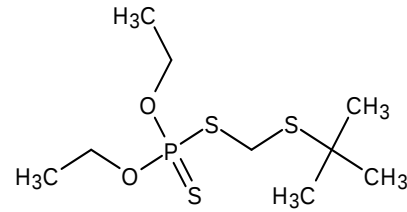
Malationa: dietil 2- dimetoxifosfinotioilsulfanilbutanodioato



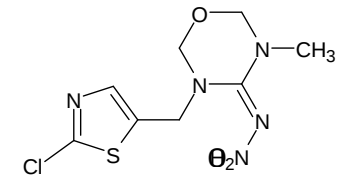
Propanil: *N*- (3,4-diclorofenil) propanamida



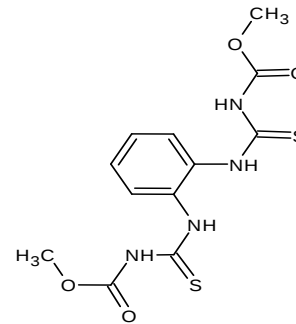
Simazina: 6-cloro-2- *N*, 4- *N* -dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina



Terbufós: *tert* -butilsulfanilmetilsulfanil-dietoxi-sulfanilideno-λ⁵-fosfano



Tiametoxam: (*N* E) - *N* - [3 - [(2-cloro-1,3-tiazol-5-il) metil] -5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno] nitramida



Tiofanato metílico: metil *N* - [[2-(metoxicarbonilcarbamotioilamino) fenil] carbamotioil] carbamato

Para o desenvolvimento da metodologia proposta neste trabalho por SPE e LC-MS, a princípio foram otimizadas as condições cromatográficas para análise simultânea dos pesticidas selecionados, seguido dos experimentos de bancada para alcançar a mais eficiente extração dos pesticidas da cerveja.

As separações analíticas em fase reversa são realizadas utilizando uma coluna de fase C18, devido ao maior comprimento da cadeia lateral do grupo alquila na fase permitindo ser menos polar [59]. A coluna avaliada para desenvolvimento das condições de trabalho foi a Shim-Pack UC-X RP por apresentar um grupo funcional polar entre a sílica e o grupo C18, permitindo ser utilizada para compostos de uma ampla faixa de polaridade, além de garantir elevada reprodutibilidade de análise [102].

5.2. Otimização das condições instrumentais de análise

As soluções individuais dos 22 pesticidas (abamectina, acetamiprido, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, carbossulfano, clorpirifós, deltametrina, diurom, epoxiconazol, esfenvalerato, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, simazina, terbufós, tiametoxam e tiofanato-metílico) foram preparadas na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma solução conjunta com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi analisada no LC-MS no modo exploratório de eluição.

A análise exploratória foi realizada a partir da eluição em modo gradiente variando o percentual de solvente orgânico (5 a 100%) na composição da fase móvel constituída de solvente orgânico (metanol): água com formiato de amônio (5 mmol L^{-1}). O metanol foi escolhido devido a estudos anteriores no grupo de pesquisa terem avaliado e os analitos apresentaram bom perfil de separação na presença desse solvente. Ressalta-se também que esse solvente é amplamente empregado na ESI juntamente com esse aditivo volátil na composição da fase móvel, além de ser adequado para utilizar na cromatografia em fase reversa, em que a fase estacionária é apolar enquanto a fase móvel é solvente de caráter polar [103]. O metanol também é preferido em comparação com acetonitrila na análise de pesticidas por LC-MS (ESI), pois apresenta uma força eluotrópica inferior, necessitando assim de uma porcentagem maior de solvente para obter a mesma força cromatográfica da acetonitrila e dessa forma terá maior sensibilidade durante a eluição dos compostos [104].

A escolha do formiato de amônio como aditivo resultou também de estudos realizados no grupo de pesquisa do LCP nos quais avaliaram as áreas de alguns desses pesticidas em presença do formiato de amônio (NH_4HCO_2) e ácido fórmico (CH_2O_2). Os resultados obtidos indicaram que os analitos na presença do NH_4HCO_2 apresentaram uma área superior em comparação com o CH_2O_2 utilizado como aditivo. O comparativo dos resultados obtidos pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6: Comparativo das áreas dos sinais do analitos em presença do formiato de amônio e em presença do ácido fórmico.

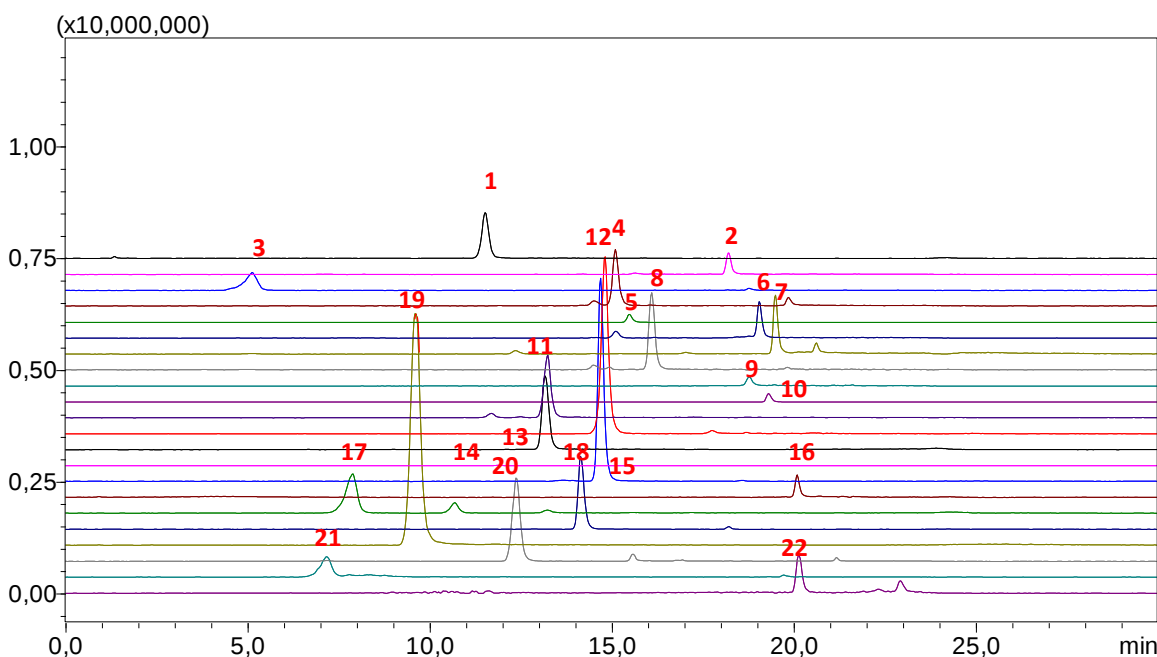
Pesticida	Área com formiato de amônio	Área com ácido fórmico
Abamectina	2,49E+07	1,59E+07
Ametrina	1,74E+08	1,63E+08
Atrazina	1,17E+08	1,36E+08
Azoxistrobina	6,59E+07	3,32E+07
Acetamiprido	2,17E+07	5,43E+06
Deltametrina	9,74E+06	2,64E+06
Diurum	6,78E+07	1,97E+07
Flutriafol	1,47E+07	2,02E+07
Epoxiconazol	8,55E+07	9,31E+07
Esfenvalerato	1,81E+06	8,43E+06
Flutriafol	4,93E+07	1,04E+08
Imidacloprido	3,79E+07	2,28E+07
Lufenurum	1,21E+06	1,46E+07
Malationa	1,42E+07	5,66E+06
Simazina	4,56E+07	6,51E+07
Terbufós	2,19E+07	8,75E+06
Tiametoxam	1,19E+07	2,39E+06
Tiofanato - metílico	3,94E+07	6,58E+06

Avaliando as áreas obtidas para o sinal dos analitos em presença do formiato de amônio foi notável melhores áreas para maior parte dos analitos, culminando para escolha desse aditivo na composição da fase móvel.

Posteriormente, para auxiliar na escolha do gradiente foi realizada uma análise exploratória no modo de varredura *Scan* com um intervalo de m/z entre 100-900 Da, que foi escolhido devido aos analitos apresentarem massas molares dentro dessa faixa. A análise exploratória ainda buscou verificar quais íons (m/z) seriam monitorados para cada pesticida, observando a resposta desses analitos através da protonação $[M+H]^+$ com hidrogênio, sódio $[M+Na]^+$ e amônio $[M+NH_4]^+$, além da desprotonação $[M-H]^-$ e formação de adutos de formiato $[M+HCOO]^-$ de forma que pudesse constatar se a ionização ocorria no modo positivo ou negativo.

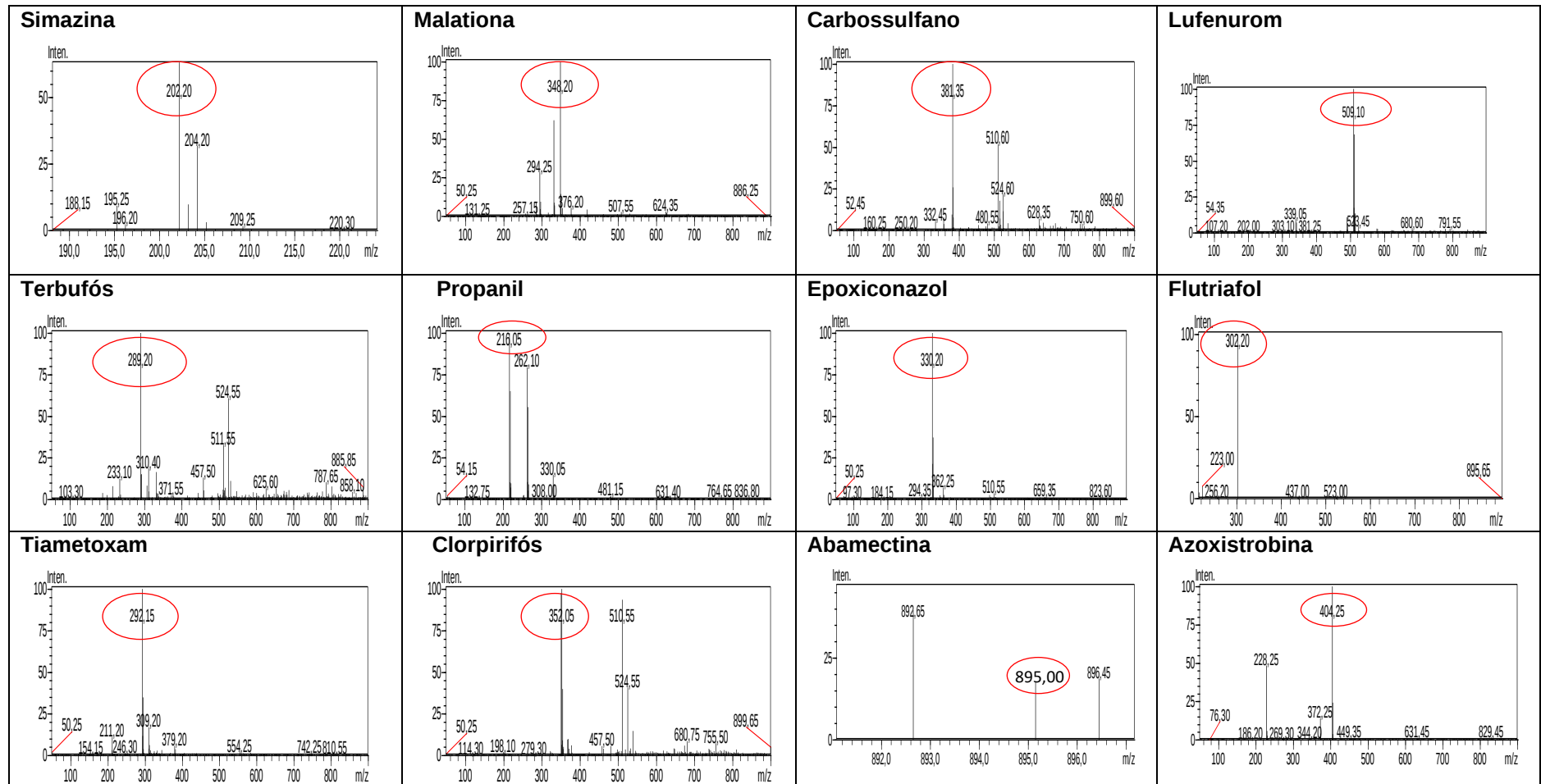
Ainda para escolha da composição do gradiente, foi calculada a porcentagem de metanol que seria necessária para cada um dos 22 analitos serem eluídos na coluna cromatográfica. Isso foi possível devido à obtenção do tempo de retenção de cada analito através da análise exploratória em um tempo de 30 minutos. Os cromatogramas, espectros de massas com a identificação dos analitos, tempos de retenção, modo de ionização e porcentagem de metanol podem ser vistos nas Figuras 3, 4 e Tabela 7, respectivamente, nas condições apresentadas no tópico 5.2.

Figura 3- Cromatogramas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparada na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.



1-simazina; 2- terbufós; 3-tiametoxam; 4-malationa; 5-propanil; 6-clorpirifós; 7-carbossulfano; 8-epoxiconazol; 9-abamectina; 10-lufenuron; 11-flutriafol; 12-azoxistrobina; 13-atrazina; 14-haloxifope; 15-ametrina; 16-esfenvalerato; 17-acetamiprido; 18-diurum; 19-carbendazim; 20-tiofanato-metílico; 21-imidacloprido; 22-deltametrina.

Figura 4: Espectros de massas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparadas na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.



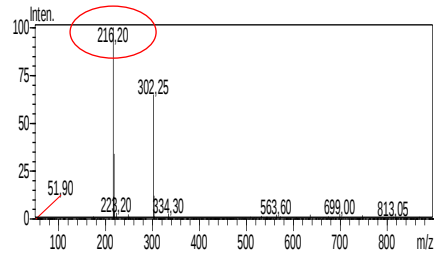
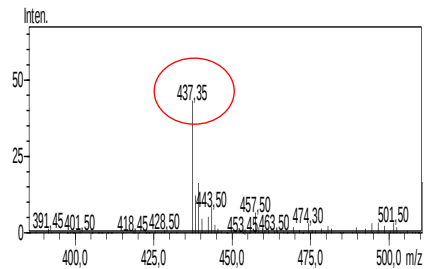
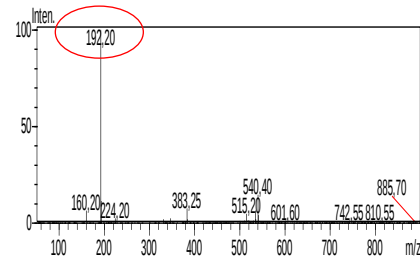
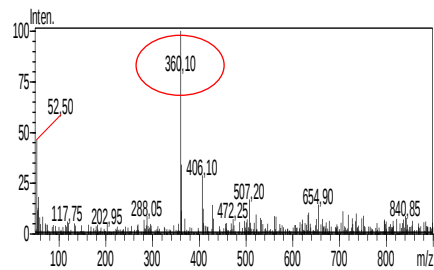
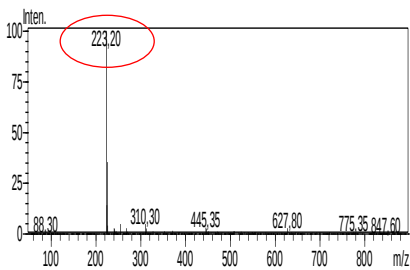
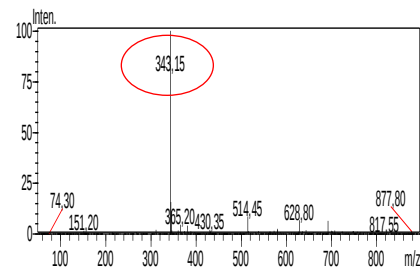
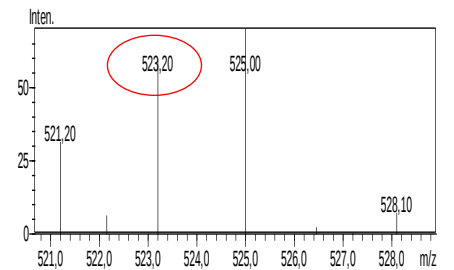
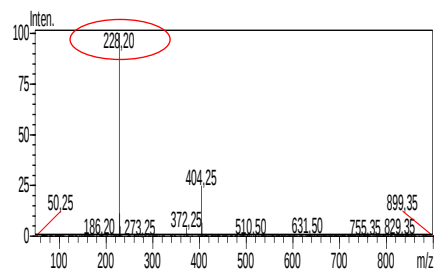
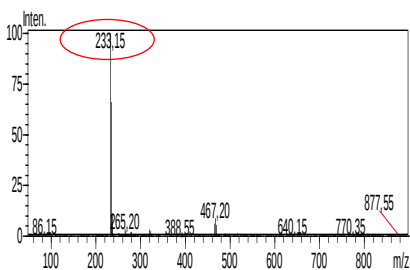
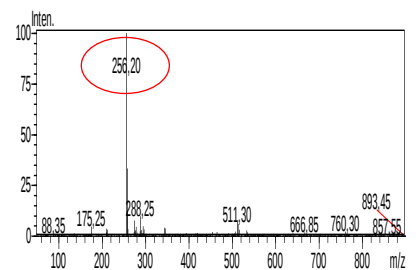
Atrazina**Esfenvalerato****Carbendazim****Haloxifop****Acetamiprido****Tiofanato – metílico****Deltametrina****Ametrina****Diuróm****Imidacloprido**

Tabela 7- Tempos de retenção, modo de ionização, relação m/z e porcentagem de metanol dos pesticidas, obtidos através da análise exploratória de soluções padrão dos pesticidas.

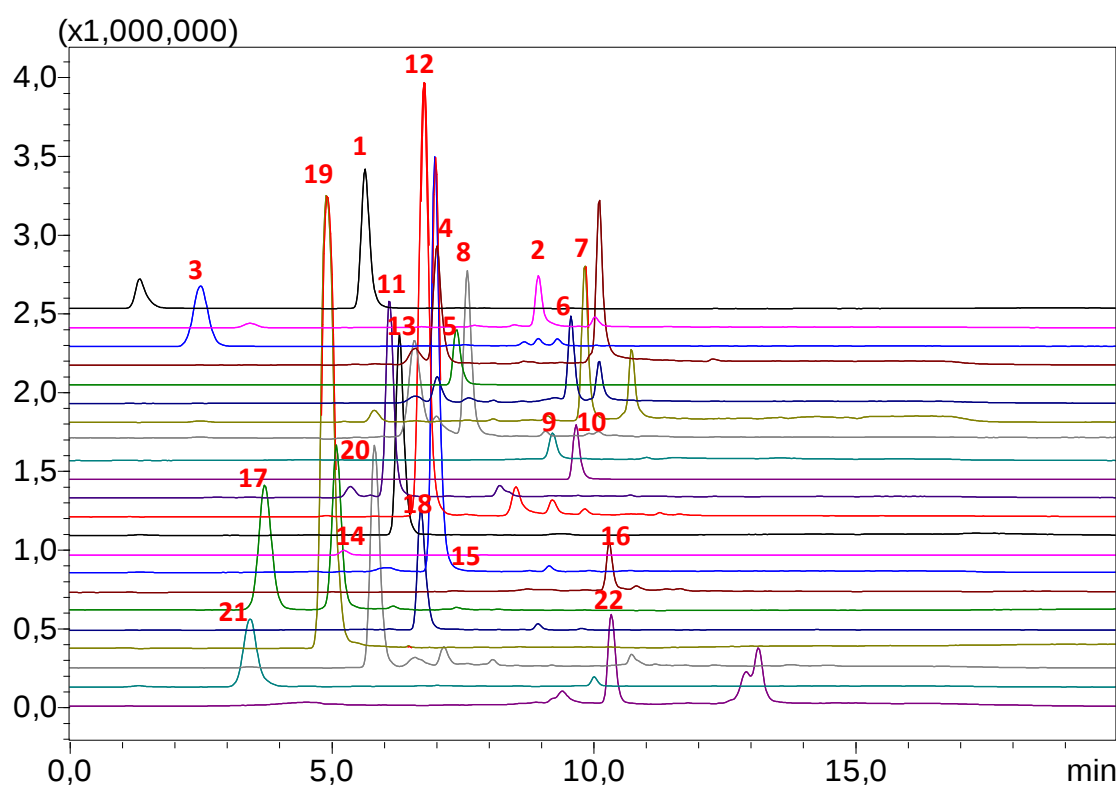
Pesticidas	Modo de Ionização	m/z	T _R (min)	%Metanol
Tiametoxam	+	[M+H] ⁺ - 292	5,1	21,2
Imidacloprido	+	[M+H] ⁺ - 256	7,1	27,6
Acetamiprido	+	[M+H] ⁺ - 223	7,8	29,9
Carbendazim	+	[M+H] ⁺ - 192	9,6	35,3
Simazina	+	[M+H] ⁺ - 202	11,5	41,4
Haloxifope	-	[M-H] ⁻ - 360	11,9	42,6
Tiofanato-metílico	+	[M+H] ⁺ - 343	12,3	44,1
Atrazina	+	[M+H] ⁺ - 216	13,1	46,6
Flutriafol	+	[M+H] ⁺ - 302	13,2	46,8
Diurum	+	[M+H] ⁺ - 233	14,1	49,7
Ametrina	+	[M+H] ⁺ - 228	14,7	51,4
Azoxistrobina	+	[M+H] ⁺ - 404	14,8	51,7
Malationa	+	[M+NH ₄] ⁺ - 348	15,1	52,7
Propanil	-	[M-H] ⁻ - 216	15,4	53,9
Epoxiconazol	+	[M+H] ⁺ - 330	16,1	55,8
Terbufós	+	[M+H] ⁺ - 289	18,2	62,5
Abamectina	+	[M+NH ₄] ⁺ - 895	18,7	64,3
Clorpirifós	+	[M+H] ⁺ - 350	19,0	65,2
Lufenuron	-	[M-H] ⁻ - 509	19,3	66,0
Carbossulfano	+	[M+H] ⁺ - 381	19,5	66,6
Esfenvalerato	+	[M+NH ₄] ⁺ - 437	20,0	68,4
Deltametrina	+	[M+NH ₄] ⁺ - 523	20,1	68,6

Tr= Tempo de retenção.

Os cromatogramas mostraram que foi possível obter um bom perfil de separação dos analitos, assim como os espectros de massas indicam a identificação de cada um desses analitos através da relação m/z . Além disso, os resultados são capazes de mostrar uma ampla faixa de proporção de metanol na fase móvel, o que permite uma melhor definição para composição do gradiente. Logo, como forma de

otimizar as condições instrumentais de análise, foi avaliado o analito que apresentou o menor tempo de retenção, ou seja, que eluiu primeiro (tiametoxam) definindo assim uma porcentagem inicial em 30% de metanol e por fim, buscou finalizar o gradiente em 100% garantindo o tempo necessário para retorno das condições iniciais e concluindo a corrida cromatográfica em um tempo de 20 minutos. Essa porcentagem para finalizar o gradiente foi escolhida como forma de garantir eluição completa dos compostos, além de permitir uma melhor manutenção da coluna cromatográfica. Esse gradiente também foi escolhido devido ter apresentado resultados satisfatórios para a maioria dos analitos que foram avaliados anteriormente no grupo de pesquisa, apresentando uma boa separação e simetria dos sinais obtidos. Analisando a Figura 5 é possível verificar a ocorrência de uma separação satisfatória dos analitos nas condições supracitadas.

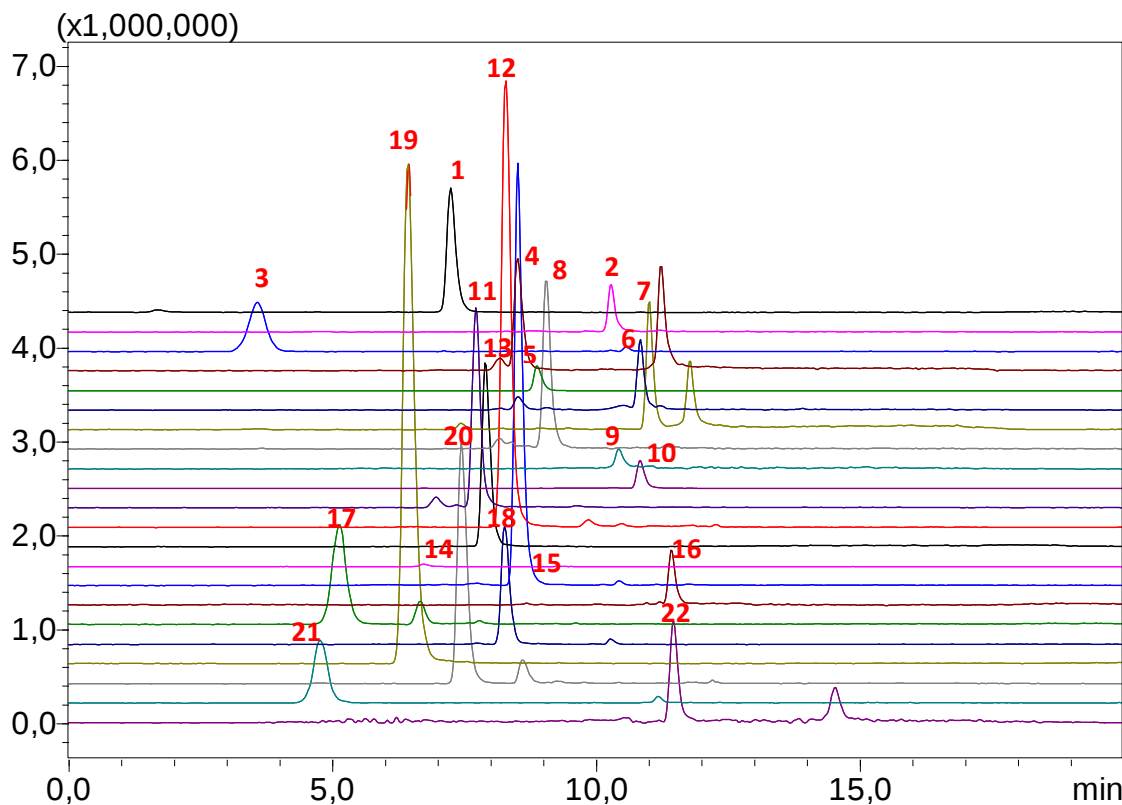
Figura 5- Cromatogramas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparadas na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SIM com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.



1-simazina (Tr: 5,6); 2-terbufós (Tr: 8,95); 3-tiametoxam (Tr: 2,50); 4-malationa (Tr: 7,02); 5-propanil (Tr: 7,39); 6-clorpirifós (Tr: 9,57); 7-carbossulfano (9,84); 8-epoxiconazol (Tr: 7,59); 9-abamectina (Tr: 9,22); 10-lufenuron (Tr: 9,67); 11-flutriafol (Tr: 6,11); 12-azoxistrobina (Tr: 6,77); 13-atrazina (Tr: 6,30); 14-haloxifope (5,24); 15-ametrina (Tr: 6,98); 16-esfenvalerato (Tr: 10,31); 17-acetamiprido (Tr: 3,73); 18-diurum (Tr: 6,71); 19-carbendazim (Tr: 4,91); 20-tiofanato-metílico (Tr: 5,82); 21-imidacloprido (Tr: 3,45); 22-deltametrina (Tr: 10,35).

Com o gradiente definido, foi avaliado a vazão da fase móvel que é um fator que influencia no processo de separação dos analitos, além de estar relacionado com a velocidade de difusão da massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária [105]. Em HPLC, reduzir a vazão geralmente melhora a separação dos analitos. Logo, foi avaliado se diminuindo a vazão da fase móvel os analitos continuavam apresentando elevadas intensidades dos sinais e com separação adequada. Ainda de acordo com Snyder *et al.*, 2010 [105], esse fator influencia na retenção dos compostos de modo que aumentando a velocidade irá diminuir o tempo de interação do analito com a fase estacionária e, conseqüentemente, diminuir o tempo de retenção do analito. Enquanto que diminuir essa velocidade da fase móvel, aumenta o tempo de interação entre o analito e a fase estacionária, ambos os casos acabam refletindo na separação dos analitos. Os cromatogramas apresentados na Figura 6 mostram que ao utilizar uma vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ocorreu uma supressão dos sinais dos analitos, pois de acordo com as propriedades dos detectores a resposta do sinal é proporcional a vazão que chega ao detector. Além disso, o tempo de retenção apresentado foi bem semelhante e dessa forma, a condição presente na Figura 5 com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ foi a mais satisfatória para separação desses analitos.

Figura 6- Cromatogramas da solução padrão conjunta dos pesticidas preparadas na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, modo SCAN com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.



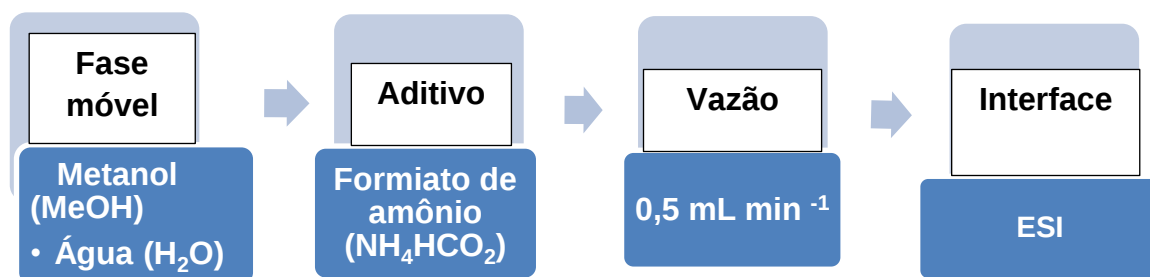
1-simazina; 2-terbufós; 3-tiametoxam; 4-malationa; 5-propanil; 6-clorpirifós; 7-carbossulfano; 8-epoxiconazol; 9-abamectina; 10-lufenuron; 11-flutriafol; 12-azoxistrobina; 13-atrazina; 14-haloxifope; 15-ametrina; 16-esfenvalerato; 17-acetamiprido; 18-diurum; 19-carbendazim; 20-tiofanato-metílico; 21-imidacloprido; 22-deltametrina.

Estudos apresentados anteriormente [74,75,106] relataram que a ESI é uma fonte de ionização mais branda permitindo trabalhar com uma ampla faixa de polaridade e apresenta uma melhor ionização dos analitos, além de ter um bom desempenho ao ser utilizado com cromatografia de fase reversa e ser caracterizada por apresentar o sinal do analito mais intenso em relação aos componentes da matriz.

Assim, a interface ESI foi escolhida devido ser adequada para trabalhar com compostos de baixa a alta polaridade e ser uma fonte de ionização bastante utilizada em trabalhos anteriores (tópico 2.7.) para determinação de pesticidas em diferentes matrizes.

Por fim, o fluxograma da Figura 7 mostra as condições instrumentais que foram satisfatórias para separação e identificação dos 22 pesticidas. Em seguida, foi otimizado um método de extração para os analitos avaliados no presente trabalho.

Figura 7: Fluxograma com a condição instrumental otimizada para separação e identificação dos pesticidas.



5.3. Desenvolvimento do método por SPE

Na SPE, a escolha do tipo e da quantidade de adsorvente, volume da amostra, solvente de condicionamento e de eluição são alguns dos parâmetros que devem ser avaliados para obtenção de melhores resultados de extração. Para a escolha do adsorvente e solvente de eluição adequados leva-se em consideração as propriedades dos analitos de interesse, natureza da matriz, assim como interferentes que devem ser eliminados. Foram avaliados e escolhidos experimentalmente a quantidade do adsorvente de trabalho, solvente de eluição e seu volume. Os parâmetros estão descritos nos subitens do tópico 5.3.

5.3.1. Seleção do adsorvente

A escolha do adsorvente apropriado depende das suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas que auxiliam na compreensão do processo de interação que ocorre entre o adsorvente e o analito de interesse, características do analito, matriz da amostra e solventes envolvidos na etapa de extração. Os mecanismos de retenção mais comuns em SPE são baseados nas forças de van de Waals (interações não polares), ligações de hidrogênio, forças dipolo-dipolo (interações polares), além das interações iônicas [107].

Os percentuais de recuperação foram avaliados como forma de definir qual adsorvente apresentava melhor capacidade de retenção no qual juntamente com o solvente de eluição adequado permitiria que os analitos apresentassem esses resultados na faixa de 70 – 120 % com desvio padrão $\leq 20\%$ [79]. Tais resultados foram obtidos com base na quantificação das áreas integradas dos picos cromatográficos dos extratos fortificados e dos picos da solução comparação através do cálculo com base na equação (1)

$$(1) \quad \text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do extrato}}{\text{Área da solução comparação}} \times 100$$

Em que a área do sinal no extrato é obtido através do resultado referente a fortificação da amostra antes do processo de extração, enquanto a área da solução comparação corresponde ao extrato que foi fortificado durante a etapa de reconstituição, ou seja, após todo o processo de extração

Os testes de recuperação foram realizados com os adsorventes comerciais alumina neutra, florisil, sílica gel, amina primária-secundária (PSA) e C18 já que suas características favorecem boa capacidade de retenção. Inicialmente, o solvente de eluição foi o metanol devido a solubilidade dos analitos neste solvente. Para os testes de otimização, a amostra foi sonificada no ultrassom por 6 minutos, o cartucho foi condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de água, utilizando um nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em cerveja com o volume de amostra de 10 mL. A Figura 8 apresenta a estrutura dos adsorventes, enquanto que as Figuras 9 (A), (B) e (C) mostram os gráficos indicando os percentuais de recuperação obtidos nos estudos com os diferentes adsorventes.

Figura 8- Fórmula estrutural dos respectivos adsorventes comerciais avaliados [59]



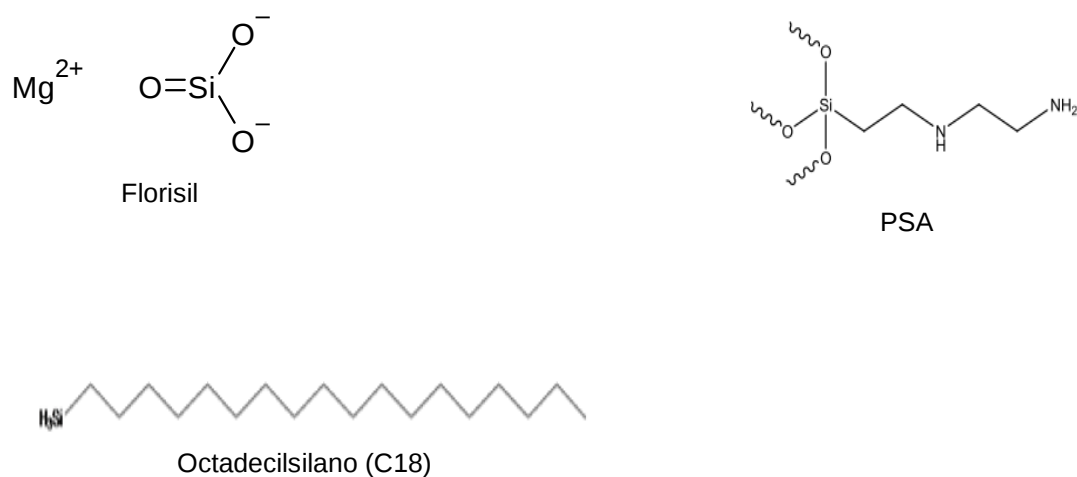
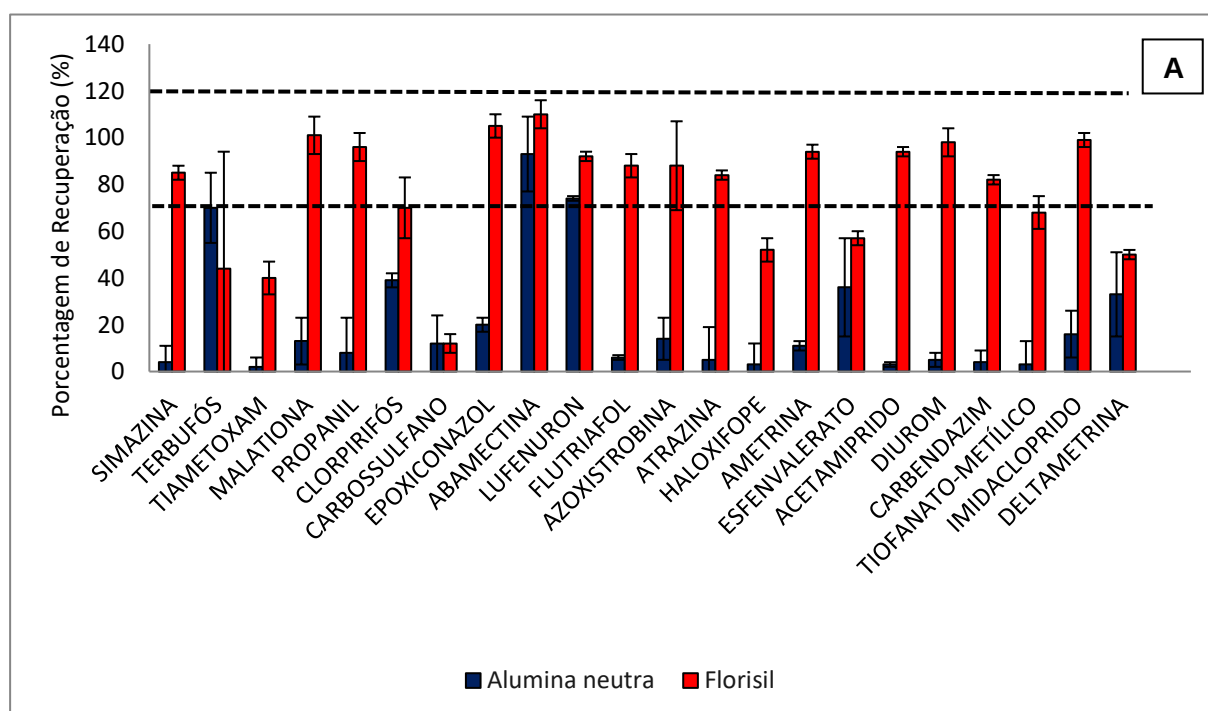
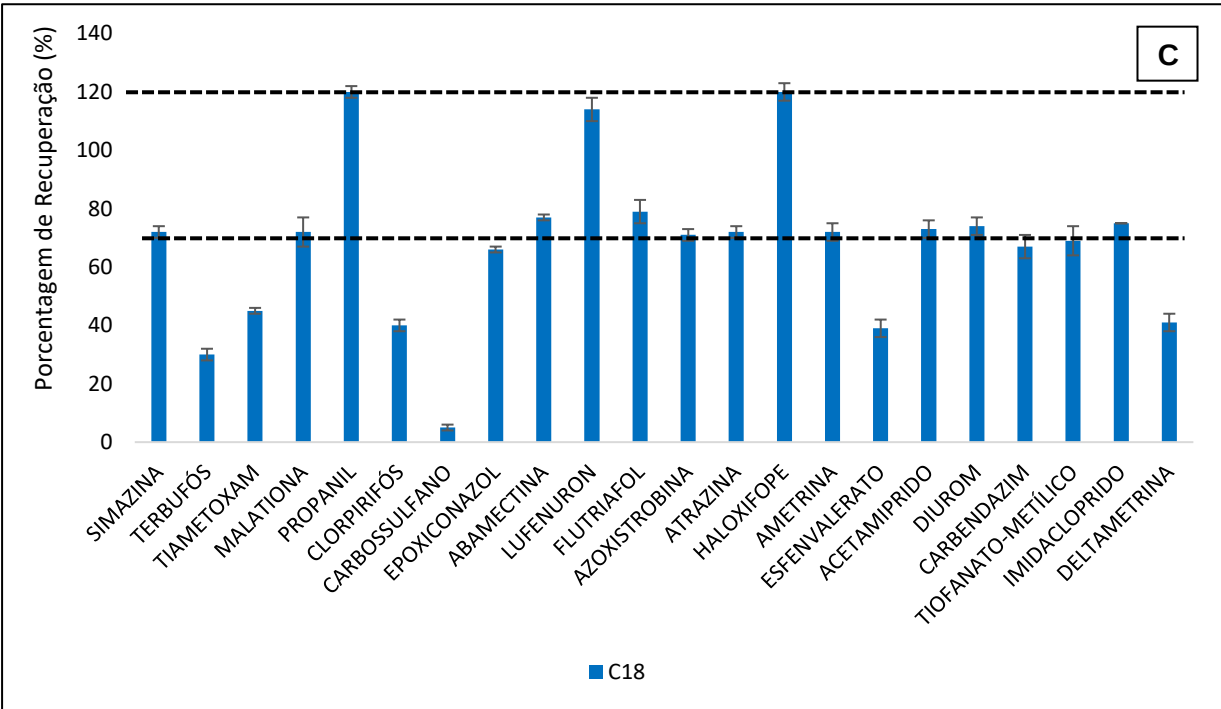
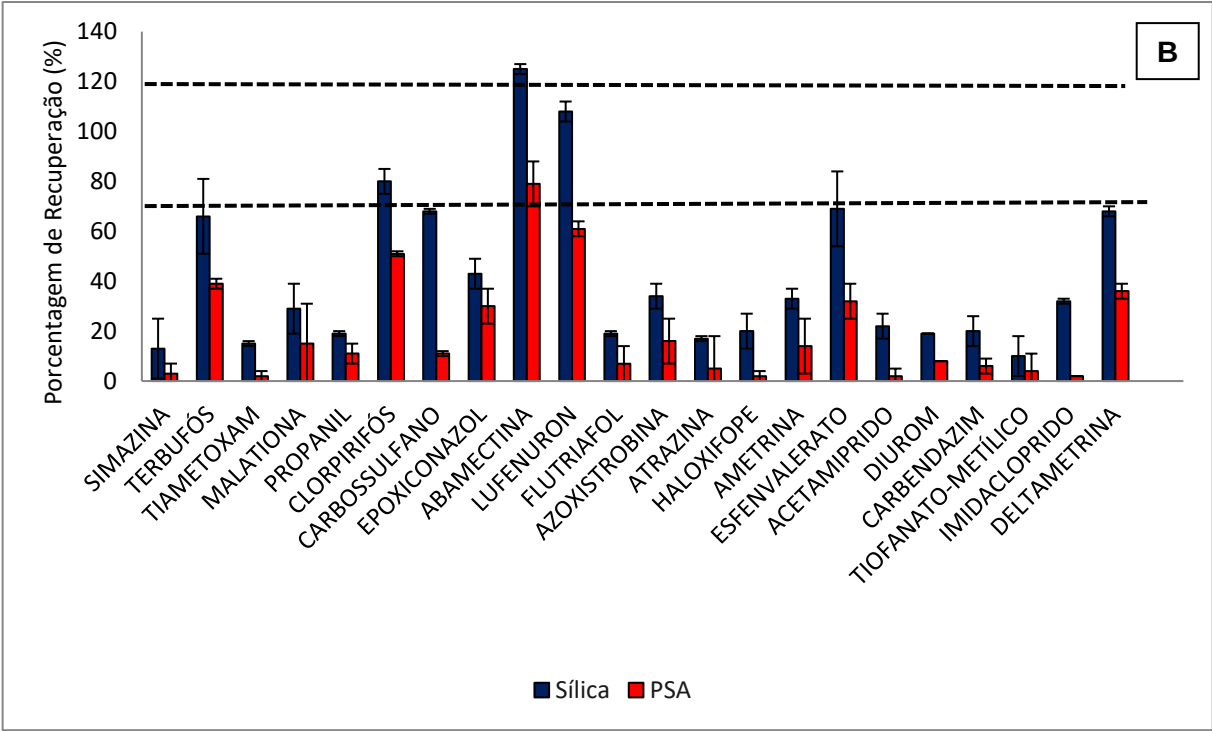


Figura 9: Percentuais de recuperação ($n=3$) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500 mg dos adsorventes alumina neutra e florisil (A), sílica e PSA (B), C18 (C) com 5 mL de metanol como solvente de eluição. Para valores de recuperação e desvio padrão relativo, ver apêndice 1.





Analisando os resultados apresentados foi possível constatar que os adsorventes PSA, sílica gel e alumina neutra apresentaram uma menor recuperação dos analitos dentro da faixa de 70-120% que é estabelecido pela ANVISA como intervalo ideal para recuperação dos pesticidas em variadas matrizes. Utilizando o PSA como adsorvente apenas a abamectina teve recuperação dentro da faixa, com $79 \pm 9\%$ de eficiência, os demais apresentaram valores inferiores a 61%. Isso pode ser justificado com base em trabalhos anteriores como de Mol *et al.*, 2007 [64] utilizaram PSA como adsorvente para análise de frutas e vegetais e notou a redução dos valores de recuperação dos analitos devido a forte interação entre os grupos polares dos analitos e do grupo amino do PSA. Além disso, esse adsorvente apresenta valores de recuperação baixos quando compostos ácidos são extraídos e isso pode ser observado com base nos valores do pKa para maioria dos pesticidas presentes na Tabela 5 (tópico 5.1), onde quanto mais baixo for o pKa mais forte será o ácido.

Empregando a alumina neutra as recuperações variaram de $2 \pm 4\%$ - $93 \pm 16\%$ e três analitos como a abamectina, lufenuron, terbufós tiveram recuperação na faixa de 70 - 120% devido serem compostos apolares e o adsorvente utilizado apresentar como característica melhor adsorção desses compostos. Ao utilizar a sílica, as recuperações variaram de $10 \pm 8\%$ - $125 \pm 2\%$, com o clorpirifós, abamectina e lufenuron apresentando recuperação de $80 \pm 5\%$, $125 \pm 2\%$ e $108 \pm 4\%$, respectivamente. A baixa recuperação em quantitativo de analitos utilizando a sílica está relacionada ao fato de facilmente adsorver água presente na matriz e formar ligações de hidrogênio com os grupos silanóis [107]. Dessa forma, como a cerveja é constituída majoritariamente por água, provavelmente a superfície da sílica foi recoberta por moléculas de água diminuindo a disponibilidade de sítios para ocorrer a adsorção.

Com isso, é possível ressaltar que o PSA, alumina neutra e sílica apresentam características polares e ao trabalhar com compostos polares e de polaridade intermediária, pode resultar em adsorção irreversível em suas superfícies fazendo com que os analitos de interesse não sejam removidos durante o processo de eluição com o emprego de solventes polares que geralmente é utilizado nessa técnica [59,107].

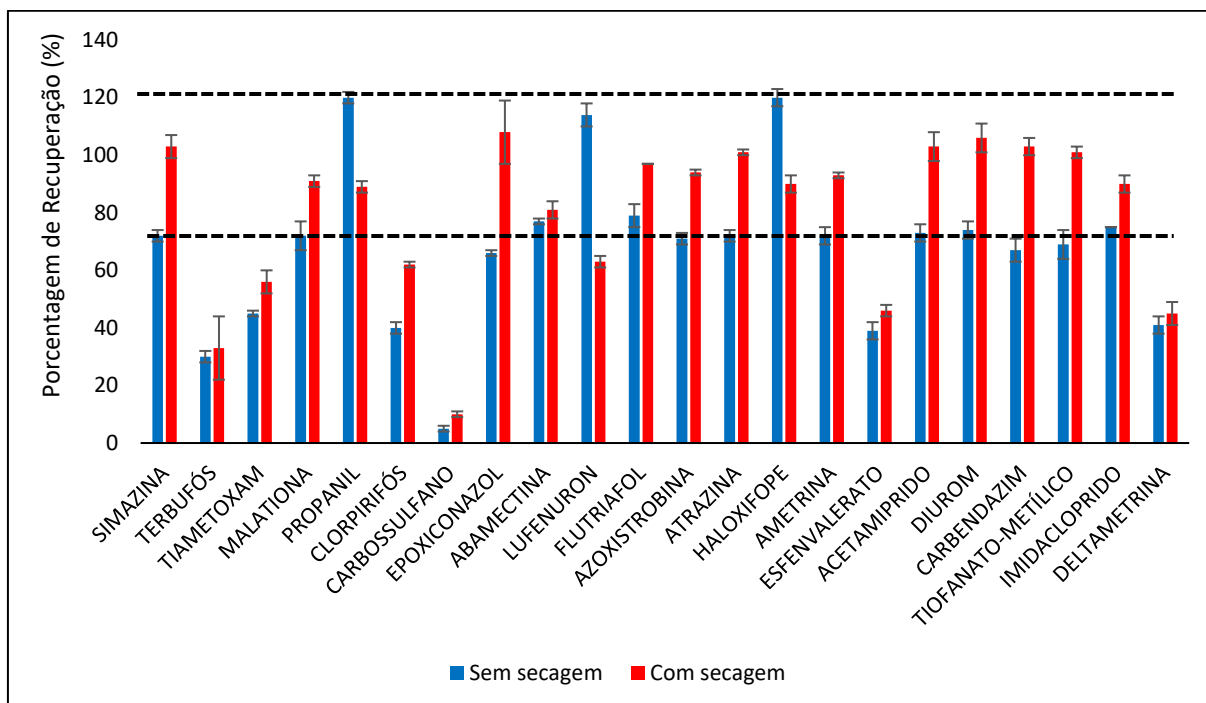
O florisil apesar de ser um adsorvente polar é ideal para limpar extratos contendo pesticidas não polares e remove a maioria dos interferentes quando é eluído com solvente não polar apropriado devido a diferença de polaridade permitir maior remoção desses compostos [107]. Os resultados mostraram uma maior recuperação para grande parte dos analitos ao utilizar esse adsorvente. Enquanto que o C18, que é caracterizado por ser um adsorvente apolar, também apresentou boas recuperações para os analitos avaliados e isso é evidente devido à maioria dos pesticidas serem de polaridade intermediária. Logo, esses dois adsorventes foram escolhidos para seguir nos testes posteriores por terem apresentado percentuais de recuperação da maioria dos analitos na faixa entre 70 - 120%.

5.3.2. Influência do processo de secagem do cartucho

Definido os adsorventes que apresentaram melhores resultados de recuperação dos pesticidas, foi avaliado se a secagem do cartucho após passar a amostra seria um fator que influenciaria na recuperação. Estudos anteriores como de Hengel *et al.*, 2002 [62] mencionaram deixar o cartucho secando por alguns minutos antes da etapa de eluição. Gunter *et al.*, 2016, [108] enfatizaram em seu trabalho em que utilizaram a SPE para determinação de pesticidas em amostras de água, o fato de que se a secagem do disco for negligenciada, os poros serão preenchidos com água e durante a eluição, o solvente pode não ser capaz de penetrar nos poros por causa de razões de miscibilidade e/ou viscosidade. Com isso, pode resultar em recuperações mais baixas e desvios padrão mais elevados [109].

Nessa etapa, o teste foi realizado com o C18 devido ter apresentado bons percentuais de recuperação dos analitos e por ser um adsorvente comumente utilizado na SPE. Após passagem da amostra, o cartucho foi seco por um período de 5 minutos e em seguida eluído com 5 mL de metanol. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10.

Figura 10- Avaliação da eficiência de recuperação com a etapa de secagem do cartucho contendo 500 mg de C18 (n=3) com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 5 mL de metanol como solvente de eluição. Para valores de recuperação e desvio padrão relativo, ver apêndice 2.



Analisando os gráficos da Figura 10 foi possível verificar que a etapa de secagem da fase sólida do cartucho interferiu na recuperação dos analitos apresentando bons valores de recuperação. O C18 tinha anteriormente recuperado um total de 13 analitos na faixa de $72 \pm 5\%$ - $133 \pm 3\%$ e após avaliação da etapa de secagem as recuperações aumentaram para 15 dos 22 pesticidas em estudo sendo que estavam dentro da faixa de $81 \pm 3\%$ - $108 \pm 11\%$, indicando um aumento de recuperação para mais analitos.

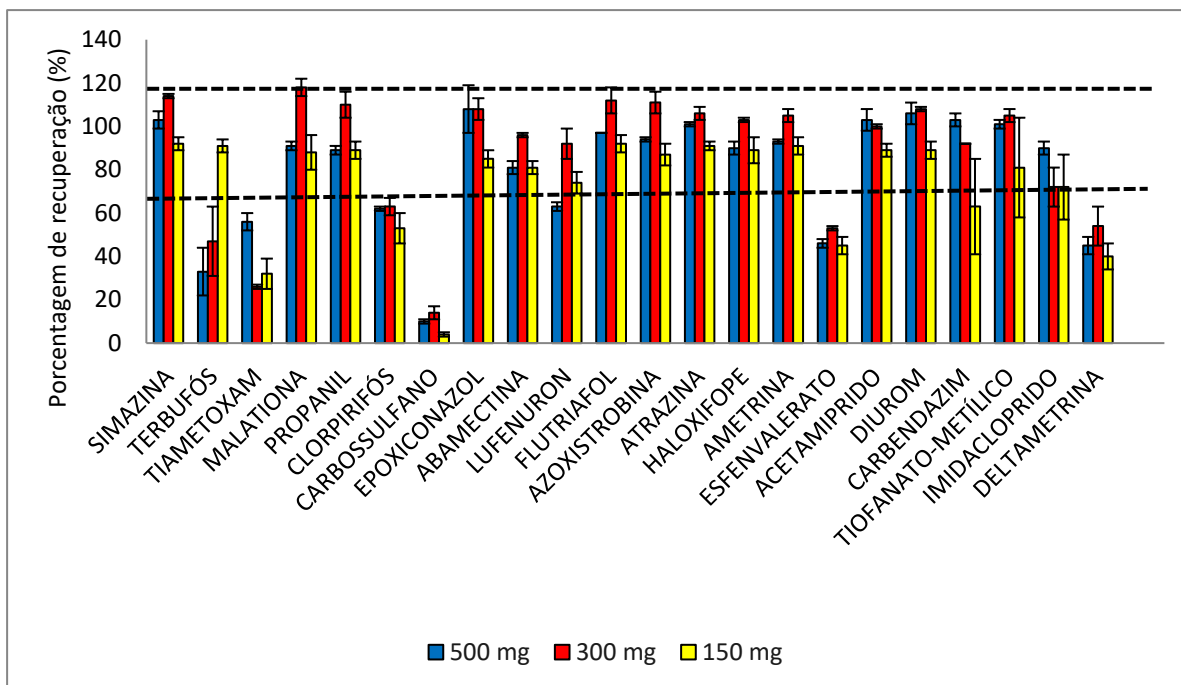
Em estudos anteriores que utilizaram a SPE para extração de pesticidas em outras matrizes, alguns autores também estabeleceram tempo de secagem do cartucho como forma de garantir uma maior interação dos analitos com a fase estacionária [62,110]. Como os resultados apresentados na Figura 10 mostraram que a etapa de secagem do cartucho influenciou de forma positiva na recuperação dos analitos, foi definido utilizar um tempo de secagem do cartucho por 5 minutos após passar a amostra durante os demais testes de otimização.

5.4. Seleção da quantidade de C18

A quantidade de adsorvente utilizado na SPE também é um dos parâmetros que interfere no processo de recuperação dos analitos, pois está diretamente relacionado com alguns fatores como o volume da amostra a ser extraída, interferentes presentes e complexidade da matriz [59]. Inicialmente foi avaliada a eficiência de extração utilizando 500 mg de C18 e, em seguida, procurou reduzir a quantidade de adsorvente para 300 e 150 mg, respectivamente, verificando se uma menor quantidade poderia apresentar resultados tão satisfatórios quanto utilizar uma quantidade superior desse material.

A Figura 11 apresenta os valores de recuperação dos pesticidas a partir da redução da quantidade de C18 e utilizando como solvente de extração 5 mL de metanol.

Figura 11 - Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500, 300 e 150 mg de C18 com 5 mL de metanol como solvente de eluição.



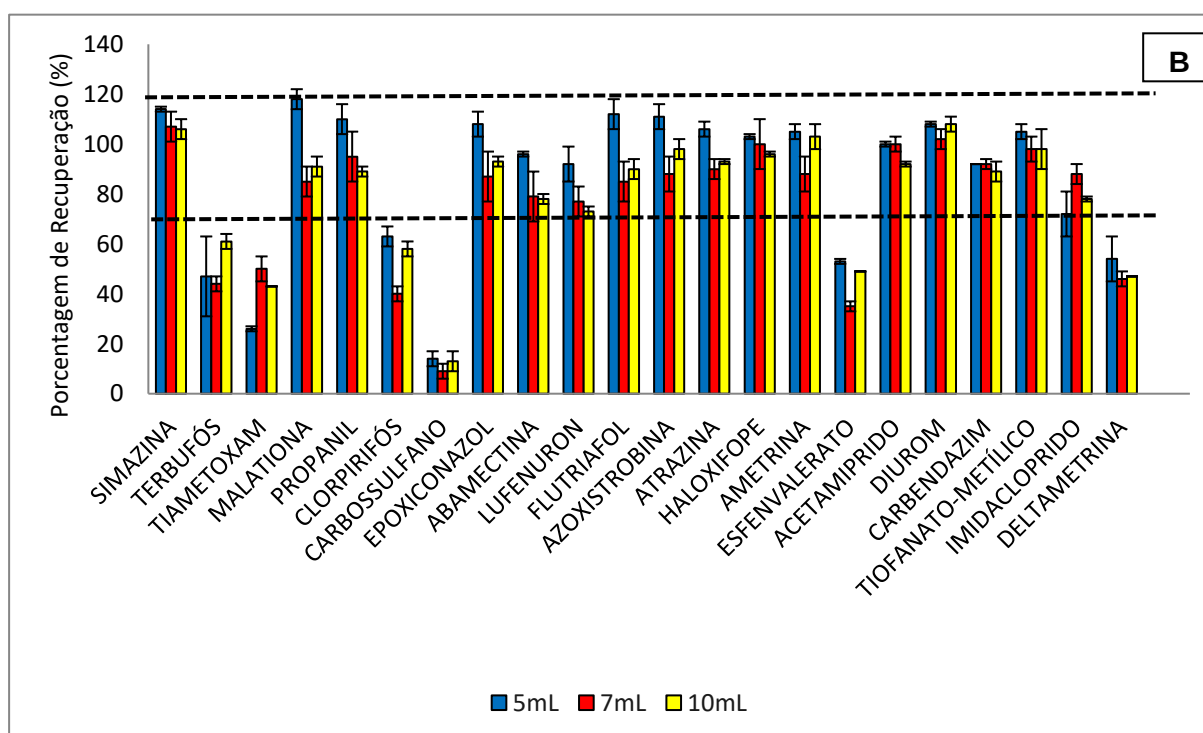
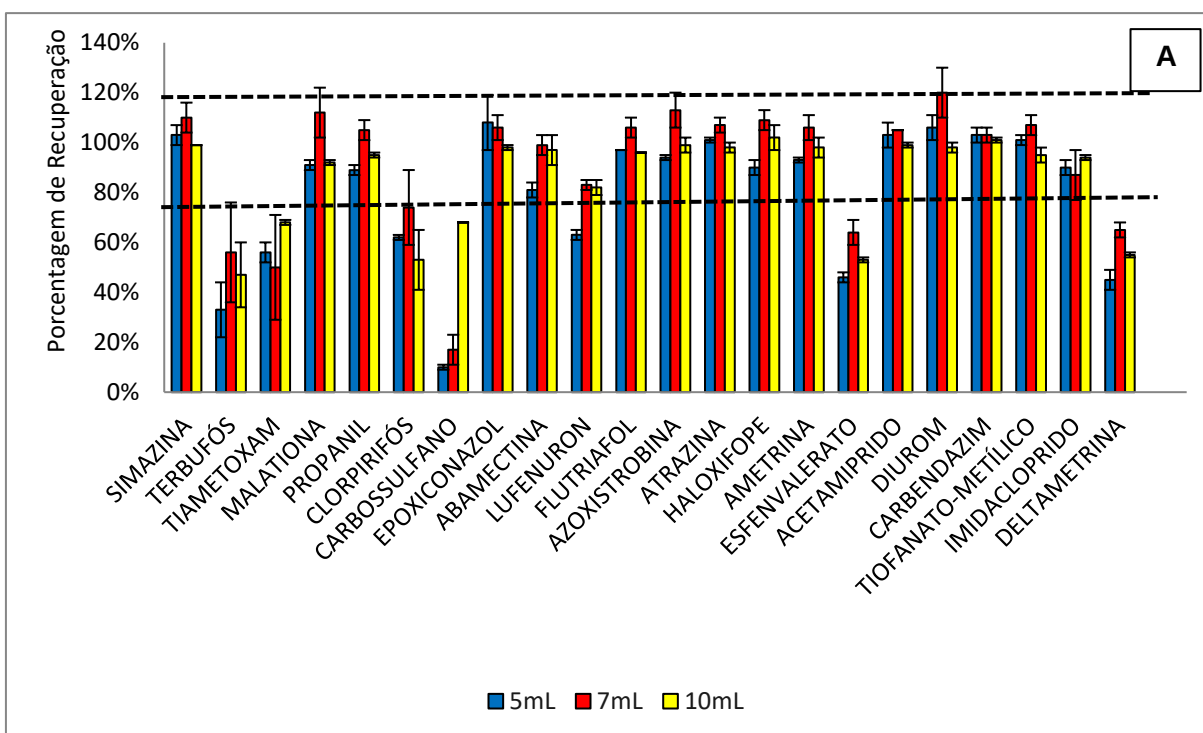
Os resultados mostraram que comparando as três quantidades de C18 os maiores valores de recuperação dos analitos foram obtidos ao reduzir a quantidade do adsorvente. Sendo que utilizar 500 mg e 150 mg de massa foram recuperados 15 analitos na faixa de $81 \pm 3\%$ - $108 \pm 11\%$ e $72 \pm 15\%$ - $92 \pm 3\%$, respectivamente. Ao utilizar 300 mg do adsorvente 16 analitos tiveram recuperação na faixa de $72 \pm 9\%$ - $118 \pm 4\%$. Os testes mostraram que mesmo reduzindo a quantidade de adsorvente ainda foi possível obter bons valores de recuperação sem interferir na eficiência da extração. Como o volume do solvente de eluição também é um dos parâmetros avaliados no desenvolvimento de método para SPE [59], foram testados três volumes de metanol como solvente de eluição para analisar se alterando esse parâmetro nas condições que foram propostas no tópico 5.4 aumentaria o número de analitos com recuperação na faixa de 70-120%.

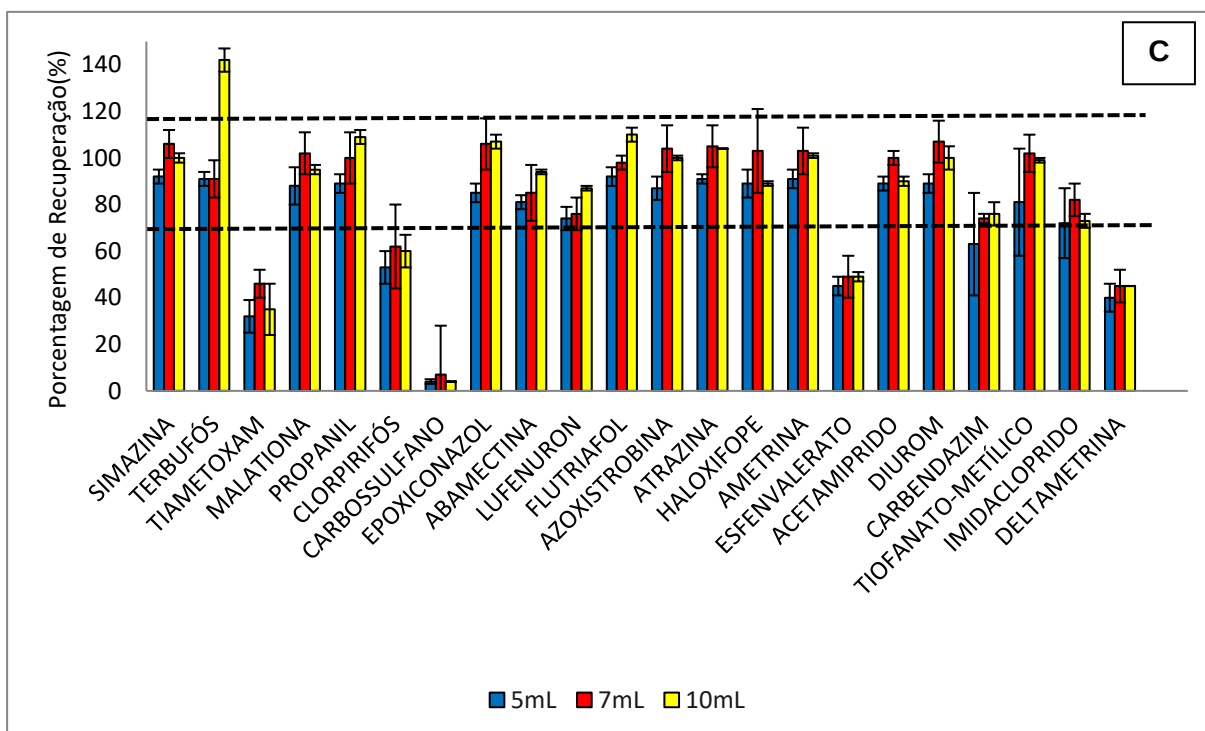
5.4.1. Seleção do volume do solvente de eluição

Ao desenvolver método por SPE, o ideal é utilizar um pequeno volume de solvente de forma que o eluente seja capaz de eluir os analitos, mas não os interferentes retidos no adsorvente [56].

Foram testados os volumes de 5, 7 e 10 mL de metanol para as três condições de quantidade de adsorvente que foram avaliados anteriormente, conforme pode ser observado na Figura 12 o quanto a variação de volume foi capaz de interferir na recuperação dos analitos.

Figura 12- Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500 (A), 300 (B) e 150 mg (C) de C18 e variando com 5, 7 e 10 mL de metanol como solvente de eluição.





Utilizando 500 mg de C18 e variando o volume do solvente de eluição (5, 7 e 10 mL, respectivamente) foram obtidos valores de recuperação entre $81 \pm 3\%$ - $108 \pm 11\%$, $82 \pm 2\%$ - $114 \pm 9\%$ e $82 \pm 3\%$ - $102 \pm 5\%$ para 16 dos 22 analitos, sendo que para a condição de 500 mg/5mL apenas 15 analitos tiveram recuperação entre 70 - 120%. Ao utilizar 300 mg de C18 nessas condições, 16 analitos recuperaram na faixa de $72 \pm 9\%$ - $118 \pm 4\%$, $77 \pm 6\%$ - $107 \pm 6\%$ e $73 \pm 2\%$ - $108 \pm 3\%$, conforme foi observado na Figura 12 (B). Enquanto que 150 mg/5 mL apresentou recuperação de 16 analitos com valores entre $72 \pm 7\%$ - $94 \pm 5\%$ e 17 analitos entre $74 \pm 2\%$ - $107 \pm 9\%$ e $73 \pm 3\%$ - $142 \pm 5\%$ ao utilizar o volume de 7 e 10 mL do solvente de eluição. Logo, em termos de otimizar as condições utilizando uma menor quantidade de adsorvente e um menor volume de solvente orgânico, a melhor condição encontrada foi 150 mg de C18 e 7 mL de eluente.

Os pesticidas tiametoxam, clorpirifós, carbossulfano, esfenvalerato e deltametrina tiveram recuperação de $46 \pm 6\%$, $62 \pm 18\%$, $7 \pm 21\%$, $49 \pm 9\%$ e $45 \pm 7\%$, respectivamente, nessas condições de trabalho. Esses compostos apresentam em comum um valor de $\log K_{ow}$ elevado em comparação com os demais pesticidas, com exceção o clorpirifós. Resultados semelhantes com baixa recuperação para o tiametoxam também foram observadas nos estudos de Pelajic *et al.*, 2016 [111] em amostras de vinho e isso era esperado devido ao tiametoxam ser pesticida polar,

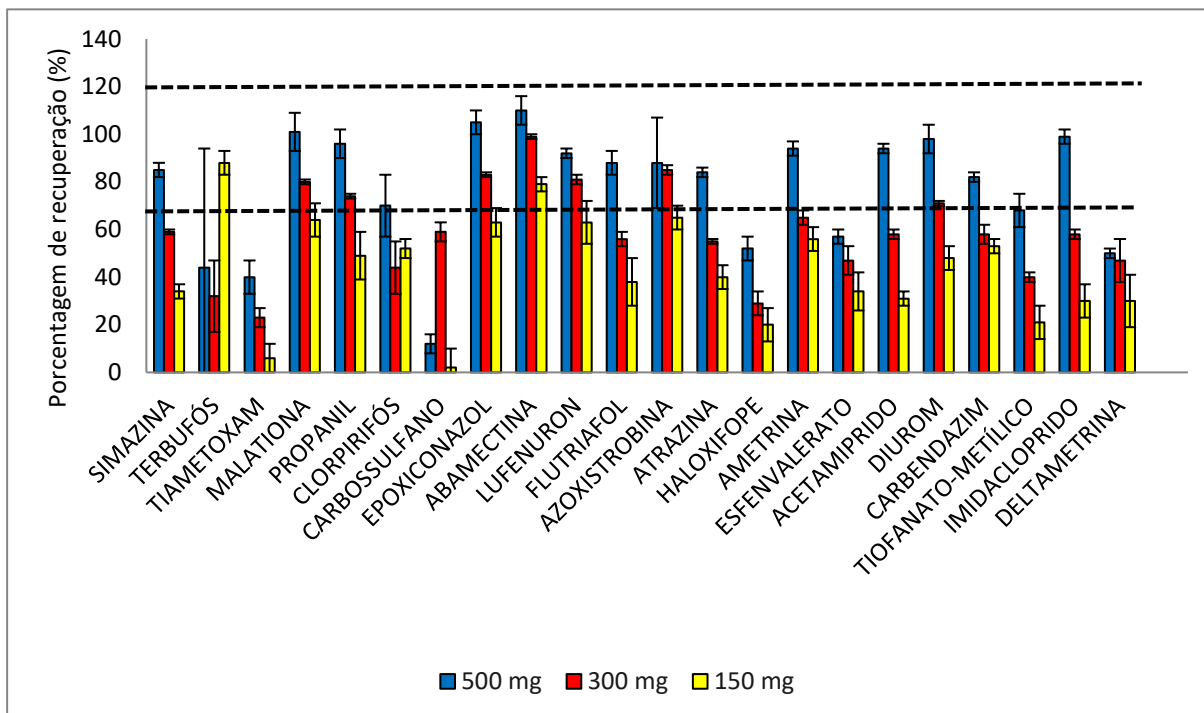
enquanto que o C18 é um adsorvente apolar. Esses pesticidas também apresentaram baixos valores de recuperação com os demais adsorventes avaliados. Além disso, a baixa recuperação desses analitos pode estar relacionada a complexidade da matriz ou os tipos de adsorventes que foram avaliados, visto que trabalhos envolvendo outras matrizes como a água apresentaram bons valores de recuperação para esses analitos [112,113].

Conforme os testes realizados para escolher o adsorvente que apresentava maior quantidade de analitos com elevadas recuperações, o florisil também obteve resultados satisfatórios para a maioria dos compostos. Logo, buscou-se avaliar as mesmas etapas de otimização que foram empregadas para o C18 e, por fim, definir qual adsorvente e condições seriam as melhores.

5.5. Seleção da quantidade de florisil

A quantidade de adsorvente utilizado na SPE é um dos parâmetros iniciais avaliados. Pois a redução dessa quantidade é capaz de interferir na recuperação dos analitos. Assim, também foi avaliado inicialmente a quantidade de 500 mg e, em seguida, reduziu essa quantidade para 300 e 150 mg avaliando a quantidade que recuperava melhor os analitos utilizando 5 mL de metanol. Esses resultados podem ser observados na Figura 13.

Figura 13- Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500, 300 e 150 mg de florissil com 5 mL de metanol como solvente de eluição.



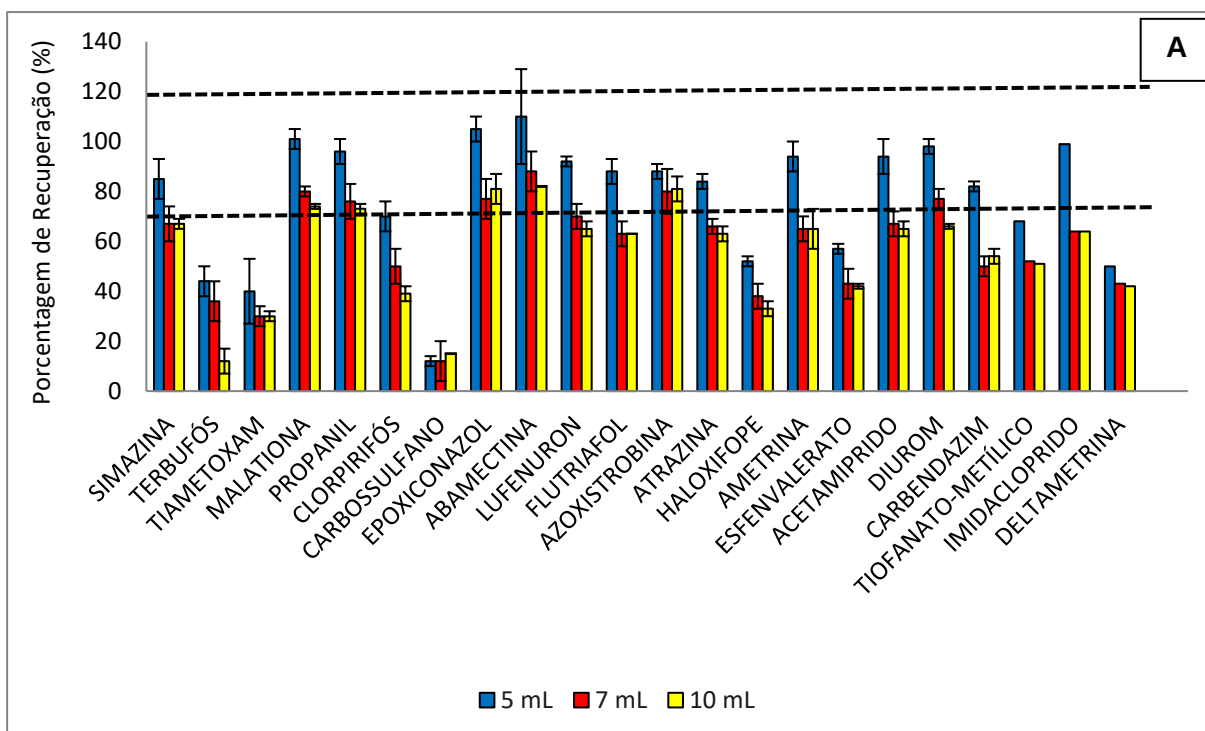
Os resultados mostraram que a diminuição da quantidade do adsorvente reduziu na eficiência da extração diminuindo a recuperação dos analitos na faixa de 70 - 120%. Na condição de 500 mg de florissil, 15 analitos apresentaram valores de recuperação entre $70 \pm 13\%$ - $110 \pm 6\%$, mas ao reduzir a massa para 300 mg, apenas 7 analitos tiveram recuperação entre $71 \pm 0\%$ - $98 \pm 0\%$ e continuando a redução para 150 mg, somente 2 analitos tiveram recuperações que variaram de $79 \pm 3\%$ - $88 \pm 5\%$. Da mesma forma que foram realizados os testes com o C18, a etapa de otimização seguiu com a seleção do volume de solvente de eluição capaz de recuperar mais analitos e essa variação de volume foi avaliado para todas as quantidades de adsorvente testadas anteriormente.

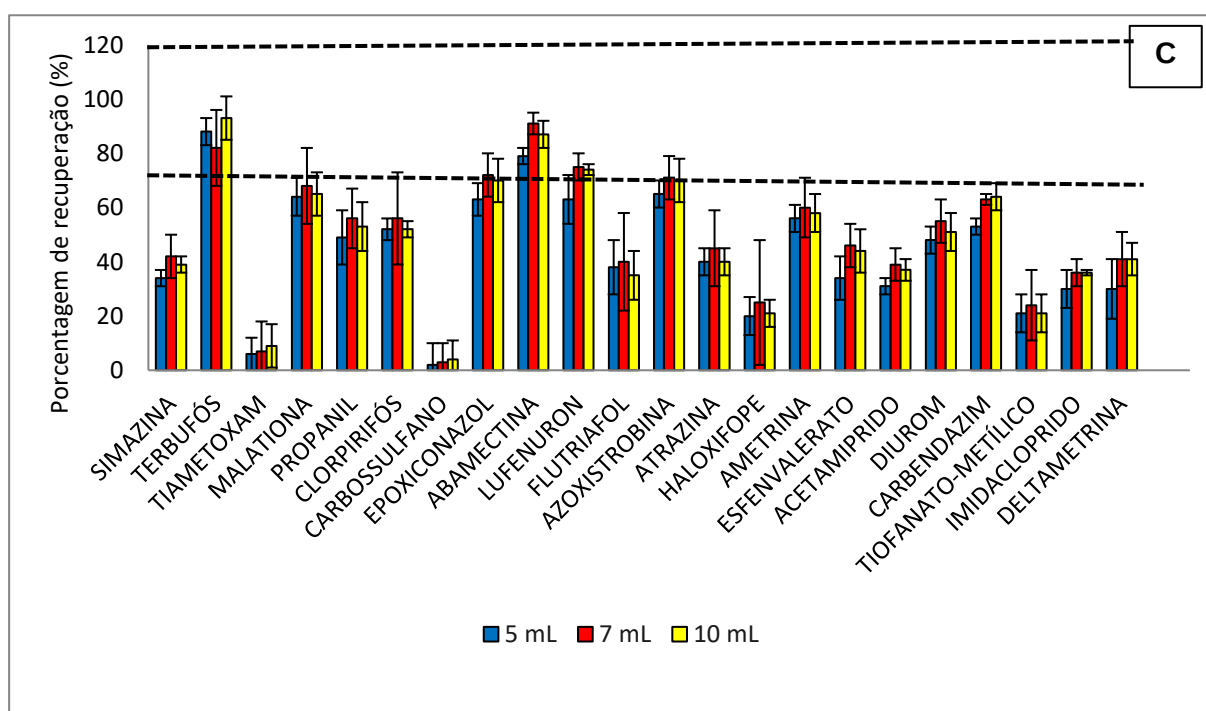
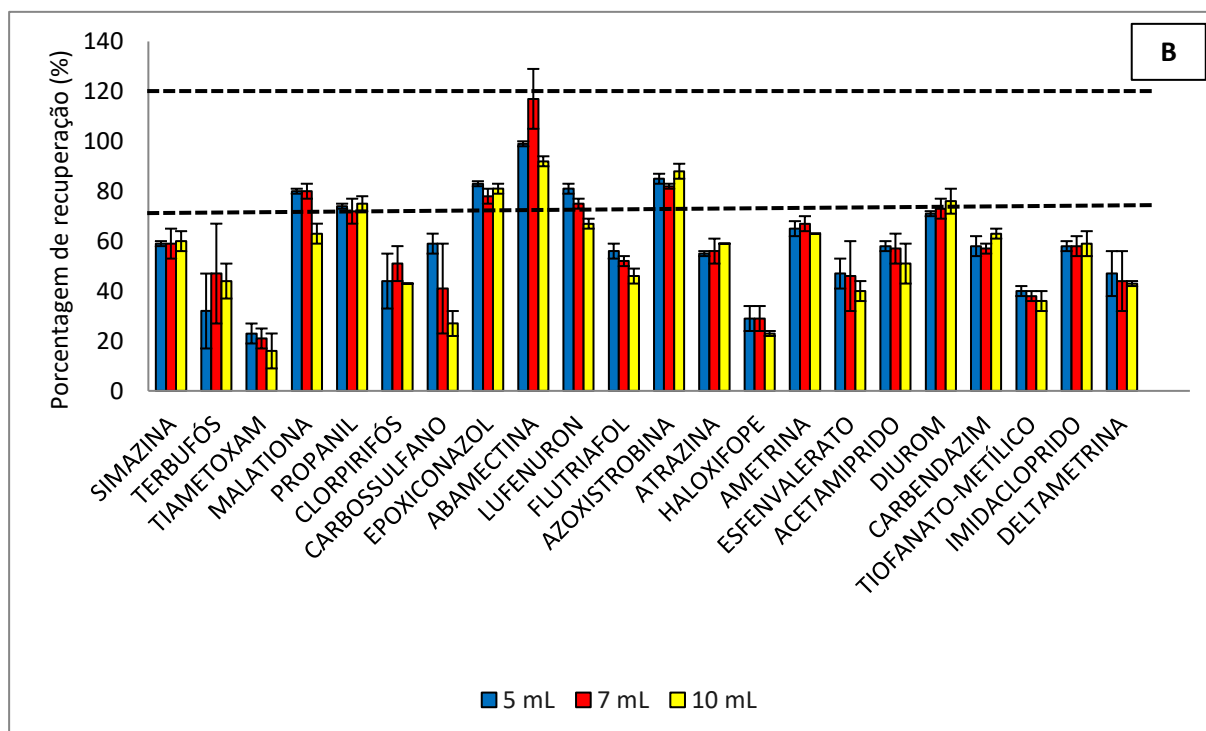
5.5.1. Seleção do volume de solvente de eluição para o florissil

Conforme procedimento também adotado ao trabalhar com o C18 foram avaliados os volumes de 5, 7 e 10 mL do solvente de eluição para verificar que condição apresentava os melhores resultados e, conseqüentemente, obter o resultado

mais satisfatório para a maioria dos compostos avaliados. A Figura 14 (A), (B) e (C) mostra como a variação da quantidade de adsorvente e solvente de eluição influenciou na recuperação de cada analito.

Figura 14- Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 500 (A), 300 (B) e 150 mg (C) de florisil e variando com 5, 7 e 10 mL de metanol como solvente de eluição.





Os gráficos da Figura 14 mostraram que variar o volume do solvente de eluição não resultou em um aumento na recuperação dos analitos. Para a condição de 500 mg do adsorvente foi mais favorável utilizar o volume de 5 mL de metanol, recuperando 15 analitos na faixa de $70 \pm 13\%$ - $110 \pm 6\%$ enquanto que ao aumentar o volume do solvente para 7 mL reduziu as recuperações e apenas 7 analitos

recuperaram na faixa de $70 \pm 8\%$ - $80 \pm 7\%$, enquanto que 5 analitos tiveram recuperação entre $73 \pm 5\%$ - $82 \pm 3\%$, utilizando 10 mL de metanol para eluição.

Os testes seguiram para a condição de 300 mg de florisil e os resultados obtidos foram de 7 analitos com recuperação entre $71 \pm 0\%$ - $98 \pm 0\%$ ao utilizar 5 mL do solvente e a mesma quantidade prevaleceu ao utilizar 7 mL, mas as recuperações variaram de $72 \pm 5\%$ - $117 \pm 12\%$. Enquanto que aumentando o volume para 10 mL resultou em recuperações de somente 5 analitos na faixa de $75 \pm 3\%$ - $92 \pm 2\%$.

Na condição de 150 mg de florisil foi recuperado 5 analitos na faixa de $71 \pm 8\%$ - $91 \pm 4\%$ e $70 \pm 8\%$ - $93 \pm 8\%$, respectivamente, ao utilizar os volumes de 7 e 10 mL de eluente. Ao utilizar 5 mL, apenas 2 analitos estiveram na faixa de $79 \pm 3\%$ - $88 \pm 5\%$. Logo, os analitos apresentaram baixas recuperações ao reduzir a quantidade de adsorvente e ao aumentar o volume do solvente de extração para todas as condições avaliadas.

Os pesticidas polares irão permanecer adsorvidos no suporte sólido do cartucho devido às interações dipolo-dipolo entre o adsorvente e os analitos. A simazina e o imidacloprido apresentam valores de pKa próximos (1,62 e 1,56, respectivamente), mas o imidacloprido apresenta uma maior massa molar e, consequentemente, as moléculas migram mais lentamente através da camada do adsorvente, fazendo assim com que ocorra uma menor recuperação ao reduzir a quantidade do florisil como adsorvente, fato que também foi observado nos estudos de Jaroszynska *et al.*, 2003 [114]. No caso da deltametrina, os resultados concordam com os estudos de Tsochatzis, Menkissoglu-Spiroudi, Karpouzas e Tzimou-Tsitouridou (2010) [115], que avaliaram a extração desse analito no arroz e também obtiveram baixas recuperações.

Foi verificado que variar os parâmetros com relação a quantidade de adsorvente e solvente de extração não foi uma boa escolha ao trabalhar com florisil, pois essa variação interferiu de forma significativa nos resultados. Em estudos anteriores como o de Silva *et al.*, 2019 [92] o silicato de magnésio (Florasil®MgAl(SiO₄)_n) foi empregado na etapa de limpeza da d-SPE do método QuEChERS com acetonitrila como solvente de extração, seguida de GC-MS/MS para determinação de resíduos de pesticidas em cerveja e tal adsorvente foi capaz de apresentar cromatogramas mais limpos e com resultados de recuperação

satisfatórias, indicando dessa forma que pode ser uma boa alternativa para ser utilizada na etapa de limpeza em outro procedimento de extração e/ou utilizando de uma outra técnica cromatográfica.

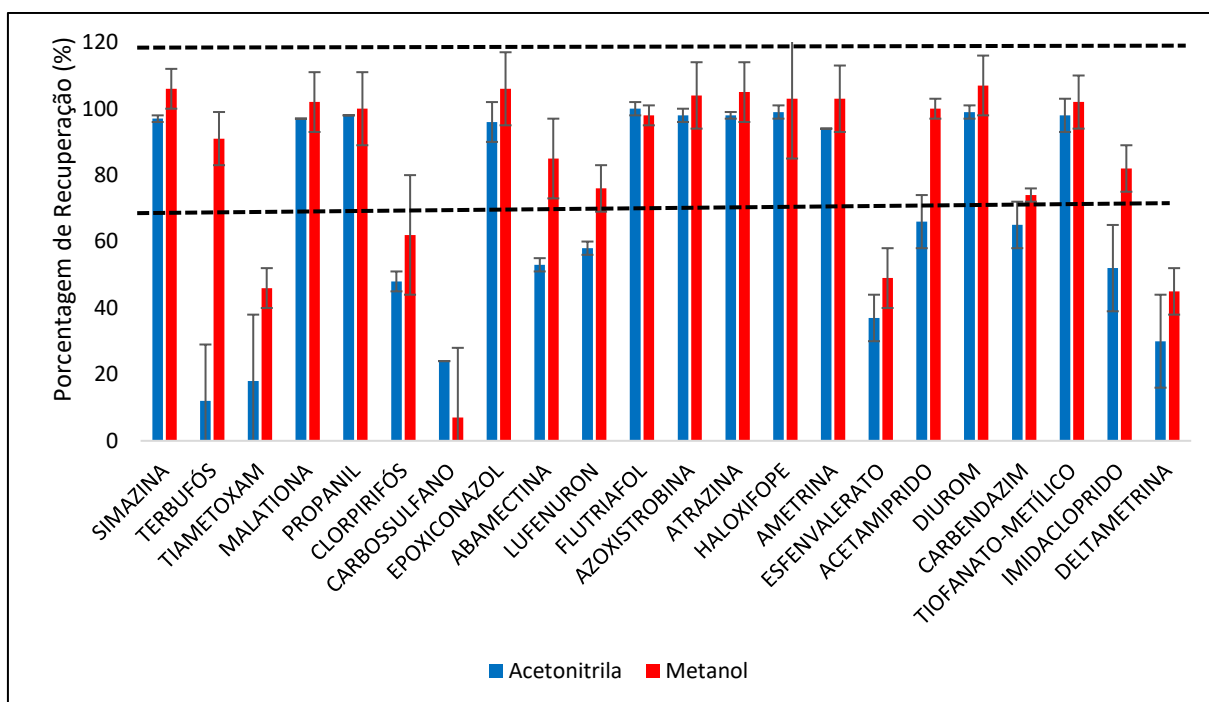
Logo, através dos testes realizados com os dois adsorventes foi definida que a melhor condição para os parâmetros estudados é trabalhar com 150 mg de C18 e 7 mL de metanol como solvente de eluição. E, com os parâmetros tipo e quantidade de adsorvente, volume de solvente de eluição definidos, buscou-se avaliar a eficiência da acetonitrila e mistura de metanol com diclorometano como possível solvente extrator. Verificando dessa forma qual solvente seria capaz de recuperar os demais analitos que não apresentaram resultados satisfatórios ao utilizar metanol.

5.6. Teste utilizando acetonitrila como solvente de eluição

A natureza do solvente de eluição é de grande importância uma vez que, os analitos alvo devem ser eficientemente dessorvidos e os componentes da matriz devem ser retidos na coluna [56].

A acetonitrila é um solvente ideal ao trabalhar com cromatografia líquida de fase reversa e SPE devido a baixa viscosidade e sua alta polaridade [16]. Estudos como de Pelajic *et al.*, 2016 [111] avaliaram acetonitrila como solvente de eluição para SPE na determinação de pesticidas em matrizes alcoólicas e os resultados mostraram elevadas recuperações dos analitos em presença desse solvente. Essas altas recuperações podem ser relacionadas ao fato que a acetonitrila apresenta uma grande miscibilidade com água e tem características hidrofílicas o suficiente para garantir uma maior eficiência de extração de pesticidas polares e apolares [116]. Então, foi avaliado a eficiência desse solvente em relação a propor uma maior recuperação dos analitos em comparação com o metanol nas mesmas condições. Os valores de recuperação obtidos para todos os analitos foram dispostos no gráfico de barras apresentado na Figura 15.

Figura 15- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg de C18 e ao utilizar 7 mL de acetonitrila e metanol como solvente de eluição.



As recuperações dos analitos utilizando acetonitrila como solvente de eluição variaram de $12 \pm 17\%$ - $100 \pm 2\%$ tendo nesse intervalo apenas 11 dos 22 pesticidas em estudo com recuperação entre 70 - 120%, enquanto que ao utilizar o metanol nas mesmas condições, os valores de recuperação tiveram na faixa $74 \pm 2\%$ - $107\% \pm 9\%$ para 17 analitos. Dessa forma, utilizar acetonitrila para esses pesticidas e nessas condições apresentou uma menor recuperação dos analitos em comparação com o metanol.

Os pesticidas como terbufós, tiametoxam, malationa, clorpirifós, carbossulfano, abamectina, lufenuron, esfenvalerato, acetamiprido, carbendazim, imidacloprido e deltametrina pertencem a diferentes grupos químicos e não foram recuperados satisfatoriamente ao serem eluídos com acetonitrila, exceto a malationa que teve uma recuperação de $97 \pm 0\%$. Mas ao ser eluído com metanol apenas o tiametoxam, clorpirifós, carbossulfano, esfenvalerato e deltametrina não tiveram boas recuperações e foi visto anteriormente que provavelmente está relacionado ao fato de apresentarem um $\log K_{ow}$ elevado, com exceção do tiametoxam, e quanto maior o valor de $\log K_{ow}$ maior tendência tem de ser adsorvido e mais hidrofóbico é o pesticida [101,102].

Visto que a acetonitrila não foi capaz de ser tão eficiente para eluição desses analitos, foi avaliado o comportamento desses pesticidas na presença de um solvente de média polaridade, como o diclorometano, através da mistura com o metanol em diferentes proporções. Os tópicos subsequentes apresentam os resultados obtidos para as condições avaliadas.

5.7. Testes avaliando metanol e diclorometano em diferentes proporções

Devido a maioria dos analitos em estudo serem compostos apolares e de polaridade intermediária buscou-se avaliar se utilizando uma mistura com solvente de polaridade intermediária seria capaz de apresentar uma força eluente suficiente para quebrar a ligação dos analitos com a superfície do adsorvente e, dessa forma, resultar em melhores percentuais de recuperação para os compostos que tiveram nos testes realizados anteriormente resultados abaixo de 70%.

Para constituir a mistura de solventes foi escolhido o diclorometano (DCM) devido ser um solvente de média polaridade. Além disso, o DCM apresenta uma força de eluição de 0,32 e o metanol que é um solvente polar tem uma força eluente com valor eluotrópico equivalente a 0,73. Portanto, uma mistura desses solventes poderá apresentar uma força eluente intermediária capaz de favorecer a eluição desses analitos [59].

Foram avaliados a mistura de metanol/diclorometano (MeOH/DCM) em diferentes proporções e os respectivos valores de força eluotrópica para cada condição estão apresentados na Tabela 8.

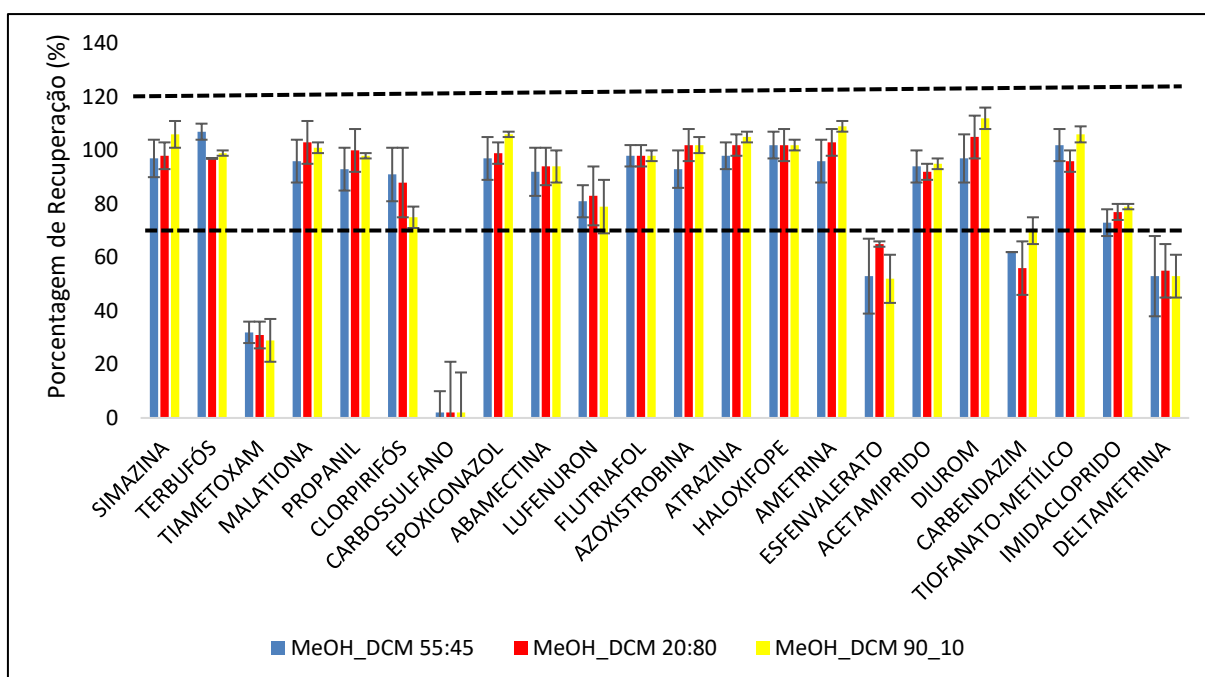
Tabela 8: Força eluotrópica da mistura dos solventes em diferentes proporções [105].

SOLVENTE	FORÇA ELUOTRÓPICA (ϵ°)
MeOH: DCM (20:80, v/v)	0,63
MeOH: DCM (55:45, v/v)	0,54
MeOH: DCM (90:10, v/v)	0,69

Com base nesses valores eluotrópicos para cada mistura buscou-se avaliar ao utilizar a condição de 150 mg do C18 e 7 mL das três diferentes condições da mistura MeOH:DCM e assim, verificar qual condição de alteração da força eluente apresentaria um maior número de analitos com recuperação na faixa de 70 – 120%.

Os resultados nas condições avaliadas estão expressos na forma de gráfico na Figura 16.

Figura 16- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg de C18 e ao utilizar 7 mL de MeOH:DCM em diferentes proporções.



Os resultados mostraram que para todas as condições avaliadas, com exceção o tiametoxam, carbossulfano, esfenvalerato e deltametrina apresentaram percentuais de recuperação na faixa de 70 – 120%. O clorpirifós é um dos analitos que apresentava recuperação abaixo de 70% na maioria dos testes realizados anteriormente, mas ao ser eluído com MeOH:DCM passou a ter valores de recuperação dentro da faixa. Logo, é possível considerar que utilizar o solvente de média polaridade favoreceu uma melhor eluição desse analito.

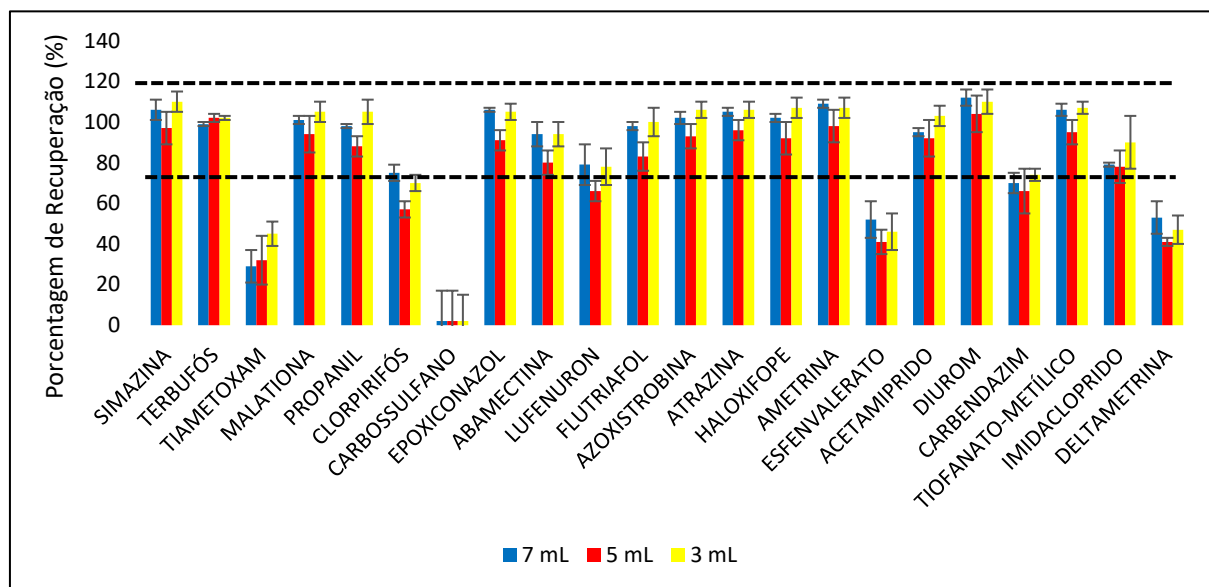
É válido ressaltar que o carbossulfano apresentou baixos valores de recuperação além de elevado desvio padrão em todos os testes avaliados anteriormente e isso é consequência da sua instabilidade podendo facilmente degradar em carbofurano ou 3 – hidroxicarbofurano [117].

Devido ao emprego do DCM ter favorecido as interações com o clorpirifós e resultado em boas recuperações para esse analito, além de aumentar a percentagem de recuperação para alguns pesticidas como azoxistrobina e haloxifope, foi considerado como adequado utilizar a mistura de MeOH:DCM para eluir esses compostos.

Ao avaliar essas três condições na proporção dos solventes percebe-se proximidade do quantitativo de analitos com recuperação acima de 70%. Logo, optou-se por utilizar a proporção com o menor volume de DCM devido ser um solvente de impacto ambiental [118].

Assim, utilizar 150 mg de C18 com 7 mL de MeOH:DCM 90:10 foi favorável para garantir um bom quantitativo de analitos com valores de recuperação entre 70 – 120 %. Posteriormente para verificar o comportamento desses analitos a medida que o volume do solvente de eluição era reduzido, foram avaliados os volumes de 5 e 3 mL de MeOH:DCM 90:10 e os resultados obtidos estão expressos na Figura 17.

Figura 17- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg de C18 e avaliando o volume de 7, 5 e 3 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v) como solvente de eluição.

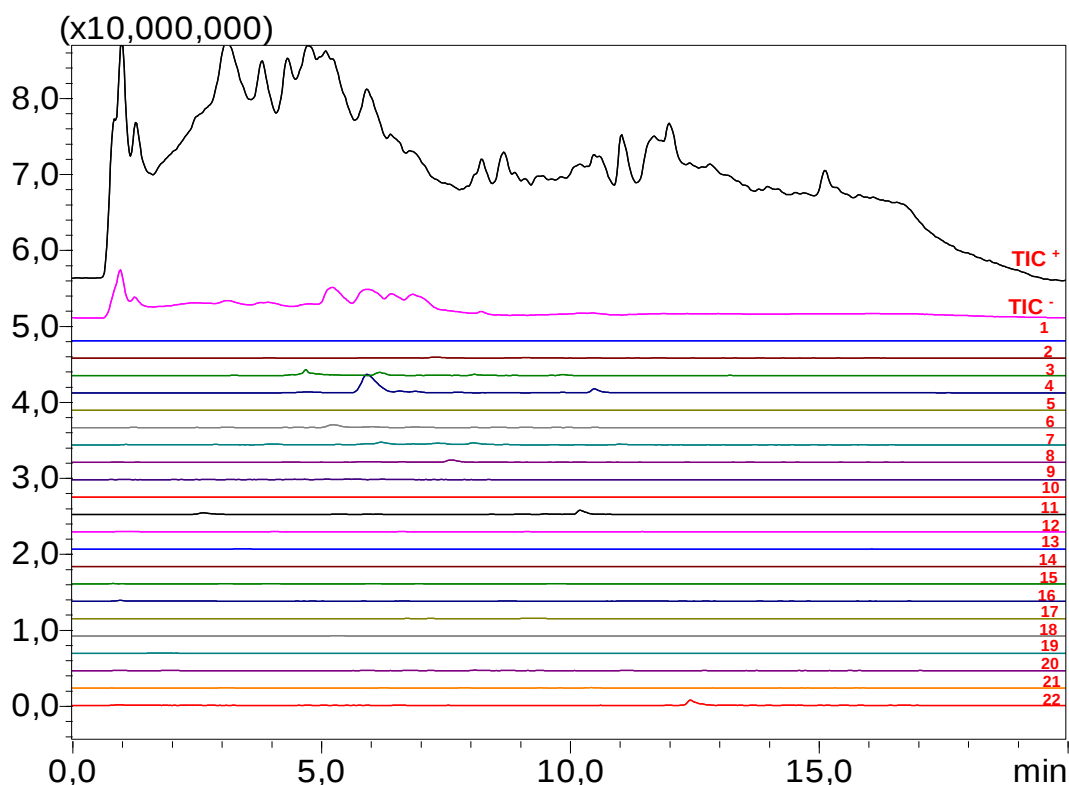


Os resultados apresentados na Figura 17 mostraram que mesmo reduzindo o volume de solvente ainda foi possível obter bons valores de recuperação para o mesmo quantitativo de analitos que tiveram recuperação acima de 70% utilizando 7 mL de eluente. Consequentemente, com o intuito de reduzir o uso de solvente orgânico e mesmo assim garantir a eficiência de extração, optou-se por utilizar 3 mL de eluente já que é o suficiente para recuperar satisfatoriamente esses analitos.

Portanto, diante os testes que foram investigados foi possível concluir que para o C18 a melhor condição para uma boa eficiência de extração no método por SPE seria utilizar 150 mg de adsorvente e 3 mL de MeOH:DCM 90:10, v/v no qual, 18 dos 22 pesticidas estudados tiveram recuperação entre 70 – 120%.

Posteriormente se fez necessário avaliar o branco do extrato para verificar possíveis interferentes no tempo de retenção dos analitos e dessa forma propor uma etapa de limpeza para o método. A Figura 18 abaixo mostra no modo varredura (SCAN) o branco para a melhor condição de extração otimizada.

Figura 18- Cromatogramas do branco do extrato de cerveja por SPE, utilizando 150 mg de C18, 10 mL de amostra e 3 mL de metanol/diclorometano (90:10, v/v). Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.



1-simazina; 2-terbufós; 3-tiametoxam; 4-malationa; 5-propanil; 6-clorpirifós; 7-carbossulfano; 8-epoxiconazol; 9-abamectina; 10-lufenuron; 11-flutriafol; 12-azoxistrobina; 13-atrazina; 14-haloxifope; 15-ametrina; 16-esfenvalerato; 17-acetamiprido; 18-diurum; 19-carbendazim; 20-tiofanato-metílico; 21-imidacloprido; 22-deltametrina.

Os cromatogramas apresentados na Figura 18 não apresentam compostos da matriz com relação massa/carga no mesmo tempo de retenção dos pesticidas estudados, não havendo, portanto, necessidade de propor uma etapa de limpeza no procedimento de extração. Os picos mais intensos que estão presentes na corrente total de íons (TICC) podem ser advindos da matriz.

Ressalta-se que foi possível otimizar uma condição com o adsorvente comercial C18 na qual foi eficiente para a matriz cerveja e os 22 pesticidas avaliados. Ademais, buscou avaliar um adsorvente alternativo como o biocarvão e dessa forma, averiguar se seria possível obter uma eficiência de extração tão boa quanto ao utilizar um adsorvente comercial.

Nos tópicos subsequentes são apresentados os estudos que foram realizados ao se utilizar biocarvões de diferentes biomassas como adsorvente alternativo para o SPE.

5.8. Avaliação de biocarvões de diferentes biomassas como adsorvente para SPE

A utilização de adsorventes alternativos vem se mostrando bastante promissora no desenvolvimento de métodos para extração de compostos poluentes. O biocarvão é produzido através da queima da biomassa em elevadas temperaturas e suas características como ampla área superficial e presença de grupos funcionais em sua estrutura favorecem a capacidade de adsorção desse material permitindo a retenção de compostos poluentes [119].

O biocarvão produzido de diferentes biomassas tem chamado atenção devido ser uma alternativa frente aos adsorventes convencionais por ser um material rico em oxigênio, grupos funcionais (por exemplo, OH, C=O, COOH) e vários minerais (S, Na, Ca, K) tendo assim, várias aplicabilidades na remoção de poluentes [120].

Os tópicos subsequentes apresentam estudos realizados visando a eficiência do biocarvão do sabugo de milho, biocarvão de aguapé e biocarvão da semente de uva para extração de pesticidas em cerveja.

5.8.1. Teste com o biocarvão do sabugo de milho

Estudos de Ji *et al.*, 2020 [120] avaliaram a eficiência do biocarvão de sabugo de milho para adsorção de poluentes aromáticos como PAHs em amostras de água e verificaram boa capacidade de adsorção resultantes das interações $\pi - \pi$ da superfície do adsorvente com a estrutura dos analitos.

Para o desenvolvimento desse trabalho o biocarvão do sabugo de milho foi obtido através da pirólise em uma temperatura de 400 °C. Dentre suas caracterizações, o biocarvão ativado com ácido e base (BCA) apresentou ânions de

carga negativa favoráveis a adsorção de pesticidas catiônicos através da atração eletrostática, além da presença de grupos ácidos em sua estrutura e alguns grupos funcionais como ácido carboxílico, carbonila, grupos alquilas e uma estrutura heterogênea com elevadas quantidades de carbonos [121].

O BCA também foi caracterizado pela presença de silício favorecendo adsorção com compostos polares e uma área superficial de $99,59 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ com volume dos poros de $0,265 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ que é capaz de favorecer adsorção para os analitos em estudo [121].

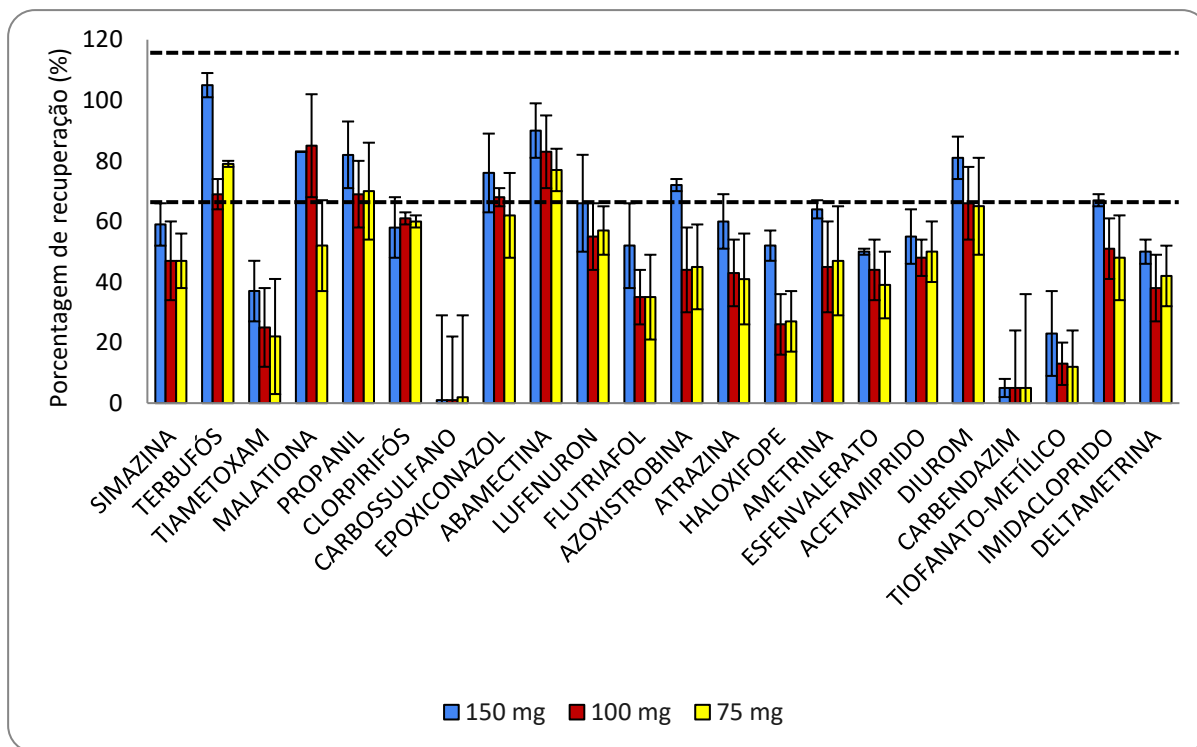
Inicialmente a análise de adsorção dos pesticidas ao biocarvão foi avaliado ao método otimizado para o C18 e reduzindo a quantidade do adsorvente. Posteriormente, foram otimizadas as condições para o BCA variando os parâmetros de proporção da mistura de solventes e tipo do solvente de eluição que fosse mais favorável para adsorção dos pesticidas em estudo nesse adsorvente alternativo.

5.8.1.1. Seleção da quantidade do biocarvão de sabugo de milho

A seleção da quantidade do BC foi avaliada de forma a verificar eficiência de extração ao reduzir a quantidade do adsorvente, visto que suas caracterizações mostraram presença de grupos funcionais e elevada porosidade que consequentemente, poderia favorecer capacidade de retenção ao utilizar uma menor quantidade desse adsorvente sem possivelmente comprometer nos ensaios de recuperação.

Conforme é apresentado na Figura 19, procurou-se avaliar a eficiência de adsorção ao utilizar as quantidades de 150, 100 e 75 mg do biocarvão.

Figura 19- Percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150, 100 e 75 mg de biocarvão com 3 mL de MeOH:DCM (90:10 v/v), como solvente de eluição.



A adsorção dos pesticidas atingiu melhores valores de recuperação ao utilizar uma maior quantidade de adsorvente, possivelmente devido à cobertura de saturação nos locais de adsorção [122]. A presença de grupos polares (grupos hidroxila e carboxila) no BC (observado por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR) deve promover a adsorção de pesticidas com alta polaridade sendo suportados na superfície sorvente. Além disso, a interação π - π entre o carbono aromático do BC e os anéis de piridina das moléculas de imidacloprido e acetamiprido pode bloquear e impedir que outras moléculas acessem o sítio de ligação na superfície externa do BC, resultando em capacidades de adsorção menores [121].

É perceptível observar que ao empregar o BC utilizando as condições otimizadas para o C18 (150 mg/3 mL MeOH:DCM 90:10) apenas 7 dos 22 analitos tiveram recuperação entre 70 – 120%. Dentre esses pesticidas, o propanil, malationa, epoxiconazol, diurom e azoxistrobina apresentaram bons valores de recuperação e isso pode estar relacionado ao fato de serem compostos de polaridade intermediária e apresentarem grupos favoráveis para ocorrer ligação de hidrogênio com a superfície

do BC, além de não apresentarem impedimentos estéricos capazes de dificultar no processo de adsorção.

A simazina, atrazina, lufenurom, flutriafol e imidacloprido apesar de apresentarem grupos favoráveis para a ocorrência de ligação de hidrogênio e do tipo $\pi - \pi$ recuperaram ligeiramente próximo a faixa o que pode está relacionado a dificuldade de adsorção devido ao impedimento estérico de suas estruturas.

Pequenas recuperações para o tiametoxam, haloxifope, esfenvalerato, acetamiprido, carbendazim, tiofanato-metílico e deltametrina podem está relacionada a presença dos anéis aromáticos em suas estruturas favorecendo interações mais fracas do tipo $\pi - \pi$, além do processo de adsorção ter sido influenciado pelo impedimento estérico.

Logo, ao reduzir a quantidade de BC ocorreu também uma redução do número de recuperação para os analitos indicando dessa forma que a diminuição de sítios para adsorção dificultou a ligação dos analitos na superfície do adsorvente.

Devido ao baixo quantitativo de analitos com valores de recuperação na faixa que é estabelecido pela ANVISA, foi elevado o volume do solvente de eluição para 10 mL conforme é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão do sabugo de milho, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v).

Pesticidas	Recuperação $\pm$ RSD%	
	3 mL	10 mL
Simazina	59 $\pm$ 7	58 $\pm$ 15
Terbufós	105 $\pm$ 4	52 $\pm$ 4
Tiametoxam	37 $\pm$ 10	32 $\pm$ 14
Malationa	83 $\pm$ 0	61 $\pm$ 18
Propanil	82 $\pm$ 11	79 $\pm$ 7
Clorpirifós	58 $\pm$ 10	59 $\pm$ 11
Carbossulfano	1 $\pm$ 28	2 $\pm$ 57
Epoxiconazol	76 $\pm$ 13	69 $\pm$ 10
Abamectina	90 $\pm$ 9	78 $\pm$ 6
Lufenurom	66 $\pm$ 16	65 $\pm$ 9
Flutriafol	52 $\pm$ 14	43 $\pm$ 17
Azoxistrobina	72 $\pm$ 2	50 $\pm$ 17
Atrazina	60 $\pm$ 9	53 $\pm$ 14
Haloxifope	52 $\pm$ 5	36 $\pm$ 21
Ametrina	64 $\pm$ 3	61 $\pm$ 19
Esfenvalerato	50 $\pm$ 1	48 $\pm$ 10
Acetamiprido	55 $\pm$ 9	63 $\pm$ 15
Diurom	81 $\pm$ 7	79 $\pm$ 9
Carbendazim	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 4
Tiofanato-metílico	23 $\pm$ 14	17 $\pm$ 21
Imidacloprido	67 $\pm$ 2	67 $\pm$ 17
Deltametrina	50 $\pm$ 4	53 $\pm$ 6

As características do biocarvão mostraram que esse adsorvente apresenta em sua estrutura tanto grupos de cadeias alquílicas quanto grupos funcionais com a presença do oxigênio. Portanto, o processo de adsorção poderá ocorrer de diversas

maneiras através de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interação $\pi - \pi$, dentre outras [120].

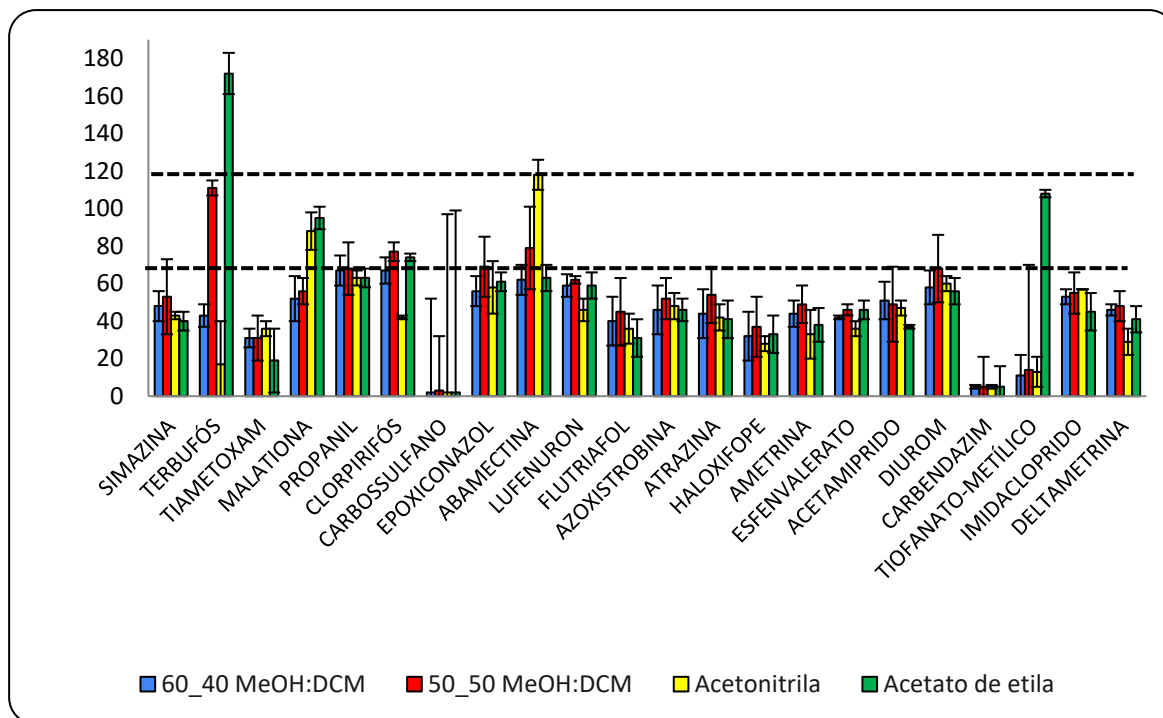
Os resultados obtidos mostraram que para esse biocarvão apenas 7 dos 22 pesticidas apresentaram recuperação entre $72 \pm 2\%$ - $105 \pm 4\%$ e a medida que aumentou o volume de eluição ocorreu uma redução na recuperação da maioria dos analitos, indicando que possivelmente uma maior quantidade de solvente não favoreceu maior eluição.

Por sua vez, foi verificado um maior número de recuperação ao utilizar uma menor quantidade de solvente. Assim, foi avaliado outros eluentes para verificar se tais testes resultariam em melhores resultados para esses analitos.

5.8.1.2. Testes variando o solvente de eluição

Inicialmente foi variada a proporção de solvente de forma que viesse a apresentar uma força eluente superior que fosse capaz de eluir os analitos que estavam retidos no adsorvente. Posteriormente, buscou verificar se utilizando acetonitrila ou acetato de etila por serem solventes polar e de polaridade intermediária, respectivamente, seriam capazes de eluir melhor os analitos em estudo. Todas as condições avaliadas foram realizadas utilizando 150 mg do biocarvão e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 20.

Figura 20- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg do biocarvão do sabugo de milho e 3 mL de diferentes solventes de eluição.



Ao variar a proporção dos solventes a força de eluição passou a ser 0,58 (MeOH:DCM 60:40, v/v) e 0,52 (MeOH: DCM 50:50, v/v) e apenas o terbufós, clorpirifós e abamectina tiveram recuperações na faixa 70 – 120%. Ressalta-se que da mesma forma que ocorreu ao utilizar o C18 como adsorvente, o diclorometano favoreceu a recuperação do clorpirifós da mesma forma que também apresentou bom percentual de recuperação ao ser eluído com o acetato de etila. Confirmando assim que esse analito é melhor eluído na presença de um solvente de polaridade intermediária. Mas em contrapartida esses solventes avaliados não foram adequados para os demais pesticidas.

A acetonitrila é um solvente polar bastante utilizado e o acetato de etila é um solvente com propriedades moderadamente polares, sendo assim um bom solvente de extração [123]. Os resultados obtidos mostraram que utilizar esses solventes não foi adequado para favorecer a recuperação de um maior número de pesticidas, indicando dessa forma que devido aos compostos avaliados apresentarem grupos aminas, ácidos carboxílicos e heteroátomos de oxigênio facilmente podem formar ligação de

hidrogênio com a superfície do adsorvente e dessa forma gerar uma sorção irreversível desses analitos.

Além disso, uma segunda possibilidade é o fato do biocarvão ser oriundo de milho assim como a própria matriz analisada e isso pode ter favorecido a baixa adsorção para os analitos através da competição existente entre constituintes da matriz e do adsorvente. Logo, foi necessário avaliar um outro biocarvão pertencente a outra biomassa para verificar qual seria o comportamento dos pesticidas perante esse adsorvente.

5.8.2. Teste com biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo

Dentre as características apresentadas pelo biocarvão de aguapé obtido em uma temperatura de pirólise de 400 °C destaca-se a presença de diversos minerais e grupos funcionais indicando uma elevada aromaticidade e assim, elevadas funcionalidades, além de uma ampla área superficial com poros irregulares e fibrosos que favorece o poder de adsorção para esse adsorvente [124].

Para o biocarvão de aguapé as condições avaliadas foram as mesmas vistas anteriormente com o biocarvão do sabugo de milho em termos de variação de solvente de eluição. Inicialmente buscou verificar o comportamento dos pesticidas em presença desse biocarvão na condição otimizada para o C18 e aumentando o volume do solvente de eluição. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH:DCM (90:10, v/v).

Pesticidas	Recuperação + RSD%	
	3 mL	10 mL
Simazina	53 $\pm$ 2	50 $\pm$ 6
Terbufós	114 $\pm$ 8	103 $\pm$ 11
Tiametoxam	13 $\pm$ 12	20 $\pm$ 12
Malationa	65 $\pm$ 13	65 $\pm$ 0
Propanil	83 $\pm$ 2	91 $\pm$ 3
Clorpirifós	63 $\pm$ 7	70 $\pm$ 5
Carbossulfano	3 $\pm$ 75	3 $\pm$ 12
Epoxiconazol	81 $\pm$ 1	89 $\pm$ 0
Abamectina	116 $\pm$ 1	90 $\pm$ 2
Lufenurom	65 $\pm$ 5	78 $\pm$ 8
Flutriafol	35 $\pm$ 7	38 $\pm$ 2
Azoxistrobina	67 $\pm$ 7	72 $\pm$ 1
Atrazina	38 $\pm$ 6	39 $\pm$ 5
Haloxifope	14 $\pm$ 3	18 $\pm$ 21
Ametrina	54 $\pm$ 5	60 $\pm$ 3
Esfenvalerato	63 $\pm$ 5	73 $\pm$ 8
Acetamiprido	59 $\pm$ 14	58 $\pm$ 17
Diurom	85 $\pm$ 3	92 $\pm$ 4
Carbendazim	5 $\pm$ 8	5 $\pm$ 4
Tiofanato-metílico	23 $\pm$ 15	26 $\pm$ 4
Imidacloprido	65 $\pm$ 13	69 $\pm$ 15
Deltametrina	61 $\pm$ 3	70 $\pm$ 8

Os resultados mostraram que ocorreu uma maior adsorção dos pesticidas com o biocarvão de aguapé, sendo que grande parte dos analitos que favorecem ligação de hidrogênio tiveram bons valores de recuperação e isso pode está relacionado a variedade de grupos funcionais presentes no biocarvão.

Ressalta-se que o clorpirifós e deltametrina apresentaram recuperação de $70 \pm 5\%$ e $70 \pm 8\%$ respectivamente, à medida que aumentou o volume de eluente e a deltametrina não vinha apresentando boas recuperações ao utilizar adsorventes comerciais o que indica que a elevada porosidade do BC também favoreceu a adsorção para esses analitos, além do maior volume de eluente ter sido capaz de eluir melhor esses compostos.

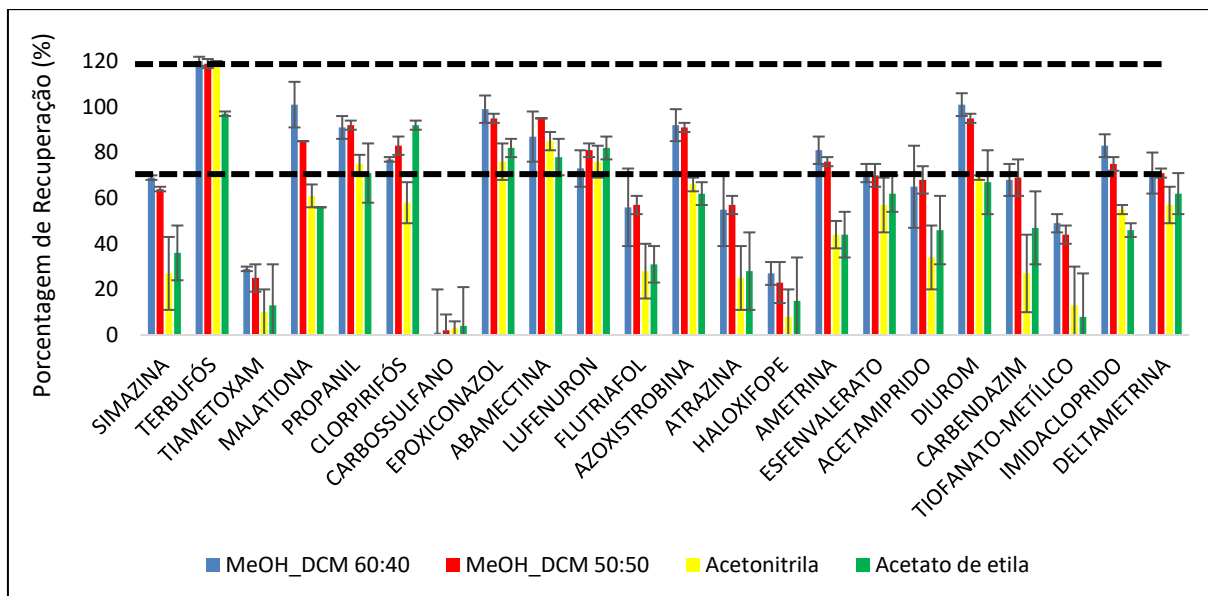
É válido ainda ressaltar que a grande aromaticidade apresentada por esse adsorvente juntamente com os grupos funcionais presentes é um fator positivo para garantir uma maior adsorção com a estrutura dos pesticidas [125].

Portanto, buscou seguir os demais estudos com esse biocarvão utilizando a condição de menor volume de solvente de eluição visto que foi suficiente para recuperar uma boa parte dos analitos.

5.8.2.1. Teste com modificação no solvente de eluição

Para o biocarvão de aguapé também foram avaliadas as proporções de solvente assim como qual permitiria apresentar melhores percentuais de recuperação através da eluição de um maior número de analitos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.

Figura 21- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé e 3 mL de diferentes solventes de eluição.



Com base nos gráficos apresentados é possível verificar que as melhores condições obtidas para esse biocarvão foram ao variar a proporção de solvente, no qual tanto ao utilizar metanol/diclorometano (MeOH:DCM) na proporção 60:40 e 50:50 foi possível obter elevados valores de recuperação para 14 dos 22 pesticidas avaliados. Ou seja, elevar a proporção de DCM favoreceu a recuperação de mais analitos e isso pode estar relacionado ao fato desse solvente ser de polaridade intermediária assim como grande parte dos analitos, além do biocarvão ter favorecido a adsorção para esses pesticidas.

Utilizando a acetonitrila apenas o terbufós, propanil, epoxiconazol, abamectina e lufenuron tiveram recuperações aceitáveis no qual, a polaridade desse solvente foi capaz de eluir melhor esses compostos. Enquanto que ao utilizar acetato de etila como eluente favoreceu melhores recuperações para esses analitos e para o clorpirifós indicando dessa forma que a melhor maneira em conseguir realizar a quebra da ligação desse analito com a superfície do adsorvente seria na presença de um solvente de polaridade intermediária.

Logo, foi possível constatar que a melhor condição para o biocarvão de aguapé seria utilizar uma mistura de solventes. Como forma de escolher a opção que utilizasse uma menor quantidade do solvente clorado foi tido como adequado para eluir os

analitos em estudo ao utilizar a condição de metanol/diclorometano 60:40. Em seguida, avaliou-se o aumento do volume de solvente em relação a possibilidade de eluir mais analitos e os resultados obtidos estão na Tabela 11.

Tabela 11: Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) na condição de 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra com nível de fortificação de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliando os volumes de 3 e 10 mL de MeOH:DCM (60:40, v/v).

Pesticidas	Recuperação + RSD%	
	3 mL	10 mL
Simazina	69 $\pm$ 1	67 $\pm$ 7
Terbufós	120 $\pm$ 2	106 $\pm$ 5
Tiametoxam	29 $\pm$ 1	33 $\pm$ 14
Malationa	101 $\pm$ 10	95 $\pm$ 9
Propanil	91 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5
Clorpirifós	77 $\pm$ 1	90 $\pm$ 9
Carbossulfano	1 $\pm$ 19	1 $\pm$ 35
Epoxiconazol	99 $\pm$ 6	99 $\pm$ 6
Abamectina	87 $\pm$ 11	91 $\pm$ 4
Lufenurom	73 $\pm$ 8	82 $\pm$ 7
Flutriafol	56 $\pm$ 17	63 $\pm$ 19
Azoxistrobina	92 $\pm$ 7	95 $\pm$ 7
Atrazina	55 $\pm$ 16	64 $\pm$ 14
Haloxifope	27 $\pm$ 5	20 $\pm$ 19
Ametrina	81 $\pm$ 6	84 $\pm$ 11
Esfenvalerato	71 $\pm$ 4	70 $\pm$ 4
Acetamiprido	65 $\pm$ 18	77 $\pm$ 8
Diurum	101 $\pm$ 5	100 $\pm$ 4
Carbendazim	5 $\pm$ 7	5 $\pm$ 3
Tiofanato-metílico	49 $\pm$ 4	47 $\pm$ 18
Imidacloprido	83 $\pm$ 5	87 $\pm$ 3
Deltametrina	71 $\pm$ 9	76 $\pm$ 7

Com um maior volume de eluente ocorreu aumento nos valores de recuperação para alguns analitos, favorecendo a recuperação para o acetamiprido que passou a ser acima de 70%. Mas, optou-se por considerar como adequado utilizar a condição

de 3 mL de eluente visto que mesmo com um menor volume do eluente ainda foi possível obter valores de recuperação na faixa estabelecida pela ANVISA para 13 dos 22 pesticidas avaliados.

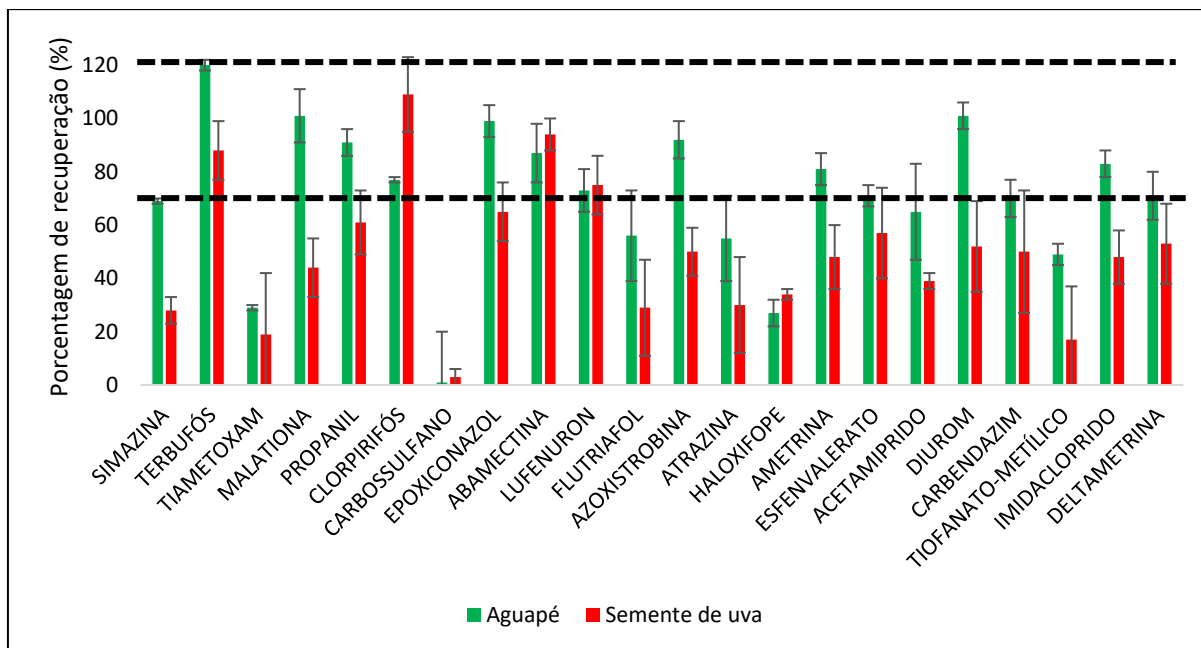
Devido as propriedades e capacidade de adsorção apresentadas pelo biocarvão da semente de uva, também foi avaliado se esse adsorvente era adequado para esses analitos e os resultados obtidos estão presentes no tópico subsequente.

5.8.3. Avaliação do biocarvão da semente de uva

Estudos de *Bahri et al.*, 2012 avaliaram a eficiência do biocarvão obtido da semente de uvas para adsorção do diurom em amostras de água e os resultados mostraram que devido a elevada superfície porosa e grupos funcionais presentes nesse material foi favorável para adsorção desse pesticida [126].

Devido a elevada área superficial ($114,42 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$), volume dos poros de $0,24 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ e presença de grupos ácidos e básicos em sua superfície que favorecem o poder de adsorção do biocarvão da semente de uva [127], foi feito um comparativo de eficiência com a condição otimizada para o biocarvão de aguapé (150 mg_3 mL MeOH:DCM 60:40, v/v) e os resultados obtidos estão na Figura 22.

Figura 22- Comparação dos percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas estudados com nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé e semente de uva e 3 mL de MeOH:DCM (60:40, v/v).



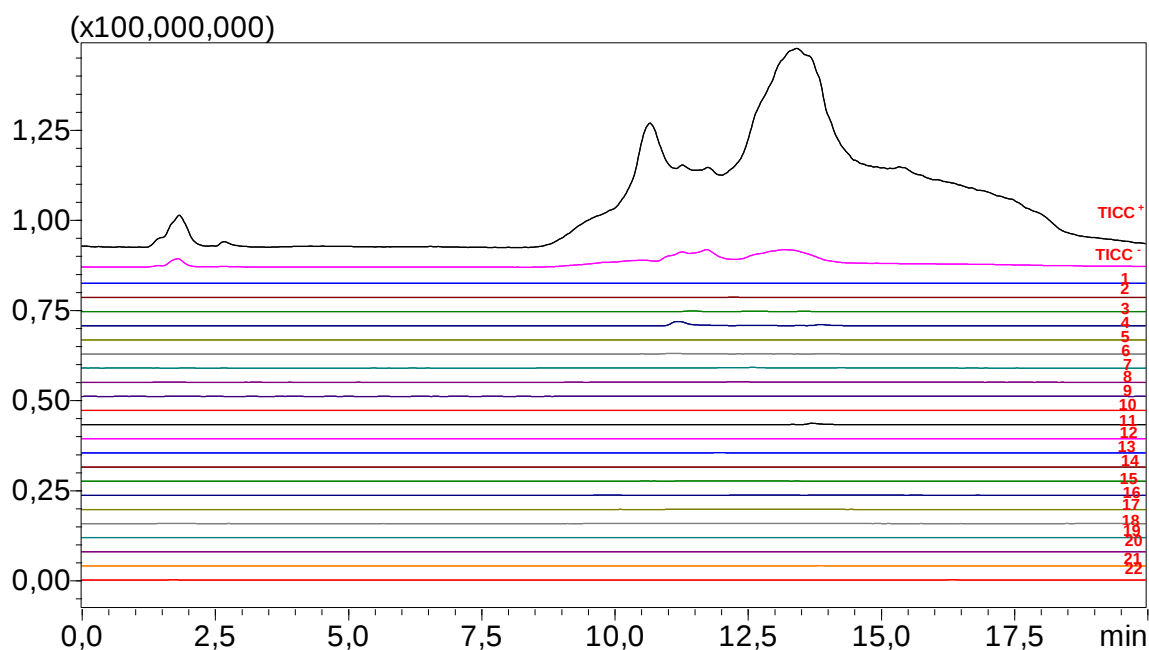
Os resultados mostraram que com o biocarvão da semente de uva apenas o terbufós, clorpirifós, abamectina e lufenuron tiveram recuperações acima de 70% e isso pode ter relação com o ponto de carga zero desse biocarvão no qual a superfície será protonada e dessa forma irá favorecer a adsorção para esses analitos já que apresentam um pKa mais elevado que caracteriza como ácidos fracos e produzem bases conjugadas fortes com grande capacidade de aceitar prótons provenientes da superfície desse biocarvão [128]. Além de ter favorecido melhores valores de recuperação para os compostos apolares, com exceção dos piretróides.

Apesar das características desse biocarvão mostrarem presença de grupos funcionais carbonílicos (cetona e aldeídos), elevada área superficial e volume de poros, conforme foi mencionado anteriormente, não foi possível obter melhores capacidades de adsorção para esses analitos ou o eluente utilizado não apresentou força suficiente para quebrar a ligação desses compostos com a superfície do biocarvão.

Portanto, o biocarvão de aguapé atuou como um material adsorvente para 22 pesticidas sendo que 14 deles apresentaram recuperação na faixa de 70 – 120%.

Da mesma forma que foi avaliado para o adsorvente C18, foi necessário avaliar o branco do biocarvão de aguapé, conforme mostra a Figura 23.

Figura 23- Cromatogramas do branco do extrato de cerveja por SPE, utilizando 150 mg do biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra e 3 mL de MeOH:DCM (60:40, v/v). Para condições instrumentais de análise, ver tópico 5.2.

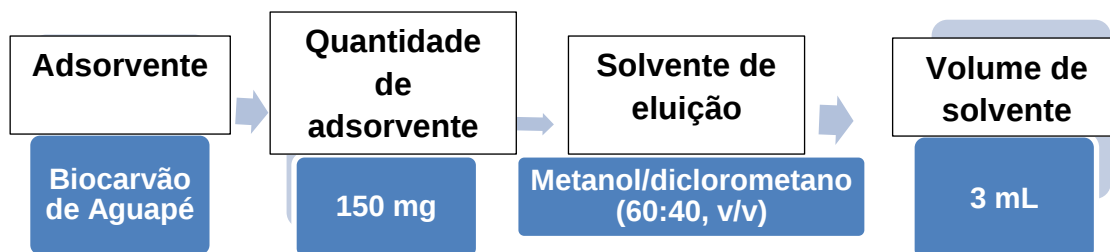


1-simazina; 2-terbufós; 3-tiametoxam; 4-malationa; 5-propanil; 6-clorpirifós; 7-carbossulfano; 8-epoxiconazol; 9-abamectina; 10-lufenuron; 11-flutriafol; 12-azoxistrobina; 13-atrazina; 14-haloxifope; 15-ametrina; 16-esfenvalerato; 17-acetamiprido; 18-diurum; 19-carbendazim; 20-tiofanato-metílico; 21-imidacloprido; 22-deltametrina.

Avaliando os cromatogramas do branco apesar de apresentar alguns picos intensos, mostrou-se mais limpo do que em relação ao C18 (tópico 5.7, Figura 18). Esses picos não estão exatamente no mesmo tempo de retenção dos analitos, mas apresentam proximidade de tempo com alguns dos pesticidas avaliados.

Portanto, em decorrência da capacidade de ter fornecido excelentes resultados com esse biocarvão, o mesmo foi escolhido para seguir durante a etapa de validação do método e a condição otimizada para o procedimento de extração está apresentado na Figura 24.

Figura 24: Fluxograma com a condição otimizada para o procedimento de extração dos analitos.



5.9. Validação do Método Analítico

O objetivo da validação é demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina. Para isso devem ser avaliados alguns requisitos que são pré-estabelecidos por algumas instituições como INMETRO e ANVISA [79,129]. Alguns desses parâmetros de validação como linearidade, sensibilidade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados e os resultados estão apresentados nos tópicos subsequentes.

5.9.1. Linearidade e sensibilidade

A linearidade relaciona-se a capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado. A quantificação das espécies de interesse por LC-MS foi realizada através de uma padronização externa. Através da aferição da massa dos padrões sólidos, foram preparadas soluções estoque de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. A partir dessas soluções, foi preparada uma solução intermediária contendo a mistura das espécies de interesse na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, em seguida, foi diluída para $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 5 mL e posteriormente, foram feitas diluições sucessivas para o preparo das concentrações da curva analítica.

Para os pontos da curva analítica foram preparadas as soluções na concentração de: 0,001; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essas concentrações foram preparadas a partir de diluições da concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para as concentrações mais baixas foram diluídas a partir da solução de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A linearidade foi obtida pela construção da curva analítica, utilizando 11 pontos, a qual foi injetada em triplicata.

De acordo com a ANVISA (2003), o coeficiente de determinação da reta (r^2) deve ser maior que 0,99. Para o INMETRO (2010) considera como aceitável o coeficiente maior que 0,9. Neste caso, os analitos apresentaram linearidade dentro dos parâmetros estabelecidos.

A Tabela 12 mostra os resultados apresentando a equação da reta, o coeficiente de determinação e o intervalo de concentração para cada analito na curva no solvente.

Tabela 12- Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) dos pesticidas estudados.

Pesticida	Equação de regressão	Coeficiente de determinação (r^2)	Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Simazina	$Y = 7.10^6x + 207802$	0,995	0,001-1
Tiametoxam	$Y = 6.10^6x + 192552$	0,996	0,005-1
Malationa	$Y = 2.10^7x + 341836$	0,998	0,001-0,5
Propanil	$Y = 3.10^6x + 174362$	0,997	0,001-1
Clorpirifós	$Y = 3.10^6x - 27327$	0,984	0,005-1
Carbossulfano	$Y = 6.10^6x + 12046$	0,999	0,05-1
Epoxiconazol	$Y = 8.10^6x - 52664$	0,999	0,0025-1
Lufenuron	$Y = 1.10^6x - 19085$	0,999	0,001-1
Flutriafol	$Y = 7.10^6x + 246370$	0,994	0,001-1
Azoxistrobina	$Y = 3.10^7x + 525861$	0,997	0,001-1
Atrazina	$Y = 9.10^6x + 568035$	0,988	0,001-1
Haloxifope	$Y = 401438x - 2083,8$	0,997	0,005-1
Ametrina	$Y = 2.10^7x + 269098$	0,999	0,001-1
Esfenvalerato	$Y = 3.10^6x + 555,12$	0,999	0,005-1
Acetamiprido	$Y = 1.10^7x + 317952$	0,996	0,001-1
Diurum	$Y = 6.10^6x + 191223$	0,990	0,001-1

Tabela 12: Continuação

Carbendazim	$Y = 9.10^7x + 684800$	0,992	0,001-0,1
Tiofanato-metílico	$Y = 2.10^7x + 373166$	0,989	0,001-1
Deltametrina	$Y = 3,63241.10^6x - 13373,3$	0,998	0,0025-1

A sensibilidade é medida através da equação da reta ao avaliar o coeficiente angular da regressão linear e quanto mais elevado for esse valor, indica o quanto o método é sensível para avaliar aquele analito. Assim, analisando o coeficiente angular de cada uma das equações é possível observar que o método foi sensível para a maioria dos compostos no qual apresentou maior sensibilidade de resposta para o carbendazim e menor sensibilidade para identificação do haloxifope.

Com base nas concentrações utilizadas e respostas obtidas ao trabalhar com a curva analítica pode-se notar que o método LC-MS foi sensível o bastante para estudo dos pesticidas nesse intervalo de concentração. Dessa forma, o método permite uma resposta nesse intervalo de concentração entre 1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, possibilitando dessa forma verificar a presença dos resíduos em concentrações menores dentro do intervalo que foi avaliado.

5.9.2. Seletividade (Efeito Matriz)

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse em meio a presença de interferentes oriundos da amostra [79]. Uma forma de avaliar essa seletividade é verificando o efeito matriz, no qual avaliará se possíveis interferentes podem aumentar ou suprimir o sinal analítico [79,129,130].

O efeito matriz é um parâmetro de extrema importância que deve ser avaliado através da razão dos coeficientes angulares da curva no extrato e solvente [79]. As curvas na amostra foram elaboradas utilizando 50 μL da solução padrão dos pesticidas em 450 μL do extrato no mesmo intervalo de concentração que foi utilizado para avaliar a linearidade.

A razão dos coeficientes angulares (RCA) é avaliado de forma que se for igual a 1 indica que não há efeito matriz pronunciado e dessa forma, o método é seletivo.

Quando $RCA < 1$ ocorre uma supressão do sinal do analito e no caso de $RCA > 1$ significa que ocorreu um aprimoramento no sinal obtido [79,129,130]. Os dados apresentados na Tabela 13 mostram que a matriz acabou interferindo e resultando na supressão dos sinais para maioria dos analitos, com exceção o lufenurô, no qual apresentou um $RCA = 1$ indicando dessa forma que não ocorreu um efeito matriz.

Tabela 13- Intervalo de concentração, equações da reta para o extrato da matriz e solvente, coeficientes de determinação e razões entre coeficientes angulares para os pesticidas.

Extrato da Matriz				Curva no Solvente		
Analito	Intervalo de concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Equação da Reta	r^2	Equação da Reta	r^2	RCA
Simazina	0,025-1	$y = 3.10^6x - 45675$	0,998	$y = 7.10^6x + 207802$	0,995	0,47
Tiametoxam	0,05-1	$y = 3.10^6x + 55768$	0,998	$y = 6.10^6x + 192552$	0,996	0,5
Malationa	0,1-1	$y = 2.10^6x + 123281$	0,996	$y = 2.10^7x + 341836$	0,998	0,15
Propanil	0,1-1	$y = 2.10^6x + 50286$	0,996	$y = 3.10^6x + 174362$	0,997	0,66
Clorpirifós	0,1-1	$y = 1.10^6x - 132761$	0,988	$y = 3.10^6x - 27327$	0,984	0,66
Carbossulfano	0,025-1	$y = 4.10^6x + 12779$	0,996	$y = 6.10^6x + 12046$	0,999	0,66
Epoxiconazol	0,05-1	$y = 5.10^6x + 23595$	0,997	$y = 8.10^6x - 52664$	0,999	0,62
Lufenurom	0,05-1	$y = 1.10^6x - 4377.6$	0,996	$y = 1.10^6x - 19085$	0,999	1
Flutriafol	0,025-1	$y = 3.10^6x - 21776$	0,997	$y = 7.10^6x + 246370$	0,994	0,42
Azoxistrobina	0,005-1	$y = 2.10^7x + 137881$	0,998	$y = 3.10^7x + 525861$	0,997	0,66
Atrazina	0,05-1	$y = 4.10^6x + 31231$	0,998	$y = 9.10^6x + 568035$	0,988	0,44
Haloxifope	0,025-1	$y = 278264x - 5239.6$	0,995	$y = 401438x - 2083.8$	0,997	0,69
Ametrina	0,05-1	$y = 1.10^7x + 222159$	0,999	$y = 2.10^7x + 269098$	0,999	0,5
Esfenvalerato	0,025-1	$y = 2.10^6x + 62016$	0,995	$y = 3.10^6x + 555.12$	0,999	0,66
Acetamiprido	0,025-1	$y = 6.10^6x + 128321$	0,999	$y = 1.10^7x + 317952$	0,996	0,6

Tabela 13: Continuação

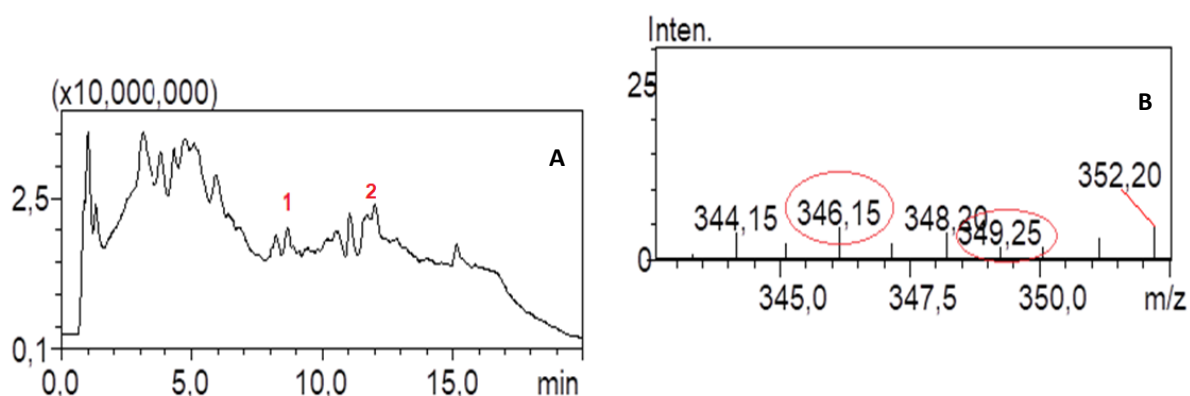
Diurum	0,01-1	$y = 3.10^6x + 18940$	0,998	$y = 6.10^6x + 191223$	0,990	0,5
Carbendazim	0,0025-0,25	$y = 3.10^7x + 61267$	0,990	$y = 9.10^7x + 684800$	0,992	0,33
Tiofanato-metílico	0,0025-1	$y = 6.10^6x + 12227$	0,998	$y = 2.10^7x + 373166$	0,989	0,3
Deltametrina	0,025-1	$y = 3.10^6x + 14476$	0,995	$y = 5.10^6x - 42697$	0,998	0,6

Os resultados mostraram um efeito matriz intenso com supressão dos sinais de até 85%. Tais resultados podem estar relacionados ao fato de aparecer interferentes do adsorvente assim como compostos da própria matriz próximo ao tempo de retenção dos analitos os quais acabaram competindo em termos de respostas com os analitos em estudo.

Essa hipótese pode ser confirmada ao verificar o extrato branco para alguns desses analitos onde verifica sinais próximos ao tempo de retenção do analito da mesma forma que os espectros de massas confirmam a presença de interferentes com relação m/z ligeiramente próximas aos analitos.

O malationa (m/z 348) foi o analito que apresentou um efeito matriz mais intenso indicando elevada supressão de sinal. Ao verificar o cromatograma de corrente total de íons (TICC) em modo positivo (Figura 25 (A)) foi constatada a presença de sinais cromatográficos (1 e 2, respectivamente) com relação m/z e tempo de retenção próximo ao analito (Figura 25 (B)), o que justifica o efeito matriz negativo.

Figura 25 – Cromatograma da corrente total de íons em modo positivo (A) e espectro de massas (B) obtidos a partir da análise em modo varredura do extrato branco de cerveja por SPE utilizando 150 mg de biocarvão de aguapé, 10 mL de amostra e 3 mL de metanol e diclorometano (60:40, v/v).



Além disso, uma das causas relacionadas a supressão de sinal e assim um elevado efeito matriz está relacionado ao espaço limitado na superfície das gotículas produzidas na fonte de íons do ESI nos quais os constituintes da matriz podem superar os analitos para determinada carga ou lugar na superfície. Consequentemente, o aumento da viscosidade ou tensão superficial causada pela matriz acaba inibindo o

solvente de evaporação de forma que algumas substâncias não voláteis da matriz acabem coprecipitando o analito antes da formação dos íons gasosos [131].

5.9.3. Exatidão e Precisão

A exatidão de método analítico deve ser obtida pelo grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro e deve ser verificada contemplando o intervalo linear com concentrações baixas, médias e altas em no mínimo três replicatas em cada nível [79].

Para os testes de exatidão e precisão foram avaliados três níveis de concentração, em quintuplicata, dentre os presentes na curva analítica de forma a verificar os menores valores de concentração para cada analito. Foi verificado em termos das concentrações mais baixas devido não existir legislação que indique o LMR de pesticidas para cerveja e assim, é necessário desenvolver um método que seja sensível o suficiente para determinar a presença desses resíduos.

Uma vez que para otimização do método de extração por SPE os testes foram desenvolvidos utilizando um nível de fortificação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, para assegurar a eficiência de extração os testes de exatidão foram realizados em concentrações baixas: (0,0025; 0,005; $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$), (0,01; 0,025; $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$), (0,025; 0,05; $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), (0,1; 0,25; $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a depender da resposta do analito na faixa linear da curva.

A Tabela 14 apresenta os três níveis de fortificação para cada analito, assim como o percentual de recuperação e desvio padrão relativo obtido através das condições otimizadas.

Tabela 14- Valores de Recuperação média (%) e desvio padrão relativo (DPR %) avaliados para o ensaio de exatidão e precisão realizados para validação.

Pesticida	Nível de fortificação($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Simazina	0,1	59	9
	0,25	64	4
	0,5	63	5
Tiametoxam	0,1	25	6
	0,25	33	5
	0,5	35	7
Malationa	0,1	81	9
	0,25	84	3
	0,5	89	2
Propanil	0,0025	91	6
	0,005	89	2
	0,01	87	4
Clorpirifós	0,025	93	6
	0,05	88	3
	0,1	87	2
Epoxiconazol	0,1	89	4
	0,25	93	2
	0,5	94	1
Lufenurom	0,01	83	7
	0,025	73	6
	0,05	76	4
Flutriafol	0,1	51	10
	0,25	60	7
	0,5	55	7
Azoxistrobina	0,01	81	5
	0,025	85	3
	0,05	77	2

Tabela 14: Continuação

Atrazina	0,025	53	7
	0,05	56	5
	0,1	52	7
Haloxifope	0,1	18	14
	0,25	26	19
	0,5	19	15
Ametrina	0,1	72	6
	0,25	82	3
	0,5	89	1
Esfenvalerato	0,1	80	12
	0,25	68	4
	0,5	81	4
Acetamiprido	0,1	68	8
	0,25	72	4
	0,5	76	3
Diurom	0,025	88	4
	0,05	94	3
	0,1	102	5
Carbendazim	0,0025	44	6
	0,005	61	4
	0,01	66	6
Tiofanato-metílico	0,0025	34	2
	0,005	38	8
	0,01	50	8
Deltametrina	0,1	69	9
	0,25	67	4
	0,5	77	3

Como base nos testes de exatidão grande parte dos pesticidas apresentaram recuperação acima de 70% e com desvio padrão relativo de até 20% conforme é estabelecido pela ANVISA [79]. Os pesticidas malationa, propanil, clorpirifós, epoxiconazol, lufenurom, azoxistrobina, ametrina, esfenvalerato, acetamiprido e diurom mostraram exatos para os três níveis de fortificação com percentual de recuperação entre 66 – 102%. Alguns pesticidas como a simazina, tiametoxam, flutriafol, atrazina, haloxifope e tiofanato – metílico apresentaram valores de recuperação abaixo de 70%, mas ainda tiveram RSD de até 20%.

A precisão relaciona a proximidade de concordância entre os valores medidos obtidos por medições replicadas sob condições específicas no qual também busca relacionar ao erro de medição e é expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) sendo menor que 20% [78,130].

Para isso foram avaliados em quintuplicata a precisão intradia (repetibilidade) que é avaliada dentro da execução utilizando de um mesmo operador, mesmo método, mesmo laboratório, mesmo equipamento e com ensaios avaliados durante o mesmo dia de trabalho.

Para precisão intermediária também busca utilizar do mesmo operador, método, laboratório, equipamento, mas com ensaios realizados em dias distintos, não necessariamente consecutivos. Para esse teste foi utilizado o nível 2 de concentração (segunda linha dos testes de exatidão da Tabela 14) e os ensaios foram realizados em quintuplicata em três dias não consecutivos.

Tabela 15- Valores de Recuperação média (%) e desvio padrão relativo (DPR %) avaliados para ensaio de precisão intradia e interdia realizados para validação.

Pesticidas	Precisão Intradia (%)	Precisão Interdia (%)
	(n = 5)	(n = 15)
Simazina	64 ± 4	66 ± 4
Tiametoxam	33 ± 5	34 ± 3
Malationa	84 ± 3	87 ± 4
Propanil	89 ± 2	89 ± 3
Clorpirifós	88 ± 3	88 ± 5
Epoxiconazol	93 ± 2	93 ± 4
Lufenurom	73 ± 6	77 ± 3
Flutriafol	60 ± 7	60 ± 5
Azoxistrobina	85 ± 3	85 ± 4
Atrazina	56 ± 5	59 ± 5
Haloxifope	26 ± 19	21 ± 3
Ametrina	82 ± 3	84 ± 3
Esfenvalerato	68 ± 4	68 ± 4
Acetamiprido	73 ± 4	75 ± 5
Diurom	94 ± 3	95 ± 2
Carbendazim	61 ± 4	61 ± 4
Tiofanato-metílico	38 ± 8	46 ± 9
Deltametrina	67 ± 4	67 ± 4

Avaliado o desvio padrão relativo não há alterações significativas nos resultados quando o método é utilizado ao longo de um determinado dia de trabalho o que permite concluir que o método desenvolvido apresenta uma boa repetibilidade. Da mesma forma que avaliando a precisão intermediária em dias distintos ainda apresentaram RSD < 20% confirmando assim que o método é reprodutível.

5.9.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) busca verificar a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não quantificado. Esse valor pode ser estimado através do método visual, relação sinal-ruído ou em parâmetros da curva de calibração [78,79].

Enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. A determinação desse parâmetro também pode ser realizada conforme os métodos mencionados anteriormente.

Para esse trabalho, os valores de LD e LQ foram estipulados com base na curva de calibração utilizando das equações (1) e (2) resultantes dos estudos de Krue et al., 2015 [78]. No qual s é a estimativa do desvio padrão linear e S é em relação ao coeficiente angular da curva analítica.

$$(1) \quad LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S}$$

$$(2) \quad LQ = 10 \cdot \frac{s}{S}$$

As estimativas do desvio padrão (s) foram calculadas empregando as respostas obtidas nas menores concentrações do ensaio de exatidão, enquanto que os coeficientes angulares utilizados foram obtidos a partir das equações da reta preparados nos extratos da matriz no estudo da seletividade do método [78, 82].

Como não existe legislação indicando o LMR de pesticidas para cerveja, buscou avaliar esses limites de forma a obter o mais baixo possível para detectar e quantificar a presença desses analitos nessa matriz. Os valores de LD e LQ estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16- Valores de limite de detecção e quantificação obtidos pelo método da curva de calibração com concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Pesticidas	Limite de Detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Simazina	0,0212	0,0644
Tiametoxam	0,0246	0,0746
Malationa	0,0330	0,1000
Propanil	0,0126	0,0381
Clorpirifós	0,0303	0,0918
Epoxiconazol	0,0235	0,0713
Lufenurom	0,0164	0,0496
Flutriafol	0,0220	0,0669
Azoxistrobina	0,0127	0,0386
Atrazina	0,0136	0,0414
Haloxifope	0,0266	0,0807
Ametrina	0,0118	0,0359
Esfenvalerato	0,0267	0,0810
Acetamiprido	0,0131	0,0398
Diurom	0,0169	0,0515
Carbendazim	0,0174	0,0528
Tiofanato – metílico	0,0099	0,0299
Deltametrina	0,0345	0,1045

Portanto, é possível observar que os valores de LD variam entre 0,009 – 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o LQ entre 0,02 – 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Logo, o método desenvolvido permite detectar e quantificar a presença desses analitos mesmo que em baixas concentrações.

Como forma de verificar a eficiência do método analítico desenvolvido, foram comparados alguns parâmetros com o que tem disponível na literatura e os dados estão disponíveis na Tabela 17.

Tabela 17- Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas por SPE como método de preparo de amostras para cerveja.

Método analítico	Matriz	Pesticidas	Grupo químico	Recuperação (%)	LD/LQ	Referência
SPE- GC/MS	Cerveja	Quinoxifeno	Quinolína	66 - 139	0,0002 – 0,0005 mg L ⁻¹	[62]
		Clorfenapir	Análogo de Pirazol			
		Tebuconazol	Triazol			
		Fenarimol	Pirimidinil Carbinol			
		Piridabem	Piridazinona			
		Dimetomorfe	Morfolina			
QuEChERS – GC-MS/MS	Cerveja	Acetamiprido	Neonicotinóide	73 – 101/	0,0001 – 0,0007/	[92]
		Terbufós	Organofosforado	65 - 103	0,001 – 0,006 µg mL ⁻¹	
		Alacloro	Cloroacetanilida			
		Ametrina	Triazina			
		Atrazina	Estrobilurina			
		Azoxistrobina	Carbamato			
		Carbofurano	Piretróide			
		Carbossulfano	Triazol			
		Cipermetrina				
		Deltametrina				
		Difenoconazol				
		Esfenvalerato				
		Flutriafol				
		Tiametoxam				

Tabela 17: Continuação

Paration metílico						
QuEChERS – LC/MS	Cerveja	Boscalida	Anilida	58 -112	1 - 200µg kg ⁻¹ / 5 – 1000 µg kg ⁻¹	[94]
		Fluxapiroxade	Carboxamida			
		Mandipropamida	Éter mandelamida			
		Deltametrina	Piretróide			
		Ciprodinil	Anilinopirimidina			
		Azoxistrobina	Estrobilurina			
		Pirimifós – metílico	Organofosforado			
Butóxido de piperonila						
SPE – LC/MS	Cerveja	Acetamiprido	Neonicotinóide	72 - 102	0,009 – 0,03/ 0,02 – 0,1 µg mL ⁻¹	*
		Ametrina	Triazina			
		Azoxistrobina	Estrobilurina			
		Atrazina	Organofosfato			
		Clorpirifós	Piretróide			
		Deltametrina	Felilamida			
		Diurum	Triazol			
		Epoxiconazol	Ariloxifenoxipropionato			
		Esfenvalerato	Benzoilureia			
		Flutriafol	Anilida			
		Haloxifope	Benzimidazol			
		Lufenurum				
		Malationa				
		Propanil				
		Simazina				
		Tiametoxam				
		Tiofanato - metílico				

* Método desenvolvido nesse trabalho.

Os parâmetros comparados mostram que mesmo utilizando o biocarvão como adsorvente alternativo foi possível apresentar percentuais de recuperação satisfatórios, além de baixos valores de limite de detecção e quantificação coerentes com o que já foi encontrado na literatura, ressaltando assim que realmente o método desenvolvido é adequado para trabalhar com a matriz cerveja.

5.10. Aplicação do método

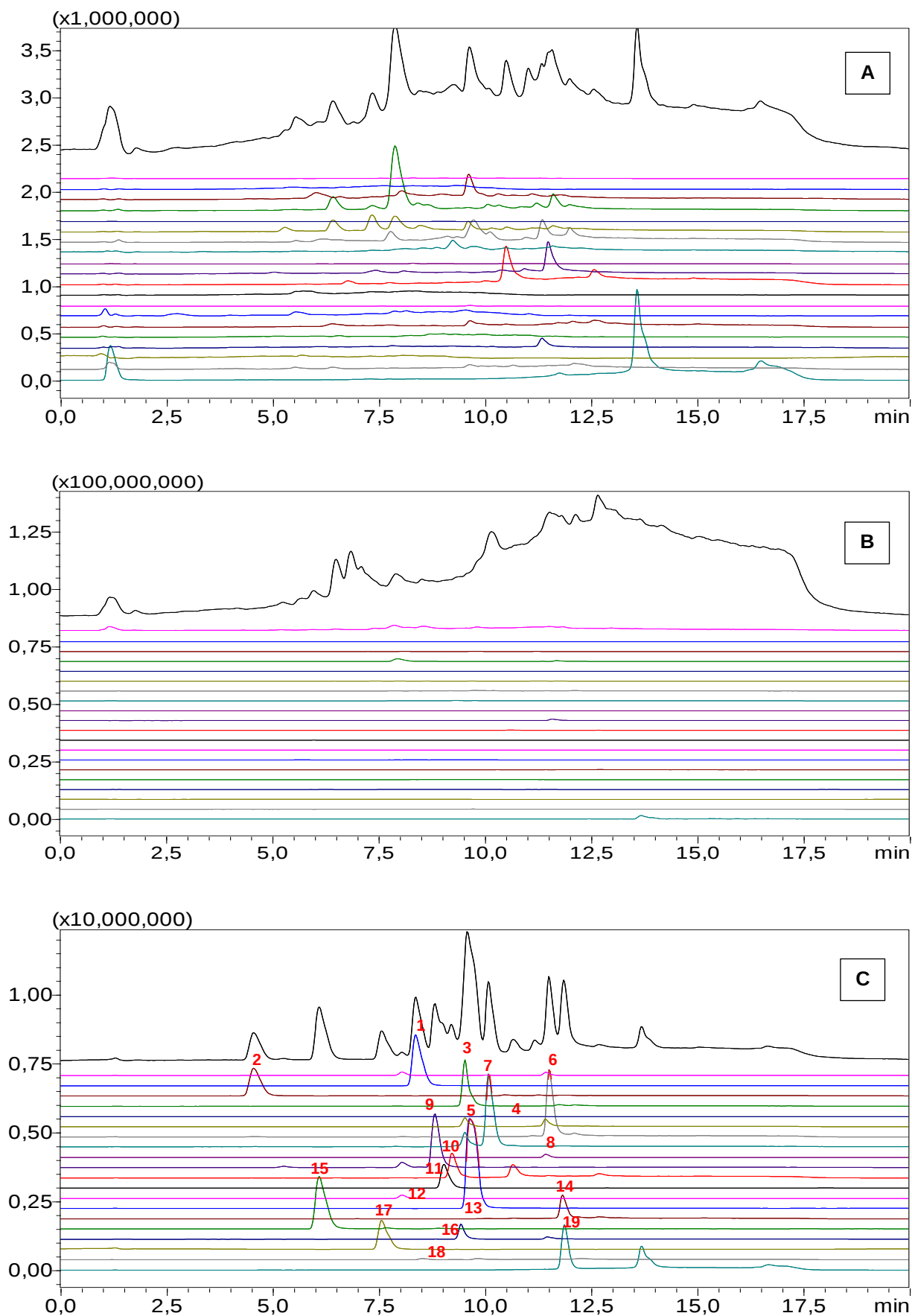
O método desenvolvido e validado para determinação dos pesticidas simazina, tiametoxam, malationa, propanil, clorpirifós, epoxiconazol, lufenurom, flutriafol, azoxistrobina, atrazina, haloxifope, ametrina, esfenvalerato, acetamiprido, diurom, carbendazim, tiofanato – metílico e deltametrina foi aplicado em 13 rótulos de cerveja lager do tipo Pilsen que são consumidas frequentemente no Brasil com o intuito de verificar a presença desses analitos.

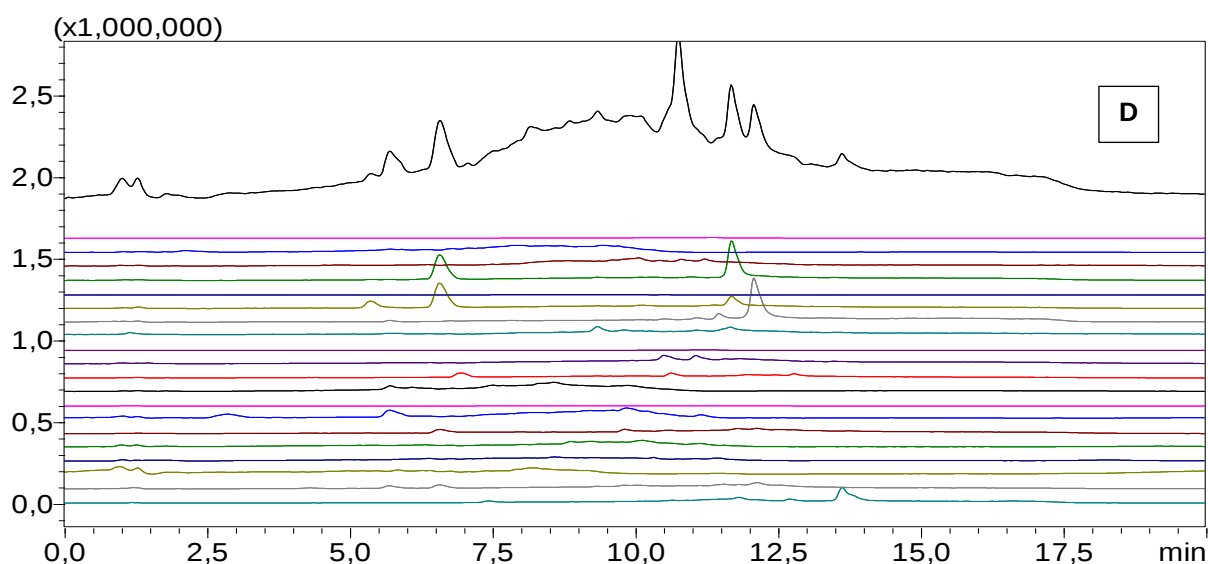
Os rótulos identificados como R1, R2, R3, R4, R5 e R6 pertencem à cervejaria AMBEV (localizada em Sergipe, São Paulo, Minas Gerais, dentre outros), o R7, R8, R9 e R10 pertencentes à cervejaria Heineken (localizada na Bahia, São Paulo, Pernambuco, dentre outros), o R11 pertencente ao grupo Petrópoles (filial no Rio de Janeiro), o R12 pertencente a cervejaria Cidade Imperial (localizada no Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo) e o R13 pertencente a cervejaria Hijos de Rivera (localizada na Espanha).

As treze amostras foram submetidas ao procedimento de extração em triplicata conforme apresentado na seção 4.10 e análise por LC-MS realizada em modo de varredura de íons (SCAN) e monitoramento de íons selecionado (SIM).

Foram avaliados o tempo de retenção dos picos presentes na amostra com o tempo de retenção destes picos na solução padrão dos pesticidas. Também foram avaliados o branco dos reagentes para verificar se apresentava picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos (Figura 26).

Figura 26: Cromatogramas (A) modo SIM, (B) SCAN para a cerveja R2, (C) SIM para a solução conjunta dos pesticidas, (D) SIM para o branco dos reagentes.





1-simazina; 2-tiametoxam; 3-malationa; 4-propanil; 5-clorpirifós; 6-carbossulfano; 7-epoxiconazol; 8-lufenuron; 9-flutriafol; 10-azoxistrobina; 11-atrazina; 12-haloxifope; 13-ametrina; 14-esfenvalerato; 15-acetamiprido; 16-diurum; 17-carbendazim; 18-tiofanato-metílico; 19-deltametrina.

Sinais intensos foram observados nos cromatogramas de monitoramento de íons selecionados (SIM) (Figura 26 (A)) e apresentaram no mesmo tempo de retenção de alguns analitos. Logo, foi calculada a média da área das replicatas para os analitos presentes no branco da amostra e esse valor foi submetido a equação da reta da curva no extrato a fim de verificar a concentração do analito.

Avaliando o branco dos reagentes também pode-se observar pequenos picos interferentes no mesmo tempo de retenção de alguns analitos como o esfenvalerato, propanil e epoxiconazol os quais tiveram o valor da área de cada pico subtraído da área dos picos na amostra.

Contudo, para confirmar se tais picos correspondiam aos respectivos analitos, os extratos foram injetados através de injeção direta no espectrômetro de massas de alta resolução (Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer), mas não foi possível detectar resíduos desses pesticidas nas amostras avaliadas nas condições estabelecidas para o desenvolvimento desse método. Alguns estudos desenvolveram métodos que foram capazes de identificar a presença de pesticidas na cerveja [9,34,84,85]. O método desenvolvido nesse trabalho também mostrou eficiente para avaliar a presença dos pesticidas em variados rótulos de cerveja.

Portanto, a contaminação vista nos demais estudos nas amostras de cerveja indica a importância de desenvolver métodos para quantificar a presença de pesticidas nessa

matriz, além de ressaltar a necessidade de existir uma legislação capaz de avaliar a presença desses contaminantes que podem afetar ou prejudicar a saúde do consumidor.

6. CONCLUSÕES

A otimização das condições instrumentais de análise por meio de um gradiente de eluição (30-100%) composto por metanol:água (5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio) com vazão de fase móvel 0,5 mL min⁻¹, coluna Shim-pack C18 (150 x 3 mm, 2,5 µm) em modo de monitoramento do íon selecionado permitiu a identificação dos pesticidas em um tempo de análise de 20 minutos. Logo, a cromatografia líquida juntamente com a espectrometria de massas se mostrou eficiente na determinação dos 22 pesticidas avaliados (abamectina, acetamiprido, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, carbossulfano, clorpirifós, deltametrina, diurom, esfenvalerato, epoxiconazol, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, terbufós, tiametoxam, tiofanato-metílico e simazina), permitindo sinais bem definidos.

Dentre os adsorventes, solventes e condições avaliadas a extração em fase sólida utilizando o adsorvente comercial C18 nas condições de 150 mg de C18, 10 mL de cerveja com nível de fortificação de 1 µg mL⁻¹ e 3 mL de metanol e diclorometano (90:10, v/v) como solvente de eluição mostrou eficiente na extração de 18 pesticidas (abamectina, acetamiprido, ametrina, atrazina, azoxistrobina, clorpirifós, diurom, epoxiconazol, flutriafol, haloxifope, imidacloprido, lufenuron, malationa, propanil, terbufós, carbendazim, tiofanato-metílico e simazina) com recuperação entre 74 ± 3% e 110 ± 6%.

O biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo na condição de 150 mg, 10 mL de cerveja com nível de fortificação de 1 µg mL⁻¹ e 3 mL de metanol e diclorometano (60:40, v/v) como solvente de eluição mostrou eficiente na extração de 14 pesticidas que apresentaram recuperação na faixa estabelecido pela ANVISA (Abamectina, ametrina, azoxistrobina, clorpirifós, deltametrina, diurom, epoxiconzol, esfenvalerato, imidacloprido, lufenurom, malationa, propanil, carbendazim e terbufós) com recuperação entre 70 ± 7% e 120 ± 2%.

O método foi adequado para validação desses pesticidas avaliados conforme parâmetros estabelecidos pela ANVISA e INMETRO utilizando o biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo e apresentou linearidade, seletividade, exatidão e precisão coerentes, além de LD entre 0,009 – 0,03 µg mL⁻¹ e o LQ entre 0,02 – 0,1 µg mL⁻¹.

O método desenvolvido foi aplicado em 13 rótulos de cerveja, mas não foram detectados resíduos dos pesticidas estudados nas condições estabelecidas para o método.

Portanto, os resultados obtidos evidenciaram a importância em se desenvolver métodos analíticos capazes de identificar e quantificar resíduos de pesticidas e estabelecer uma legislação de forma a indicar o LMR para os pesticidas na cerveja devido a elevada toxicidade desses compostos.

7. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Mediante os resultados que foram obtidos, o presente trabalho tem a seguinte perspectiva:

- Propor uma etapa de limpeza para o método de extração.

8. REFERÊNCIAS

- [1] STATISTA. **ALCOHOLIC DRINKS**. Disponível em: <[https://www.statista.com/outlook/10000000/100/alcoholic-drinks/worldwide#market volume](https://www.statista.com/outlook/10000000/100/alcoholic-drinks/worldwide#market-volume)>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- [2] COSTA, C. E.R. **A bebida de Ninkasi em terras tupiniquins: O mercado da cerveja e o Turismo Cervejeiro no Brasil**. Revista Iberoamericana de Turismo, Penedo, vol. 5, n. 1, p. 22-41, 2015.
- [3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA (**CERVBRASIL**). Dados do setor. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/>. Acesso em: 18 dez. 2021.
- [4] KEUKELERIE, D. D. **Fundamentals of beer and hop chemistry**. Química Nova, 23, 108-112, 2000.
- [5] FILHO, V.; GASTONI, W. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Blucher. v.1, 576, 2016.
- [6] MEGA, J.F.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. **A produção da cerveja no Brasil**. Revista CITINO, n. 1, v. 1, p. 34-42, 2011.

- [7] ROSA, N.A.; AFONSO, J.C. **A Química da Cerveja**. Química Nova na Escola, n. 2, vol. 37, p. 98-105, 2015.
- [8] GONZÁLES CURBELO, M.A.; HERRERA A.V.; RAVELO PÉREZ, L.M.; HENANDÉZ BORGES, J. **Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives**. Trends in Analytical Chemistry. 38, 32-51, 2012.
- [9] NAVARRO, S., PÉREZ, G., VELA, N., MENA, L., NAVARRO, G. **Behavior of myclobutanil, propiconazole, and nuarimol residues during lager beer brewing**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 8572-8579, 2005.
- [10] BOLAÑOS, P.P.; GONZÁLEZ, R.R.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M. **Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A. 1208, 16-24, 2008.
- [11] 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. 1495-1503, 2007.
- [12] BACALONI, A., CAVALIERE, C., FABERI, A., PASTORINI, E., SAMPERI, R., LAGANÀ, A. **Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 5518-5525, 2005.
- [13] GONZÁLEZ, R.R., VIDAL, J.L.M., LUIZ, M.M.A., FRENICHI, A.G. **Application of conventional solid-phase extraction for multi mycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal Agricultural and Food Chemistry. 57, 9385–9392, 2009.
- [14] HORÁK, T., CULÍK, J., CEJKA, P., JURKOVÁ, M., KELLNER, V., DVORÁK, J., HASKOVÁ, D. **Analysis of free fatty acids in beer: comparison of solid-phase extraction, solid-phase microextraction, and stir bar sorptive extraction**. Journal Agricultural and Food Chemistry. 57, 11081–11085, 2009.
- [15] NAGATOMI, Y., YOSHIOKA, T., YANAGISAWA, M., UYAMA, A., MOCHIZUKI, N. **Simultaneous LC-MS/MS analysis of glyphosate, glufosinate, and their metabolic products in beer, barley tea, and their ingredients**. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 77 (11), 2218-2221, 2013.
- [16] ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce**, Journal AOAC International. 86, 412–431, 2003.
- [17] ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused sílica optical fibers**. Analytical Chemistry, 62, 2145-2148, 1990.

- [18] QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.S. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Química Nova, vol. 24, n. 1, 68-76, 2001.
- [19] CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.** Química Nova, v. 31, n. 3, 623-636, 2008.
- [20] REBELLO, F.F.P. **Produção de cerveja.** Revista Agrogeoambiental, dezembro de 2009.
- [21] BRASIL. **Decreto 9.902, de 8 de julho de 2019.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato_2009-2022/2019/Decreto/D9902.htm>. Acesso em: 07 de janeiro de 2021.
- [22] MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/produtos-vegetal/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas>. Acesso em: 07 de janeiro de 2021.
- [23] SLEIMAN, M.; VENTURINI, F. W.G.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. **Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica.** Ciência e Agrotecnologia. 34, n.1, 163-172, 2010.
- [24] PRIEST, F. G, STEWART, G. G. Hand book of Brewing. Boca Raton: Taylor & Francis, 2° ed., 853, 2006.
- [25] OLIVEIRA, M.; AMATO, G.W. **Arroz: tecnologia, processos e usos.** ISBN 978-65-5506-261-8. 1ª edição. Blucker, 2021.
- [26] PLIANSRITHONG, P.; USANSA, U. & WANAPU, C. **Increasing of nitrogenous substances in wort by using commercial enzymes and modifyng mashing method.** Journal International of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 3, 404-407, 2013.
- [27] DRAGONE, G.; SILVA, J. B. A. Cerveja. In: Venturini Filho, W. G. Bebidas alcoólicas. São Paulo: Blucher, 15-48, 2010.
- [28] BELETI, M. A.; DUARTE, F.; KRHEMER, J. E. **A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4) – β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação.** Ciência Rural, v. 42, n. 3, p. 467-473, 2012.
- [29] MORI, C.; MINELLA, E. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 28 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 139). 128p. Disponível em: Acesso em 30 nov. 2021.
- [30] BAMFORTH, C.W. **Nutritional aspects of beer - a review.** Nutrition Research, n. 22 p. 227–237, 2002.
- [31] CARVALHO, L. G. Dossiê Técnico: **Produção de Cerveja.** Rio de Janeiro, REDETEC Rede Tecnológica do Rio de Janeiro. 54, 2007.
- [32] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019.** Brasília, DF, 2019. Disponível

em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosvegetal/legislacao1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-65-de-10-de-dezembro-de-2019.pdf/view>>. Acesso em: 01 dez. 2021).

[33] CERVEJA LAGER E CERVEJA ALE: <https://www.cervejariacampinas.com.br/blog/cerveja-lager-e-cerveja-ale/> - acesso em 07 de julho de 2021.

[34] 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, 18, 50–56, 2017.

[35] BALINDONG, J.L.; WARD, R.M.; LIU, L.; ROSE, T.J.; PALLAS, L.A.; OVENDEN, V.W.; SNELL, P.J.; WATERS, D.L.E. **Rice grain protein composition influences instrumental measures of Rice cooking and eating quality.** Journal of Cereal Science. p. 35-42, 2018.

[36] GONÇALVES, B. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil.** Pelotas: SOSBAI. 197, 133-137, 2016.

[37] CONAB - **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2020/2021.** 9º. Levantamento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 07 de janeiro 2022.

[38] SALDIVAR, S.O.S.; CARRILLO, E.P. **Food uses of whole corn and dry-milled fractions.** American Association of Cereal Chemists. p. 435-467, 2019.

[39] MAPA- **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2006. Disponível em:<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>Acesso em: 07 de janeiro, 2022.

[40] MONTEIRO, V.A.; AMABILE, R.F.; SPEHAR, C.R.; FALEIRO, F.G.; VIEIRA, E.A.; PEIXOTO, J.R.; JUNIOR, W.Q.R.; MONTALVÃO, A.P.L. **Genetic parameters and morpho-agronomic characterization of barley in the Brazilian Savannah.** Institute of Brewing & Distilling. 2018.

[41] EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** Comissão de Pesquisa de Cevada. (2015). Acesso em: 07 de janeiro de 2022. Não paginado.

[42] MAYER, E.T.; FUKU, G.; NORNBERG, J.L.; MINELLA, E. **Caracterização nutricional de grãos integrais e descascados de cultivares de cevada.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 42, n. 11, p. 1635-1640, 2007.

[43] PROJETO **LEI 6299/02** <https://agrosaber.com.br/pl629902/> acessado em 08 de junho de 2022.

[44] BRASIL. **Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002>. Acesso em: 07 de janeiro de 2022.

- [45] SUN, S.; ZHANG, C.; HU, R. **Determinants and overuse of pesticides in grain production a comparison of Rice, maize and wheat in China.** China Agricultural Economic Review. Vol. 12, n.2, p. 367-379, 2020.
- [46] ANJOS, J. P., ANDRADE, J. B. **Simultaneous determination of pesticide multiresidues in White wine and rose wine by SDME/GC-MS.** Microchemical Journal 120. p. 69–76, 2015.
- [47] ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos.** Disponível em:<<https://bit.ly/2YgxJt2>>. Acesso em: 25 de junho de 2021.
- [48] INOUE, T.; NAGATOMI, Y.; SUGA, K., UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. **Fate of pesticides during beer brewing.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59, 3857-3868, 2011.
- [49] MIYAKE, Y.; HASHIMOTO, K.; MATSUKI, H.; ONO, M.; TAJIMA, R. **Fate of insecticide and fungicide residues on barley during storage and malting.** Journal Society Brewing Chemistry. 60, 110 – 115, 2002.
- [50] PINTO, G.M.; JARDIM, I.C.F.S. **Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation method.** Journal of Chromatography A. 869, 463-469, 2000.
- [51] NAVARRO, S.; PÉREZ, G.; NAVARRO, G.; MENA, L.; VELA, N. **Influence of fungicide residues on the primary fermentation of Young lager beer.** Journal Agricultural and Food Chemistry. 55, 1295-1300, 2007.
- [52] ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. **Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta. 520, 33-45, 2004.
- [53] BORGES, K.B.; FIGUEIREDO, E.C.; QUEIROZ, M.E.C. (Org) **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, capítulo 24, 2015, 1ª Ed. Rio de Janeiro: LTC.
- [54] 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. 32, n. 6, 1620-1634, 2009.
- [55] WALORCZYK, S.; DROZDZYNSKI, D. **Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry revisited.** Journal of Chromatography A. 1251, 219-231, 2012.
- [56] JARDIM, I.C.F.S. **Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para a preparação de fases sólidas.** Scientia Chromatographica. v.2, n 1, 13-25, 2010.

- [57] BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de Piretróides em água.** Química Nova, v. 24, n.2, 172-175, 2001.
- [58] NOVÁKOVÁ, L. VICKOVÁ, H. **A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation.** Analytica Chimica Acta. 656, 8–35, 2009.
- [59] LANÇAS, F.M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** São Carlos; RiMa; p. 93, 2004.
- [60] HACK, M.; NITZ, S.; PARLAR, H. **Behavior of [14C] Atrazine, [14C] Terbutylazine, and their major metabolites in the brewing process.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45, 1375-1380, 1997.
- [61] JONES, R.D.; KAVANAGH, T.E.; CLARKE, B.J. **Determination of carbaryl residues in malt and beer and their impact on beer quality.** Journal of the American Society of Brewing Chemistry. 46:2, 43-50, 1988.
- [62] 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. 50, 3412-3418, 2002.
- [63] MAJORS, R. E. Solid-Phase Extraction. In: PAWLISZYN, J.; LORD, H. L. *Hand book of Sample Preparation*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- [64] MOL, H. G. J.; ROOSEBOOM, A.; DAM, R. V.; RODING, M.; ARONDEUS, K. & SUNARTO, S. **Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389, 1715–1754, 2007.
- [65] AUGUSTO, F.; HANTAO, L. W.; MOGOLLÓN, N. G. S.; BRAGA, S.C.G.N. **New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction.** *Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 43, pp. 14-23.
- [66] AHMAD, M.; RAJAPAKSHA, A.U.; LIM, J.E.; ZHANG, M.; BOLAN, N.; MOHAN, D.; VITHANAGE, M.; LEE, S.S.; OK, Y.S. **Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review,** Chemosphere 99. 2014, p. 19–33.
- [67] TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. **Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil.** Journal of Bioscience and Bioengineering 2013, 116, 6, pp. 653-659.
- [68] SINGH, R.; NAIK, D.V.; DUTTA, R.K.; KANAUIA, P.K. **Biochars for the removal of naphthenic acids from water: a prospective approach towards remediation of petroleum refinery wastewater,** J. Clean. Prod. 266, 2020.
- [69] SRIKHAOW, A.; CHAENGSAWANG, W.; KIATSIRIROAT, T.; KAJITVICHYANUKUL, P.; SMITH, S.M; **Adsorption Kinetics of imidacloprid, acetamiprid and methomyl pesticides in aqueous solution onto Eucalyptus woodchip derived biochar.** Minerals 2022, 12, 528.

- [70] GOTO, T.; ITO, Y.; OKA, H.; SAITO, I.; MATSUMOTO, H.; SUGIYAMA, H. OHKUBO, C.; NAKAZAWA, H.; NAGASE, H. **The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in winw and juice by electrospray ionization liquid chromatography tandem mass spectrometry with direct sample injection into a short column.** *Analytica Chimica Acta* , 531, p. 79, 2005.
- [71] BRAGA, J.W.B.; BOTTOLI, C.B.G.; JARDIM, I.C.S.F.; GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI, A.C.; POPPI, R.J. **Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods.** *Journal Chromatography A* , 1148, p. 200 – 210, 2007.
- [72] JIN, B.; XIE, L.; GUO, Y.; Pang, G. **Multiresidue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods.** *Food Research International* 46. 399-409, 2012.
- [73] FERNÁNDEZ, V.P.; ROCCA, L.M.; TOMAI, P.; FANALI, S.; GENTILI, A. **Recent advancements and future trends in environmental analysis: sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta* 983. p. 9–41, 2017.
- [74] SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. **The Role of the Liquid Chomatography – Mass Spectrometry in pesticide residue determination in food.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 38, p. 93-117, 2008.
- [75] SILVA, R.O.; MENEZES, M.G.G.; CASTRO, R.C.; NOBRE, C.A.; MILHOME, M.A.L.; NASCIMENTO, R.F. **Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix.** *Food Chemistry* 297. 124934, 2019.
- [76] NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. **LC-MS/MS analysis of organic toxics in food.** *Trends in Analytical Chemistry*, v.24. N. 7, 2005.
- [77] DONATO, F.F.; MARTINS, M.L.; MUNARETTO, J.S.; PRESTES, O.D., ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. **Development of a multiresidue method for pesticide analysis in drinking water by solid phase extraction and determination by gas and liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 10, 2077-2087, 2015.
- [78] KRUBE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. **Review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I.** *Analytica Chimica Acta*, v. 870, p. 29-44, 2015.
- [79] Brasil. Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nº166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras 75 providências. https://www.in.gov.br/materia/- /asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-

2017-07-25-resolucaordc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. (Acessada em 30 de maio de 2022).

[80] ICH HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.

[81] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química. Nova, v. 27, No. 5, 771-780, 2004.

[82] VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METODOLOGY. London: ICH, p.9, 1996 (ICH Harmonised Tripartite Guideline). CPMP/ICH/281/95.

[83] ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (Royal Society of Chemistry). Analyst, v.112, p 199-204, 1987.

[84] OMOTE, M.; HARAYAMA, K.; SASAKI, T.; MOCHIZUKI, N.; YAMASHITA, H. **Analysis of simultaneous screening for 277 pesticides in malt and beer by liquid chromatography with tandem mass spectrometry**. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 64(3):139-150, 2006.

[85] VELA, N.; PÉREZ, G.; NAVARRO, G.; NAVARRO, S. **Gas Chromatographic determination of pesticide residues in malt, spent grains, wort, and beer with electron capture detection and mass spectrometry**. Journal of AOAC International, v. 90, n. 2, 2007.

[86] KONG, Z.; LI, M.; CHEN, J.; GUI, Y.; BAO, Y.; FAN, B.; JIAN, Q.; FRANCIS, F.; DAÍ, X. **Processing factors of triadimefon and triadimenol in barley brewing based on response surface methodology**. Food Control. 64, 81-86, 2016.

[87] KONG, Z.; LI, M.; CHEN, J.; GUI, Y.; BAO, Y.; FAN, B.; JIAN, Q.; FRANCIS, F.; DAÍ, X. **Behavior of field-applied triadimefon, malathion, dichlorvos, and their main metabolites during barley storage and beer processing**. Food Chemistry. 679-686, 2016.

[88] ZHOU B.; GUAN W.; ZHANG H.; WANG X.; XU H.; WANG Q. **Fate of carbendazim residue during beer brewing process by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal Chinese of Pesticide Science, 18(3): 402-406, 2016.

[89] WUETHRICH, A.; HADDAD, P.R.; QUIRINO, J.P. **Simultaneous electrophoretic concentration and separation of herbicides in beer prior to stacking capillary electrophoresis UV and liquid chromatography-mass spectrometry**. Electrophoresis, 37, 1122–1128, 2016.

- [90] BEDASSA, T.; MEGERSA, N.; GURE, A. **Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of multiresidue pesticides in alcoholic beverages by high performance liquid chromatography.** Science Journal of Analytical Chemistry. 38-45, 2017.
- [91] DUSEK, M.; JANDOVSKÁ, V.; OLSOVSKÁ, J. **Tracking, behavior and fate of 58 pesticides originated from hops during beer brewing.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66, 10113-10121, 2018.
- [92] SILVA, A.R.; NAVICKIENE, S.; SANTOS, L.F.S. **Use of magnesium silicate as a new type of adsorbent for dispersive solid-phase extraction clean up of the Qhick, cheap, effective, rugged, and safe method of pesticides during analysis of lager beer by gas chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of AOAC International. 102, n. 2, 2019.
- [93] LOPEZ, S.H.; DIAS, J.; MOL, H.; KOK, A. **Selective multiresidue determination of highly polar anionic pesticides in plant-based milk, wine and beer using hydrophilic interaction liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2020.
- [94] PIRES, N.A.; OLIVEIRA, M.L.G.; GONÇALVES, J.A.; FARIA, A.F. **Multiclass Analytical method for pesticide and mycotoxin analysis in malt, brewers's spent grain ,and beer: Development, validation and application.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69, 4533-4541, 2021.
- [95] NAGATOMI, Y.; YOSHIOKA, T.; YANAGISAWA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. **Rapid analisys of paraquat and diquat in beer and malt using LC-MS/MS.** Journal of Pesticide Science. 38(3), 144-146, 2013.
- [96] IUPAC **PPDB – International Union of Pure and Applied Chemistry.** Pesticides Properties Data Base. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>> Acesso em: 28 de setembro de 2021.
- [97] PUBCHEM. PubChem Data Base. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 25 de setembro de 2021.
- [98] CARMO, D. A.; CARMO, A.P.B.; PIREZ, J.M.B.; OLIVEIRA, J.L.M. **Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina.** Revista Ambiente & Água, v. 8, n. 1, p. 133–143, 2013.
- [99] BARCELÓ, D.; HENNION, M-C. **Pesticides and their degradation products: characteristics, usage and environmental behavior.** In: BARCELÓ, D.; HENNION, MC. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. Vol. 19; Amsterdam: Elsevier Science, 1997.
- [100] BAIRD, C.; CANN, M. Environmental Chemistry. 5 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012.
- [101] MILHOME, M. A. L.; SOUZA, D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F. **Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas**

aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 14, n. 3, 2009, p. 363–372.

[102] **SHIMADZU: Coluna cromatográfica Shim-pack UC-X RP.** <https://www.shimadzu.eu.com/columns-sfc>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.

[103] KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J.; **Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1216, p. 685-699, 2009.

[104] REBANE, R.; KRUBE, A.; LIIGAND, J.; GORNISCHEFF, A.; LEITO, I. **Ionization efficiency ladders as tools for choosing ionization mode and solvent in liquid chromatography/mass spectrometry.** Rapid Communications in Mass Spectrometry. 33: 1834-1843, 2019.

[105] SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography.** 3 ed. EUA: Editora John Wiley& Sons, 2010.

[106] LANÇAS, F. M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”?** Scientia Chromatographica, v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.

[107] FERENC, A.Z.; BIZIUK, M. **Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications.** Polish Journal of Environmental Studies. v. 15, n. 5, 677-690, 2006.

[108] GUNTER, A.; BALSAA, P.; WERRES, F.; SSHMIDT, T.C. **Influence of the drying step within disk-based solid phase extraction both on the recovery and the limit of quantification of organochlorine pesticides in surface Waters including suspended particulate matter.** Journal of chromatography A. 1450:1-8, 2016.

[109] SENSEMAN, S.A.; LAVY, T.L.; MATTICE, J.D. **Desiccation Effects on Stability of Pesticides 481 Stored on Solid-Phase Extraction Disks.** Analytical Chemistry 67. 3064-3068, 1995.

[110] MILIADIS, G.E. **Determination of pesticide residues in natural Waters of Greece by solid phase extraction and gas chromatography.** Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. 52:25-30 Springer-Verlag New York Inc, 1994.

[111] PELAJIC, M.; PECEK, G.; PAVLOVIC, D.M.; CEPO, D.V. **Novel multi residue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography – mass spectrometry and solid phase extraction.** Journal Food Chemistry. 200: 98-106, 2016.

[112] ZHOU, Q.; DING, Y.; XIAO, J. **Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high performance liquid chromatography.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 385: 1520-1525, 2006.

[113] HADJMOHAMMAD, R. M.; PEYROV, M.; BIPARVA, P. **Comparison of C18 silica and multi-walled carbon nanotubes as the adsorbents for the solid-phase extraction of chlorpyrifos and phosalone in water samples using HPLC.** Journal of Separation Science. 33- 1044-1051, 2010.

- [114] JAROSZYNSKA, J. **Isolation of free phenolic compounds from arboreal leaves by use of the Florisil/C18 system.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, p. 702–708, 2003.
- [115] TSOCHATZIS, E.D.; SPIROUDI, U.M.; KARPOUZAS, D.G.; TSITOURIDOU, R.T. **A Multi-residue method for pesticide residues analysis in rice grains using matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397:2181-2190, 2010.
- [116] SINHA, S.N.; VASUDEV, K.; VARDHANA, R.M.V. **Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “Quick Easy Clean Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique.** *Journal Food Chemistry*, 132. 1574-1584, 2012.
- [117] SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. **Liquid chromatography – electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits.** *Journal of chromatography A*, 1048. 41-40. 2004.
- [118] MICHEL, M.; BUSZEWSKI, B. **Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material.** *Journal of Chromatography B*, 800. 309-314, 2004.
- [119] LI, Y.; XING, B.; DING, Y.; HAN, X.; WANG, S. **A critical review of the production and advanced utilization of biochar via selective pyrolysis of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*. 312, 123614, 2020.
- [120] JI, X.; FENG, J.; LI, C.; HAN, S.; SUN, M.; FENF, J.; SUN, H.; FAN, J.; GUO, W. **Corn cob biochar as a coating for trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by online in tube solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography.** *Microchemical Journal* 159, 105399, 2020.
- [121] SOARES, P.R.L. **Produção de biocarvão e sua aplicação para extração em fase sólida de pesticidas em água.** Mestrado. Dissertação. Programa de Pós – Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, 2022.
- [122] BOOTHARAJU, M.S.; PRADEEP, T. **Understanding the degradation pathway of the pesticide, chlorpyrifos by noble metal nanoparticles.** *Langmuir*, 28, 2671–2679, 2012.
- [123] KOC, F.; KARAKUS, E. **Determination of organochlorinated pesticide residues by gas chromatography – mass spectrometry after elution in a florisil column.** *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 17 (1): 65 – 70, 2011.
- [124] CARREGOSA, I.S.C. **Termovalorização da biomassa de aguapé (Eichhornia Crassipes) através de pirólise em reator forno rotativo.** Mestrado. Dissertação. Programa de Pós – Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, 2016.
- [125] ASWANI, M.T.; KUMAR, M.V.P. **A novel water hyacinth based biosorbent for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) removal from aqueous solution.** *Desalination and water treatment* 165, 163-176, 2019.

- [126] BAHRI, M. A.; CALVO, L.; GILARRANZ, M.A.; RODRIGUEZ, J.J. **Activated carbon from grape seeds upon chemical activation with phosphoric acid: application to the adsorption of diuron from water**, Chem. Eng. J. 203, 348–356, 2012.
- [127] LUNA, J.H.M. **Produção e aplicação do biocarvão da semente de uva na extração dos desreguladores endócrinos 17 α -etinilestradiol e dietilestilbestrol**. Mestrado. Dissertação. Programa de Pós – Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, 2022.
- [128] UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Ácidos e Bases**. Disponível em: [http://www.ufrgs.br/comgradbio/images/Qu%C3%ADmica_Te%C3%B3rica_Funda 98 mental_Material_Did%C3%A1tico_Produzido.pdf](http://www.ufrgs.br/comgradbio/images/Qu%C3%ADmica_Te%C3%B3rica_Funda%2098_mental_Material_Did%C3%A1tico_Produzido.pdf) (acessado em 29 de maio de 2022).
- [129] INMETRO–INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQCGCRE-008. 2020.
- [130] SANTE, Commission of the European Communities. Document n° SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and 84 method validation procedures for pesticides and analysis in food and feed**. Uppsala, Suécia, 2017.
- [131] STAHNKE, H.; KITTAUS, S.; KEMPE, G.; ALDER, L. **Reduction of matrix effects in liquid-chromatography-electrospray ionization – mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed?** American Chemical Society. 84, 1474-1482, 2012.

9. APÊNDICE

Apêndice 1. Relação dos percentuais de recuperação (R%) e coeficientes de variação (CV%) dos adsorventes que foram avaliados na condição de 500 mg, 10 mL de cerveja com nível de fortificação de 1 µg mL⁻¹ e 5 mL de metanol.

Pesticida	Alumina neutra		Florisil		Sílica		PSA		C18	
	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)
Simazina	4%	7%	85%	3%	13%	12%	3%	4%	72%	2%
Terbufós	70%	15%	44%	50%	66%	15%	39%	2%	30%	2%
Tiametoxam	2%	4%	40%	7%	15%	1%	2%	2%	45%	1%
Malationa	13%	10%	101%	8%	29%	10%	15%	16%	72%	5%
Propanil	8%	15%	96%	6%	19%	1%	11%	4%	137%	2%
Clorpirifós	39%	3%	70%	13%	80%	5%	51%	1%	40%	2%
Carbossulfano	12%	12%	12%	4%	68%	1%	11%	1%	5%	1%
Epoxiconazol	20%	3%	105%	5%	43%	6%	30%	7%	66%	1%
Abamectina	93%	16%	110%	6%	125%	2%	79%	9%	77%	1%
Lufenuron	74%	1%	92%	2%	108%	4%	61%	3%	114%	4%
Flutriafol	6%	1%	88%	5%	19%	1%	7%	7%	79%	4%
Azoxistrobina	14%	9%	88%	19%	34%	5%	16%	9%	71%	2%
Atrazina	5%	14%	84%	2%	17%	1%	5%	13%	72%	2%
Haloxifope	3%	9%	52%	5%	20%	7%	2%	2%	133%	3%
Ametrina	11%	2%	94%	3%	33%	4%	14%	11%	72%	3%

Apêndice 1: Continuação

Esfenvalerato	36%	21%	57%	3%	69%	15%	32%	7%	39%	3%
Acetamiprido	3%	1%	94%	2%	22%	5%	2%	3%	73%	3%
Diurum	5%	3%	98%	6%	19%	0%	8%	0%	74%	3%
Carbendazin	4%	5%	82%	2%	20%	6%	6%	3%	67%	4%
Tiofanato-metílico	3%	10%	68%	7%	10%	8%	4%	7%	69%	5%
Imidacloprido	16%	10%	99%	3%	32%	1%	2%	0%	75%	0%
Deltametrina	33%	18%	50%	2%	68%	2%	36%	3%	41%	3%

Apêndice 2: Relação dos percentuais de recuperação (R%) e coeficientes de variação (CV%) na condição de 500 mg de C18, 10 mL de cerveja com nível de fortificação de 1 µg mL⁻¹ e 5 mL de metanol para verificar a influência da etapa de secagem do adsorvente.

Pesticida	C18 sem secagem		C18 com secagem	
	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)
Simazina	72%	2%	103%	4%
Terbufós	30%	2%	33%	11%
Tiametoxam	45%	1%	56%	4%
Malationa	72%	5%	91%	2%
Propanil	137%	2%	89%	2%
Clorpirifós	40%	2%	62%	1%
Carbossulfano	5%	1%	10%	1%
Epoxiconazol	66%	1%	108%	11%
Abamectina	77%	1%	81%	3%
Lufenuron	114%	4%	63%	2%
Flutriafol	79%	4%	97%	0%

Apêndice 2: Continuação

Azoxistrobina	71%	2%	94%	1%
Atrazina	72%	2%	101%	1%
Haloxifope	133%	3%	90%	3%
Ametrina	72%	3%	93%	1%
Esfenvalerato	39%	3%	46%	2%
Acetamiprido	73%	3%	103%	5%
Diurum	74%	3%	106%	5%
Carbendazim	67%	4%	103%	3%
Tiofanato-metílico	69%	5%	101%	2%
Imidacloprido	75%	0%	90%	3%
Deltametrina	41%	3%	45%	4%

Apêndice 3. Relação dos adsorventes alternativos avaliados na condição de 150 mg, 10 mL de cerveja com nível de fortificação de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3 mL de (MeOH: DCM) com os respectivos valores de recuperação (R%) e coeficientes de variação (CV%).

Pesticida	BC sabugo de milho		BC Aguapé		BC semente de uva	
	<i>MeOH_DCM (90:10)</i>		<i>MeOH_DCM (60:40)</i>		<i>MeOH_DCM (60:40)</i>	
	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)	(R%)	(CV%)
Simazina	59%	7%	69%	1%	28%	5%
Terbufós	105%	4%	120%	2%	88%	11%
Tiametoxam	37%	10%	29%	1%	19%	23%
Malationa	83%	0%	101%	10%	44%	11%
Propanil	82%	11%	91%	5%	61%	12%
Clorpirifós	58%	10%	77%	1%	109%	14%

Apêndice 3: Continuação

Carbossulfano	1%	28%	1%	19%	3%	3%
Epoxiconazol	76%	13%	99%	6%	65%	11%
Abamectina	90%	9%	87%	11%	94%	6%
Lufenuron	66%	16%	73%	8%	75%	11%
Flutriafol	52%	14%	56%	17%	29%	18%
Azoxistrobina	72%	2%	92%	7%	50%	9%
Atrazina	60%	9%	55%	16%	30%	18%
Haloxifope	52%	5%	27%	5%	34%	2%
Ametrina	64%	3%	81%	6%	48%	12%
Esfenvalerato	50%	1%	71%	4%	57%	17%
Acetamiprido	55%	9%	65%	18%	39%	3%
Diurum	81%	7%	101%	5%	52%	17%
Carbendazim	5%	3%	5%	7%	5%	23%
Tiofanato-metílico	23%	14%	49%	4%	17%	20%
Imidacloprido	67%	2%	83%	5%	48%	10%
Deltametrina	5%	4%	71%	9%	53%	15%