UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

THAÍS CAMAROTTO OLIVEIRA

Determinação de pesticidas em alimentos derivados da cana-de-açúcar por LC-MS/MS empregando DPX como técnica de preparo de amostra

São Carlos
2022

THAÍS CAMAROTTO OLIVEIRA

Determinação de pesticidas em alimentos derivados da cana-de-açúcar por LC-MS/MS empregando DPX como técnica de preparo de amostra

Dissertação submetida ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:
Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Oliveira, Thaís Camarotto
Determinação de pesticidas em alimentos derivados da cana-de-açúcar por LC-MS/MS empregando DPX como técnica de preparo de amostra / Thaís Camarotto Oliveira. — São Carlos, 2022.
113 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Cromatografia. 2. Espectrometria de massas. 3. DPX. 4. Extração em ponteiras descartáveis. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.

Solange M S Puccinelli - CRB: 1500/8

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo amor, dedicação, esforço e apoio ao longo de toda a minha vida. Sem vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, à Deus, por me abençoar, proteger, iluminar o meu caminho e me dar forças, coragem e conforto nos momentos mais difíceis.

À minha família, pelo apoio incondicional neste período e, em especial, pela ajuda e conselhos dados nos momentos difíceis dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, por ter me recebido no Laboratório de Cromatografia e me orientado durante todas as etapas deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, apoio e oportunidades que contribuíram para o desenvolvimento da minha formação profissional e acadêmica.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos técnicos do CROMA, Guilherme e Elaine, pelo apoio, dedicação, atenção e paciência constante durante esses anos de trabalho. Obrigada por sempre ouvirem as minhas perguntas e pelas respostas que contribuíram muito para a minha formação.

Aos amigos que fiz durante a pós-graduação. Obrigada Keila, Natália e Mariá, por me ouvirem nos bons e maus momentos, pelos conselhos, sugestões e pela amizade.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro ao laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Ao longo dos anos, o mercado agrícola tornou-se cada vez mais competitivo, e a busca por aumento da produção, assim como pela qualidade e controle de pragas faz com que haja uma crescente necessidade do uso de pesticidas. A toxicidade dessas substâncias e potenciais riscos à saúde geram uma constante cobrança da sociedade quanto à presença de resíduos de pesticidas em alimentos. A classe dos herbicidas é a mais empregada no cultivo de cana-de-açúcar. Apesar de existir legislação para o monitoramento dessas substâncias na planta, nada consta para o controle de resíduos dos herbicidas em alimentos derivados da cana. Este trabalho propõe métodos para a análise de onze herbicidas em garapa, rapadura, melado e cachaça. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) foi utilizada para a separação, identificação e quantificação dos analitos. Por estarem presentes em matrizes complexas, e em baixas concentrações, o preparo de amostra é fundamental para adequação dos analitos para a análise instrumental. Para isso, empregaram-se as técnicas de extração em ponteira descartável (DPX) e extração em fase sólida (SPE). Na SPE, C18 foi utilizado como fase extratora, obtendo recuperações entre 30 e 109% para os analitos em metanol/água. Dois métodos empregando DPX foram desenvolvidos: um utilizando ponteiras com 50 mg de C18 (octadecilsilano) e outro utilizando 10 mg de óxido de grafeno ancorado à sílica e C18 com endcapping (SiGOC18end), o qual foi sintetizado em laboratório e caracterizado por FT-IR. No método DPX-C18, as recuperações variaram entre 58 e 77% para os analitos em água, de 48 a 69% em garapa e de 48 a 70% em cachaça. Posteriormente, o método DPX-C18 foi aplicado em análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS), obtendo-se resultados ligeiramente melhores - após incluir uma etapa de secagem - que os obtidos através das análises por LC-MS/MS. No método DPX-SiGOC18end, as recuperações variaram de acordo com a matriz: água (34 – 90%), garapa (37 – 82%), rapadura (34 – 89%), melado (28 – 76%) e cachaça (10 – 100%). O método DPX-SiGOC18end foi validado seguindo o guia ICH – Q2 (R1), onde determinou-se a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação do método nas quatro matrizes avaliadas. O método foi aplicado em amostras reais encontradas no comércio de São Carlos, evidenciando sua versatilidade e potencial para aplicação em outras matrizes derivadas ou não da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cromatografia. Espectrometria de massas. DPX. Extração em ponteiras descartáveis. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Over the years, the agricultural market is facing a growing competition, and the search for increased production, quality, and pest control makes the use of pesticides increasingly necessary. The toxicity of these substances and potential health risks generate a constant charge to society due to the presence of pesticide residues in food. The class of herbicides is the most widely used in sugarcane cultivation. Although there is legislation for the monitoring of these substances in the crop, there is nothing about the control of herbicide residues in foods derived from sugarcane. This work proposes methods to analyze eleven herbicides in sugarcane juice (garapa), candy (rapadura), syrup (melaço) and spirit (cachaça). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for separation, identification and quantification of the analytes. Because they are present in complex matrices, and in low concentrations, sample preparation is essential for the suitability of the analytes for instrumental analysis. For this purpose, the techniques of disposable tip extraction (DPX) and solid phase extraction (SPE) were employed. In SPE, C18 was used as the extractant phase, obtaining recoveries between 30 and 109% for the analytes in methanol/water. Two methods employing DPX were developed: one using tips with 50 mg of C18 (octadecylsilane) and the other using 10 mg of silica-anchored graphene oxide and C18 with endcapping (SiGOC18end), which was synthesized in the laboratory and characterized by FT-IR. In the DPX-C18 method, recoveries ranged from 58 to 77% for the analytes in water, from 48 to 69% in juice, and from 48 to 70% in spirit. Subsequently, the DPX-C18 method was applied in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS) analyses, achieving slightly better results, after including a drying step, than LC-MS/MS analyses. In the DPX-SiGOC18end method, the recoveries ranged according to matrix: water (34 - 90%), juice (37 - 82%), candy (34 - 89%), syrup (28 - 76%) and spirit (10 - 100%). The DPX-SiGOC18end method was validated following the ICH - Q2 (R1) guide, determining the linearity, precision, accuracy, detection and quantification limits of the method in the four matrices evaluated. The method was applied to real samples found in the São Carlos region, showing its versatility and potential for application in other matrices derived from sugarcane or otherwise.

Keywords: Chromatography. Mass spectrometry. DPX. Disposable Pipette Tip Extraction. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimento de extração em fase sólida (SPE)....23
Figura 2 – Procedimento de extração por DPX....25
Figura 3 - Materiais sintetizados. Da esquerda para a direita: GO, SiGO, SiGOC18 e SiGOC18end....42
Figura 4 - Espectros FT-IR dos materiais sintetizados....43
Figura 5 - Gradiente de eluição LC-MS/MS....44
Figura 6 – Cromatograma (TIC) dos analitos por LC-MS/MS....44
Figura 7 – Programação de temperatura no método GC-MS....46
Figura 8 – Cromatograma de 12 analitos avaliados no método GC-MS....47
Figura 9 – DPR entre injeções de acetocloro em 12 métodos *autosampler*....48
Figura 10 – Cromatograma (TIC) dos analitos por GC-MS/MS....51
Figura 11 – Recuperação dos analitos (amostra aquosa) empregando diversos solventes de eluição....51
Figura 12 – Avaliação da composição do solvente da amostra para extração SPE (GC-MS)....51
Figura 13 – Avaliação do solvente de eluição em SPE....52
Figura 14 – Avaliação do solvente de condicionamento em SPE....53
Figura 15 – Avaliação do volume de solvente de condicionamento em SPE....53
Figura 16 – Avaliação da etapa de lavagem em SPE....54
Figura 17 – Parâmetros SPE otimizados....54
Figura 18 – Dispositivo DPX. (a) DPX apenas com o frit de polietileno; (b) DPX-C18; (c) DPX-SiGOC18end....56
Figura 19 – Avaliação do volume de amostra....57
Figura 20 – Avaliação do volume de ar após adição da amostra....57
Figura 21 – Avaliação do tempo de equilíbrio após a adição da amostra....58
Figura 22 – Tempo de equilíbrio após adição do solvente de eluição....59
Figura 23 – Método DPX-C18-LC-MS/MS....59
Figura 24 – Comparação entre as recuperações obtidas por SPE e DPX-C18 por LC-MS/MS....60
Figura 25 – Performance do método DPX-C18-LC-MS/MS em diferentes matrizes....61
Figura 26 – Comparação entre extrações DPX analisadas por GC-MS/MS e LC-MS/MS....62
Figura 27 – Efeito dos ciclos na adição da amostra na extração DPX-C18 –GC-MS/MS....63

Figura 28 – Efeito dos ciclos na etapa de eluição no método DPX-C18 –GC-MS/MS 63
Figura 29 – Avaliação do tempo de secagem do dispositivo no método DPX-GC-MS/MS 64
Figura 30 – Comparação das performances entre LC-MS/MS e GC-MS/MS (incluindo secagem) 65
Figura 31 – Avaliação dos materiais derivados de óxido de grafeno em DPX 66
Figura 32 – Avaliação do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end 67
Figura 33 – Avaliação do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end (inclusão da etapa de secagem) 67
Figura 34 – Avaliação de ciclos (amostra/manual) no método DPX-SiGOC18end 68
Figura 35 – Avaliação de ciclos (eluição/manual) no método DPX-SiGOC18end 68
Figura 36 – Avaliação de ciclos (amostra/automatizado) no método DPX-SiGOC18end 69
Figura 37 – Avaliação de ciclos (eluição/automatizado) no método DPX-SiGOC18end 69
Figura 38 – Avaliação do modo de inserção da amostra no método DPX-SiGOC18end 70
Figura 39 – Avaliação da etapa de aspiração de ar (amostra) no método DPX-SiGOC18end 70
Figura 40 – Avaliação da quantidade de sorvente no método DPX-SiGOC18end 71
Figura 41 – Avaliação do volume de solvente de eluição no método DPX-SiGOC18end 72
Figura 42 – Método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS. 72
Figura 43 – Método DPLX-SiGOC18end-LC-MS/MS aplicado em água, garapa, rapadura e melado 73
Figura 44 – Recuperações do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em cachaça diluída em diferentes proporções de água 74
Figura 45 – Efeito do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça) 74
Figura 46 – Efeito da água na etapa de condicionamento no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça) 75
Figura 47 – Efeito do solvente de eluição no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça) 75
Figura 48 – Avaliação da seletividade do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS para garapa (A), rapadura (B), melado (C) e cachaça (D) 77
Figura 49 – Detecção de simazina em amostra real de cachaça 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Herbicidas de interesse do trabalho 18
Tabela 2 – Parâmetros a serem avaliados no método autosampler (GC-MS e GC-MS/MS)... 36
Tabela 3 – Tempos de retenção e parâmetros de detecção do método LC-MS/MS..... 45
Tabela 4 – Tempos de retenção e íons monitorados por GC-MS..... 47
Tabela 5 – DPR entre dez injeções no método *autosampler* 12..... 48
Tabela 6 – Transições monitoradas no método GC-MS/MS..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Acetocloro
ALA	Alacloro
AME	Ametrina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Atrazina
C18	Octadecilsilano
CLO	Clomazona
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
DPR	Desvio padrão relativo
DPX	Extração em ponteira descartável
EI	Impacto de elétrons
ESI	*Electrospray*
FT-IR	Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
GO	Óxido de grafeno
HEX	Hexazinona
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC	Cromatografia líquida
LMRs	Limites Máximos de Resíduos
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEPS	Microextração em sorvente empacotado
METO	Metolacloro
METR	Metribuzim
MRM	Monitormento de reações múltiplas
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
OXI	Oxifluorfem
S	Desvio padrão

SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SCAN	Modo de varredura
SIM	Monitoramento de íon único
SiGO	Óxido de grafeno ancorado à sílica
SiGOC18	Óxido de grafeno ancorado à sílica e funcionalizado com C18
SiGOC18 end	Óxido de grafeno ancorado à sílica e funcionalizado com C18 com *endcapping*
SIMA	Simazina
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TEB	Tebutiurom
t_r	Tempo de retenção
TRIF	Trifluralina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Cana-de-açúcar e alimentos derivados 17
2.2 Pesticidas 18
2.3 Cromatografia e espectrometria de massas 18
2.4 Técnicas de preparo de amostra 21
2.5 Extração em Fase Sólida – SPE 23
2.6 Extração em ponteira descartável – DPX 24
2.7 Materiais à base de grafeno 26
2.8 Validação de métodos analíticos 27
2.8.1 SELETIVIDADE 28
2.8.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) 28
2.8.3 LINEARIDADE 28
2.8.4 PRECISÃO 29
2.8.5 EXATIDÃO 29
3 OBJETIVOS 30
3.1 Objetivos gerais 30
3.2 Objetivos específicos 30
4 MATERIAIS E MÉTODOS 31
4.1 Padrões e reagentes utilizados 31
4.2 Instrumentação 31
4.3 Metodologia 32
4.3.1 SÍNTESE DOS MATERIAIS 32
4.3.1.1 Síntese do óxido de grafeno 32
4.3.1.2 Síntese de óxido de grafeno anconrado a sílica 33
4.3.1.3 Síntese do óxido de grafeno ancorado à sílica funcionalizado com C18 33
4.3.1.4 Síntese do óxido de grafeno ancorado à sílica funcionalizado com C18 com *endcapping* 34
4.3.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO LC-MS/MS 34
4.3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO GC-MS 35
4.3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO GC-MS/MS 35
4.3.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO SPE 36

4.3.6 DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO DPX-C18 e DPX-SiGOC18end 37
4.3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX C18 (LC-MS/MS) 37
4.3.8 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX C18 (GC-MS/MS) 38
4.3.9 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX SiGOC18end-LC-MS/MS 38
4.3.10 PREPARO DAS MATRIZES PARA A VALIDAÇÃO ANALÍTICA 39
4.3.11 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS 40
4.3.12 APLICAÇÃO DO MÉTODO DPX-SiGOC18$_{end}$-LC-MS/MS EM AMOSTRAS 41
5 RESULTADOS 42
5.1 Caracterização dos materiais sintetizados 42
5.2 Desenvolvimento do método LC-MS/MS 43
5.3 Desenvolvimento do método GC-MS 46
5.4 Desenvolvimento do método GC-MS/MS 49
5.5 Desenvolvimento do método SPE 49
5.6 Desenvolvimento do dispositivo DPX-C18 e DPX-SiGOC18end 54
5.7 Desenvolvimento do método DPX C18 (LC-MS/MS) 56
5.8 Comparação DPX-C18 e SPE 59
5.9 Aplicação do método DPX-C18-LC-MS/MS em amostra de garapa e cachaça fortificada 60
5.10 Comparação do método DPX-C18 com posterior análise por LC-MS/MS e GC-MS/MS 61
5.11 Desenvolvimento do método de extração DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS 65
5.12 Aplicação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em matrizes derivadas da cana-de-açúcar 73
5.13 Aplicação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em cachaça 73
5.14 Validação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS 76
5.14.1 SELETIVIDADE 76
5.14.2 LINEARIDADE, LOD E LOQ 78
5.14.3 PRECISÃO 78
5.14.4 EXATIDÃO 79
5.15 Aplicação em amostras 79
6 CONCLUSÃO 80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82
APÊNDICE 91

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e destaca-se como grande exportador de etanol e açúcar. A espécie é uma das mais cultivadas do país e movimenta a economia de diversos estados, com destaque para a região sudeste. Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) a produção da safra 2021/2022 de cana-de-açúcar foi de 585,2 milhões de toneladas, com produção de 35 milhões de toneladas de açúcar e 26,8 bilhões de litros de etanol.[1]

Ao longo dos anos, o mercado agrícola está cada vez mais competitivo e a busca por aumento de produção, qualidade e controle de pragas faz com que haja uma crescente necessidade do uso de pesticidas, também conhecidos como agrotóxicos.

Dentre os pesticidas usados no cultivo da cana-de-açúcar, destacam-se os herbicidas, os quais são utilizados para controle e eliminação de ervas daninhas que causam impactos negativos na produtividade da cana. Com o uso extensivo de pesticidas nas plantações (muitas vezes, de forma inadequada) e o fortalecimento do comércio internacional de alimentos, a qualidade e segurança alimentar têm sido temas cada vez mais discutidos.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina quais pesticidas são permitidos no cultivo das plantas e, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por regulamentar os limites máximos de resíduos de pesticidas (LMRs) permitidos.

No caso da cana-de-açúcar, porém, não há legislação quando se trata dos produtos derivados dessa cultura. Entretanto, deve ser considerado que muitos desses derivados são empregados como alimentos, após processamento (caso do açúcar e da rapadura), ou “in natura” como no caso do suco extraído da cana (popularmente conhecido como garapa).

Assim, observou-se a necessidade de desenvolver um método analítico capaz de identificar e quantificar essas substâncias, na cana-de-açúcar e seus derivados (açúcar, garapa, rapadura, melaço e cachaça).

Por tratar de matrizes complexas e analitos em concentrações muito baixas, o preparo de amostra é uma etapa essencial antes da análise cromatográfica.

A técnica de extração em ponteira descartável (DPX – *Disposable Pipette Tip Extraction*) foi escolhida por ser uma micro técnica de extração rápida, simples, com possibilidade de automação e que requer volumes pequenos de amostra e solventes, em consonância com os princípios da “química verde”.

Esta técnica tem sido alvo de crescente interesse dos pesquisadores, com diversos trabalhos publicados recentemente. Porém, não há relatos da sua aplicação em cana-de-açúcar e seus derivados.

A técnica de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) também foi avaliada no preparo de amostra, sendo uma técnica já consolidada há décadas e, amplamente empregada para a extração de analitos em diversas matrizes.

Este projeto propõe-se desenvolver um procedimento analítico o qual possibilitará um melhor controle da presença de herbicidas na cana-de-açúcar e seus derivados alimentícios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar e alimentos derivados

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao gênero *Saccarum L*. composta de água (65 – 75%), açúcares (11 – 18%), fibras (8 – 14%) e sólidos solúveis (12 – 23%). Dentre os açúcares, a sacarose está em maior concentração (70 – 91%), seguida de frutose e glicose (2 – 4% cada).[2]

O açúcar é um dos principais produtos derivados da cana, sendo empregado em diversos segmentos da indústria alimentícia. Pode ser classificado de acordo com o tamanho dos cristais, grau de clarificação, polarização, dentre outros.[3] Os tipos mais produzidos são cristal branco, refinado e VHP (*very high polarization*).

O caldo de cana, também conhecido popularmente como garapa, é uma bebida altamente nutritiva e de baixo custo, produzida pela moagem da cana-de-açúcar e vendida principalmente em feiras e mercados populares.[4]

A rapadura é um doce produzido pela concentração do caldo de cana, que depois de solidificado por resfriamento, é cortado em blocos. A rapadura possui alto valor nutritivo, sendo rica em vitaminas e minerais.[5]

O melado é um líquido viscoso de coloração âmbar, obtido a partir da concentração do caldo de cana ou do derretimento da rapadura e pode ser consumido puro ou como adoçante em receitas caseiras e produção de alimentos industrializados. Além do alto teor de carboidratos, o melado é fonte de minerais, como cálcio, magnésio, ferro e fósforo.[6]

A aguardente de cana é a bebida alcoólica obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana, com graduação alcoólica entre 38 e 54% a 20°C, enquanto que a cachaça é um tipo específico de aguardente de cana produzido no Brasil, cujo o teor alcoólico fica entre 38 e 48%, a 20°C.[7]

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, perdendo apenas para a cerveja.[7] Além do grande consumo interno, em 2021 a cachaça movimentou mais de 13 milhões de dólares no mercado internacional, sendo exportada para 67 países.[8]

2.2 Pesticidas

Pesticidas, também conhecidos como agrotóxicos, podem ser definidos como substâncias usadas na prevenção, controle e eliminação de pragas indesejáveis ou prejudiciais à agricultura e pecuária.[9] A competitividade nestes setores, e a busca por aumento da produção e qualidade dos alimentos, resultam em uma necessidade crescente do uso dessas substâncias.

Apesar de trazer diversos benefícios para a agricultura, pesticidas apresentam vários graus de toxicidade e, resíduos dessas substâncias, junto com seus metabólitos e produtos de degradação, podem se acumular no solo, água, plantas e alimentos.[10]

Além da exposição direta e indireta dos trabalhadores que aplicam os pesticidas nas lavouras, os resíduos presentes nos alimentos, mesmo que em baixas concentrações, podem provocar diversas doenças na população.

O MAPA e a ANVISA, são os órgãos brasileiros responsáveis pela regulamentação e controle do uso de pesticidas e seus resíduos em alimentos. Segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)[11], base de dados vinculada ao MAPA, cinquenta e dois pesticidas são liberados para uso na cultura de cana-de-açúcar no Brasil, sendo os herbicidas a classe mais empregada.

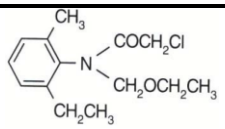
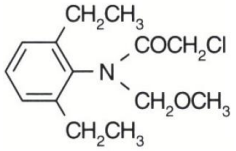
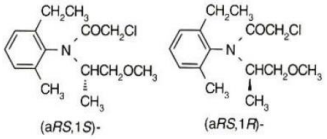
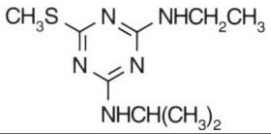
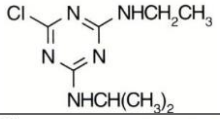
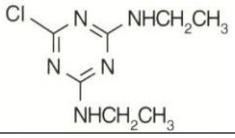
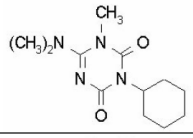
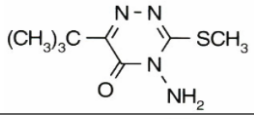
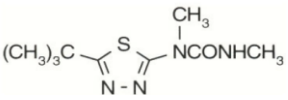
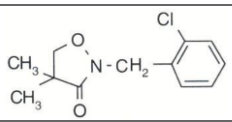
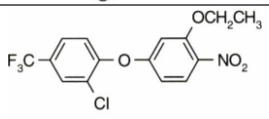
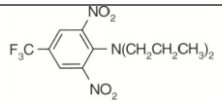
Para este trabalho, foram selecionados os doze herbicidas mais usados no cultivo de cana-de-açúcar e que, devido suas estruturas químicas favoráveis, podem ser analisados diretamente por cromatografia gasosa e líquida. A Tabela 1 apresenta os nomes dos analitos, abreviação, número CAS, massa molecular (MM) e estrutura molecular.

2.3 Cromatografia e espectrometria de massas

A cromatografia é uma técnica físico-química que permite separar componentes de uma mistura. O processo de separação ocorre por meio da distribuição dos componentes da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel. De acordo com as interações dos compostos com as fases, eles são retidos na fase estacionária nos diferentes tempos, sendo assim separados.[12]

Dentre as diversas formas da técnica, destaca-se a cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*).

Tabela 1 – Herbicidas de interesse do trabalho

Nome	Abreviação	CAS	MM	Estrutura
Acetocloro	ACE	34256-82-1	269,77	
Alacloro	ALA	15972-60-8	269,77	
Metolacloro	METO	51218-45-2	283,79	
Ametrina	AME	834-12-8	227,33	
Atrazina	ATR	1912-24-9	215,68	
Simazina	SIMA	122-34-9	201,66	
Hexazinona	HEX	51235-04-2	252,31	
Metribuzim	METR	21087-64-9	214,29	
Tebutiurom	TEB	34014-18-1	228,31	
Clomazona	CLO	81777-89-1	239,70	
Oxifluorfem	OXI	42874-03-3	361,70	
Trifluralina	TRIF	1582-09-8	335,28	

Na cromatografia gasosa, a amostra é distribuída entre uma fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e uma fase gasosa móvel, composta de um gás inerte, que transporta as moléculas pela coluna no processo de separação.[13]

Esta técnica pode ser aplicada na análise de amostras voláteis, termicamente estáveis e de baixo peso molecular. Em alguns casos, onde a molécula não atende esses requisitos, pode-se aplicar o processo de derivatização, a fim de modificar o composto e conseguir uma separação mais rápida e eficiente. [13]

Na cromatografia líquida (LC), a amostra é distribuída entre a fase estacionária, que pode ser líquida ou sólida, e uma fase móvel líquida, geralmente uma mistura de água e solvente orgânico. A LC separa tanto moléculas neutras como íons, independentemente da volatilidade, estabilidade térmica e peso molecular, necessitando apenas que a amostra seja solúvel na fase móvel.[12]

Os principais mecanismos envolvidos na separação por cromatografia líquida são: adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho.

No mecanismo de adsorção, os analitos são separados pela interação entre a superfície de uma fase estacionária sólida polar (sílica ou alumina, por exemplo) e fase líquida apolar/semipolar. A partição envolve a distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária depositada na coluna. Na troca iônica, resinas contendo excesso de cargas elétricas interagem com os íons presentes na amostra. A exclusão por tamanho é empregada na separação de compostos de diferentes tamanhos, que interagem com a fase estacionária contendo poros de diferentes diâmetros. [14]

A espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) é amplamente empregada junto à cromatografia, auxiliando na identificação estrutural dos compostos através da relação massa/carga dos mesmos.[15] Mais recentemente, o uso de dois analisadores em sequência (“tandem”), representado pela sigla MS/MS, permite uma melhora acentuada da condição analítica, em especial na seletividade.

Na configuração em tandem, no modo de aquisição MRM (monitoramento de reações múltiplas), o primeiro analisador é usado para selecionar apenas os íons com determinada relação massa/carga (m/z) (íons-precursor ou íons-pai), que são encaminhados para uma célula de colisão, onde são fragmentados (íons-fragmento ou íons-filho).[16] Esses fragmentos são analisados em um segundo analisador. Esse sistema permite analisar transições (composta por um íon-precursor e seu íon fragmento) específicas para cada substância, tornando o método mais seletivo, podendo diferenciar moléculas com a mesma massa molecular ou com estruturas semelhantes.

O acoplamento GC-MS e GC-MS/MS é bem estabelecido, resultando em uma técnica rápida, simples e com grande sensibilidade e seletividade.[17] A técnica tem sido empregada em diversas áreas de pesquisa.[18–22]

A forma de ionização mais usada no acoplamento com cromatografia gasosa é a ionização por elétrons (EI – *Electron Ionization*), antigamente conhecida como impacto de elétrons. A fonte EI opera em baixas pressões e utiliza elétrons com alta energia (geralmente 70 eV) para fragmentar a molécula e gerar uma grande quantidade de íons, contribuindo para a identificação dos compostos de estudo.[23]

Inicialmente, baseado em GC-MS, o acoplamento da espectrometria de massas com a cromatografia líquida resultou em problemas de compatibilidade devido à diferença das propriedades da fase móvel e pressões de operação dos equipamentos.

O desenvolvimento de fontes de ionização à pressão atmosférica (API – *Atmospheric Pressure Ionization*) e a diminuição do fluxo e diâmetro das colunas cromatográficas permitiram o acoplamento LC-MS (e posteriormente, LC-MS/MS) de forma efetiva, sendo utilizado para análises em diversos segmentos.[24–27]

A fonte de ionização denominada *electrospray* (ESI) é a mais usada no acoplamento com cromatografia líquida. A ESI opera em pressão atmosférica, sendo considerada uma fonte branda de ionização, pois utiliza baixa energia para ionizar as moléculas, gerando uma pequena quantidade de íons.[23]

2.4 Técnicas de preparo de amostra

Na maioria das vezes não é possível analisar a amostra diretamente no equipamento pretendido, devido à complexidade da matriz, cujos compostos interferem na análise, e os analitos de interesse estarem presentes a níveis de traços (baixas concentrações).

O preparo de amostra torna-se fundamental para uma análise seletiva, eficiente e com resultados confiáveis. Essa etapa visa extrair e concentrar os compostos de interesse e eliminar os interferentes da matriz, tornando a amostra adequada para a análise instrumental.[28] A etapa de preparo de amostra geralmente consome a maior parte do tempo total da análise.

Diversas técnicas de preparo de amostras estão disponíveis. As técnicas de extração Soxhlet[29], líquido-líquido (LLE – *Liquid-Liquid Extraction*) e extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) são consideradas convencionais ou clássicas.

As técnicas clássicas de preparo de amostra, além de serem demoradas, tornam-se caras e ambientalmente incorretas, devido ao alto consumo de solventes orgânicos e, consequentemente, a geração de grande quantidade de resíduos.

Visando minimizar estes problemas, nas últimas décadas as técnicas clássicas têm sido substituídas por técnicas miniaturizadas que, além de estarem de acordo com os princípios da química verde, também visam à automação e redução do tempo gasto com preparo de amostra.

Dentre as diversas técnicas miniaturizadas, destacam-se a microextração em fase sólida (SPME – *Solid Phase Microextraction*), extração sortiva em barra de extração (SBSE – *Stir Bar Sorptive Extraction*), microextração em sorvente empacotado (MEPS – *Microextraction by Packed Sorbent*) e extração em ponteira descartável (DPX – *Disposable Pipette Tip Extraction*).

Descrita pela primeira vez por Arthur e Pawliszyn em 1990, a técnica SPME é baseada no equilíbrio de partição dos analitos com a fase extratora.[30] O dispositivo mais empregado consiste em uma fibra de sílica fundida, ou de metal, recoberta com uma fase extratora. Na primeira etapa da técnica, a fibra é colocada em contato com a amostra e os analitos são sorvidos (absorvidos ou adsorvidos) na fibra. Em seguida, a fibra é encaminhada para o instrumento analítico para a dessorção, separação e quantificação dos analitos.[31]

A SPME é uma técnica de extração e concentração simples, rápida, com baixo consumo de amostra e solventes orgânicos, a qual pode ser aplicada para amostras líquidas, sólidas e gasosas. Nos últimos anos, as fibras vem sendo utilizadas em diferentes formatos, como no interior de uma ponteira (*in-tip* SPME), em tubo (*in-tube* SPME) e em seringas.[32]

A técnica MEPS foi desenvolvida em 2004 por Abdel-Rehim[33], inicialmente para análises biológicas. Uma pequena quantidade de material sorvente (em torno de 2 mg) é empacotada no interior de uma seringa, a qual pode ser conectada *on-line* com técnicas cromatográficas, sem grandes modificações nos instrumentos.[34]

Desenvolvida por Baltusen[35], a extração por SBSE ocorre em uma barra de agitação magnética revestida com uma camada de material sorvente, sendo polidimetilsiloxano (PDMS) a fase mais empregada. A barra é colocada em contato com a amostra, sob agitação por um período determinado, e os analitos são sorvidos. Em seguida, os analitos podem ser dessorvidos termicamente para análise por GC ou por solvente líquido para análise por LC.[36]

A SBSE é considerada uma técnica de extração sem solvente (*solventless*), quando utilizada com dessorção térmica, possui alta eficiência de extração, boa sensibilidade e reprodutibilidade.[37]

2.5 Extração em Fase Sólida – SPE

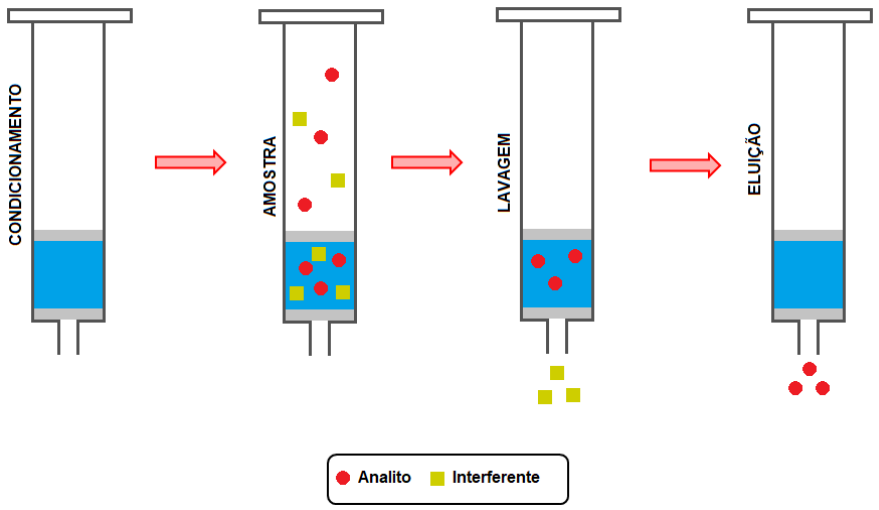
A extração em fase sólida surgiu em torno de 1970, visando eliminar os problemas da LLE. A SPE se baseia nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica, porém ocorre em uma coluna aberta, denominada cartucho, contendo material sorvente. Outros formatos também estão disponíveis, como discos e cartuchos em forma de barril.[38]

No processo de extração (Figura 1), primeiramente o cartucho é condicionado, com a finalidade de ativar o material contido no interior do cartucho. Em seguida, a amostra é adicionada e os analitos ficam retidos no cartucho, por meio de interações entre os compostos e a fase sólida. Uma etapa de lavagem pode ser adicionada, utilizando um solvente que não possua força suficiente para extrair os compostos de interesse, visando à eliminação de interferentes contidas na amostra.[39,40]

A última etapa da extração consiste na eluição dos analitos. O solvente usado deve ser capaz de extrair os analitos de interesse, mas não retirar os interferentes que ainda podem estar retidos na fase. Geralmente, este solvente possui força de eluição maior do que o solvente em que a amostra estava dissolvida.[40]

Esta técnica foi muito estudada desde o seu surgimento e apresenta boa recuperação, eficiência, além de grande seletividade, devido à vasta quantidade de fases extratoras disponíveis e os vários formatos, disponíveis para diferentes volumes de amostra.

Figura 1 – Procedimento de extração em fase sólida (SPE)



2.6 Extração em ponteira descartável – DPX

A técnica DPX foi desenvolvida em 2003, por Willian E. Brewer.[41] Também conhecida como PT- SPE[42] e Dispersive *Pipette Extraction*[43,44], a técnica é uma variação da extração em fase sólida, porém utiliza material sorvente inserido em ponteiras descartáveis de pipeta.[45]

Além de ser uma técnica simples, rápida e eficiente, a DPX necessita de pequenas quantidades de amostra e solvente orgânico (sendo compatível com o conceito de "química verde"), apresentando boa recuperação e possibilidade de automatização.[46]

As ponteiras empregadas nesta técnica usualmente são de 1 ou 5 mL. O material sorvente é colocado entre dois filtros (denominados *frits*). O primeiro é colocado na extremidade inferior da ponteira, podendo ser de diversos materiais. Este filtro proporciona uma barreira permeável para a passagem dos fluídos nos sentidos de aspiração e dispersão da amostra. O segundo filtro é colocado na extremidade superior da ponteira, com a finalidade de prevenir a contaminação da pipeta ao impedir a passagem do material para o interior da mesma.[47,48]

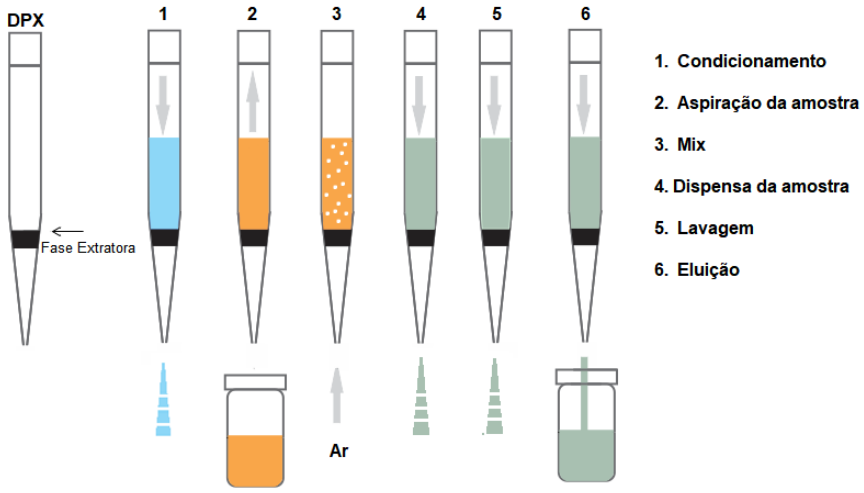
Na maioria dos procedimentos de extração com DPX (Figura 2) o material a ser inserido na ponteira é condicionado para ativação dos sítios de ligações. Após essa etapa, a amostra é aspirada para o interior da ponteira e misturada com a fase extratora através da entrada de ar pela ponta da ponteira. A suspensão formada pode ser dispensada após atingir o equilíbrio dinâmico entre analito e fase extratora, geralmente esse tempo é de alguns segundos. O próximo passo é a lavagem com solvente para a remoção de interferentes. Por último, o solvente de eluição é aspirado com ar, várias vezes, para a dessorção dos analitos, que migram para o solvente de eluição. O eluato então segue para a análise cromatográfica.[46]

Desde o seu surgimento, a técnica tem sido empregada como preparo de amostra para diversas matrizes e analitos[46], destacando-se a área de pesticidas em alimentos.

O desenvolvimento de métodos de análise multirresidual de pesticidas em alimentos é alvo de crescente interesse, seja de pesticidas pertencentes à mesma classe (multi-componentes), de diferentes grupos de substâncias aplicados à determinada matriz (multi-classes), ou ambos.

Recentemente, pesquisadores desenvolveram um método analítico para determinação de 28 pesticidas em vinho, no qual foram empregadas ponteiras com sorvente de troca iônica no preparo de amostra e posterior análise por LC-MS/MS. Além de alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão, bons valores de LOD e LOQ foram obtidos (1,5 – 3,0 e 5 – 10 ng

Figura 2 – Procedimento de extração por DPX



mL^{-1}, respectivamente). Ao ser comparado com métodos que empregam SPE e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective,Rugged, and Safe*), o método proposto mostrou-se mais apropriado para análise dos compostos selecionados em vinho.[49]

Carbendazim é um fungicida largamente empregado no cultivo de frutas cítricas. Pesquisadores sintetizaram um novo material (Si(PGDMS)), o qual foi aplicado como sorvente em ponteiras DPX para extração do fungicida em suco de laranja, com posterior análise por HPLC-DAD. O método apresentou boa exatidão, precisão, recuperação entre 93 e 110% e a extração foi feita em menos de três minutos.[50]

DPX foi utilizada para análise simultânea de inseticidas neocotinóides e reguladores de crescimento de inseto em amostras de mel.[51] As ponteiras atuaram na retenção dos analitos de interesse e remoção de açúcares presentes na amostra. O método apresentou boa sensibilidade e valores de LOD e LOQ entre 0,3 – 3 ng mL^{-1} e 1 – 10 ng mL^{-1}, respectivamente, além de ter potencial para aplicação em diferentes matrizes com alto teor de açúcares.

A extração em ponteira descartável também foi empregada na etapa de purificação e concentração de amostras de tomate, maçã e alface, para análise de nove pesticidas por GC-MS/MS.[52] O método desenvolvido foi considerado rápido, preciso e adequado para análise desses pesticidas em frutas e vegetais.

A técnica de extração também foi aplicada para determinação de cinco carbamatos em suco de frutas.[53] Ponteiras de pipeta com grafeno foram utilizadas na etapa de preparo de amostras de suco de uva, pera e limão, as quais posteriormente foram analisadas por UHPLC–

MS/MS. Quando comparado com outros materiais sorventes, disponíveis comercialmente, o grafeno apresentou melhores resultados para os analitos selecionados. O método apresentou boa linearidade, recuperação, precisão e baixos valores de LOD e LOQ (2,2 – 33 e 7,4 – 110 ng L^{-1}, respectivamente).

2.7 Materiais à base de grafeno

O grafeno é uma forma alotrópica do carbono, a qual possui uma estrutura bidimensional composta por átomos de carbono com hibridização sp^2. Com elevada área superficial (~2630 m^2 g^{-1}), excelentes propriedades térmicas, óticas e eletrônicas, o material está sendo estudado em vários campos científicos. [54]

Sua grande área superficial com elétrons π deslocalizados e nanoestrutura bidimensional em camadas torna o grafeno um material interessante para atuar como sorvente em preparo de amostras, principalmente para compostos aromáticos.[55]

A superfície das folhas de grafeno não possui grupos funcionais, o que pode resultar em baixa seletividade. A forma oxidada do grafeno, o óxido de grafeno (GO), possui grupos funcionais contendo oxigênio distribuídos em sua superfície. Além de aumentar a seletividade, esses sítios ativos facilitam a modificação do material com outras partículas e moléculas.[56]

Devido às suas características físicas e químicas, o grafeno, o óxido de grafeno e compostos derivados vem sendo empregados como sorventes em várias técnicas de extração, incluindo extração em ponteiras descartáveis.[57,58]

Yan et al desenvolveram um método para análise de resíduos de sulfonamidas em leite, empregando o grafeno na extração por DPX. Ponteiras de 100 μL e 1 mL preparadas com 3 mg do material foram capazes de analisar 2 mL de leite, mostrando-se um método econômico, simples e com grande sensibilidade.[59]

As auxinas são usadas como reguladores de crescimento em plantas e estudos apontam um potencial tóxico para humanos.[60] Pesquisadores analisaram essas substâncias em suco de mamão utilizando um composto à base de óxido de grafeno como sorvente na extração em ponteira descartável.[61] A fase extratora apresentou alta afinidade e capacidade de adsorção para as auxinas selecionadas. Devido à alta sensibilidade, simplicidade e confiabilidade, os autores consideraram que, o método tem potencial para ser aplicado futuramente na análise desses compostos em amostras biológicas complexas.

Yuan et al[62] propuseram um método para determinação do hormônio 17β- estradiol, responsável por diversas interferências no sistema endócrino humano. Neste trabalho, foram utilizadas ponteiras de pipeta preparadas com um compósito de grafeno tridimensional/nanotubos de carbono como fase extratora, obtendo alta sensibilidade e grau de purificação para análise desse composto em amostras de laticínios.[62]

Chumbo (Pb II) é considerado um metal pesado e altamente tóxico para humanos, o qual entra no organismo por via respiratória e alimentar, podendo causar diversas doenças. Pesquisadores elaboraram um método para analisar o metal em amostras de cabelo[63], empregando um nano compósito de óxido de grafeno, zinco e cromo (GO/ZnCr LDH) na extração por DPX. O material apresentou alta capacidade de sorção e o método, sob condições ótimas, obteve resultados com boa linearidade, precisão e exatidão, além de recuperações entre 92 e 104%.

Um líquido iônico funcionalizado com óxido de grafeno foi empregado em ponteiras para extração de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) em amostras de sangue humano, com posterior análise por GC-MS. Os limites de detecção e quantificação do método para os analitos ficaram entre 0,002 - 0,004 e 0,007 - 0,013 ng mL^{-1}, respectivamente. O material apresentou alta eficiência de extração e o método foi considerado simples, rápido e as ponteiras podem ser reutilizadas, diminuindo o custo das extrações.[64]

2.8 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos consiste em um conjunto de testes feitos para atestar a confiabilidade e veracidade dos dados obtidos. A avaliação dos parâmetros de validação, também conhecidos como figuras de mérito, tem como finalidade demonstrar que o método é adequado para a finalidade proposta.[65]

No Brasil, as principais agências responsáveis pelo estabelecimento das exigências de validação são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)[66], o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)[65] e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)[67].

Internacionalmente, os guias mais empregados são desenvolvidos pelo *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH)[68], *U.S. Food and Drug Administration* (FDA)[69] e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO)[70]. Quando comparados, podem existir algumas diferenças entre os

guias, porém os testes para validação do método contemplam os parâmetros principais descritos a seguir.

2.8.1 SELETIVIDADE

Corresponde à capacidade do método em determinar o composto de interesse na presença de interferentes, como impurezas, diluentes, metabólitos e outros componentes presentes na matriz.

2.8.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de detecção corresponde a menor quantidade que o analito pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, pelo método analítico. O limite de quantificação refere-se à concentração mínima no analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

Diferentes métodos podem ser aplicados para determinar esses limites. Em métodos instrumentais os quais apresentam uma linha de base na medição, o modo mais comum é a determinação pela relação sinal/ruído. Geralmente, para o LOD adota-se um sinal gerado para uma concentração conhecida do analito que seja três vezes maior que o ruído (3:1). Para o LOQ, a relação sinal deve ser dez vezes maior que o ruído (10:1).

2.8.3 LINEARIDADE

Compreende a capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em um determinado intervalo, denominado faixa de trabalho. Para a determinação da linearidade, constrói-se uma curva analítica correspondente à regressão linear conforme a Equação 1, onde y é uma variável dependente e corresponde ao sinal gerado pela injeção de diferentes concentrações, x é uma variável independente que corresponde às concentrações conhecidas do analito, a é o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. A partir da regressão linear, avalia-se também o coeficiente de correlação (r^2), que avalia a dispersão dos pontos ao longo da curva. Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de correlação, menor o desvio padrão dos pontos e maior confiabilidade é atribuída a linearidade.

$$y = a + bx \quad (1)$$

2.8.4 PRECISÃO

A precisão estima a proximidade dos resultados obtidos em ensaios independentes utilizando condições operacionais similares. Pode ser expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade, também conhecida como precisão intra-dia, avalia a concordância dos resultados obtidos em medições sucessivas em um curto período de tempo empregando as mesmas condições (mesmo operador, equipamento, local, condições analíticas). A precisão intermediária, também denominada precisão inter-dia, é avaliada sobre a mesma amostra, amostras iguais ou padrões, empregando o mesmo método, porém variando condições como dia, equipamento e operador. A reprodutibilidade é avaliada mediante ensaio interlaboratorial.

A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variância (CV), o qual pode ser calculado por meio das Equações 2 e 3.

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

$$DPR\% = \frac{S.100}{\bar{x}} \quad (3)$$

em que: x_i é o valor de cada medição, $\bar{x}$ é o valor médio das medições, n é o número de medições e s é o desvio padrão das amostras.

2.8.5 EXATIDÃO

A exatidão expressa o grau de concordância entre os valores de concentração obtidos experimentalmente em relação aos valores de concentração teórica e pode ser determinada pela Equação 4.

$$Exatidão\ \% = \frac{C1}{C2} . 100 \quad (4)$$

em que: C1 é a concentração experimental da amostra fortificada e C2 é a concentração teórica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos empregando extração em ponteira descartável à base de C18 e de materiais derivados de óxido de grafeno, para a análise cromatográfica de herbicidas selecionados em matrizes alimentares derivadas da cana-de-açúcar.

3.2 Objetivos específicos

a) Desenvolver um método cromatográfico empregando GC-MS e GC-MS/MS;
b) Desenvolver um método cromatográfico empregando LC-MS/MS;
c) Sintetizar óxido de grafeno e derivados;
d) Desenvolver e avaliar o preparo de amostra empregando a técnica de SPE, utilizando C18 como material sorvente;
e) Preparar ponteiras com fase extratora C18 e, posteriormente, com materiais à base de óxido de grafeno para serem utilizadas na técnica de DPX;
f) Desenvolver e avaliar a técnica de DPX como método de preparo de amostra para análise dos herbicidas de interesse;
g) Comparar os resultados obtidos empregando as técnicas SPE e DPX empregando C18;
h) Validar o método DPX-SiGOC18$_{end}$-LC-MS/MS em garapa, rapadura, melado e cachaça;
i) Aplicar o método DPX-SiGOC18$_{end}$-LC-MS/MS na análise de amostras reais de garapa, rapadura, melado e cachaça, disponíveis no comércio local de São Carlos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padrões e reagentes utilizados

Os padrões analíticos dos herbicidas foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), todos com pureza superior a 98%, com exceção do metolacloro e acetocloro (pureza >95%). Soluções-estoque individuais dos herbicidas foram preparadas na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol e armazenadas a -20 °C.

Metanol, etanol, acetonitrila, acetato de etila – adquiridos da Tedia (Fairfield, EUA) –, diclotometano (Honeywell Riedel-de Haen), e acetona (PanReac AppliChem), todos grau HPLC, foram utilizados no preparo de soluções, fase móvel e no desenvolvimento dos métodos de SPE e DPX. Água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Concord Road, Billerica, MA, EUA) foi utilizada nos experimentos.

Para a síntese dos materiais utilizou-se grafite em pó (< 20 µm), nitrato de sódio 99% ($NaNO_3$), permanganato de potássio 99% ($KMnO_4$), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida 98% (NHS), trimetilclorosilano (TMS) e tolueno anidro 99,8 %, todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Ácido sulfúrico 97,9 % (H_2SO_4), metanol e ácido clorídrico (HCl) 37% foram adquiridos da Tedia (Fairfield, EUA). Também se utilizou peróxido de hidrogênio (H_2O_2; 30%) da Synth (Diadema, Brasil), clorodimetil-n-octadecilsilano 95% (ODS; Alfa Aesar, Ward Hill, EUA), imidazol 98% (Mallinckrodt Chemical, Paris, France) e aminopropil sílica (40 µm, J.T. Baker; Phillipsburg, EUA).

4.2 Instrumentação

Os experimentos empregando LC-MS/MS foram conduzidos em um sistema Waters Acquity Ultra Performance LC (Milford, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo Xevo TQMS (Waters, Milford, EUA) com ionização por *electrospray* (ESI), empregando uma coluna modelo Kinetex C18 (2.1 mm x 100 mm x 2.6 µ; Phenomenex, Torrance, EUA). Na detecção, o espectrômetro de massas utilizado foi do tipo triplo quadrupolo, empregando argônio como gás de colisão (0,15 mL min^{-1}) e nitrogênio como

gás de dessolvatação (800 L h^{-1}; 400 °C). O *dwell time* utilizado no monitoramento dos íons foi de 0,01 s.

O sistema GC-MS/MS utilizado consiste em um cromatógrafo a gás Agilent 7890A (Santa Clara, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, modelo Waters Micromass Quattro micro GC Mass Spectrometer (Milford, EUA), equipado com fonte de ionização por elétrons. O sistema também é equipado com duas bombas rotativas externas, uma bomba interna turbomolecular de fluxo dividido (*split-flow*) e um injetor automático CombiPal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). A separação dos analitos foi feita utilizando uma coluna Agilent DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Santa Clara, EUA). Na detecção por espectrometria de massas, empregou-se uma fonte de ionização por elétrons no modo positivo (EI+), aplicando uma energia de 70 eV. A temperatura da fonte foi de 250 °C e da interface, 300 °C. A aquisição de dados iniciou após 3 min (*sonvent delay*) e adotou-se um *dwell time* de 0,05 s.

Em ambas as técnicas, o software MassLynx foi utilizado para aquisição e processamento de dados durante o desenvolvimento do método analítico.

Para comparar a performance entre técnicas de extração, SPE foi empregada quando cartuchos de C18 (1mL, 100 mg) da Varian (Harbor City, EUA), conectados a um sistema de vácuo multivias modelo Visiprep 24 (Supelco, Bellefonte, EUA).

Os materiais sintetizados foram caracterizados utilizando um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) modelo IRAffinity-1 da Shimadzu (Kyoko, Japão). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}, utilizando discos de KBr (brometo de potássio). Para a liofilização dos materiais sintetizados, utilizou-se o liofilizador modelo FR-Drying Digital Unit MODULYOD-115 (ThermoFisher, Waltham, EUA).

4.3 Metodologia

4.3.1 SÍNTESE DOS MATERIAIS

4.3.1.1 Síntese do óxido de grafeno

O óxido de grafeno (GO) foi sintetizado a partir do grafite, pelo método de Hummers modificado.[71] Em um balão de 500 mL, sob agitação e banho de gelo, foram colocados 50 mL de H_2SO_4 concentrado, 1,0 g de grafite e 1,0 g $NaNO_3$. Após 2 horas, adicionou-se 6,0 g $KMnO_4$ e deixou-se por 1h. Posteriormente, o balão foi transferido para um banho de água e mantido a 40°C durante a noite toda.

Mantendo as condições de temperatura e agitação forte, foram adicionados 40 mL de água lentamente. Em seguida, o balão foi colocado no banho de gelo e foram adicionados mais 160 mL de água, sob agitação.

Lentamente, 10 mL de H_2O_2 (30% v/v) foram adicionados. Ao observar uma mudança cor de marrom escuro para amarelo, a solução foi deixada sob repouso até dia seguinte, para que o precipitado migrasse para o fundo do balão.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi centrifugado (5000 rpm por 5 min). O precipitado foi lavado 5 vezes com uma solução aquosa de HCl 5% (v/v), utilizando as mesmas condições de centrifugação, para remoção de impurezas. Em seguida, o precipitado foi lavado com água até atingir o pH neutro (5000 rpm, 15 min). O produto final foi redisperso em água e mantido no ultrassom por 30 min e, então centrifugado por 15 min (5000 rpm) e liofilizado *overnight*.

4.3.1.2 Síntese de óxido de grafeno anconrado a sílica

Visando a maior estabilidade da fase extratora, a qual é contida no interior da pipeta e sofre uma pressão pela passagem dos líquidos, optou-se por ancorar o óxido de grafeno à aminopropil sílica.

A síntese do óxido de grafeno ancorado a sílica (SiGO) foi feito pela ligação do GO em aminopropil sílica em meio aquoso.[72] Para isso, 40 mg de GO e 80 mL de água foram adicionados em um balão de 250 mL e a mistura foi submetida ao ultrassom por 1h. Em temperatura ambiente, foram adicionados 0,750 mL de uma solução aquosa composta de 10 mmol L^{-1} de EDC e 5 mmol L^{-1} de NHS e deixou-se sob agitação por 30 minutos.

Em seguida, adicionou-se 1 g de aminopropil sílica e manteve-se a agitação por 4 h para obter uma suspenção marrom, a qual foi centrifugada (5000 rpm, 5 min). O material obtido foi lavado três vezes com metanol e água, alternadamente, e em seguida liofilizado.

4.3.1.3 Síntese do óxido de grafeno ancorado à sílica funcionalizado com octadecilsilano (C18)

Em um balão de duas bocas acoplado a um condensador de Friedrich e fluxo de nitrogênio, adicionou-se 400 mg de SiGO e 4 mL de tolueno anidro, 5 mg de imidazol (dissolvido em 0,4 mL de tolueno) e 40,0 g de ODS (dissolvido em 0,6 mL). A reação foi deixada sob refluxo (banho de óleo a 85 – 90°C) por 5 h.

As partículas foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min) e lavadas com os seguintes solventes: tolueno, metanol, metanol/água (1:1, v/v) e metanol. O produto final foi liofilizado e denominado SiGOC18.

4.3.1.4 Síntese do óxido de grafeno ancorado à sílica funcionalizado com C18 com *endcapping*

A mesma quantidade do material sintetizado na última etapa foi submetido ao mesmo procedimento descrito no item anterior, porém ao invés de ODS, adicionou-se 50 µL de TMS dissolvido em 0,6 mL de tolueno. O material foi liofilizado e denominado SiGOC18end.

4.3.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO LC-MS/MS

O método foi desenvolvido empregando-se injeções individuais e mistura dos padrões dos onze pesticidas (todos da Tabela 1, exceto a trifluralina) em metanol, todos na concentração de 100 µg L^{-1}. A fim de obter a melhor separação dos compostos, diferentes gradientes de eluição foram avaliados, variando a quantidade de água (fase A) e acetonitrila (fase B), ambas acidificadas com 0,1% v/v de ácido fórmico.

No método de detecção, primeiramente foram testadas transições obtidas na literatura para cada analito, no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM – *multiple reaction monitoring*). A partir dos resultados, foram feitas injeções no modo de detecção “fragmentos” (ou “*daughter ions*”), o qual possibilita determinar os fragmentos (ou íons filhos) produzidos a partir de um precursor (ou íon pai) selecionado. Esta etapa permitiu a escolha e confirmação das transições de cada analito e a avaliação da influência da energia de colisão (10 – 50 eV) e voltagem do cone (10 – 50 V) no sinal analítico e intensidade dos picos nos cromatogramas e espectros.

4.3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO GC-MS

O método instrumental foi desenvolvido por meio de injeções individuais dos padrões analíticos e, posteriormente, de misturas dos mesmos, todos em concentração de 5 mg L^{-1} em acetato de etila.

Na detecção por espectrometria de massas, primeiramente os analitos foram analisados no modo de varredura (*scan*), a fim de obter os íons mais abundantes no espectro gerado pelo equipamento. Em seguida, foram feitos testes com os principais íons no modo de monitoramento de íon único (SIM – *single ion monitoring*) e os dois mais abundantes foram escolhidos para detectar e quantificar os analitos.

Em seguida, avaliou-se a influência dos fatores envolvidos no método de injeção automática (*autosampler*) sobre as áreas obtidas entre as injeções do mesmo analito.

Para minimizar a quantidade de dados gerados, optou-se por avaliar esses fatores injetando apenas um analito, inicialmente. Foram feitas cinco injeções de acetocloro (5 mg L^{-1} em acetato de etila) em cada um dos 12 métodos avaliados (Tabela 2) e os desvio padrão e relativo entre injeções foram calculados (Equação 2 e 3, respectivamente).

Após escolher o método com melhores resultados, foram feitas dez injeções com os pesticidas (todos da Tabela 1, exceto simazina e oxifluorfem), a fim de avaliar o comportamento dos outros analitos.

4.3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO GC-MS/MS

Após o desenvolvimento do método GC-MS, com a separação cromatográfica e parâmetros de *autosampler* já otimizados, o método de detecção no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM – *multiple reaction monitoring*) foi desenvolvido (GC-MS/MS).

Inicialmente, foram testadas transições obtidas na literatura, com posterior otimização da energia de colisão (3 – 20 eV), fator que altera a intensidade do sinal analítico, por tratar-se da energia necessária para romper uma ligação do íon precursor, formando o íon fragmento.

Tabela 2 – Parâmetros a serem avaliados no método *autosampler* (GC-MS e GC-MS/MS)

Parâmetros	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Pré-lavagem com solvente 1	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	2
Velocidade de preenchimento	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1
Filling stroke	5	5	5	5	5	5	2	5	2	5	4	5
Velocidade de injeção	50	50	10	10	10	10	10	10	10	8	10	5
Pré-retardamento de injeção	500	0	500	500	0	0	0	0	500	500	500	500
Pós-retardamento de injeção	500	0	500	500	500	0	0	0	500	500	500	500
Pós-lavagem com solvente 1	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3

4.3.5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO SPE

A SPE é uma técnica amplamente estudada e empregada em diversas áreas. Como a DPX possui vários conceitos da SPE, porém na forma miniaturizada, a performance dessas duas técnicas foi comparada, empregando o mesmo sorvente.

Optou-se por começar desenvolvendo o preparo de amostra empregando SPE, pois as variáveis que afetam a extração são mais conhecidas e podem ser transferidas para o método DPX posteriormente, além de utilizar cartuchos comerciais contendo C18 como fase extratora (já prontos e disponíveis no laboratório). Para o desenvolvimento do método de extração, foram avaliados os seguintes parâmetros: solvente da amostra (variando a proporção de etanol e metanol em água), solvente de condicionamento e eluição (metanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila), volume de solvente de condicionamento (1 a 5 mL), tempo de secagem após dispensa da amostra (5 a 20 min).

As técnicas de GC-MS e LC-MS/MS foram usadas para avaliar e comparar resultados, por meio da integração das áreas obtidas e cálculo da recuperação (Equação 5), onde Ca é a concentração da amostra fortificada direta (sem extração) e Cb é a concentração da amostra fortificada após a extração (eluato). Os experimentos foram feitos em triplicata.

$$\%\ Recuperação = \frac{Ca}{Cb}\ .100 \quad (5)$$

As extrações foram feitas percolando 1 mL de solução amostra nos cartuchos. Nos testes avaliados por GC-MS, a amostra era composta de uma mistura de dez pesticidas (todos da Tabela 1, exceto simazina e oxifluorfem, os quais foram retirados devido às baixas solubilidades em água) na concentração de 5 mg L^{-1}. Nos testes avaliados por LC-MS/MS, a amostra consistia de onze pesticidas (todos da Tabela 1, exceto trifluralina), na concentração de 100 ng mL^{-1}.

4.3.6 DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO DPX-C18 e DPX-SiGOC18end

Os dispositivos para uso na técnica DPX foram desenvolvidos empregando ponteiras de 1000 µL e micropipeta analógica modelo Corning Lambda Nº 29443-132.

Para filtro inferior, avaliou-se diversos materiais: lã de vidro silanizada (Shimadzu, Kioto, Japão), *frit* de polietileno com 20 µm de porosidade (Supelco, Bellefonte, USA) e *frit* de aço inox retirado dos mesmos cartuchos de 1 mL utilizados nos experimentos com SPE. As posições e tamanho dos *frits* e massas de lã de vidro também foram avaliados.

Para os dispositivos DPX-C18, avaliou-se massas entre 25 e 100 mg de octadecilsilano (C18; Alltech, Deerfield, EUA) no interior da ponteira.

Todos os testes foram feitos com água, a fim de verificar qual a melhor configuração do dispositivo para a aspersão e dispersão de líquidos e definir o volume máximo de amostra a ser utilizada nas próximas etapas. A mesma configuração de filtro inferior adotada nas ponteiras com C18 foram adotadas para as ponteiras DPX-SiGOC18endcap, porém empregando 10 mg do material sintetizado.

4.3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX C18 (LC-MS/MS)

O dispositivo DPX, construído na etapa anterior, foi utilizado no desenvolvimento do método de preparo de amostra contendo onze pesticidas (todos da Tabela 1, exceto trifluralina),

concentração de 100 µg L^{-1}. Os experimentos foram avaliados utilizando LC-MS/MS para a separação, detecção e quantificação dos analitos.

Os mesmos solventes adotados no método SPE, também foram empregados na extração DPX, a fim de comparar os resultados obtidos nas duas técnicas. Posteriormente, outros parâmetros que afetam a extração por DPX também foram avaliados, sendo eles: volume de amostra (0,15 – 0,30 mL), volume de ar utilizado para promover o contato analito/fase extratora (0 – 0,7 mL), tempos de equilíbrio antes da dispensa da amostra (15 – 60 segundos) e do solvente de eluição (0-45 segundos).

4.3.8 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX C18 (GC-MS/MS)

Após o desenvolvimento do método DPX-C18-LC-MS/MS, o método de extração foi analisado por GC-MS/MS, a fim de comparar os resultados obtidos nas diferentes técnicas instrumentais.

Outros parâmetros foram avaliados por GC-MS/MS, com objetivo de melhorar os resultados, sendo eles: tempo de secagem da fase extratora após a dispensa da amostra (0 – 5 minutos), ciclos de aspiração/dispensa da amostra (1 – 20) e do solvente de eluição (1 – 5).

4.3.9 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX SiGOC18end-LC-MS/MS

Quatro materiais foram sintetizados (GO, SiGO, SiGOC18 e SiGOC18end) e testados nas ponteiras, utilizando os mesmos volumes e solventes empregados no método DPX-C18: as ponteiras foram condicionadas com 0,3 mL de metanol e o mesmo volume de água. Foram adicionados 0,3 mL de amostra e a eluição foi feita com 0,3 mL de metanol.

Vários trabalhos publicados utilizando materiais à base de grafeno e óxido de grafeno em DPX empregam entre 1 e 10 mg do material no interior da ponteira.[63,73–76] Dessa forma, optou-se por fazer experimentos com 10 mg de cada material. Todos os testes foram feitos com amostras aquosas fortificadas com os herbicidas à 100 µg L^{-1}.

Após escolher o material que resultou em maiores recuperações dos herbicidas estudados ($SiGOC18_{end}$), os parâmetros de extração foram avaliados. Foram testados quatro solventes de condicionamento e eluição (metanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila); tempo

de equilíbrio na etapa de adição da amostra e eluição (entre 0 e 90 segundos); necessidade da inclusão da adição de água no condicionamento; modo de adição da amostra (adicionada por cima da ponteira (fluxo ↓) e amostra aspirada (fluxo ↑); necessidade de aspiração de ar na etapa da amostra; quantidade de material sorvente (entre 10 e 20 mg).

Em DPX, é comum realizar ciclos de aspiração e dispensa da amostra.[63,77–79] Ao passar a amostra diversas vezes na ponteira, a interação analito-sorvente pode ser aumentada, resultando em uma maior capacidade de extração. Esse conceito pode ser aplicado também na etapa de eluição, para promover a maior interação analito-solvente de eluição.

Os ciclos foram testados na etapa de adição da amostra e eluição, variando de 1 a 10 ciclos, de forma manual e automatizada. Para a automatização, foi empregado um robô lab-made[80] e a ponteira foi conectada a uma seringa de 10 mL.

4.3.10 PREPARO DAS MATRIZES PARA A VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Antes de serem submetidas ao processo de extração, as matrizes passaram por um processo de filtração e/ou diluição para retirada de partículas suspensas e adequação ao método. Os processos descritos a seguir foram empregados tanto para o preparo das matrizes para a validação quanto para a aplicação do método em amostras reais.

A garapa é uma matriz complexa a qual contém muitos sólidos suspensos que, além de dificultar a passagem pela ponteira, podem danificar o sistema cromatográfico, causando entupimento da coluna, por exemplo. Dessa forma, a garapa foi centrifugada por 10 minutos (5000 rpm) e o sobrenadante foi filtrado em membranas de celulose de diferentes porosidades (filtro comum / 1,2 µm e 0,2 µm).

A rapadura é um sólido, e o melado é um líquido altamente viscoso, com consistência similar ao mel. Para adequação ao método de extração, essas matrizes precisaram ser diluídas em água, na concentração de 0,2 g mL^{-1}. Após a diluição, as matrizes foram filtradas em membrana de celulose de 0,22 µm. A cachaça é uma matriz mais limpa, com baixa viscosidade e sem sólidos dispersos visíveis a olho nu. Assim, a cachaça foi apenas filtrada em membrana de celulose de 0,22 µm. Após a filtração, todas as matrizes e amostras foram armazenadas em baixa temperatura (-20 °C).

4.3.11 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS

Os ensaios para validação analítica do método foram baseados nas instruções do guia ICH – Q2 (R1)[68]. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas obtidos na análise da matriz branca (não fortificada) e fortificada no primeiro ponto da curva analítica. Com a matriz isenta dos analitos de interesse, foi possível verificar a presença ou não de interferentes que eluam no mesmo tempo de retenção dos herbicidas.

Para determinar os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), as matrizes foram fortificadas com concentrações conhecidas dos herbicidas, para que o sinal gerado fosse três e dez vezes maior que o ruído do equipamento, respectivamente.

Para avaliar a linearidade, a curva analítica foi construída com seis níveis de concentração, sendo o primeiro ponto o limite de quantificação para cada analito e os demais nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 ng mL^{-1} (garapa); 50, 100, 150, 200 e 250 µg kg^{-1} (rapadura e melado); 40, 80, 120, 160 e 200 ng mL^{-1} (cachaça). Cada concentração foi injetada em triplicata e a média foi utilizada para a construção das curvas analíticas para cada analito, tendo como critério de aceitação dos resultados um coeficiente de correlação maior que 0,99.

A precisão foi expressa em termos de repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A matriz foi injetada em triplicata no mesmo dia, em três níveis de concentração (totalizando 9 injeções): 10, 30 e 50 ng mL^{-1} (garapa), 50,150 e 250 ng mg^{-1} (rapadura e melado), 40, 120 e 200 ng mL^{-1} (cachaça). Para a precisão intermediária, o procedimento foi feito em três dias diferentes. Os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo (DPR), sendo o critério de aceitação DPR < 20%.

A exatidão foi determinada em três níveis de concentração (os mesmos usados para precisão), em triplicatas independentes dos pontos utilizados para a construção da curva analítica. O critério de aceitação adotado foi exatidões entre 70 e 120%.

Os procedimentos descritos foram aplicados para cada matriz (garapa, rapadura, melado e cachaça) de forma independente e em dias diferentes.

4.3.12 APLICAÇÃO DO MÉTODO DPX-SiGOC18$_{end}$-LC-MS/MS EM AMOSTRAS

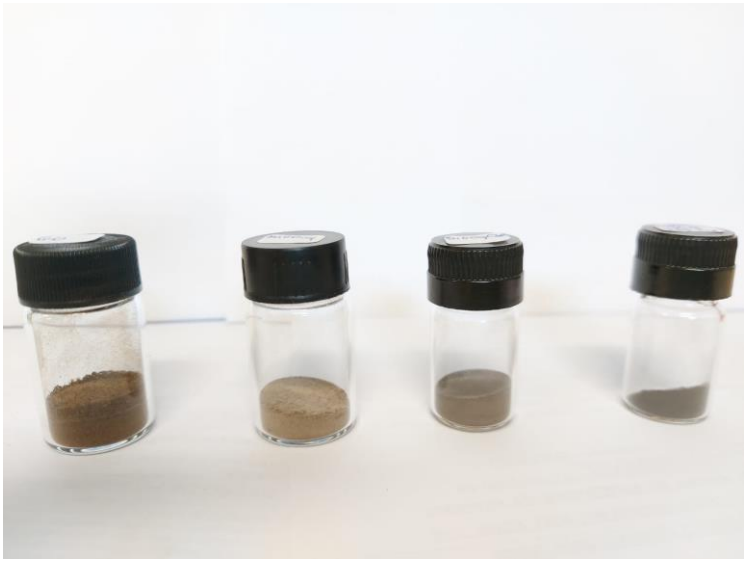
As amostras passaram pelo mesmo processo de pré-preparo descritas no item 4.3.10 antes de serem submetidas à extração. O método foi empregado em 10 amostras reais de cachaças e cinco amostras reais de cada uma das demais matrizes (garapa, melado e rapadura). Todas as amostras foram obtidas no comércio local da cidade de São Carlos/SP.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos materiais sintetizados

Os quatros materiais sintetizados são mostrados na Figura 3. Ao comparar os espectros dos materiais (Figura 4), nos ancorados à sílica, é possível observar o surgimento de bandas intensas em 803 cm^{-1}, correspondente a ligação Si-OH, e 1100 cm^{-1}, associada a ligação Si-O. Essas ligações provenientes da aminopropil sílica, as quais não estão presentes no GO, sugerem o ancoramento do GO à sílica. É possível ainda observar o estiramento -OH em 3420 cm^{-1}, presente em todos os materiais.[72,81]

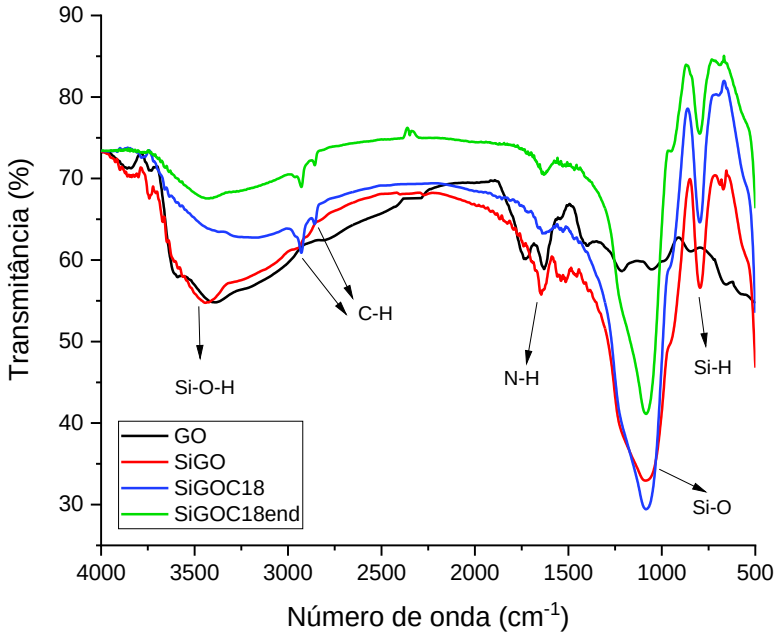
Figura 3 - Materiais sintetizados. Da esquerda para a direita: GO, SiGO, SiGOC18 e SiGOC18end.



A banda em 1630 cm^{-1}, correspondente ao dobramento N-H, sugere a formação de um grupo amida, proveniente da ligação do grupo carboxila do GO com o grupo amina presente na aminopropil sílica.[72,81]

Nos espectros de SiGOC18 e SiGOC18end observa-se a aparição de duas bandas em 2928 e 2856 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos C-H dos grupos metilenos (-CH_2-) presentes no C18, sugerindo a ligação do C18 às partículas de SiGO efetivamente ocorreu.[82] Além disso, observa-se uma redução do estiramento O-H (3420 cm^{-1}), uma vez que os grupos silanóis são funcionalizados com C18, e no caso do material SiGOC18endcap, essa redução é ainda maior, uma vez que na etapa de *encapping*, o TMS reduz os grupos silanóis remanescentes.[82]

Figura 4 - Espectros FT-IR dos materiais sintetizados

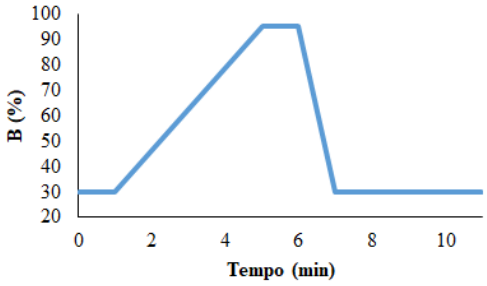


5.2 Desenvolvimento do método LC-MS/MS

Os testes por LC-MS/MS foram realizados com os 11 herbicidas da Tabela 1, exceto trifluralina, a qual possui uma estrutura molecular altamente estável, dificultando sua ionização por *eletrospray*. Inicialmente, este projeto foi pensado para utilizar apenas GC-MS/MS para a análise dos herbicidas. Porém, frequentes problemas técnicos dificultaram a realização dos experimentos programados de uma forma regular, e as análises passaram a ser realizadas também por LC-MS/MS.

Na análise cromatográfica, as amostras foram acondicionadas à 10 °C até o momento da injeção de 3 µL (modo *partial loop*) na coluna, a qual foi mantida à temperatura de 40 °C. A separação dos analitos foi feita utilizando gradiente de eluição (Figura 5), empregando água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) (Fase A) e acetonitrila acidificada do mesmo modo (Fase B), em um fluxo de 0,25 mL min^{-1}.

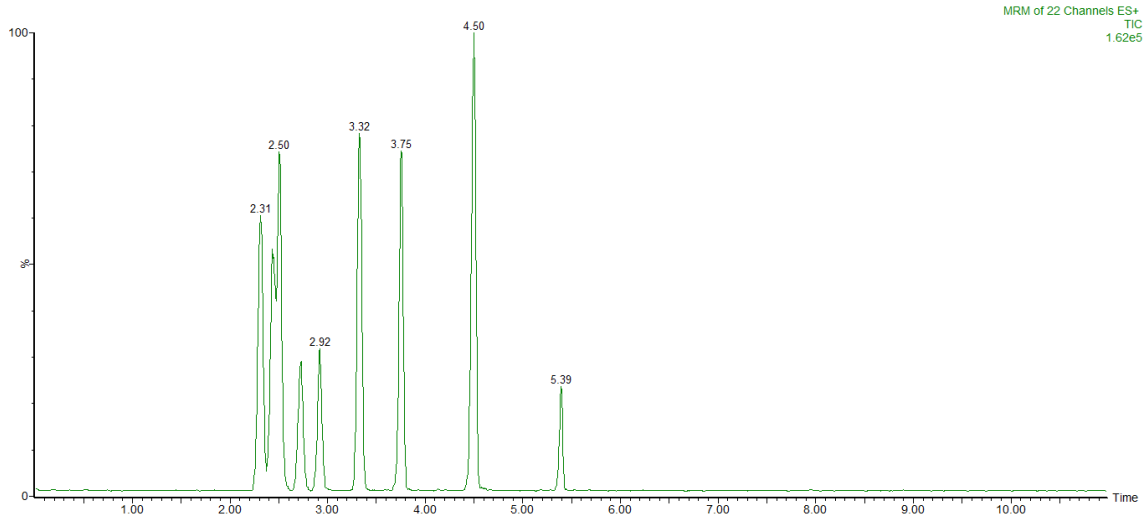
Figura 5 - Gradiente de eluição LC-MS/MS



Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	70	30
1	70	30
5	05	95
6	05	95
7	70	30
11	70	30

Os tempos de retenção, transições monitoradas e energias de cone e colisão otimizadas são mostrados na Tabela 3. Sob as condições descritas, a separação dos analitos é apresentada na Figura 6. Cromatogramas do íon extraído para cada analito podem ser encontrados no Apêndice (Figura 1A).

Figura 6 – Cromatograma (TIC) dos analitos por LC-MS/MS



Não foi possível separar os analitos acetocloro, alacloro e metolacloro (os quais coeluem no pico com t_r = 4,5 min – parte superior da figura), porém o monitoramento das transições MRM na detecção por espectrometria de massas permite a identificação e quantificação dos analitos individualmente, uma vez que as transições são diferentes para cada composto. A maior intensidade deste pico, em relação aos demais, pode ser explicada pela presença dos três analitos com o mesmo tempo de retenção.

Tabela 3 – Tempos de retenção e parâmetros de detecção do método LC-MS/MS

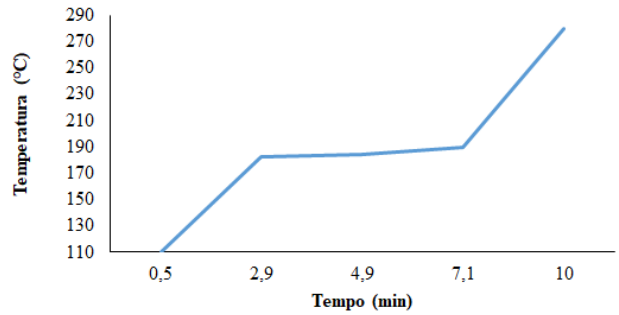
Analito	**t_r (min)**	**Íon Pai**	**Íon Filho**	**Energia de cone (eV)**	**Energia de colisão (V)**
Tebutiurom	2,31	229	172 [a]	20	20
		229	116 [b]	20	30
Hexazinona	2,43	253	71 [a]	20	30
		253	171 [b]	20	20
Ametrina	2,49	228	186 [a]	30	20
		228	96 [b]	40	30
Simazina	2,72	202	104 [a]	20	25
		202	132 [b]	30	20
Metribuzim	2,93	215	49 [a]	30	30
		215	187 [b]	30	20
Atrazina	3,33	216	104 [a]	30	30
		216	174 [b]	20	20
Clomazona	3,76	240	89 [a]	30	50
		240	125 [b]	20	20
Acetocloro	4,53	270	148 [a]	20	20
		270	224 [b]	20	10
Alacloro	4,50	270	238 [a]	20	10
		270	162 [b]	20	20
Metolacloro	4,50	284	176 [a]	20	30
		284	252 [b]	20	20
Oxifluorfem	5,40	362	140 [a]	30	50
		362	237 [b]	20	20

[a] transição de quantificação [b] transição de qualificação

5.3 Desenvolvimento do método GC-MS

Durante o desenvolvimento do método para análise dos herbicidas, foram avaliados diversos parâmetros. Melhores resultados foram atingidos empregando 2 µL de amostra no modo *splitless*, com temperatura do injetor de 300 °C. Hélio a um fluxo de 1,5 mL min^{-1} foi empregado como gás de arraste. Programação de temperatura (Figura 7) foi empregada para promover uma melhor separação dos analitos em um menor intervalo de tempo.

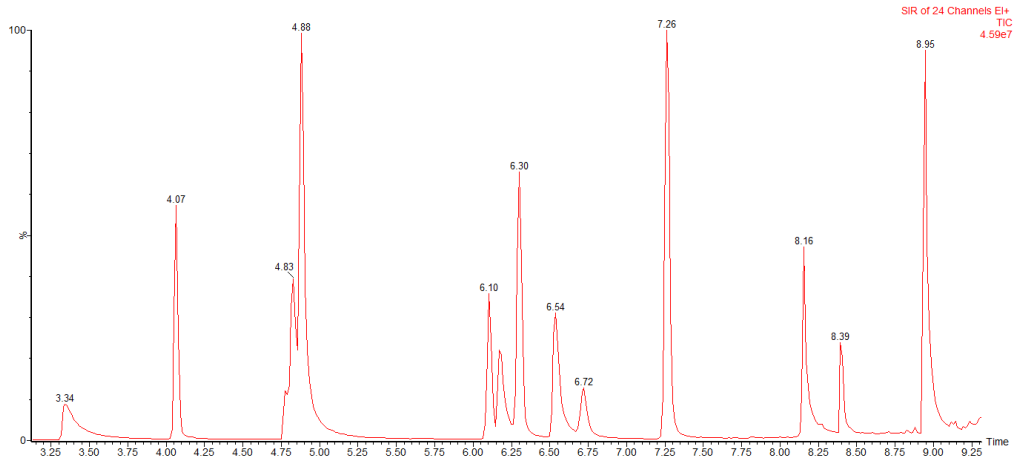
Figura 7 – Programação de temperatura no método GC-MS



Taxa de Aquecimento (°C min^{-1})	Temperatura Final (°C)	Tempo de espera (min)	Tempo Total (min)
0	110	0,5	0,5
30	182	0	2,9
1	184	0	4,9
5	190	1	7,1
100	280	2	10

A Tabela 4 apresenta os íons empregados (detecção e quantificação) no modo *SIM* e também os tempos de retenção para cada analito. O cromatograma (Figura 8) mostra uma separação adequada dos analitos, onde os picos são estreitos e bem definidos. No apêndice (Figura A2), são mostrados os cromatogramas do íon extraído para cada herbicida.

Figura 8 – Cromatograma de 12 analitos avaliados no método GC-MS



Apesar de testar várias programações de temperatura, não foi possível melhorar a separação entre atrazina e clomazona. Sendo assim, para uma melhor separação desses analitos, seria necessária uma coluna com outra fase e/ou dimensões. Entretanto, a técnica de espectrometria de massas empregada permite a identificação e quantificação dos analitos separadamente, visto que os íons monitorados são diferentes para cada analito.

Tabela 4 – Tempos de retenção e íons monitorados por GC-MS

Analito	**t_r (min)**	**Íon de qualificação**	**Íon de quantificação**
Tebutiurom	3,34	158	156
Trifluralina	4,07	264	306
Atrazina	4,83	215	200
Simazina	4,78	200	186
Clomazona	4,88	204	125
Acetocloro	6,10	223	146
Metribuzim	6,17	199	198
Alacloro	6,30	188	160
Ametrina	6,54	212	227
Metolacloro	7,27	238	162
Oxifluorfem	8,39	300	252
Hexazinona	8,95	83	171

No desenvolvimento do método empregando um *autosampler*, foi observado que os fatores envolvidos na injeção automática têm grande impacto na reprodutibilidade do método (Figura 9), sendo que menores DPRs entre injeções de acetocloro foram obtidos nos métodos M3 e M12, ambos em torno de 5%.

Para determinar qual desses métodos seria o mais adequado, ambos foram utilizados em um número de injeções de acetocloro (10 injeções). O método M12 obteve melhores DPRs (7,33%, comparado com 9,38% do método M3) e foi escolhido para a próxima etapa, a qual injetou-se os dez pesticidas. As DPRs entre injeções ficaram em torno de 3,13 e 7,05% (Tabela 5), mostrando uma boa reprodutibilidade do método *autosampler*.

Figura 9 – DPR entre injeções de acetocloro em 12 métodos *autosampler*

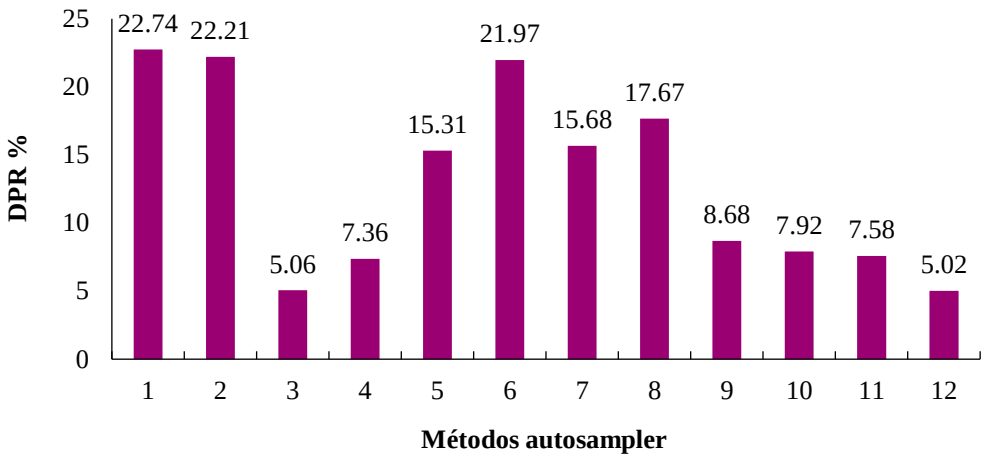


Tabela 5 – DPR entre dez injeções no método *autosampler* 12

Analito	**DPR%**
Tebutiurom	3,13
Hexazinona	6,22
Alacloro	5,84
Metribuzim	4,24
Atrazina	4,97
Clomazona	7,05
Ametrina	6,66
Acetocloro	5,63
Metolacloro	6,39
Trifluralina	6,96

5.4 Desenvolvimento do método GC-MS/MS

Ao utilizar o espectrômetro de massas no modo MRM, (operação em tandem – MS/MS), o método se torna mais seletivo, pois são monitoradas transições específicas de cada analito, as quais são compostas de um íon precursor (íon pai) e um íon fragmento (íon filho) gerado após uma reação no interior de um dos quadrupolos do analisador do equipamento.

Os parâmetros cromatográficos e tempos de retenção não foram alterados, apenas o modo de detecção e quantificação. Após os testes, as transições monitoradas e suas respectivas energias de colisão estão apresentadas na Tabela 6. A separação dos analitos é apresentada na Figura 10 e os cromatogramas das transições, no apêndice (Figura A3).

5.5 Desenvolvimento do método SPE

Primeiramente, optou-se por realizar os testes para determinar o melhor solvente de eluição. Porém, todas as extrações, independentemente do solvente usado para eluição, mostraram recuperações superiores ao esperado para a maioria dos analitos (Figura 11).

A fim de avaliar a influência da água na recuperação dos analitos, foram feitos testes alterando a composição do solvente da amostra contendo 5 mg L^{-1} de alacloro. A eluição foi feita com acetato de etila. Diferentes proporções de água e solvente orgânico (metanol e etanol) foram avaliadas (Figura 12).

Conforme a quantidade de água na amostra diminui, recuperações mais baixas são obtidas. Observa-se que as amostras contendo etanol apresentaram recuperações muito inferiores às obtidas com metanol, sendo que melhores resultados foram alcançados em metanol/água (65:35).

Tabela 6 – Transições monitoradas no método GC-MS/MS

Analito	Íon Pai	Íon Filho	Energia de colisão (V)
Simazina	201	138[a]	10
	201	172[b]	10
Metribuzim	198	82[a]	12
	198	110[b]	5
Atrazina	200	122[a]	8
	200	132[b]	8
Ametrina	227	170[a]	8
	227	212[b]	8
Tebutiurom	171	156[a]	5
	156	89[b]	5
Clomazona	204	107[a]	17
	125	89[b]	10
Hexazinona	171	71[a]	10
	171	85[b]	12
Acetocloro	146	131[a]	8
	223	132[b]	15
Alacloro	160	132[a]	8
	188	160[b]	8
Metolacloro	162	133[a]	10
	238	162[b]	8
Oxifluorfem	300	223[a]	12
	361	330[b]	15
Trifluralina	201	138[a]	10
	201	172[b]	10

[a] transição de quantificação [b] transição de qualificação

Figura 10 – Cromatograma (TIC) dos analitos por GC-MS/MS

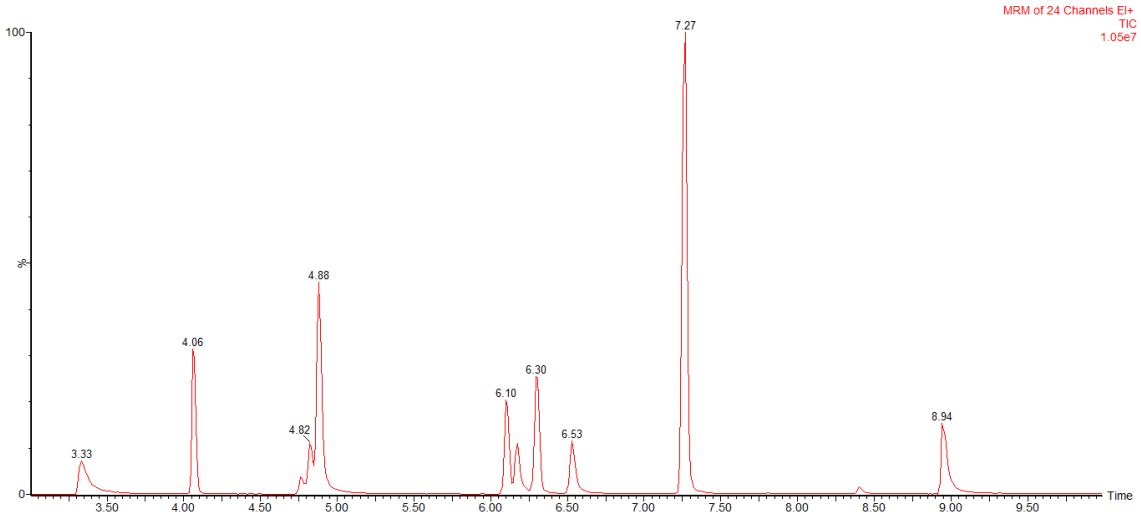


Figura 11 – Recuperação dos analitos (amostra aquosa) empregando diversos solventes de eluição

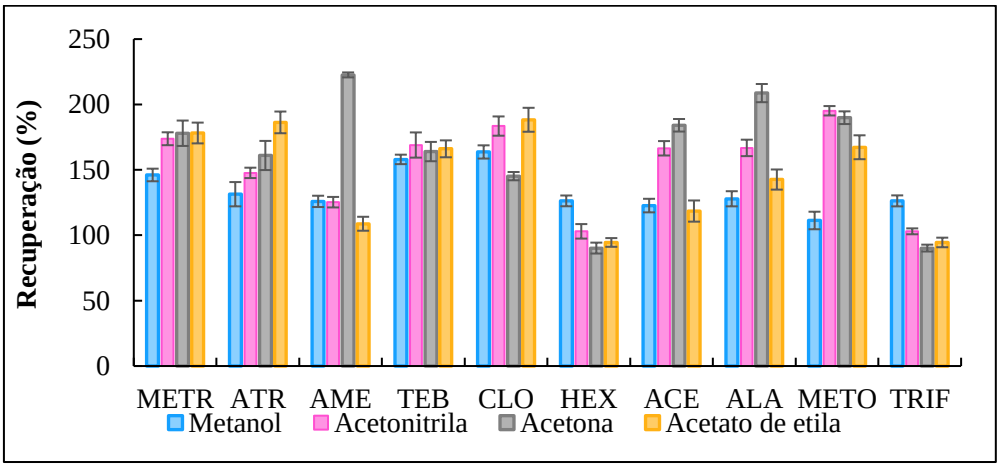
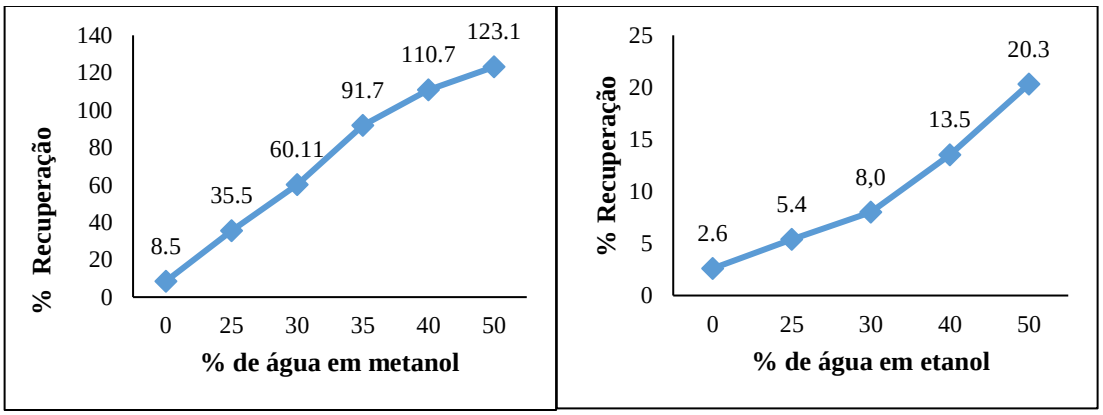


Figura 12 – Avaliação da composição do solvente da amostra para extração SPE (GC-MS)



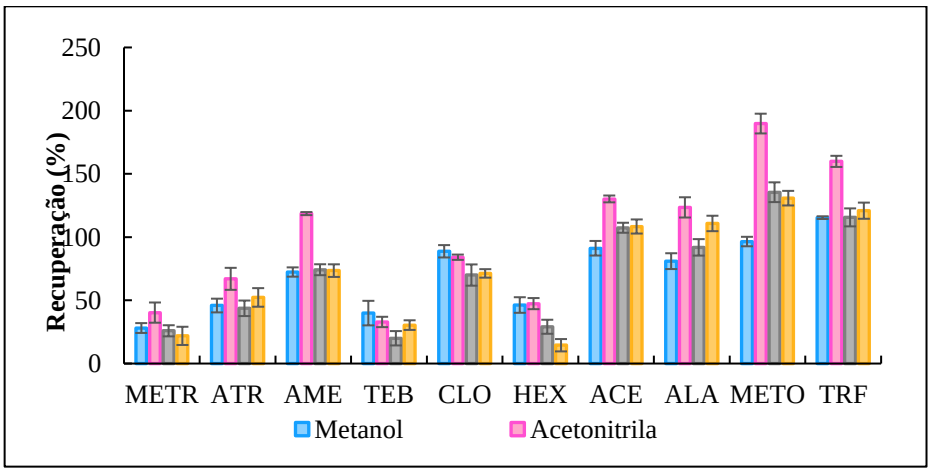
(a) Água/metanol (b) Água/etanol

Após definir o melhor solvente da amostra, foram feitos novamente testes para a escolha do melhor solvente de eluição, solvente de condicionamento, volume de condicionamento, e avaliação da necessidade da etapa de lavagem após o condicionamento.

Os experimentos mostrados nas Figuras 13 a 15 foram analisados por GC-MS. Um problema técnico no equipamento na época, cujo reparo seria demorado, impossibilitou a continuação da otimização do método SPE por esta técnica. Desta forma, os demais experimentos foram avaliados por meio da técnica LC-MS/MS.

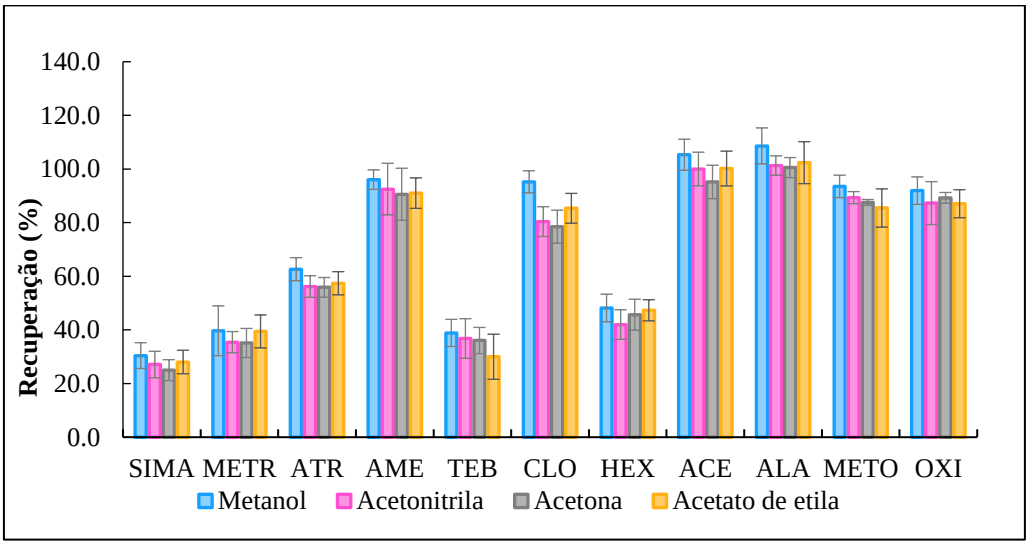
Na avaliação do solvente de eluição (Figura 13), ao utilizar acetonitrila, para vários analitos as recuperações foram bem superiores a 100%. Uma possível explicação pode ser a perda do solvente por volatilidade, entre o intervalo de aplicação do mesmo e coleta para injeção, resultando na concentração dos analitos, uma vez 1 mL é aplicado na eluição, porém o volume final par injeção pode ser menor. Dessa forma, esse solvente não foi escolhido e optou-se por metanol na eluição, o qual resultou em recuperações ligeiramente maiores para a maiorias dos analitos, quando comparado com os demais solventes, além de também poder ser injetado diretamente no LC-MS/MS, devido a compatibilidade do mesmo com a fase móvel empregada no método cromatográfico.

Figura 13 – Avaliação do solvente de eluição em SPE



Para o solvente de condicionamento (Figura 14), não há grande diferença nos resultados ao variar a polaridade do solvente utilizado, porém optou-se por metanol, por trazer uma pequena melhora nas recuperações.

Figura 14 – Avaliação do solvente de condicionamento em SPE



O volume de solvente de condicionamento foi avaliado (Figura 15) e as recuperações obtidas são bem próximas, indicando que 1 mL de metanol já é suficiente para o condicionamento da fase.

Também foi verificado se a etapa de lavagem (adição de água após condicionamento) era necessária (Figura 16). Os testes indicam que ao adicionar água após o solvente de condicionamento, recuperações maiores para a maioria dos analitos são obtidas, portanto essa etapa foi mantida.

Figura 15 – Avaliação do volume de solvente de condicionamento em SPE

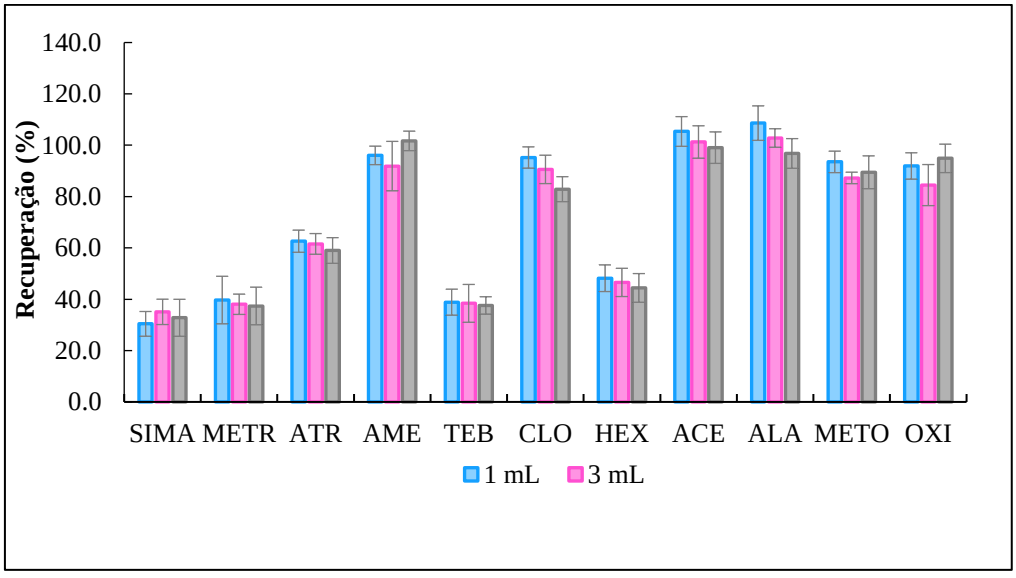
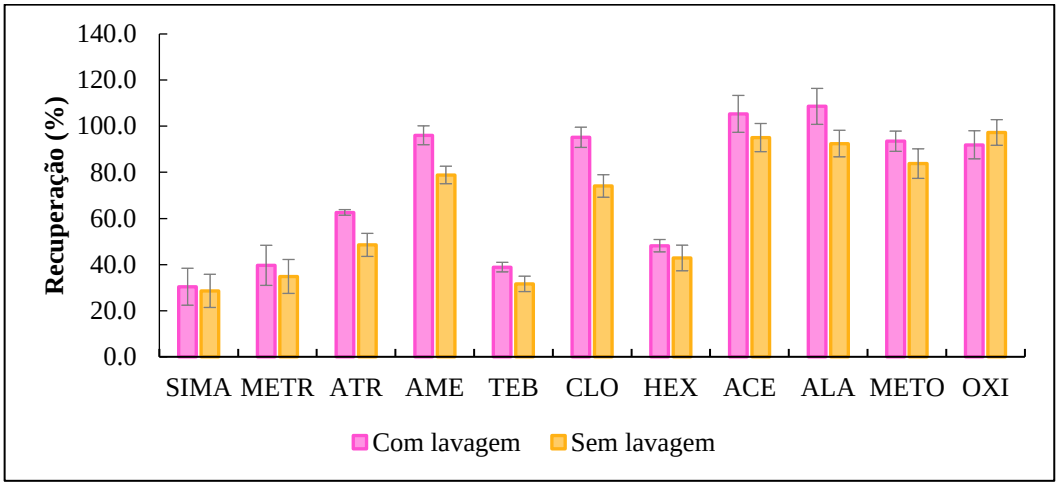
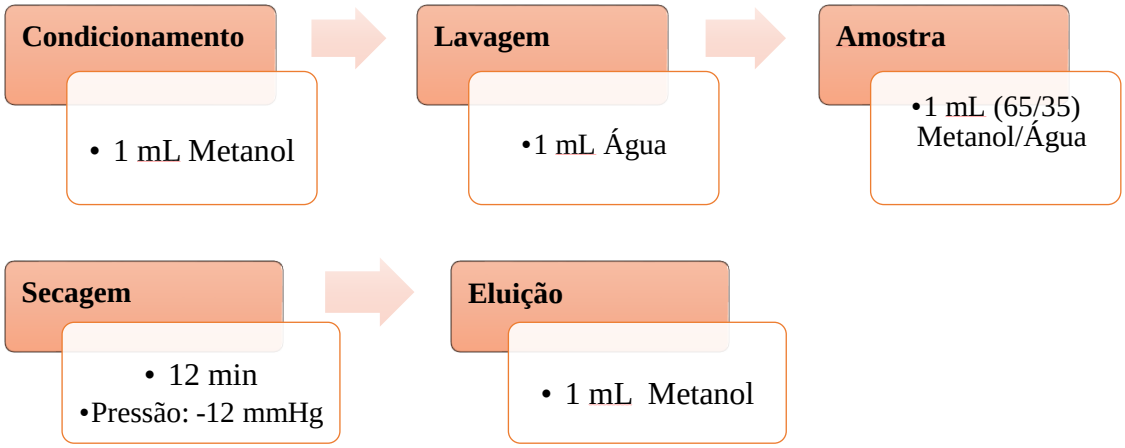


Figura 16 – Avaliação da etapa de lavagem em SPE



O método de extração por SPE com as condições otimizadas é apresentado na Figura 17. Estas condições foram as que proporcionaram maiores recuperações para o conjunto de analitos de interesse, sendo que estas variam de 30 a 109% (Tabela A1).

Figura 17 – Parâmetros SPE otimizados



5.6 Desenvolvimento do dispositivo DPX-C18 e DPX-SiGOC18end

Nos testes para escolha do material para filtro inferior, o *frit* de aço não apresentou dificuldade na aspiração/dispensa de água. Porém, a posição do *frit* (3,1 cm da base da ponteira)

limita o volume a ser utilizado e como não há ferramentas disponíveis em laboratório capazes de cortar esse material em tamanhos menores, optou-se por descartar essa opção de *frit* para as próximas etapas.

Com lã de vidro, melhores resultados foram obtidos com massas entre 3 e 5 mg do material, optando-se pelo valor intermediário de 4 mg, posicionado entre 0,7 e 1,0 cm a partir da base da ponteira. Essa configuração permitiu múltiplas aspirações da amostra de forma adequada e o material permaneceu na posição descrita acima.

O *frit* de polietileno pode ser cortado em diferentes diâmetros e assim colocado em várias posições no interior da ponteira. Ao utilizar o *frit* com 0,4 cm de diâmetro posicionado a 1,9 cm da base da ponteira, o material permaneceu na posição após múltiplas aspirações e dispensas de amostra e permitiu múltiplas passagens de líquido sem que haja perca de fase estacionária.

Tanto a lã de vidro quanto o *frit* de polietileno foram capazes de reter a fase extratora enquanto permitiam a passagem de líquidos, permanecendo fixos em suas posições durante os testes. Para as ponteiras DPX-C18, optou-se por trabalhar com o *frit*, por sua colocação ser mais rápida e fácil do que a lã de vidro, que precisa ser pesada precisamente, para que haja uma padronização das ponteiras.

Quanto à massa de C18, foram feitos testes com 25, 50 e 100 mg, sendo que ao utilizar 100 mg, houve dificuldade na passagem da amostra pela ponteira e permeação do líquido pela fase. Nos testes com 25 e 50 mg, foi possível aspirar e dispensar a amostra sem dificuldade, além de observar a água permeando todo o material, garantindo a interação dos analitos e fase extratora em etapas futuras. Diversos trabalhos empregam em torno de 50 mg de C18 nas ponteiras DPX[83–85] e também por ser um valor intermediário testado, este foi o escolhido para o desenvolvimento do método de extração DPX-C18.

A mesma configuração de *frit* não pôde ser adotada com a fase baseada em óxido de grafeno, pois o *frit* de polietileno não é capaz de reter a fase extratora, gerando perda do material tanto pela lateral da ponteira, quanto pelos poros do material. Assim, as ponteiras DPX-SiGOC18end utilizaram 5mg de lã de vidro e 10 mg de material sorvente. A Figura 18 mostra a configuração da ponteira DPX-C18 e DPX- SiGOC18end.

Figura 18 – Dispositivo DPX. (a) DPX apenas com o frit de polietileno; (b) DPX-C18; (c) DPX-SiGOC18end.

(a) (b) (c)

5.7 Desenvolvimento do método DPX C18 (LC-MS/MS)

Os resultados dos testes para avaliação do volume de amostra, volume de ar, tempo de equilíbrio após adição da amostra e após adição do solvente são mostrados nas Figuras 19 a 22.

Na avaliação do volume de amostra (Figura 19), observou-se que quanto menor o volume, maior é a recuperação, pois há uma menor quantidade de analitos para interagir com a mesma quantidade de fase extratora. O volume de 0,15 mL foi adotado para os próximos experimentos.

A grande diferença entre DPX e outras técnicas baseadas em extração em fase sólida é o fato do sorvente não estar compactado no interior de um dispositivo, seja uma seringa, cartucho, disco, dentre outros. Na etapa de adição da amostra, ar é aspirado e as bolhas promovem uma mistura turbulenta entre os analitos e a fase, aumentando a capacidade de extração do material.

O efeito da quantidade ar nas recuperações dos analitos foi investigado (Figura 20). Os resultados mostraram que esta etapa aumenta as recuperações dos analitos, porém a quantidade aspirada de ar não tem muita influência nos resultados. Assim, o valor intermediário de 0,5 mL foi escolhido para as próximas etapas.

Figura 19 – Avaliação do volume de amostra

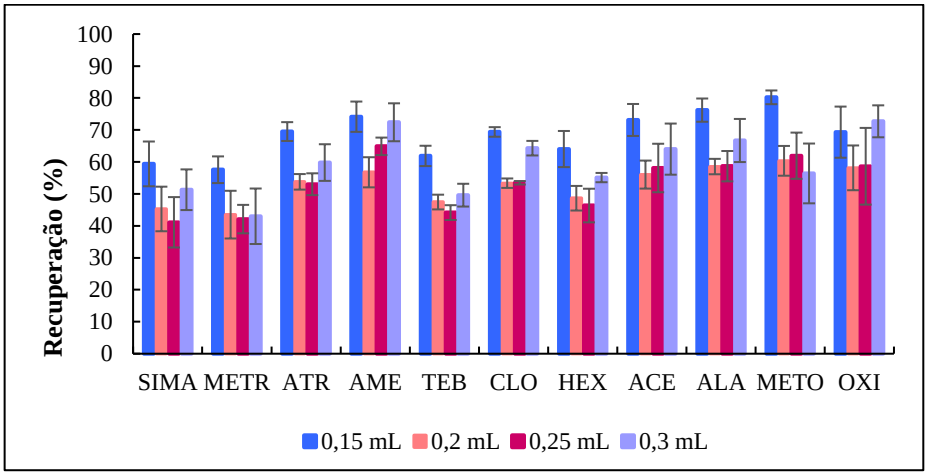
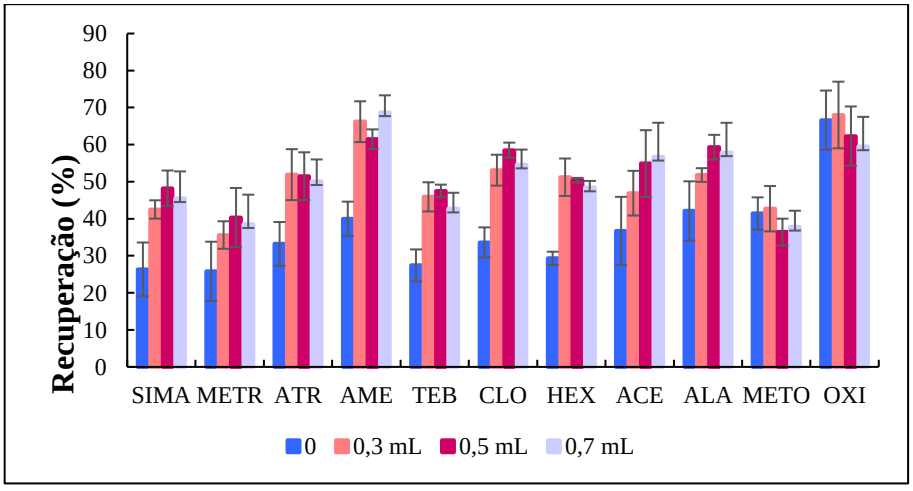


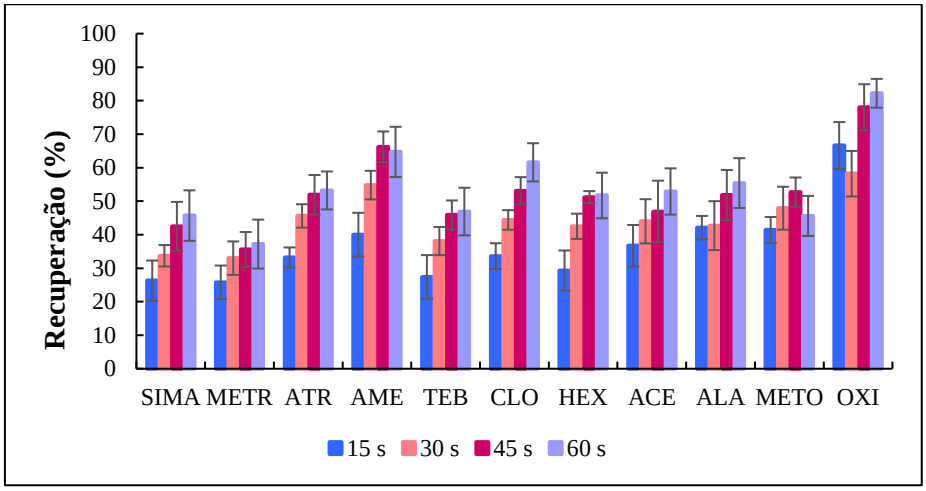
Figura 20 – Avaliação do volume de ar após adição da amostra



A mistura dinâmica entre sorvente e amostra na DPX atinge o equilíbrio rapidamente, porém, alguns estudos[85–87] mostram que alguns segundos podem ser necessários para que essa interação se complete totalmente e a amostra possa ser dispensada. Esse período de tempo é denominado tempo de equilíbrio.

Foram avaliados intervalos de 0 a 60 segundos (Figura 21) entre a mistura da amostra com ar e a dispensa da mesma. Os resultados mostraram, que, quanto maior o tempo de equilíbrio nesta etapa, maior é a recuperação dos analitos. Tendo em vista que uma das vantagens da DPX é ser uma técnica de extração rápida, o tempo máximo de equilíbrio avaliado foi de 60 segundos, pois um aumento nesse valor, resultaria em um tempo de extração maior.

Figura 21 – Avaliação do tempo de equilíbrio após a adição da amostra

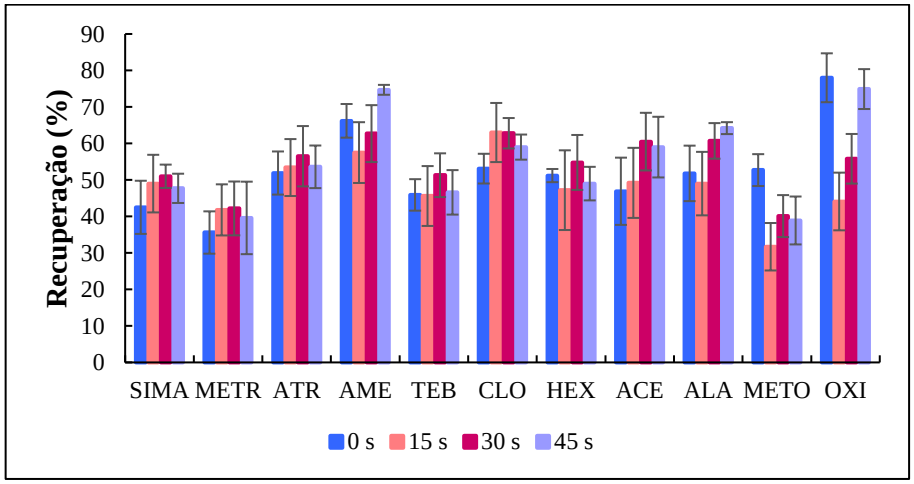


O mesmo conceito de tempo de equilíbrio pode ser aplicado na etapa de eluição. Alguns segundos podem ser necessários para completar a dessorção dos analitos, os quais migram da fase extratora para o solvente de eluição.

O intervalo de 0 a 45 segundos foi aplicado entre a adição e dispensa do solvente de eluição (Figura 22). Nesta etapa, entre 30 e 45 segundos foram suficientes para promover a dessorção dos analitos. Visando diminuir o tempo total de extração e considerando as recuperações obtidas para a maioria dos herbicidas, optou-se por seguir os próximos experimentos com 30 segundos de tempo de equilíbrio na eluição.

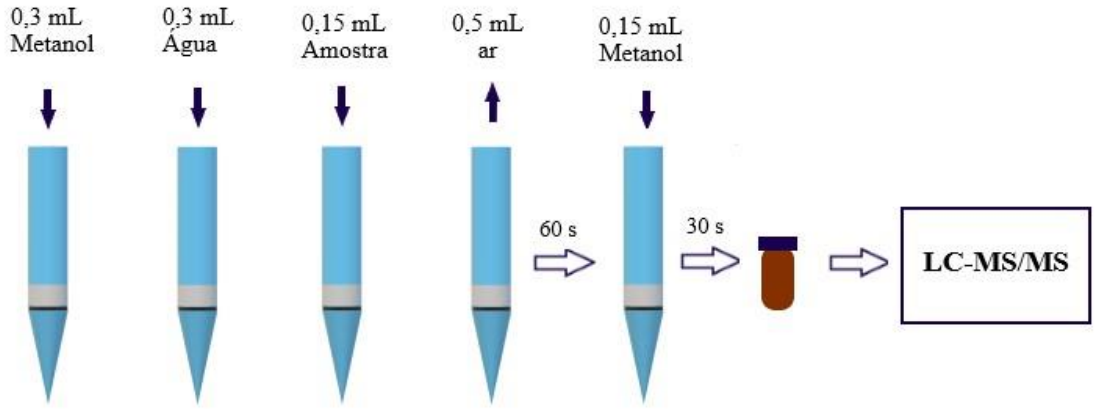
Sulfato de magnésio e sulfato de sódio, ambos na forma anidra, foram avaliados como agentes secantes, sendo misturados à fase extratora, a fim de contribuírem com a retirada da água do meio, que pode interferir na etapa de análise instrumental, principalmente quando se utiliza a cromatografia gasosa. Porém, observou-se que o *frit* utilizado não é capaz de reter essas substâncias, que após a extração são encontradas no extrato final, interferindo na análise instrumental. Desta forma, optou-se por não utilizar tais substâncias, sendo a fase extratora composta apenas de C18 (50 mg).

Figura 22 – Tempo de equilíbrio após adição do solvente de eluição



O método de extração DPX (Figura 23) resultou em recuperações entre 57,8 e 76,5%, sendo que esses valores foram calculados por meio da média de quatro extrações no método (Tabela A2). Os desvios padrões relativos encontrados entre as extrações são menores que 10%, indicando que o método tem boa reprodutibilidade.

Figura 23 – Método DPX-C18-LC-MS/MS



5.8 Comparação DPX-C18 e SPE

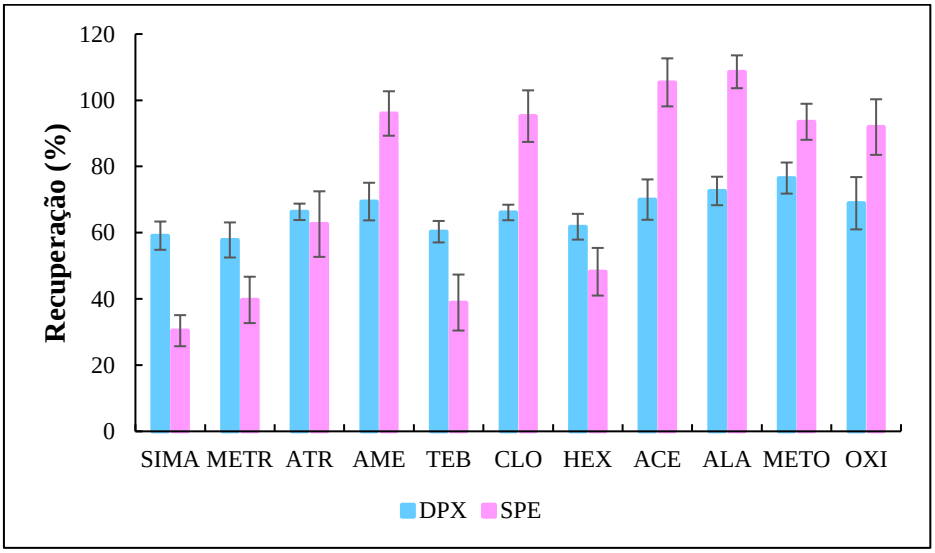
Duas técnicas de extração à base de C18 foram empregadas no preparo de amostra para a análise dos onze herbicidas por LC-MS/MS. Ao comparar a performance da DPX e SPE

(Figura 24), a primeira apresenta recuperações para os analitos entre 59,1 e 76,5 %, enquanto que na segunda, os valores variam de 30,4 a 108,6%.

Apesar de apresentar recuperações mais baixas para alguns analitos, o intervalo de recuperação é mais uniforme na DPX, além de os desvios entre extrações serem menores.

O método DPX-C18 desenvolvido utiliza quatro vezes menos solvente e mais de seis vezes menos amostra que o SPE. A extração é completada em quatro minutos, enquanto que a duração média da extração SPE é de vinte minutos (cinco vezes maior).

Figura 24 – Comparação entre as recuperações obtidas por SPE e DPX-C18 por LC-MS/MS

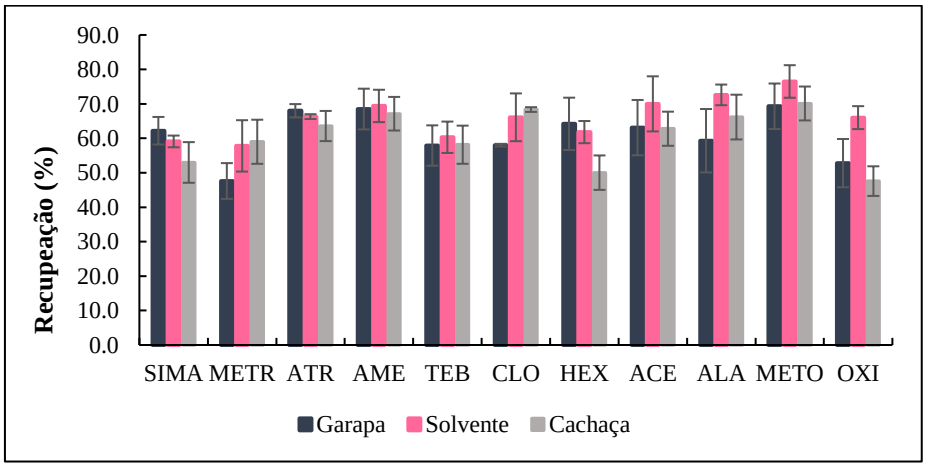


Outra questão a ser avaliada para escolher qual o melhor método a ser utilizado para a extração desses herbicidas é o custo de cada extração. Além de usar menos solvente e o baixo custo das ponteiras e *frits* utilizados nos dispositivos DPX, testes iniciais mostraram que a ponteira DPX-C18 pode ser reutilizada após aplicação de 0,6 mL de metanol, sem apresentar efeito de memória (*carryover*), enquanto que o cartucho de SPE geralmente é utilizado apenas uma vez e depois descartado.

5.9 Aplicação do método DPX-C18-LC-MS/MS em amostra de garapa e cachaça fortificada

Após a avaliação dos parâmetros de extração, o método DPX-C18-LC-MS/MS foi empregado em garapa e cachaça, ambas fortificadas com os herbicidas em 100 µL L^{-1} (Figura 25). As extrações em solvente (como foi usado no desenvolvimento do método) e em amostras reais fortificadas apresentam resultados próximos, indicando a ausência de efeito matriz e possibilitando o uso do método para determinação dos onze herbicidas nestas matrizes.

Figura 25 – Performance do método DPX-C18-LC-MS/MS em diferentes matrizes



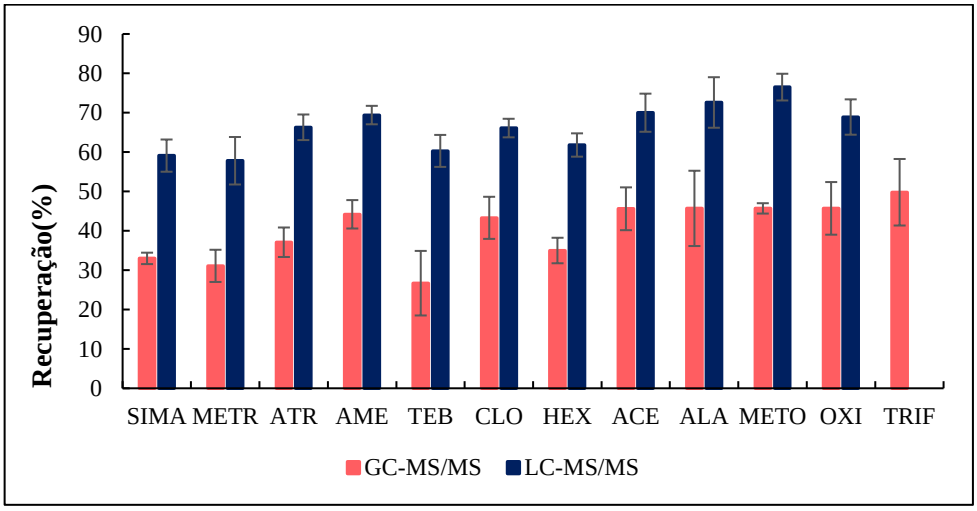
5.10 Comparação do método DPX-C18 com posterior análise por LC-MS/MS e GC-MS/MS

O método DPX-C18, desenvolvido com análise por LC-MS/MS, foi também avaliado para análise por GC-MS/MS. Ao comparar a performance as duas técnicas analíticas (Figura 26), observa-se que as recuperações obtidas por GC-MS/MS são bem menores.

Essa diferença de resultados é esperada, visto que as técnicas envolvem diferentes mecanismos de separação e detecção. Apesar de todos os analitos (exceto trifluralina) poderem ser analisados por ambas, as estruturas químicas dos analitos podem apresentar características que favoreçam a análise por uma ou outra técnica, gerando resultados diferentes.

Além disso, a distinção dos resultados pode ser explicada pela presença de moléculas de água no extrato final a ser injetado. Durante a extração, utiliza-se água na etapa de lavagem e a amostra também é composta por uma porcentagem aquosa. Dessa forma, na etapa de eluição, moléculas de água podem estar retidas junto à fase extratora e, consequentemente o extrato final a ser injetado possui uma pequena quantidade de água.

Figura 26 – Comparação entre extrações DPX analisadas por GC-MS/MS e LC-MS/MS



Esse fator não tem grande impacto na análise por LC-MS/MS, visto que a fase móvel utilizada na separação dos analitos também é composta de água. Porém em cromatografia gasosa, a água é um fator a ser considerado, pela baixa volatilidade da mesma, que pode interferir nas análises.

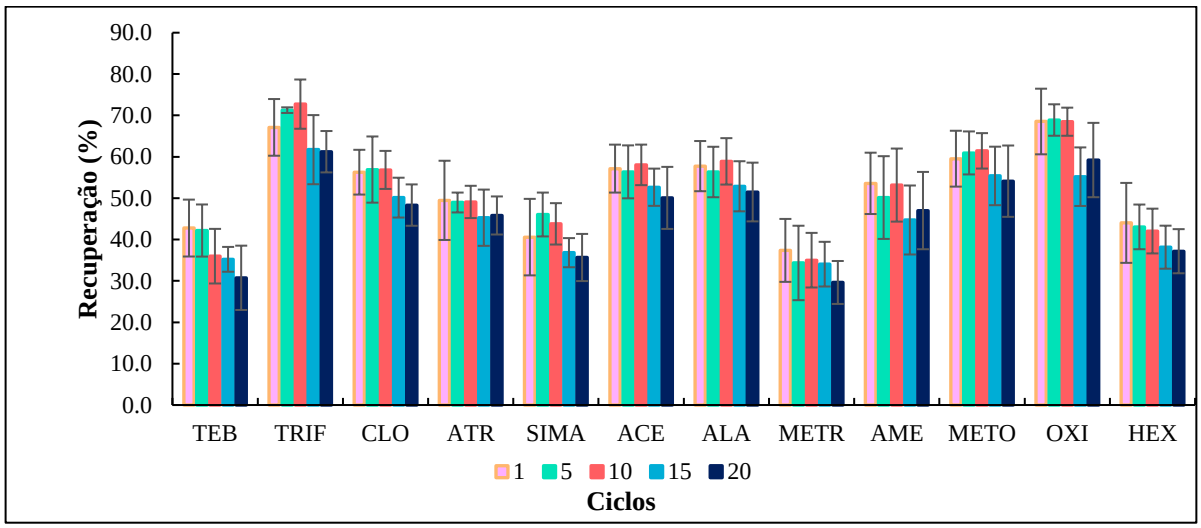
Em uma tentativa de melhorar as recuperações obtidas por GC-MS/MS, outros parâmetros de extração foram avaliados. A passagem de amostra pela ponteira é conhecida como ciclo, ou seja, cada aspiração/dispensa da amostra constitui um ciclo. Alguns trabalhos[88–91] indicam que realizar este processo várias vezes aumenta a sorção dos analitos à fase extratora, resultando em maiores recuperações.

Esse fator foi avaliado, variando o número de ciclos de 1(conforme foi feito até o momento) a 20, na etapa de adição da amostra. Ao contrário do esperado, o aumento do número de ciclos não aumentou a recuperação dos analitos (Figura 27).

Os resultados indicam que ao passar a amostra várias vezes pela ponteira, ao invés de ocorrer a sorção na fase estacionária, os analitos voltam para o solvente da amostra e são extraídos em menor proporção pela fase extratora.

Dessa forma, observa-se que o tempo de equilíbrio após a adição da amostra é um fator com maior influência na extração dos analitos do que o número de ciclos, visto que ao aumentar o tempo de equilíbrio, aumenta-se também a recuperação (Figura 21).

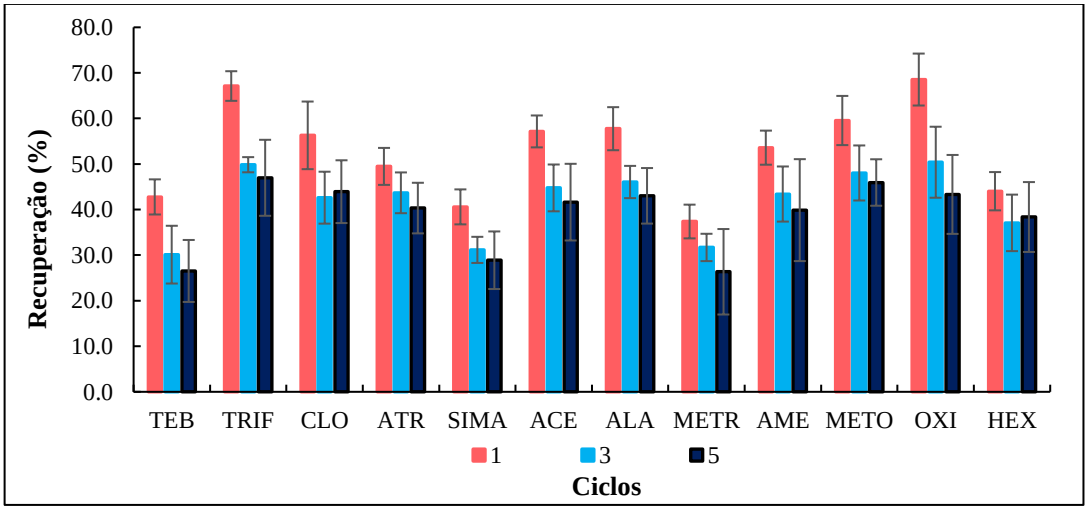
Figura 27 – Efeito dos ciclos na adição da amostra na extração DPX-C18 –GC-MS/MS



O mesmo conceito de ciclos pode ser aplicado na etapa de eluição. Como a realização de ciclos não apresentou resultados satisfatórios na etapa de adição da amostra, optou-se por apenas variar os ciclos de 1 a 5 na eluição (Figura 28).

O aumento na quantidade de ciclos não favorece a dessorção dos analitos, sendo que com apenas um ciclo, o sistema já atinge o equilíbrio. Devido à similaridade entre a composição da amostra (metanol:água; 65:35 v/v) e o solvente de eluição (metanol), ao efetuar os ciclos na eluição, os analitos podem interagir novamente com a fase extratora e serem novamente sorvidos, resultando em recuperação menores.

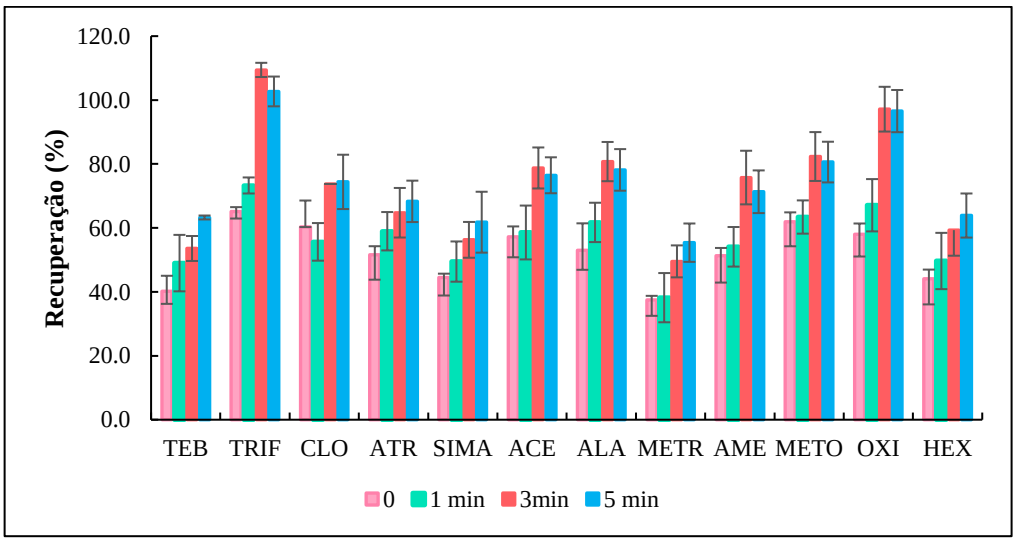
Figura 28 – Efeito dos ciclos na etapa de eluição no método DPX-C18 –GC-MS/MS



Conforme mencionado anteriormente, a água pode interferir nas análises por GC-MS/MS. Visando diminuir este efeito, após dispensar a amostra (que contém água), o dispositivo DPX foi conectado à um sistema de vácuo (o mesmo utilizado para a extração SPE) utilizando pressão negativa (-15 mmHg) e variando o tempo de secagem, a fim de eliminar a água presente na ponteira.

Os resultados (Figura 29) mostram que, quanto mais tempo sob vácuo, maior é a recuperação dos analitos, confirmando que a presença de água no dispositivo influencia negativamente as recuperações. O tempo de 3 minutos foi escolhido como melhor tempo de secagem.

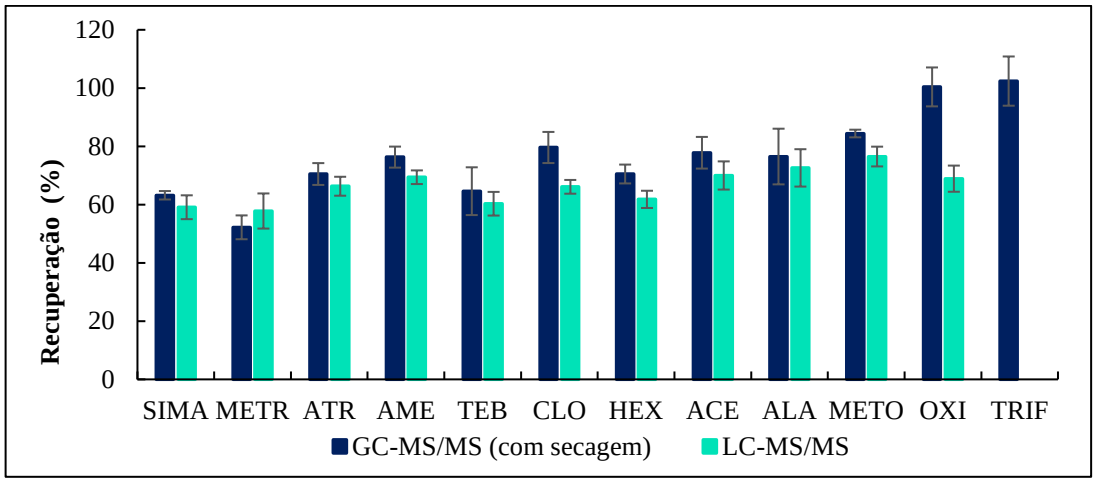
Figura 29 – Avaliação do tempo de secagem do dispositivo no método DPX-GC-MS/MS



Desta forma, o método final DPX-C18-GC-MS/MS ficou da seguinte maneira: 0,3 mL de metanol foram adicionados no condicionamento da fase, seguido do mesmo volume de água na etapa de lavagem. Em seguida, adicionou-se 0,15 mL de amostra e 0,5 mL de ar foram aspirados, para promover a interação analito-sorvente. Após 60 segundos a amostra foi dispensada e o dispositivo foi conectado ao sistema de vácuo por 3 min, para a secagem. A eluição foi feita com 0,15 mL de metanol e após 30 segundos, o solvente foi coletado e seguiu para a análise por GC-MS/MS.

Por fim, ao comparar a performance das duas técnicas analíticas (Figura 30), observa-se que as recuperações obtidas por GC-MS/MS (incluindo a etapa de secagem da ponteira) são ligeiramente superiores às obtidas por LC-MS/MS, variando entre 63 e 102% (Tabela A3).

Figura 30 – Comparação das performances entre LC-MS/MS e GC-MS/MS (incluindo secagem)



5.11 Desenvolvimento do método de extração DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS

Os materiais SiGOC18 e SiGOC18end obtiveram bons resultados como fase extratora em outras técnicas de preparo de amostra em métodos desenvolvidos no grupo[92–94]. Assim, optou-se por avaliar esses materiais na extração com ponteiras descartáveis. Como descrito na seção 5.1, vários materiais intermediários são sintetizados para obter o SiGOC18end. Os quatro materiais foram empregados na ponteira, a fim de comparar a performance de cada material.

O óxido de grafeno (GO) possui uma estrutura em forma de folha, com diversos grupos oxigenados ao longo de sua superfície. A agregação irreversível das folhas de GO pode ocorrer devido às fortes interações de van der Waals e interações π-π existentes, resultando em uma redução da área de superfície e permeabilidade do material.[54]

A aglomeração das folhas de GO faz com que o material não seja o mais indicado para atuar como sorvente em técnicas de extração, principalmente em DPX, onde o sorvente não fica compactado no interior do dispositivo. Essas características foram comprovadas ao realizar testes nas ponteiras. A aglomeração do material, que só aumenta ao adicionar os solventes em cada etapa, torna extremamente difícil dispensar os solventes. Devido a esse aspecto prático da extração, o GO foi desconsiderado para os próximos experimentos.

Visando eliminar ou diminuir a aglomeração das folhas de óxido de grafeno, o mesmo foi ancorado a partículas de sílica, as quais possuem uma estrutura esférica. A Figura 31 mostra a performance dos três materiais ancorados à sílica na extração dos herbicidas de interesse. É possível observar uma maior seletividade e capacidade de extração ao ligar o C18 às partículas

de SiGO. O material SiGOC18end, o qual foi submetido por um processo de endcapping, onde o agente TMS recobre os grupos Si-OH remanescentes, gerou melhores resultados e foi utilizado nos demais experimentos.

A próxima variável estudada foi o solvente de condicionamento. Mantendo o volume de 0,3 mL (empregado no método DPX-C18), foram testados quatro solventes (Figura 32).

É possível observar que algumas recuperações são bem superiores a 100%, indicando uma possível concentração (indevida) dos analitos. A explicação mais provável para esses valores é que durante a eluição, o solvente utilizado pode ficar retido na lã de vidro, que é utilizada como filtro na ponteira. Dessa forma, ao adicionar 0,3 mL de solvente para extrair os analitos da fase, o volume coletado para injeção pode ser menor do que o aplicado, concentrando os analitos.

Visando diminuir ou erradicar esse efeito indesejado de concentração dos analitos, o teste de solvente de condicionamento foi refeito, porém após a eluição, o extrato foi seco sob sistema de concentração à vácuo (SpeedVac SPD120; ThermoFisher, Waltham, EUA) e ressupendido no mesmo volume de metanol para injeção. Os resultados (Figura 33) mostram que o melhor solvente de condicionamento é acetato de etila, a qual foi adotada nos próximos experimentos.

Assim como no desenvolvimento do método DPX-C18, avaliou-se diferentes solvente de eluição, tempo de equilíbrio na etapa de amostra, na etapa de eluição e a necessidade da adição de água no condicionamento. Os resultados desses experimentos podem ser encontrados no Apêndice (Figuras A4-A7).

Figura 31 – Avaliação dos materiais derivados de óxido de grafeno em DPX

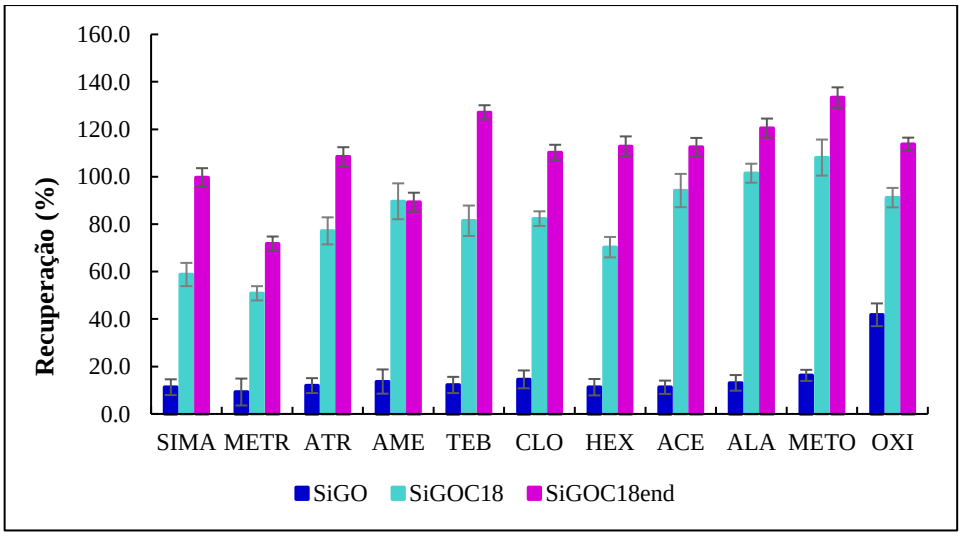


Figura 32 – Avaliação do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end

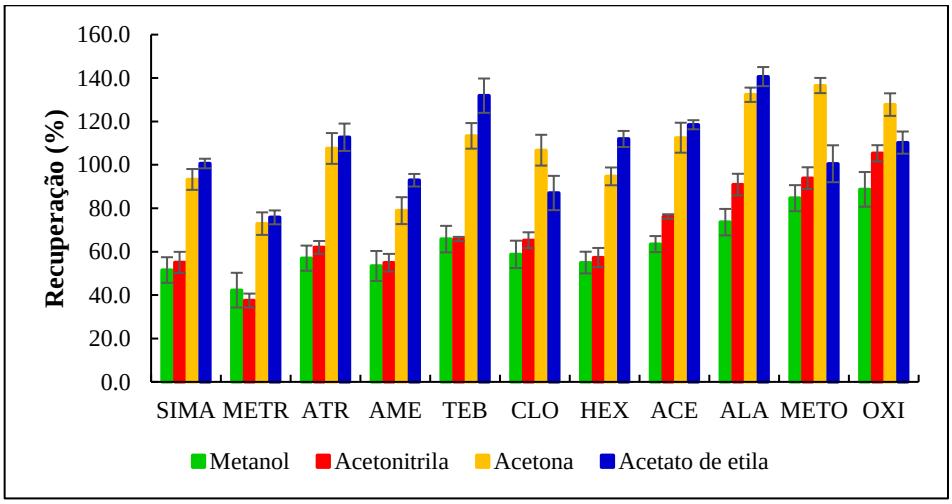
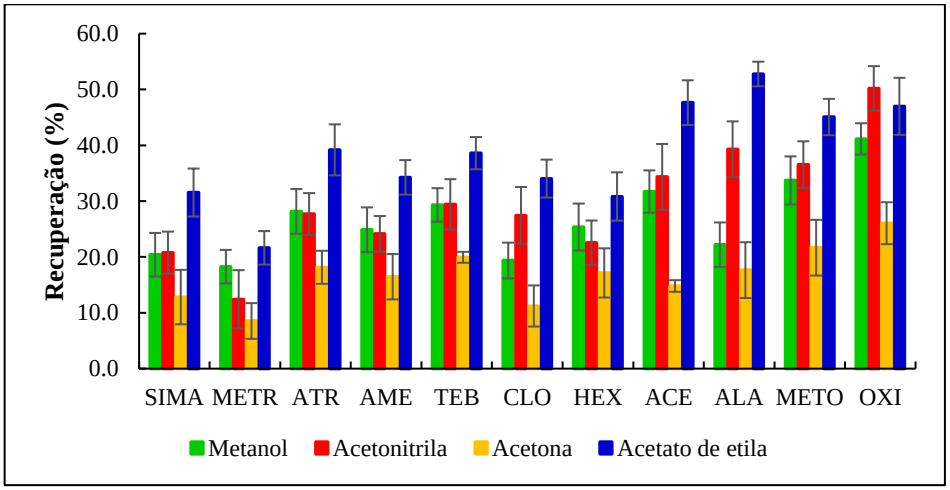


Figura 33 – Avaliação do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end (inclusão da etapa de secagem)



Melhores recuperações foram atingidas empregando acetona na eluição. Como esse solvente é incompatível com o método cromatográfico devido a diferença de polaridade entre a acetona e a fase móvel, continuou-se adotando a secagem do extrato e ressuspenção com metanol para injeção.

A aplicação de um intervalo de tempo entre a adição e dispensa da amostra e solvente de eluição, assim como no método empregando C18, aumentaram a recuperação para maioria dos analitos. Tanto na etapa de amostra como eluição, melhores resultados foram alcançados adotando tempo de equilíbrio de 60 segundos.

No condicionamento, observa-se uma ligeira melhora nas recuperações ao empregar 0,3 mL de água após o metanol. Assim, essa etapa foi mantida. A avaliação da etapa de ciclos foi

feita tanto manualmente como automatizada, com auxílio de um robô lab-made, empregando de 1 a 10 ciclos.

Manualmente, assim como no método DPX-C18, os ciclos resultaram em uma piora nas recuperações dos analitos (Figuras 34 e 35). Uma possível explicação é que ao passar a amostra ou solvente várias vezes na ponteira (com fluxos em sentidos opostos), a fase extratora pode escapar pelos espaços vazios da lã de vidro e sair do dispositivo, resultando em uma menor capacidade de extração.

Outra opção é que ocorra o mesmo efeito mencionado anteriormente no método DPX-C18: na etapa de amostra, por exemplo, os analitos que estão sorvidos na fase migram novamente para o solvente, resultando em menores recuperações.

Figura 34 – Avaliação de ciclos (amostra/manual) no método DPX-SiGOC18end

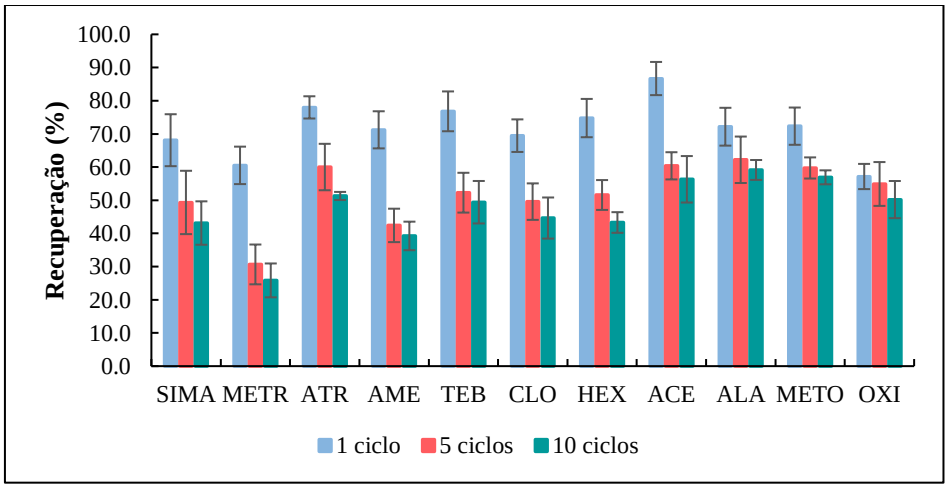
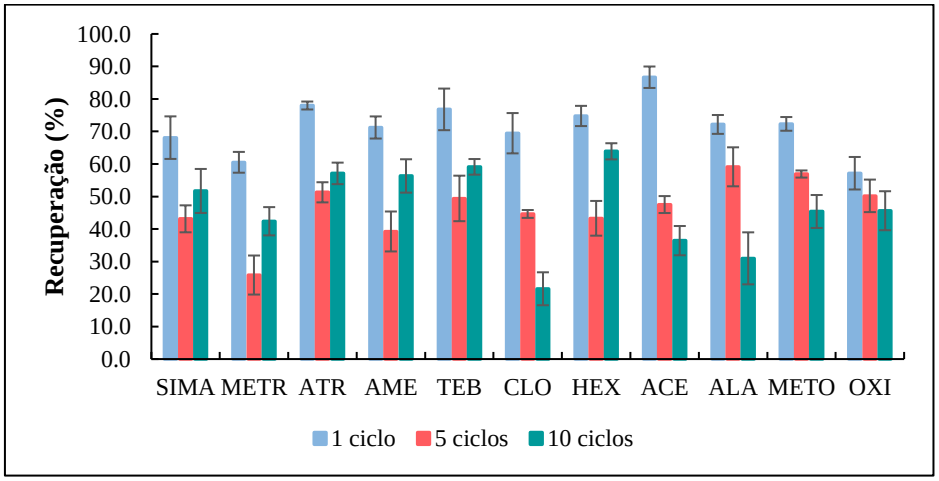


Figura 35 – Avaliação de ciclos (eluição/manual) no método DPX-SiGOC18end



Na automatização, os ciclos também levaram a uma piora nas recuperações (Figuras 36 e 37). Observa-se ainda que, as recuperações obtidas no modo automatizado são inferiores às obtidas manualmente. Essa queda nas recuperações pode estar associada com a velocidade dos ciclos de aspiração/dispensa, que é menor quando realizada pelo robô.

Além dos resultados negativos, a utilização do robô demanda que a ponteira seja cortada para que haja um encaixe correto com a seringa, a qual é acoplada ao sistema, tornando o processo de confecção do dispositivo DPX mais trabalhoso e demorado. Diante dos resultados, não foram adotados ciclos no método de extração.

Figura 36 – Avaliação de ciclos (amostra/automatizado) no método DPX-SiGOC18end

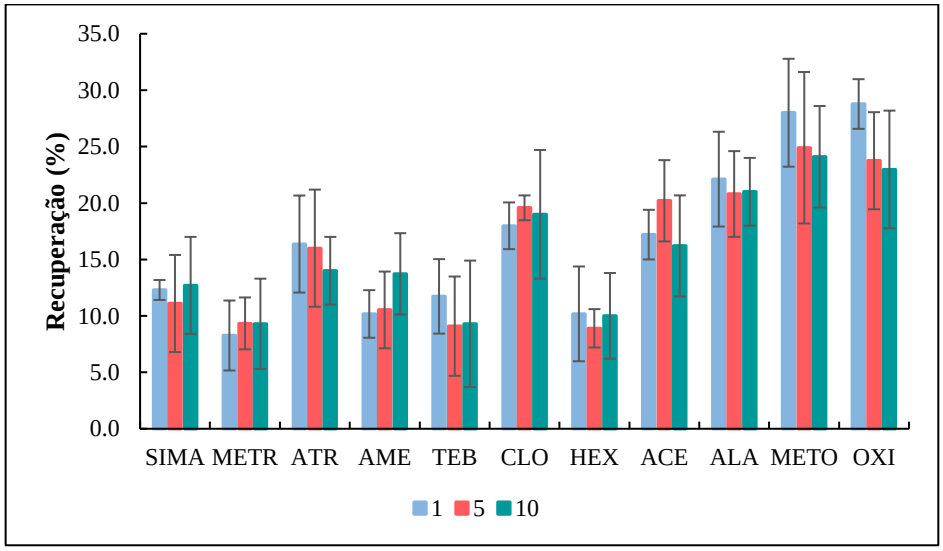
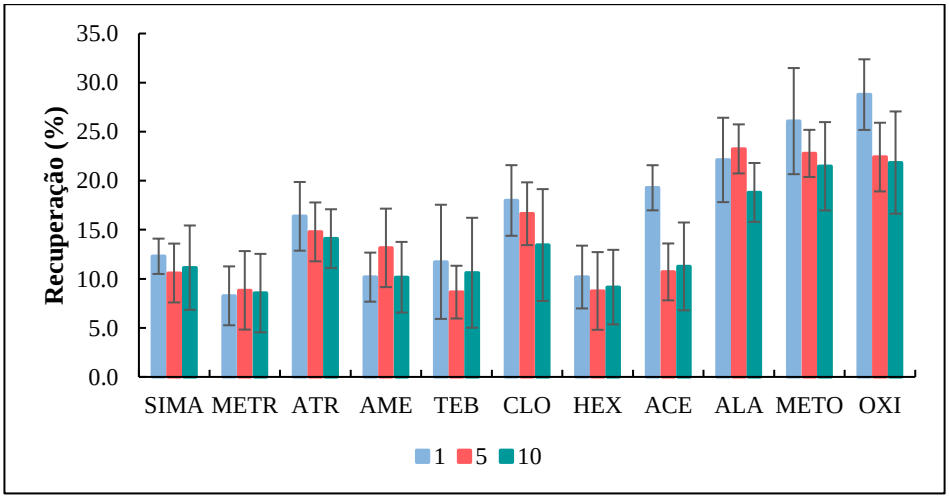


Figura 37 – Avaliação de ciclos (eluição/automatizado) no método DPX-SiGOC18end



Na técnica DPX, os líquidos podem ser tanto inseridos por cima do dispositivo como aspirados (forma convencional de pipetagem). Esse fator foi avaliado na etapa de amostra (Figura 38). Ao aspirar a amostra, observa-se uma queda significativa nas recuperações da maioria dos analitos. Dessa forma, a amostra continuou sendo inserida por cima do dispositivo, assim como os outros líquidos empregados no método.

Em seguida, avaliou-se a necessidade de aspiração de ar para promover a mistura dinâmica entre fase e analito (Figura 39). Observa-se que aspirar 0,5 mL de ar promove uma melhor interação entre a fase e os analitos da amostra, aumentando a capacidade de extração do material.

Figura 38 – Avaliação do modo de inserção da amostra no método DPX-SiGOC18end

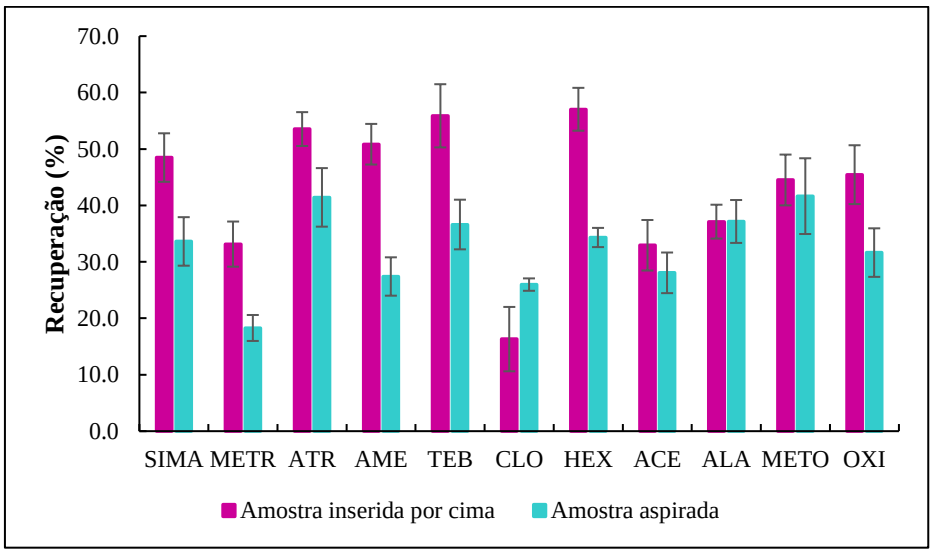
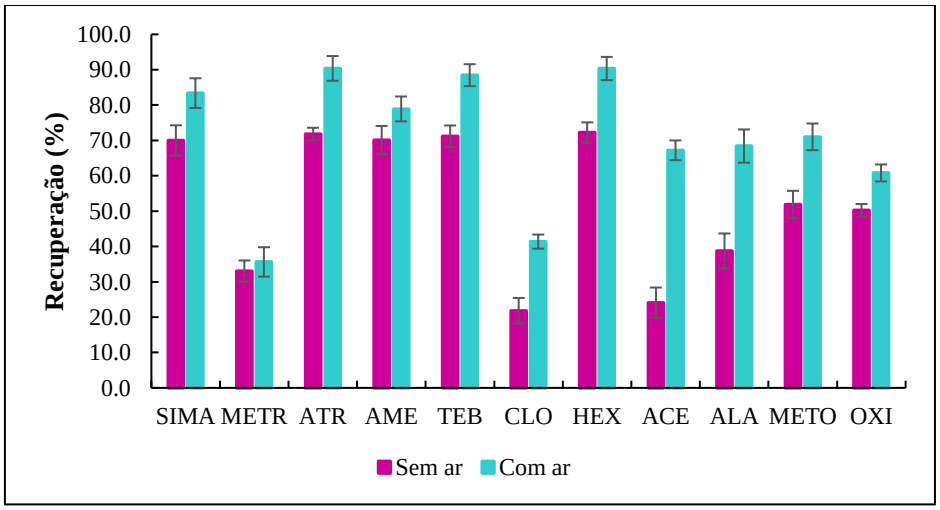


Figura 39 – Avaliação da etapa de aspiração de ar (amostra) no método DPX-SiGOC18end

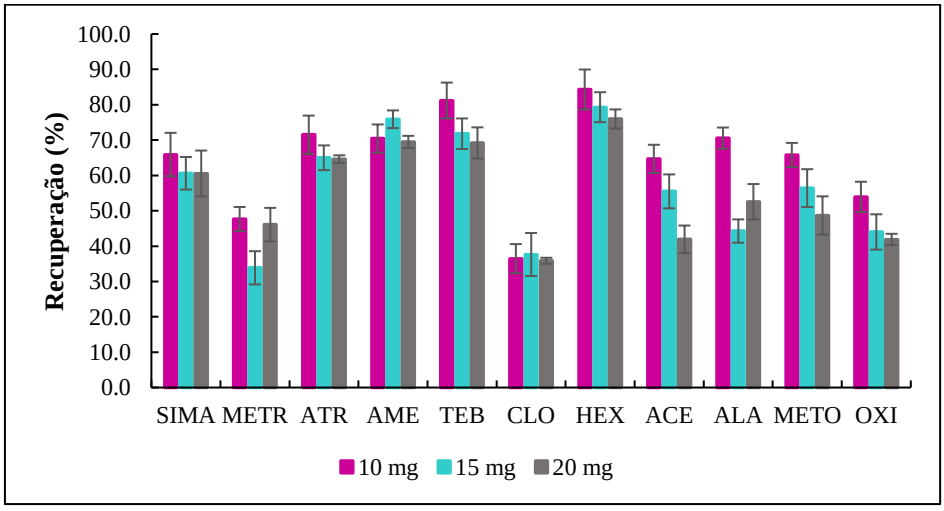


A quantidade de fase extratora no dispositivo DPX foi avaliada, variando de 10 a 20 mg (Figura 40). Um aumento na quantidade de fase não aumenta a recuperação dos analitos, indicando que 10 mg são suficientes para extrair os herbicidas selecionados.

Por último, foi avaliado o fator de concentração. Por se tratar de análises de herbicidas em níveis traço, é importante que o método de preparo de amostra concentre os analitos, para uma análise instrumental mais eficiente e precisa.

Para isso, optou-se por inserir 0,8 mL de amostra (capacidade máxima da ponteira) e o volume final de injeção adotado (após secagem e ressuspensão) foi de 0,08 mL, volume mínimo para uma injeção automática na coluna cromatográfica precisa e exata. Dessa maneira, o fator de concentração adotado é de 10.

Figura 40 – Avaliação da quantidade de sorvente no método DPX-SiGOC18end



Como após a etapa de eluição, o solvente é seco e depois ressuspenso e o fator de concentração considera o volume final para injeção, avaliou-se a quantidade de solvente necessário para eluir os analitos da ponteira. Para isso, foram testados 0,3 mL (volume que já sendo usado anteriormente) e 0,8 mL, volume máximo permitido na ponteira.

Comparando os resultados (Figura 41), é possível notar que não há diferença significativa nas recuperações ao modificar a quantidade de acetona na eluição. Dessa forma, 0,3 mL foi adotado como volume de eluição, ao qual além de empregar uma menor quantidade de solvente, acelera o processo da etapa de secagem com nitrogênio, diminuindo o tempo total da extração. A Figura 42 ilustra o método DPX-SiGOC18end desenvolvido.

Figura 41 – Avaliação do volume de solvente de eluição no método DPX-SiGOC18end

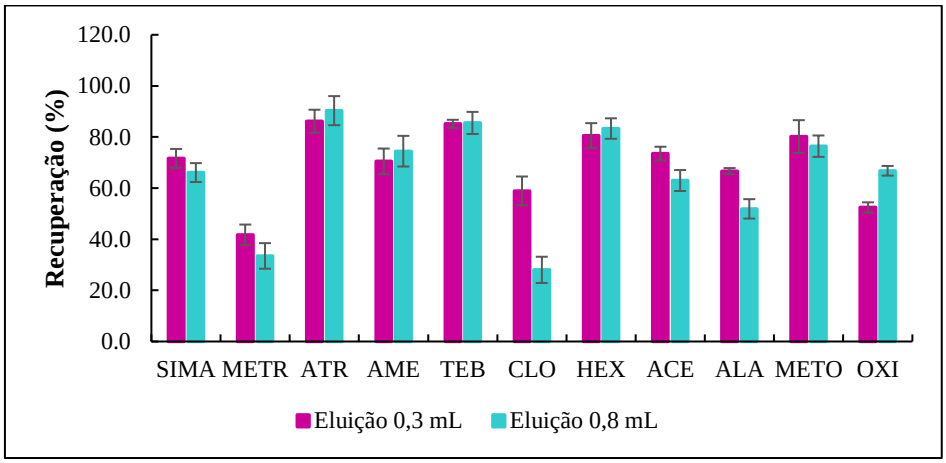
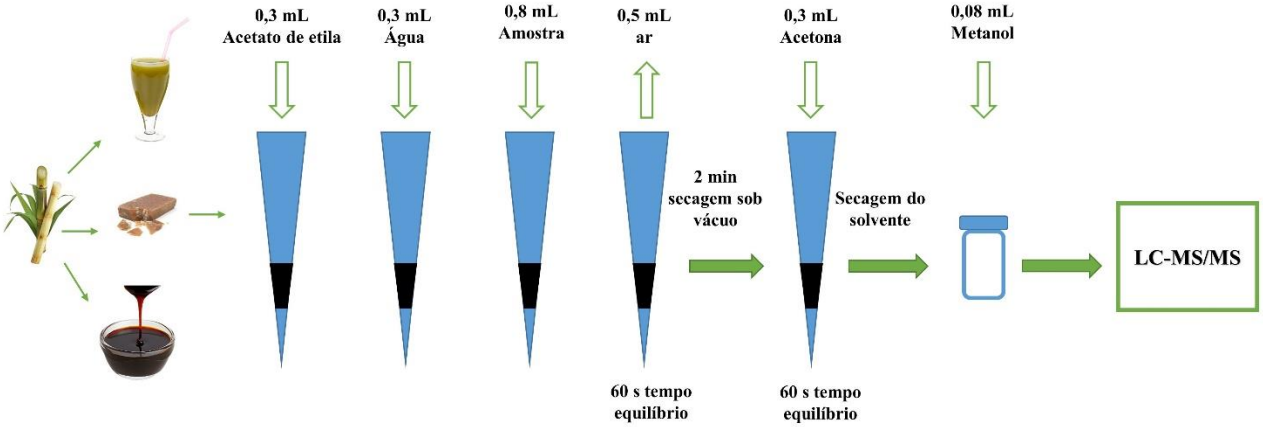


Figura 42 – Método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS.

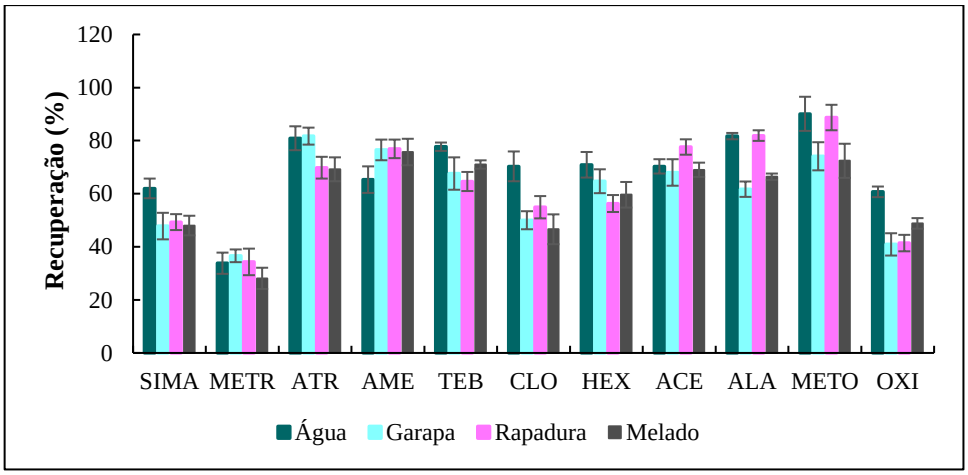


Em resumo, 0,3 mL de acetato de etila e a mesma quantidade de água são utilizados para condicionar a ponteira DPX. Em seguida, aplica-se 0,8 mL de amostra e 0,5 mL de ar são aspirados para aumentar a interação dos analitos com a fase. Após 60 segundos, a amostra é descartada e a ponteira DPX é seca sob vácuo por 2 minutos para retirar a quantidade remanescente de amostra que pode ficar presa nas paredes da ponteira e lã de vidro. A eluição é feita com 0,3 mL de acetona e após 60 segundos, o eluato é coletado e seco totalmente em sistema de concentração à vácuo (SpeedVac SPD120; ThermoFisher, Waltham, EUA). No mesmo frasco, 0,08 mL de metanol são aplicados e após homogeneização, o conteúdo é encaminhado para injeção no ssitema LC-MS/MS.

5.12 Aplicação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em matrizes derivadas da cana-de-açúcar

Após o desenvolvimento do método em água, o mesmo foi aplicado em garapa, rapadura e melado (Figura 43). De modo geral, as três matrizes são constituídas do caldo extraído da cana-de-açúcar em diferentes formas. Ao fazer as extrações, as recuperações dos analitos também são semelhantes. Os diferentes valores obtidos entre as matrizes e a água se devem aos interferentes presentes nas matrizes, os quais podem influenciar positivamente ou negativamente na extração.

Figura 43 – Método DPLX-SiGOC18end-LC-MS/MS aplicado em água, garapa, rapadura e melado



5.13Aplicação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em cachaça

Dentre as matrizes analisadas neste trabalho, a cachaça é a com composição mais diferente, pois trata-se de um produto destilado da cana-de-açúcar, com teor alcóolico em torno de 40%. A presença do etanol faz com que essa matriz tenha um caráter mais apolar, quando comparada com as outras. Apesar de ser uma matriz mais limpa, não tendo impurezas sólidas em seu meio, ao realizar os testes, foi possível perceber que a presença do etanol influencia negativamente a performance do método de extração, provavelmente fazendo com que os analitos sejam menos retidos pela fase extratora.

A fim de minimizar esse efeito do etanol, a cachaça foi diluída com água na proporção de 1:0 até 1:3 de (cachaça/água; v/v) (Figura 44). Observa-se que quanto mais diluída a cachaça,

menor a quantidade de etanol na amostra e melhores são as recuperações. Dessa forma, foi adotada a proporção 1:3 (cachaça/água; v/v) para os demais experimentos.

Considerando que os resultados são muito inferiores aos obtidos em outras matrizes optou-se por fazer mais alguns testes com a cachaça diluída, a fim de melhorar as recuperações. Como a polaridade desta matriz é diferente, foram feitos testes com diferentes solventes de condicionamento e eluição, a fim de avaliar a interação desses com a matriz. Os demais parâmetros do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS foram mantidos.

No condicionamento (Figura 45), observa-se uma melhora nas recuperações ao empregar acetonitrila, um solvente de polaridade intermediária, ao invés de acetato de etila, conforme foi utilizado para as outras matrizes.

Figura 44 – Recuperações do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em cachaça diluída em diferentes proporções de água

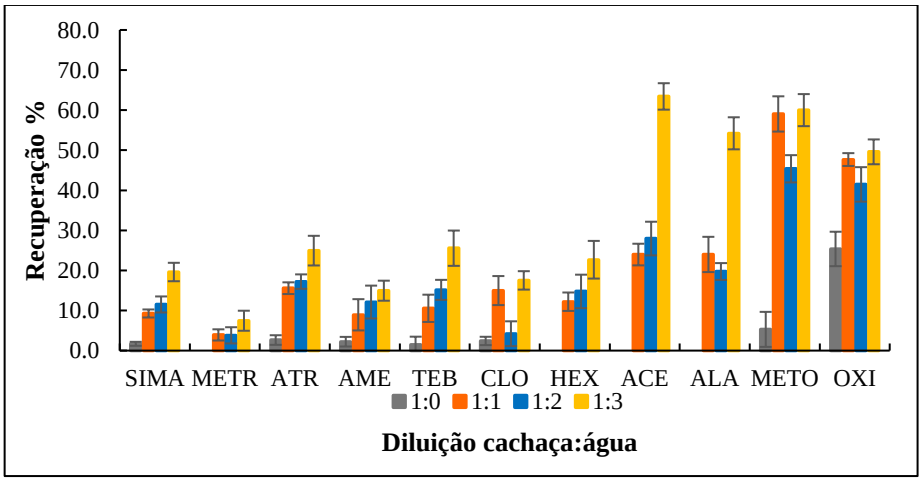
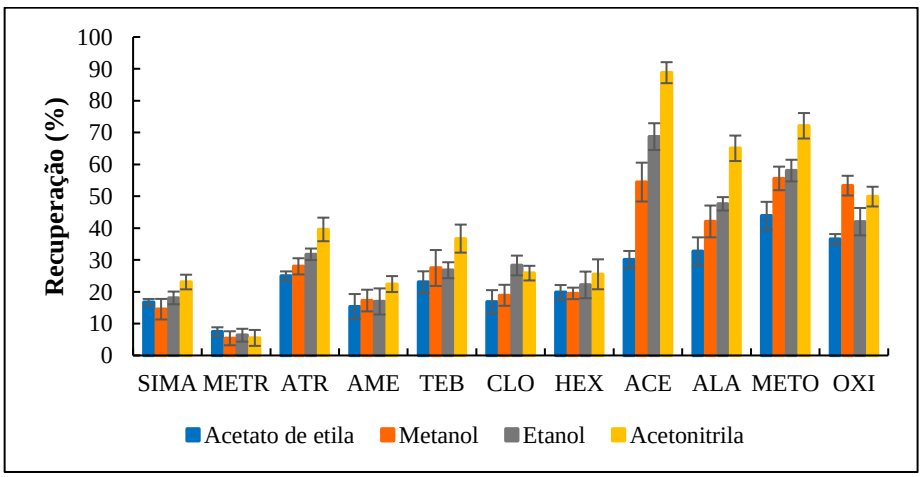


Figura 45 – Efeito do solvente de condicionamento no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça)



Ainda no condicionamento, foi avaliado o efeito da adição de água após o solvente de condicionamento (Figura 46). Ao contrário do que foi visto anteriormente, para a cachaça, utilizar água no condicionamento diminui as recuperações.

Na etapa de eluição (Figura 47), foram avaliados acetona, acetonitrila e metanol. Assim como em água e outras matrizes derivadas da cana, a acetona foi o melhor solvente para extrair os analitos do sorvente.

Os experimentos mostraram que, devido a composição da cachaça, é necessário um tratamento diferente para condicionar a fase extratora antes de aplicar a cachaça. Dessa forma, a única modificação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (descrito na Figura 42) para essa matriz é o condicionamento, o qual deve ser feito com 0,3 mL de acetonitrila.

Figura 46 – Efeito da água na etapa de condicionamento no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça)

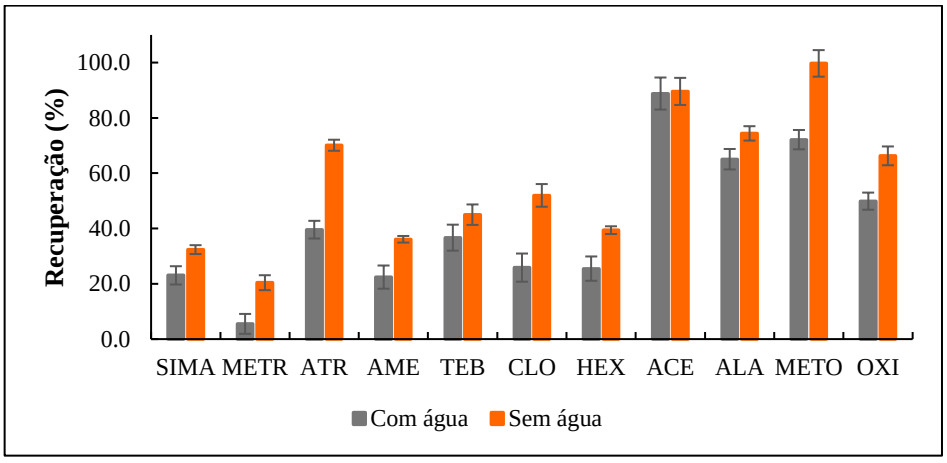
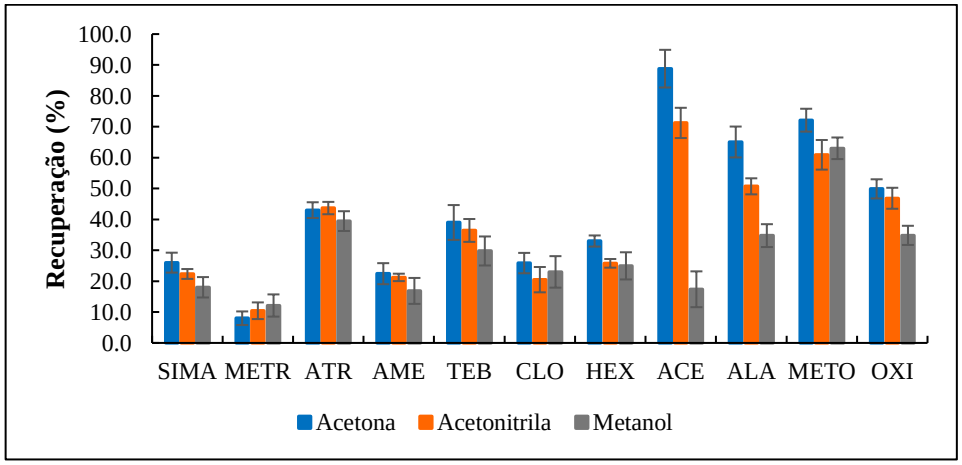


Figura 47 – Efeito do solvente de eluição no método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS (cachaça)



Os valores finais das recuperações obtidas com o método nas matrizes água, garapa, rapadura, melado e cachaça (já com o condicionamento otimizado) podem ser encontrados no Apêndice (Tabela A4).

5.14 Validação do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS

5.14.1 SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada comparando injeções da amostra "branca" (sem adição dos herbicidas) e fortificada no primeiro ponto da curva analítica, após a extração.

Os cromatogramas da garapa, rapadura e melado (Figura 48) apresentam perfis semelhantes. No início do cromatograma, observa-se a presença de interferentes polares altamente solúveis em água, com tempos de retenção inferior a 1 minuto. Esses picos não prejudicam a análise dos herbicidas, visto que eles eluem antes dos analitos de interesse.

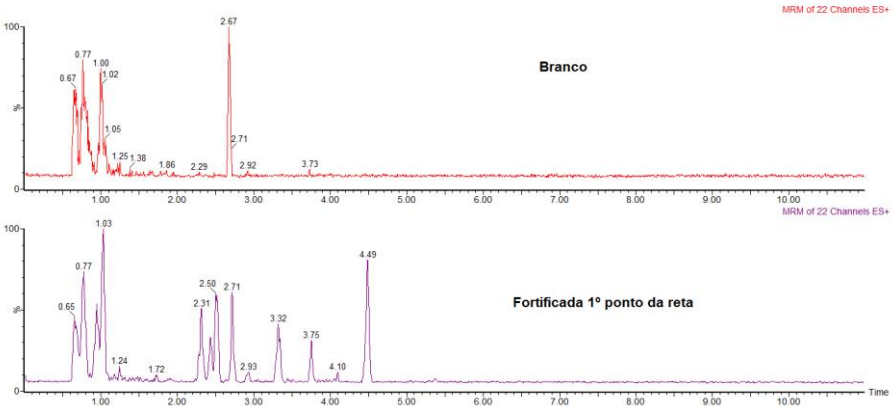
Observa-se também a presença de um pico intenso entre 2,67 e 2,71 minutos, correspondente à transição 284>176. Essa transição é monitorada para quantificação do metolacloro, cujo tempo de retenção é 4,5 minutos. Apesar de o modo MRM ser mais seletivo que outros modos de detecção, é possível que mais de um composto tenha a mesma transição de íons. Visto que os tempos de retenção entre o interferente e o metolacloro são muito diferentes, a presença deste pico não prejudica a quantificação do herbicida.

A cachaça possui elevado teor de etanol em sua composição; assim, a injeção desta matriz "branca" apresenta um perfil distinto das citadas anteriormente (Figura 48D). O cromatograma da matriz branca apresenta apenas um pico de baixa intensidade em 2,69 minutos, também correspondente à transição 284>176 (metolacloro), a qual não interfere na análise dos herbicidas.

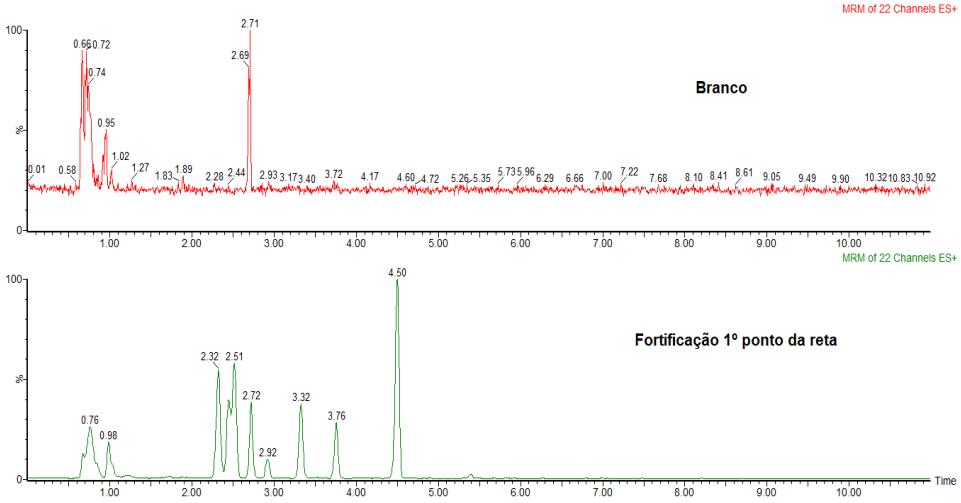
Dessa forma, apesar da detecção de alguns poucos possíveis interferentes nas matrizes brancas, os quais não são eliminados pelo método de extração, esses não interferem na detecção e quantificação dos analitos, comprovando que o método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS é seletivo para os onze herbicidas nas matrizes estudadas.

Figura 48 – Avaliação da seletividade do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS para: (A) garapa, (B) rapadura, (C) melado e (D) cachaça

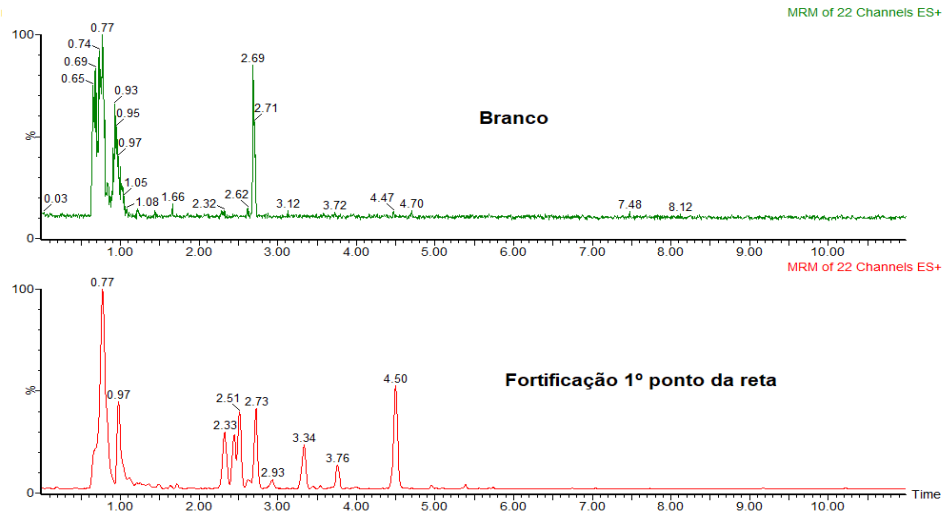
A

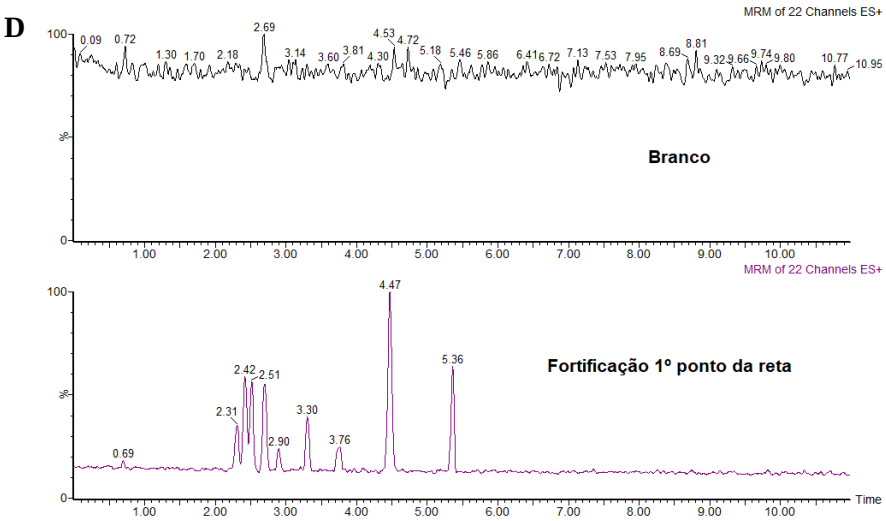


B



C





5.14.2 LINEARIDADE, LOD E LOQ

Para a avaliação da linearidade do método, a curva analítica foi construída para cada matriz, com seis níveis de concentração, partindo do limite de quantificação.

Atualmente, não há legislação para o monitoramento dos herbicidas selecionados nas matrizes avaliadas neste trabalho, apenas na cana-de-açúcar, cujos limites variam de acordo com o analito, sendo a maioria na ordem de ng mL^{-1}.

As Tabelas A5-A8 do Apêndice expressam os parâmetros da curva, limites de detecção e quantificação do método para cada matriz. As curvas analíticas são também mostradas no Apêndice (Figuras 8-11), onde o eixo y representa a área do pico cromatográfico e o eixo x, a concentração do analito. Em todos os casos, o coeficiente de correlação é igual ou superior a 0,99, indicando uma boa linearidade na faixa de trabalho adotada. Os LOQs (que correspondem ao primeiro ponto da faixa linear) variam entre 1 a 5 ng mL^{-1} (garapa), 5 a 25 µg Kg^{-1} (rapadura e melado) e 4 a 32 ng mL^{-1} (cachaça). Os LODs alcançados foram de 0,3 a 2 ng mL^{-1} (garapa), 1,5 a 7,5 µg Kg^{-1} (rapadura e melado) e 1,2 a 9,6 ng mL^{-1} (cachaça).

5.14.3 PRECISÃO

A precisão intra-dia (repetitividade) e a precisão intermediária (inter-dia) foram avaliadas em três níveis: alto, médio e baixo. Os resultados são mostrados nas Tabelas A9-A12 do Apêndice e os desvios são inferiores a 15%, indicando que o método é preciso tanto nos ensaios feitos no mesmo dia, quanto em dias diferentes.

5.14.4 EXATIDÃO

Os resultados da exatidão para cada matriz são mostrados nas Tabelas A13-A16 do Apêndice. Os valores variam entre 90 e 110% e estão dentro do intervalo aceitável para vários guias de validação, nas concentrações adotadas neste trabalho. [65,69]

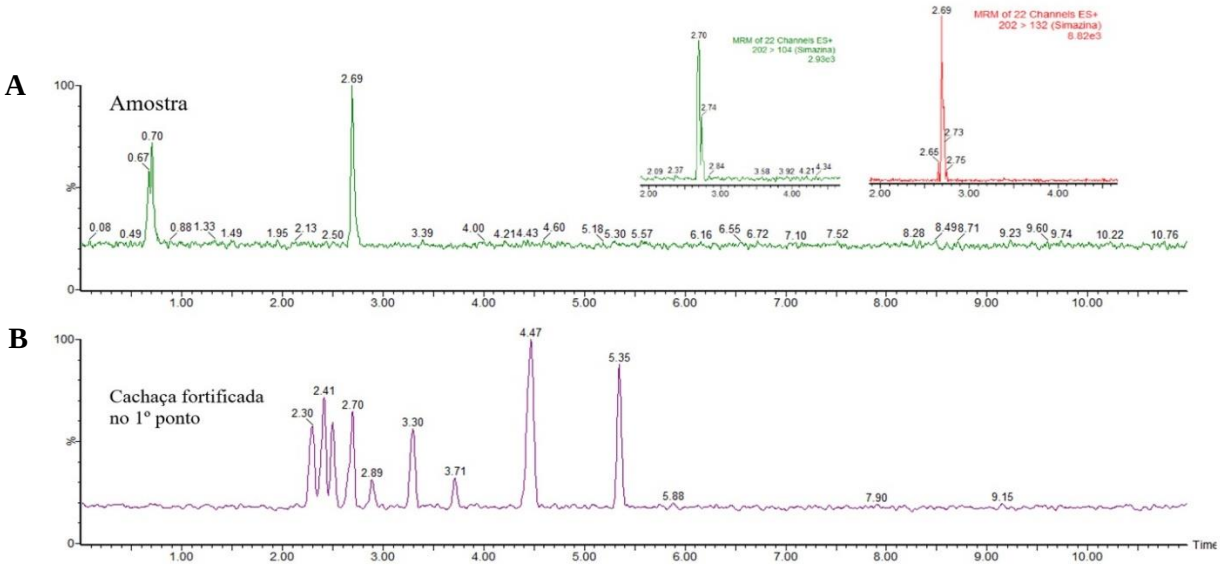
5.15 Aplicação em amostras

Após a validação do método, o mesmo foi empregado para a análise dos onze herbicidas em amostras reais. Ao todo, foram analisadas 10 amostras de cachaças e cinco amostras das demais matrizes, totalizando pelo menos 25 amostras diferentes.

Dentre as amostras de garapa, três apresentaram clomazona e outras três apresentaram o herbicida tebutiurom, todos abaixo do limite de quantificação. Nos testes com melado, em três amostras detectou-se tebutiurom, porém abaixo do limite de quantificação. Os herbicidas estudados não foram encontrados nas amostras de rapadura.

Nas cachaças, clomazona e metolacloro foram detectados em duas amostras, ambos abaixo dos limites de quantificação. Outra amostra apresentou tebutiurom também abaixo do LOQ. Por fim, simazina foi detectada em uma amostra (Figura 49). Calculou-se que a concentração do herbicida na amostra era de 16 ng mL^{-1}.

Figura 49 – Detecção de simazina em amostra real de cachaça. (A) Amostra de cachaça analisada; (B) Mesma amostra após fortificação com a mistura de herbicidas estudada. O tempo de retenção da simazina na amostras é ao redor de 2,7 minutos.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação e quantificação de onze herbicidas aplicados no cultivo de cana-de-açúcar, utilizando diferentes técnicas instrumentais e de preparo de amostra.

O método empregando LC-MS/MS foi utilizado para o desenvolvimento dos métodos de preparo de amostra, validação e aplicação em amostras reais. O método desenvolvido é capaz de separar, identificar e quantificar os analitos de forma adequada e rápida. O método GC-MS (usado no auxílio do desenvolvimento do método SPE) e o método GC-MS/MS foram usados para comparar a performance do método DPX-C18 em técnicas analíticas diferentes (GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS).

A SPE é uma técnica muito consolidada, sendo estudada e desenvolvida há décadas. Os mecanismos da SPE serviram como base para outras técnicas de extração utilizando fase sólida, como a DPX, investigada neste estudo. Os parâmetros avaliados em SPE foram transferidos para o método DPX, o qual possui mais variáveis que podem interferir na extração. O método SPE-C18-LC-MS/MS apresentou bom desempenho, sendo que as recuperações obtidas para os analitos ficaram entre 30 e 109%.

As ponteiras DPX-C18 foram elaboradas no laboratório e o método de extração foi desenvolvido, variando diversos parâmetros, como tempo de equilíbrio, aspiração de ar na etapa de amostra, aplicação de água no condicionamento, dentre outros. As recuperações do método DPX-C18 ficaram entre 58 e 76,5%.

Ao comparar as duas técnicas empregando o mesmo sorvente (C18), observa-se que a SPE resulta em recuperações mais altas para sete analitos (do total de onze), porém o intervalo de recuperações para o grupo de analitos é mais uniforme na DPX. Apesar das recuperações mais baixas obtidas no método DPX, essa técnica consome um volume bem menor de solventes e amostra, além de não necessitar de equipamentos, como bomba de vácuo e *manifolds*, e reduzir o tempo de extração (5 vezes menor do que o tempo gasto para a extração de um cartucho em SPE).

O método DPX-C18, desenvolvido com auxílio de LC-MS/MS, foi também avaliado utilizando GC-MS/MS. Ao adicionar uma etapa de secagem da ponteira, após dispensar a amostra, o método apresentou recuperações ligeiramente superiores para a maioria dos analitos (52 – 102%), quando comparado com LC-MS/MS, indicando que o método DPX-C18 pode ser aplicado para análises nas duas técnicas instrumentais.

O sorvente SiGOC18end foi sintetizado, caracterizado por FT-IR e empregado nas ponteiras DPX. Após a avaliação de vários parâmetros que influenciam a extração, o método apresentou recuperações entre 34 – 90% em água, 37 – 82% em garapa, 34 – 89% em rapadura, 28 – 76% em melado e 10 – 100% em cachaça.

O método DPX- SiGOC18end-LC-MS/MS foi validado seguindo o guia ICH Q2 (R1), onde avaliou-se a linearidade, precisão inter e intra-dia, exatidão, LOD e LOQ para as quatros matrizes derivadas da cana-de-açúcar. O método apresentou linearidade na faixa avaliada para cada matriz, com coeficiente r^2 igual ou superior a 0,99. O método é preciso e exato na faixa de trabalho adotada.

A técnica de DPX se mostrou rápida, simples e adequada para o preparo de amostra contendo os analitos estudados, consumindo pouca amostra e solventes orgânicos e consequentemente, gerando pouco resíduo. As ponteiras DPX são fáceis de elaborar e apresentam baixo custo quando comparadas com outros dispositivos de extração, como os cartuchos de SPE. Os resultados mostram que os métodos DPX-C18 e DPX-SiGOC18end podem ser aplicados no preparo de amostra para a análise dos herbicidas presentes nos derivados alimentares da cana-de-açúcar e possuem potencial para serem aplicados em outras matrizes contendo esses analitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. **Conab,** Brasília, v. 8, n. 4, 2022.

2. BARLETTA, J. Y. **Desenvolvimento e aplicação de uma nova fase para extração por sorção em barra de agitação (SBSE)**. Orientador: Fernando Mauro Lanças. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

3. TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H . P.; TOLEDO, M. C. F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 76–82, 2007.

4. PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 147–152, 2005.

5. DJALOU, J. **Agregação de valor nutricional e sensorial em rapaduras artesanais.** Orientador: Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges e Marta Regina Verruma-Bernardi. 2017. 77f . Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

6. BELÉ, J. S. A. H. S. **Análise da qualidade microbiológica e sujidades em melado de cana-de-açúcar.** Orientador: Marta Regina Verruma-Bernardi e Valdinei Luis Belini. 2019. 78f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2019.

7. DE MIRANDA, E. E ; FONSECA, M. F. Sugarcane: food production, energy, and environment. *In*: SANTOS, F.; RABELO, S. C.; DE MATOS, M.; EICHLER, P. (org). **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**: Elsevier , 2019. p. 67–88.

8. INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA (IBRAC). **Mercado Externo**. 2020. Disponível em: https://ibrac.net/servicos/mercado-externo. Acesso em: 16 mar. 2022.

9. RIBEIRO , M. L.; LOURENCETTI , C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L. C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 8, n. 1, p. 53–71, 2008. Disponível em: http://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/holos/article/viewArticle/2539. Acesso em: 21 maio. 2022.

10. SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 71, n. July 2017, p. 188–201, 2018.

11. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E PECUÁRIA. **Consulta de ingrediente ativo**. [s.d.]: AGROFIT, 2022. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 mar. 2022.

12. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2007.

13. LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.

14. LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna:** HPLC/ CLAE. Campinas: Átomo, 2009.

15. MCMASTER, M.; MCMASTER, C. **GC/MS:** a practical user's guide. New York: Wiley-VCH, 1998.

16. SPENCER, C.; ZHANG, W.; OUYANG, Z. Mass spectrometry and applications. *In*: **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 24 ed. Philadelphia: Elsevier, 2022. p. 60–73.

17. EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M. KRAJ, A. **Mass spectrometry:** instrumentation, interpretation, and applications. New Jersey: Wiley, 2009.

18. TSOCHATZIS, E. D.; LOPES, J. A.; HOEKSTRA, E.; EMONS, H. Development and validation of a multi-analyte GC-MS method for the determination of 84 substances from plastic food contact materials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 412, n. 22, p. 5419–5434, 2020.

19. XU, X. B.; MURTADA, K.; PAWLISZYN, J. Determination of selected volatile terpenes in fish samples via solid phase microextraction arrow coupled with GC-MS. **Talanta**, Amsterdam, v. 221, n. July 2020, p. 121446, 2021.

20. DOZEIN, S. V.; MASROURNIA, M.; ES'HAGHI, Z.; BOZORGMEHR, M. R. Development of a new magnetic dispersive solid-phase microextraction coupled with gc-ms for the determination of five organophosphorus pesticides from vegetable samples. **Food Analytical Methods**, New York, v. 14, n. 4, p. 674–686, 2021. DOI: 10.1007/s12161-020-01906-0.

21. LIU, M.; GE, Y.; LIAO, L. High-throughput quantification of urinary steroids by supported liquid extraction coupled with gc-ms/ms: unravelling cyclic fluctuations of steroid profiling in regular menstrual cycle. **SSRN Electronic Journal**, Rochester, 2021. Disponível em: https://www.ssrn.com/abstract=3996119. Acesso em: 08 abr. 2022.

22. KHETAGOUDAR, M. C.; JINENDRA, U.; PRAVEEN KUMAR, A.; BILEHAL, D.; PRASAD KOLLUR, S. Multiresidue pesticide analysis in green chilli using GC–MS/MS using modified QuEChERS method with highly efficient Fe3O4@CFR@GO nanocomposite. **Inorganic Chemistry Communications**, Amsterdam, v. 137, p. 109195, 2022. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138770032200003X. Acesso em: 01 mar. 2022.

23. HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry:** principles and applications. 3. ed. Chichester: Wiley, 2007.

24. ERYAVUZ ONMAZ, D.; ABUSOGLU, S.; ONMAZ, M.; YERLIKAYA, F. H.; UNLU, A. Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS / MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1176, p. 122768, 2021.

25. LIAO, R.; XIA, Q.; ZHOU, C.; GENG, F.; WANG, Y.; SUN, Y.; HE, J.; PAN, D.; CAO, J. LC-MS/MS-based metabolomics and sensory evaluation characterize metabolites and texture of normal and spoiled dry-cured hams. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 371, p. 131156, 2022.

26. ZHANG, L . LI, Y.; LIANG, Y.; ZHANG, F.; XU, T.; WANG, M.; SONG, H.; LIU, X.; LU, B. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 276, p. 538–546, 2019.

27. GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; AFONSO, M. D. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Determination of phthalates in beverages using multiwalled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction before HPLC-MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 41, n. 12, p. 2613–2622, 2018. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201800192. Acesso em: 10 abr. 2022.

28. CARASEK, E.; MORÉS, L.; MERIB, J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 19, p. e00060, 2018.

29. LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

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

31. ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 31–52, 2015.

32. SAJID, M .; KHALED NAZAL , M.; RUTKOWSKA, M.; SZCZEPAŃSKA, N.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Solid phase microextraction: apparatus, sorbent materials, and application. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 49, n. 3, p. 271–288, 2019.

33. ABDEL-REHIM, M. **Method and apparatus for sample preparation using solid phase microextraxtion.** Depositante: Mohamed Abdel-Rehim. Patent Application Publication No .: US 2004 / 0092606A1. Depósito: 28 ago. 2002. Concessão: 2 dez. 2004.

34. YANG, L.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): a review. **Journal of Chromatography B:** Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Amsterdam, v. 1043, p. 33–43, 2017.

35. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, Hoboken, v. 11, n. 10, p. 737–747, 1999.

36. KHATIBI, S. A.; HAMIDI, S.; SIAHI-SHADBAD, M . R. Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 61, n. 20, p. 3361–3382, 2021.

37. BURATO, J . S. S.; MEDINA, D. A. V.; DE TOFFOLI, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 43, n. 1, p. 202–225, 2020.

38. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida(SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

39. ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 80, p. 641–654, 2016.

40. JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. *In*: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (org). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro, LTC, 2015. p. 62–79.

41. BREWER, W. E. **Disposable pipette extraction.** Depositante: Willian E. Brewer. United States Patent (6,566,145 B2). Depósito: 09 fev. 2001. Concessão: 20 mai. 2003. Disponível em: https://patentimages.storage.googleapis.com/63/37/40/d41e88143fecef/US6566145.pdf. Acesso em: 05 nov. 2021.

42. ARCÍA DE LLASERA, M. P.; HERNÁNDEZ CAMARILLO, M.; GARCÍA CICOUREL, A. R. ; COVARRUBIAS HERRERA, M. R. Semi-continuous monitoring of HMWPAH in microalgae cultures by PT-SPE/HPLC/FD-UV: estimation of the degradation constant. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 633, n. March, 2021.

43. ASTRIANNI, K. R.; METAVARAYUTH, K.; BREWER, W. E.; WANG, Q. Analysis of 10 β-agonists in pork meat using automated dispersive pipette extraction and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B:** Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Amsterdam, v. 1084, n. January, p. 64–68, 2018.

44. GUAN, S. H.; HUANG, M. W.; LI, X.; CAI, Q. Determination of atrazine, simazine, alachlor, and metolachlor in surface water using dispersive pipette extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical Letters**, New York, v. 51, n. 4, p. 613–625, 2018.

45. BORDIN, D . C. M.; ALVES, M. N . R.; DE CAMPOS, E. G.; DE MARTINIS, B. S. Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 39, n. 6, p. 1168–1172, 2016.

46. CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R. D. Disposable pipette extraction: a critical review of concepts, applications, and directions. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1192, 2022.

47. OLIVEIRA, T. C.; LANÇAS, F. M. Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiras descartáveis. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 10, n. 4, p. 243–255, 2019.

48. PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

49. ZHANG, H.; LI, Y.; ZHU, J.; LI, H.; LI, D.; LIU, Z.; SUN, X.; WANG, B.; WANG, Q.; GAO, Y. Disposable pipette extraction (dpx) coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of pesticide residues in wine samples. **Food Analytical Methods**, New York, v. 12, n. 10, p. 2262–2272, 2019.

50. AGUIAR JÚNIOR, C. A. S.; DOS SANTOS, A. L. R.; DE FARIA, A. M. Disposable pipette extraction using a selective sorbent for carbendazim residues in orange juice. **Food Chemistry**, Amsterdam, p. 125756, 2019.

51. SONG, S. ; ZHANG, C. ; CHEN, Z .; HE, F.; WEI, J.; TAN, H.; LI, X. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC–MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1557, p. 51–61, 2018.

52. ZHANG, W.; HU, X.; FEI, J.; YANG, J. Determination of 9 kinds of pesticide residues in fruits and vegetables using disposable pipette extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Food Safety and Quality**, **Alfred,** v. 10, n. 10, p. 3017–3023, 2019.

53. SHI, Z.; LI, Q.; XU, D.; HUAI, Q.; ZHANG, H. Graphene-based pipette tip solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of carbamate pesticide residues in fruit juice. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 39, n. 22, p. 4391–4397, 2016.

54. LI, Y.; LAN, S.; ZHU, T. Recent advances of graphene-based sorptive materials in extraction: a review. **TrAC- Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 142, p. 116319, 2021.

55. HOU, X.; TANG, S.; WANG, J. Recent advances and applications of graphene-based extraction materials in food safety. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 119, p. 115603, 2019.

56. HAN, X.; GUO, Z. Graphene and its derivative composite materials with special wettability: potential application in oil-water separation. **Carbon**, Oxford, v. 172, p. 647–681, 2021.

57. JING, W.; WANG, J.; KUIPERS, B.; BI, W.; CHEN, D. D. Y. Recent applications of graphene and graphene-based materials as sorbents in trace analysis. **TrAC -Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 137, p. 116212, 2021.

58. MANOUSI, N.; PLASTIRAS, O.; DELIYANNI, E. A.; ZACHARIADIS, G. A. Green bioanalytical applications of graphene oxide for the extraction of small organic molecules. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 9, p. 2790, 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2790. Acesso em: 20 mar. 2022.

59. YAN, H.; SUN, N.; LIU, S.; ROW, K. H.; SONG, Y. Miniaturized graphene-based pipette tip extraction coupled with liquid chromatography for the determination of sulfonamide residues in bovine milk. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 158, p. 239–244, 2014.

60. LU, Q.; CHEN, L.; LU, M.; CHEN, G.; ZHANG, L. Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid−liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 5, p. 2763–2770, 2010.

61. WANG, L.; WANG, M.; YAN, H.; YUAN, Y.; TIAN, J. A new graphene oxide/polypyrrole foam material with pipette-tip solid-phase extraction for determination of three auxins in papaya juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1368, p. 37–43, 2014.

62. YUAN, Y.; WANG, M.; JIA, N.; ZHAI, C.; HAN, Y.; YAN, H. Graphene/multi-walled carbon nanotubes as an adsorbent for pipette-tip solid-phase extraction for the determination of 17β-estradiol in milk products. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1600, p. 73–79, 2019.

63. MIRZAEE, M. T.; SEIDI, S.; ALIZADEH, R. Pipette-tip SPE based on graphene/ZnCr LDH for Pb(II) analysis in hair samples followed by GFAAS. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 612, p. 113949, 2021.

64. ZHANG, Y.; ZHAO, Y. G.; CHEN, W. S.; CHENG, H. L.; ZENG, X. Q.; ZHU, Y. Three-dimensional ionic liquid-ferrite functionalized graphene oxide nanocomposite for pipette-tip solid phase extraction of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in human blood sample. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1552, p. 1–9, 2018.

65. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de garantia da qualidade analítica:** áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2015.

66. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da União, Brasília, 2017.

67. BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos:** DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. Coordenação Geral de Acreditação, Brasília, 2016.

68. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures:** text and methodology Q2(R1). Versão 04. *[S. l.]*, 2015.

69. UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **Guidelines for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics, and veterinary products.** 3.ed. *[S. l.]*, 2019.

70. ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS . Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed.** World Health Organization, *[S. l.]*, 2017.

71. SERESHTI, H.; KHOSRAVIANI, M.; SAMADI, S.; AMINI-FAZL, M. S. Simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in different tea beverages by graphene-oxide based ultrasonic-assisted dispersive micro solid-phase extraction combined with HPLC-UV. **RSC Advances**, Cambridge, v. 4, n. 87, p. 47114–47120, 2014. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA06412G. Acesso em: 03 fev. 2022.

72. LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 123, n. 26, p. 6035–6039, 2011.

73. TSAI, P.; PUNDI, A; BRINDHADEVI, K.; PONNUSAMY, V. K. Novel semi-automated graphene nanosheets based pipette-tip assisted micro-solid phase extraction as eco-friendly technique for the rapid detection of emerging environmental pollutant in waters. **Chemosphere**, Oxford, v. 276, p. 130031, 2021.

74. SUN, N.; HAN, Y.; YAN, H.; SONG, Y. A self-assembly pipette tip graphene solid-phase extraction coupled with liquid chromatography for the determination of three sulfonamides in environmental water. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 810, p. 25–31, 2014.

75. GOLZARI AQDA, T.; BEHKAMI, S.; RAOOFI, M.; BAGHERI, H. Graphene oxide-starch-based micro-solid phase extraction of antibiotic residues from milk samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1591, p. 7–14, 2019. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.11.069.

76. LI, Y.; LI, Z.; WANG, W.; ZHONG, S.; CHEN, J.; WANG, A. Miniaturization of self-assembled solid phase extraction based on graphene oxide/chitosan coupled with liquid chromatography for the determination of sulfonamide residues in egg and honey. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1447, p. 17–25, 2016.

77. ZHANG, H.; WU, X.; YUAN, Y.; HAN, D.; QIAO, F.; YAN, H. An ionic liquid functionalized graphene adsorbent with multiple adsorption mechanisms for pipette-tip solid-phase extraction of auxins in soybean sprouts. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 265, p. 290–297, 2018.

78. CHEN, X.; YUAN, Y.; YAN, H.; SHEN, S. Selective, sensitive, and miniaturized analytical method based on molecularly imprinted graphene oxide composites for the determination of naphthalene-derived plant growth regulators in apples. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 349, p. 128982, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128982.

79. QI, M.; TU, C.; LI, Z.; WANG, W.; CHEN, J.; WANG, A. Determination of sulfonamide residues in honey and milk by hplc coupled with novel graphene oxide/polypyrrole foam material-pipette tip solid phase extraction. **Food Analytical Methods**, New York, v. 11, n. 10, p. 2885–2896, 2018.

80. MEDINA, D. A. V.; RODRIGUEZ CABAL, L. F.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, A. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, Oxford, v. 5, p. e00056, 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468067218300907. Acesso em: 10 jan. 2022.

81. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

82. CARMONA, K. S. M. **Colunas capilares extratoras à base de grafeno e derivados ancorados em sílica para a determinação de xantinas e ocratoxina em amostras de café**. Orientador: Fernando Mauro Lanças. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

83. KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MIAO, S; LEEPIPATPIBOON, N. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 43, p. 6692–6703, 2010.

84. FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Comparison of disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction in the quechers method for analysis of pesticides in strawberries. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford. v. 52, n. 10, p. 1339–1345, 2014.

85. OLIVEIRA, I. G. C.; MARCHIONI, C.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of anandamide in cerebrospinal fluid samples by disposable pipette extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1130–1131, p. 121809, 2019.

86. MORÉS, L.; DA SILVA, A. C.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. A natural and renewable biosorbent phase as a low-cost approach in disposable pipette extraction technique for the determination of emerging contaminants in lake water samples. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 42, n. 7, p. 1404–1411, 2019.

87. OENNING, A. L.; MERIB, J.; CARASEK, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1092, p. 459–465, 2018.

88. MORELLI, D. C.; MENDES, L. D.; CARASEK, E.; SANTOS MADUREIRA, L. A. Ultrasound-assisted and disposable pipette extraction for the determination of faecal contaminants in sediment samples by GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, p. 1–12, 2020. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03067319.2020.1782393. Acesso em: 12 mar. 2022.

89. SOARES, F. Q.; ALVARENGA, B. F.; RUGGIERO, M. A.; CASANOVA, M. C.; LIMA, E. M.; RABELO, D.; CHAVES, A. R. Disposable pipette extraction phase based on styrene–divinylbenzene/pernigraniline composite, applied for dexamethasone determination in synovial fluid by HPLC with UV detector. **Acta Chromatographica**, Budapest, v. 31, n. 4, p. 250–254, 2019. Disponível em: https://akjournals.com/doi/10.1556/1326.2018.00460. Acesso em: 25 fev. 2022.

90. TAVARES, L.; BERNARDO, R.; DE OLIVEIRA, A.; VAZ, B.; CHAVES, A. Novel method for the extraction of cocaine from oral fluid by means of disposable pipette modified with restricted access material. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 32, n. 12, p. 2235-2244, 2021.

91. VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P. H.; MERIB, J.; CARASEK, E. Estrogens determination through disposable pipette extraction coupled to ultraviolet spectroscopy and nonlinear pseudo-univariate calibration: Solving rank deficiency problems. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 34, n. 12, 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cem.3276. Acesso em: 02 mar. 2022.

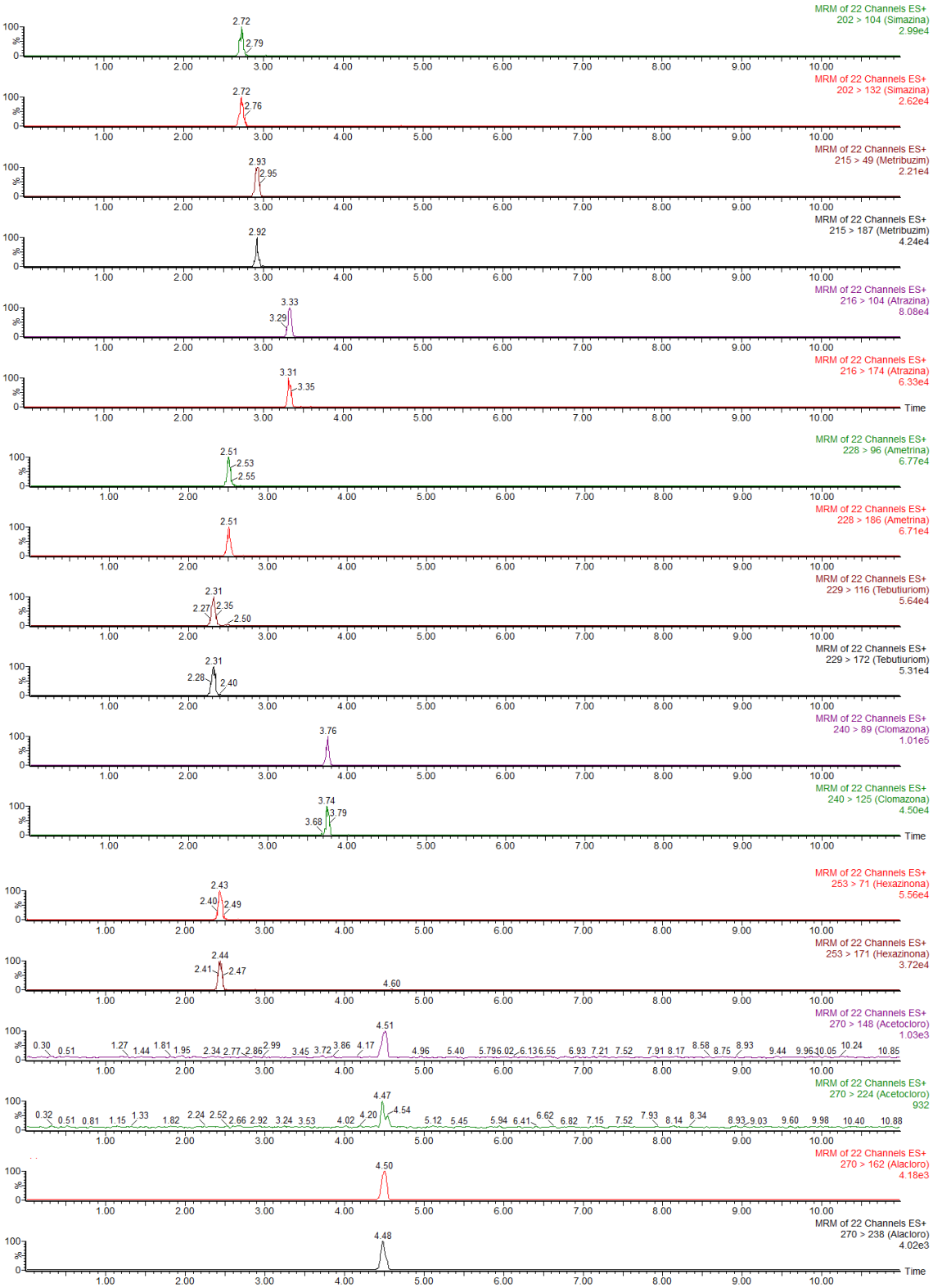
92. MEJÍA-CARMONA, K.; LANÇAS, F. M. Modified graphene-silica as a sorbent for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. determination of xanthines in coffee beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1621, p. 461089, 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461089.

93. VASCONCELOS, E. S. M.; MEJÍA-CARMONA, K.; LANÇAS, F. M. Evaluation of two fully automated setups for mycotoxin analysis based on online extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 12, p. 2756, 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2756. Acesso em: 15 abr. 2022.

94. VASCONCELOS, E. S. M.; FUMES, B. H.; TOFFOLI, A. L. ; LANÇAS, F. M. Graphene particles supported on silica as sorbent for residue analysis of tetracyclines in milk employing microextraction by packed sorbent. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 39, n. 15, p. 2047–2055, 2018. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201800051. Acesso em: 21 abr. 2022.

APÊNDICE

Figura A1 – Cromatogramas das transições monitoradas por LC-MS/MS



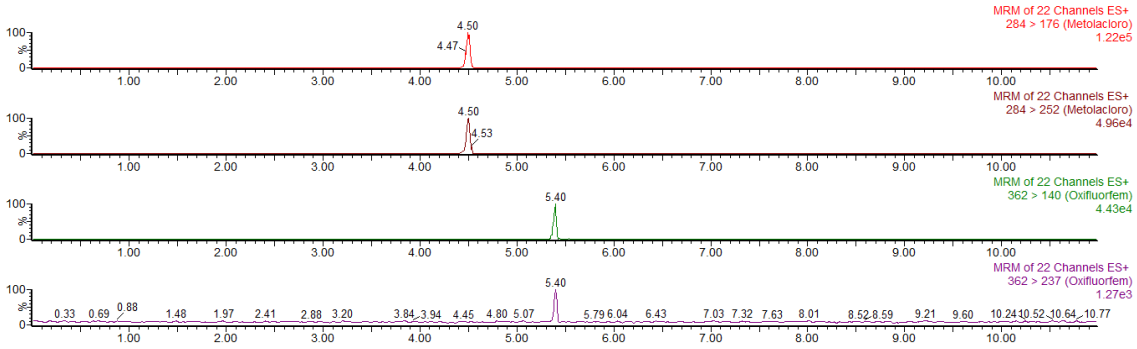
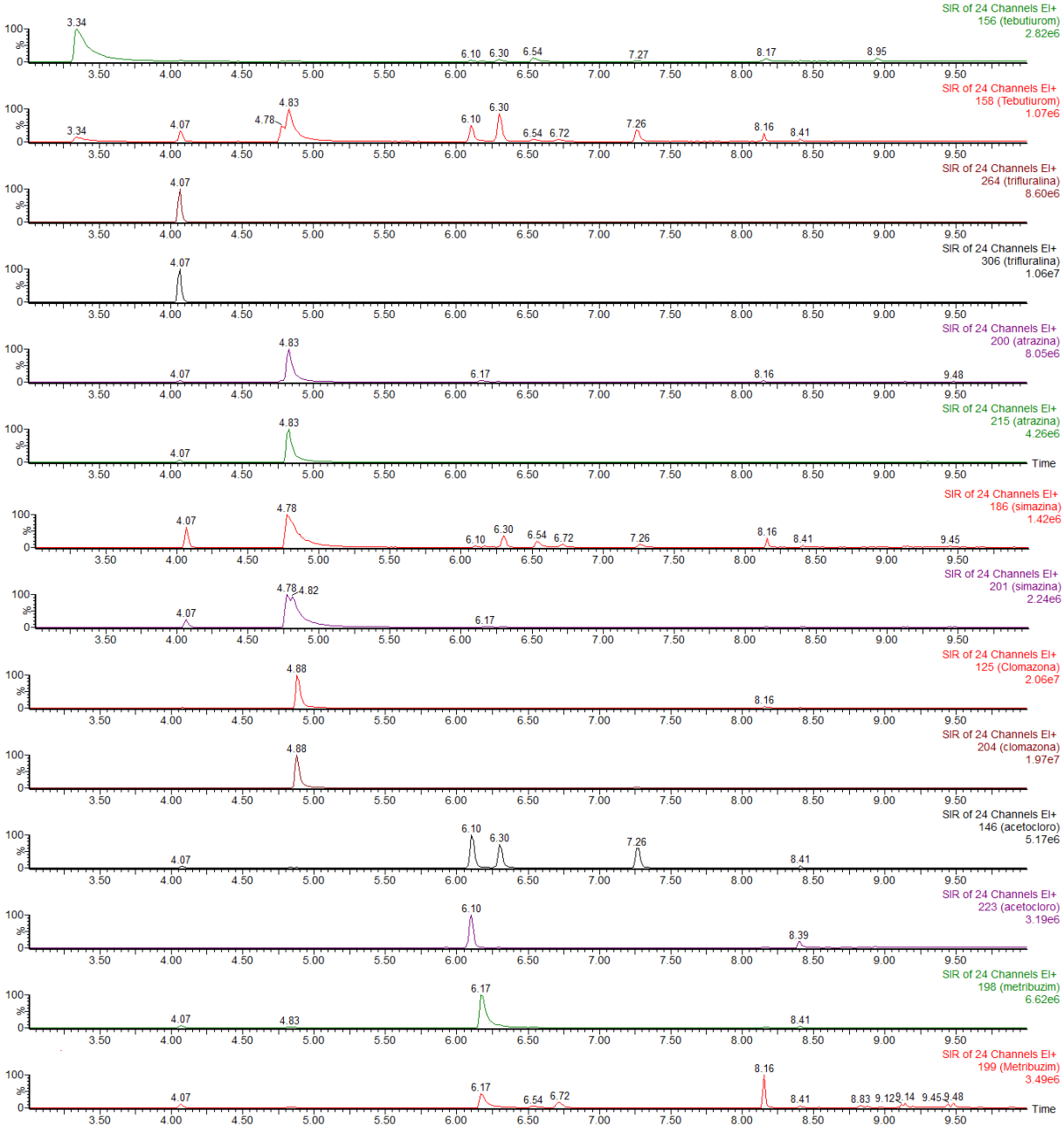

MRM of 22 Channels ES+
284 > 176 (Metolacloro)
1.22e5
4.50
4.47
MRM of 22 Channels ES+
284 > 252 (Metolacloro)
4.96e4
4.50
4.53
MRM of 22 Channels ES+
362 > 140 (Oxifluorfem)
4.43e4
5.40
MRM of 22 Channels ES+
362 > 237 (Oxifluorfem)
1.27e3
5.40
0.33 0.69 0.88 1.48 1.97 2.41 2.88 3.20 3.84 3.94 4.45 4.80 5.07 5.79 6.04 6.43 7.03 7.32 7.63 8.01 8.52 8.59 9.21 9.60 10.24 10.52 10.64 10.77
100
%
0
1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00

Figura A2 – Cromatogramas dos íons monitorados por GC-MS



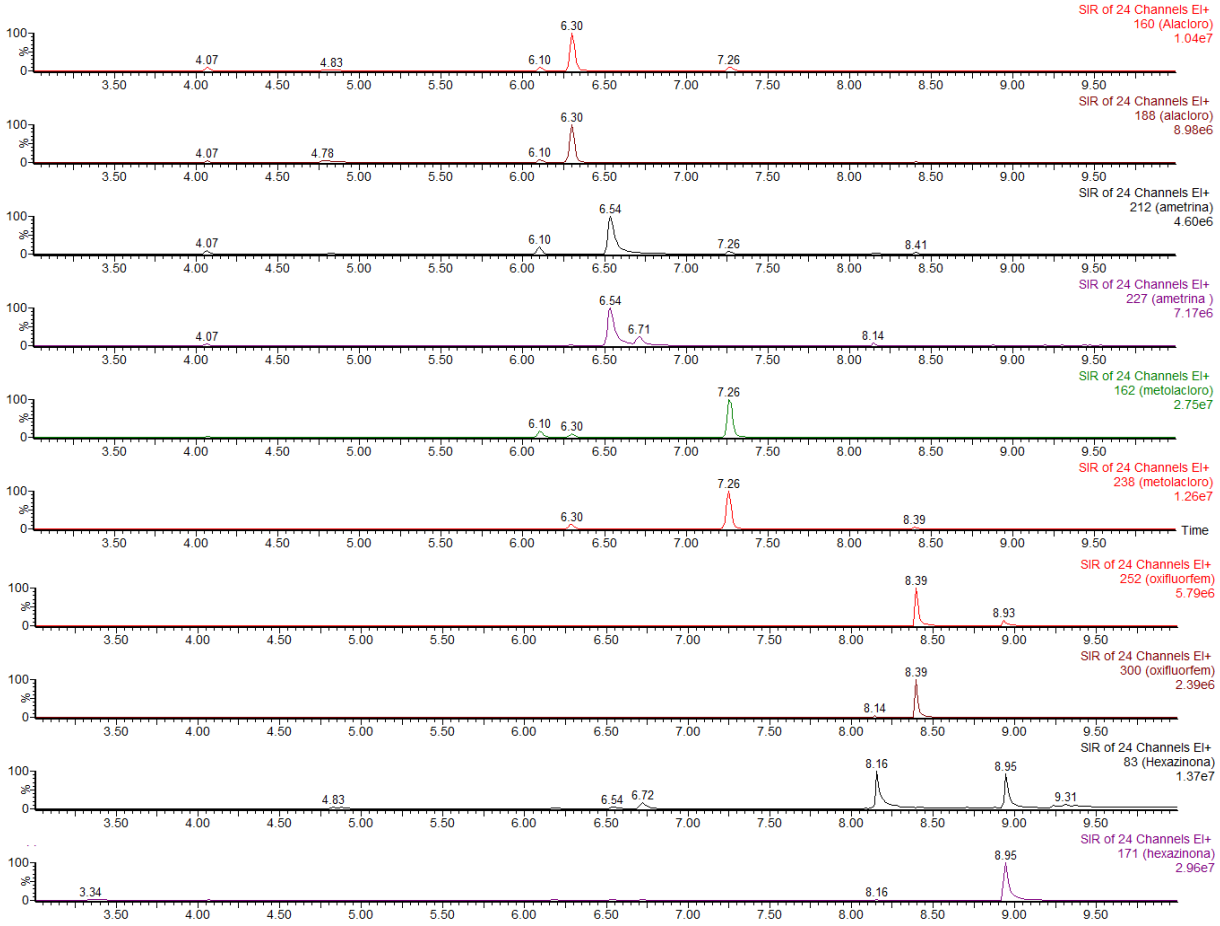
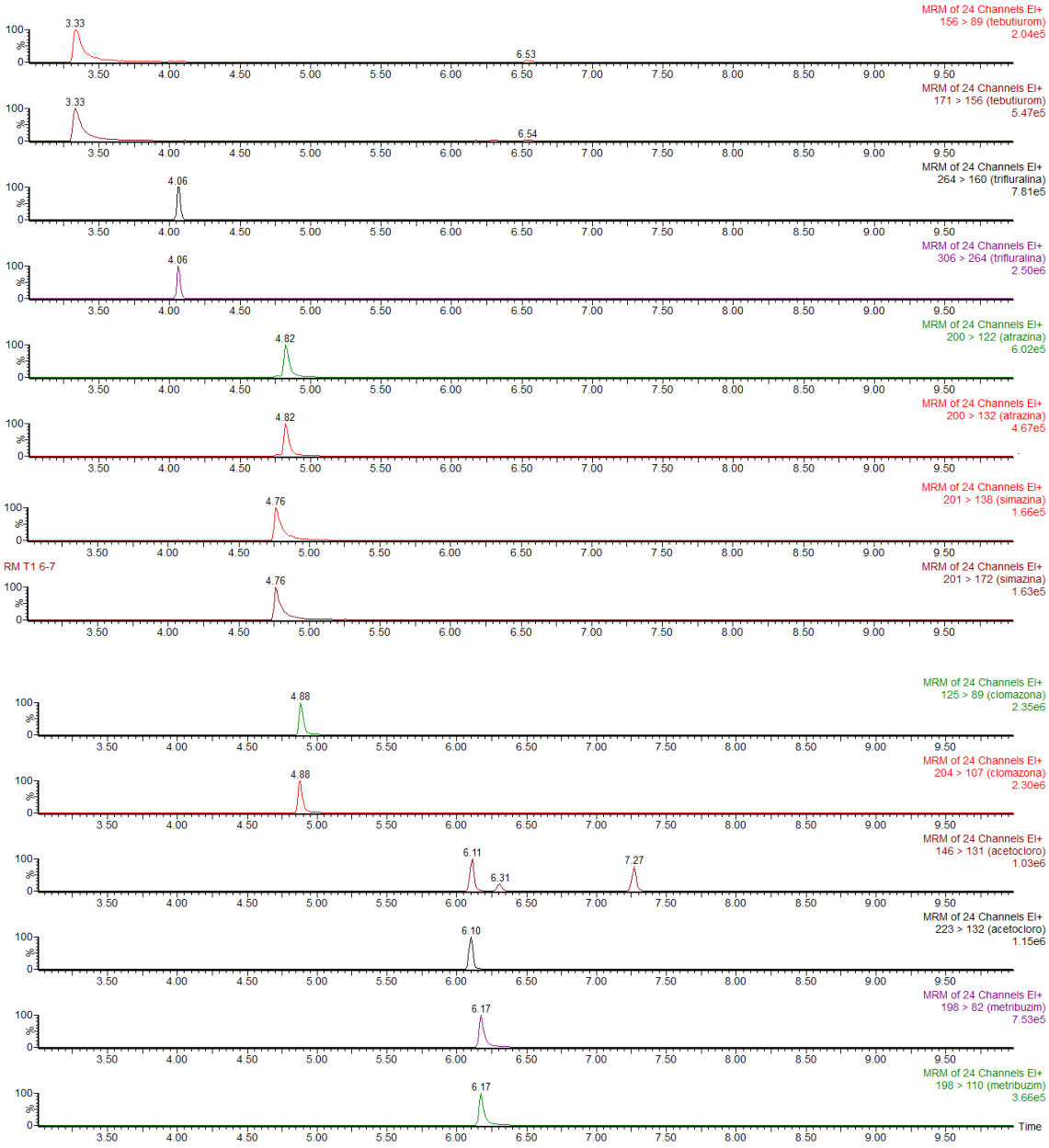

SIR of 24 Channels EI+
160 (Alacloro)
1.04e7
SIR of 24 Channels EI+
188 (alacloro)
8.98e6
SIR of 24 Channels EI+
212 (ametrina)
4.60e6
SIR of 24 Channels EI+
227 (ametrina)
7.17e6
SIR of 24 Channels EI+
162 (metolacloro)
2.75e7
SIR of 24 Channels EI+
238 (metolacloro)
1.26e7
Time
SIR of 24 Channels EI+
252 (oxifluorfem)
5.79e6
SIR of 24 Channels EI+
300 (oxifluorfem)
2.39e6
SIR of 24 Channels EI+
83 (Hexazinona)
1.37e7
SIR of 24 Channels EI+
171 (hexazinona)
2.96e7

Figura A3 – Cromatogramas das transições monitoradas por GC-MS/MS



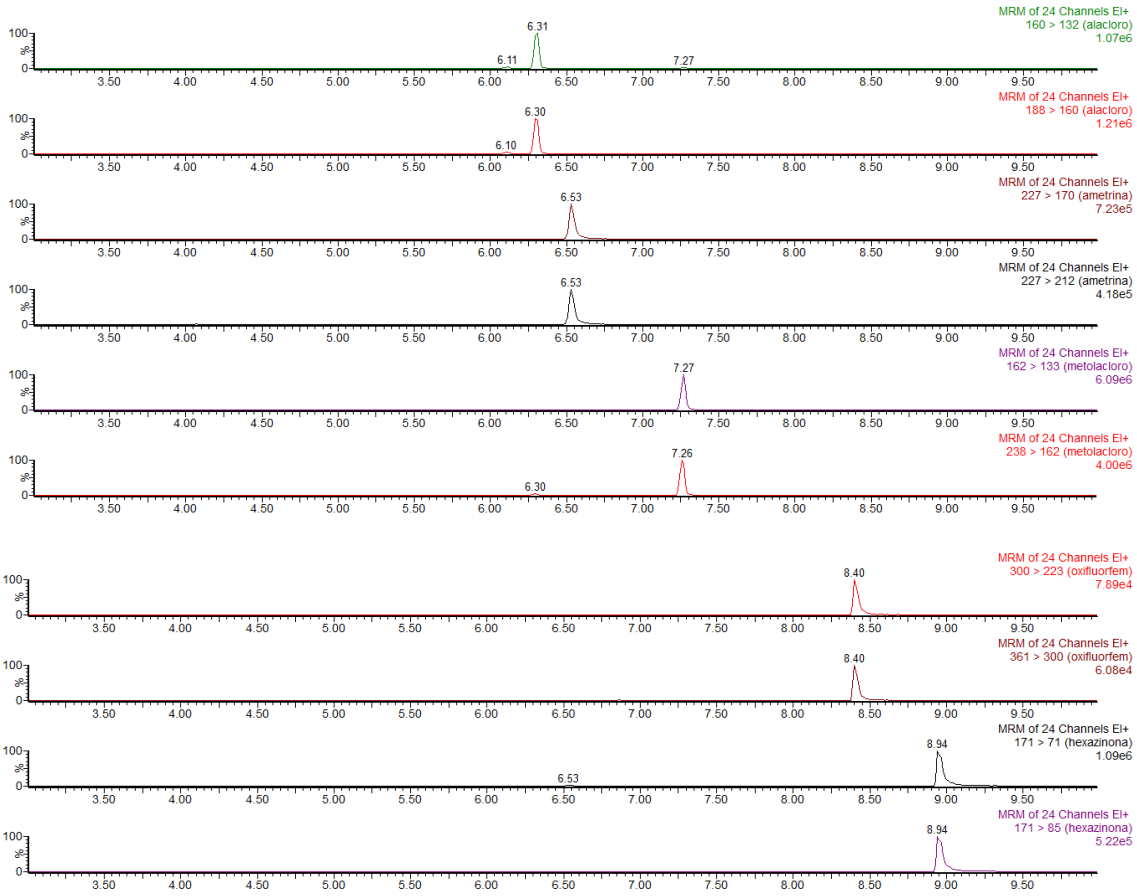

MRM of 24 Channels EI+
160 > 132 (alacloro)
1.07e6
6.31
6.11
7.27
MRM of 24 Channels EI+
188 > 160 (alacloro)
1.21e6
6.30
6.10
MRM of 24 Channels EI+
227 > 170 (ametrina)
7.23e5
6.53
MRM of 24 Channels EI+
227 > 212 (ametrina)
4.18e5
6.53
MRM of 24 Channels EI+
162 > 133 (metolacloro)
6.09e6
7.27
MRM of 24 Channels EI+
238 > 162 (metolacloro)
4.00e6
7.26
6.30
MRM of 24 Channels EI+
300 > 223 (oxifluorfem)
7.89e4
8.40
MRM of 24 Channels EI+
361 > 300 (oxifluorfem)
6.08e4
8.40
MRM of 24 Channels EI+
171 > 71 (hexazinona)
1.09e6
8.94
6.53
MRM of 24 Channels EI+
171 > 85 (hexazinona)
5.22e5
8.94
100
%
0
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50

Figura A4 – Avaliação do solvente de eluição no método DPX-SiGOC18end

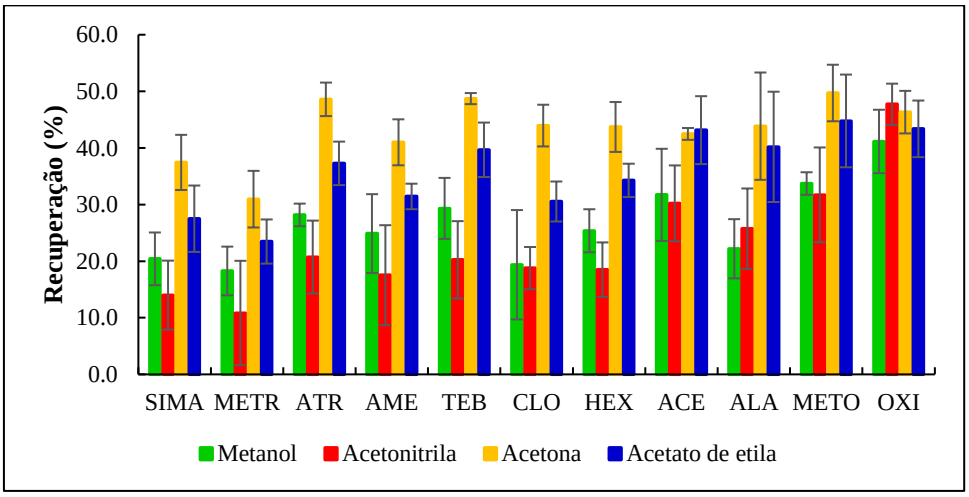


Figura A5 – Avaliação do tempo de equilíbrio (amostra) no método DPX-SiGOC18end

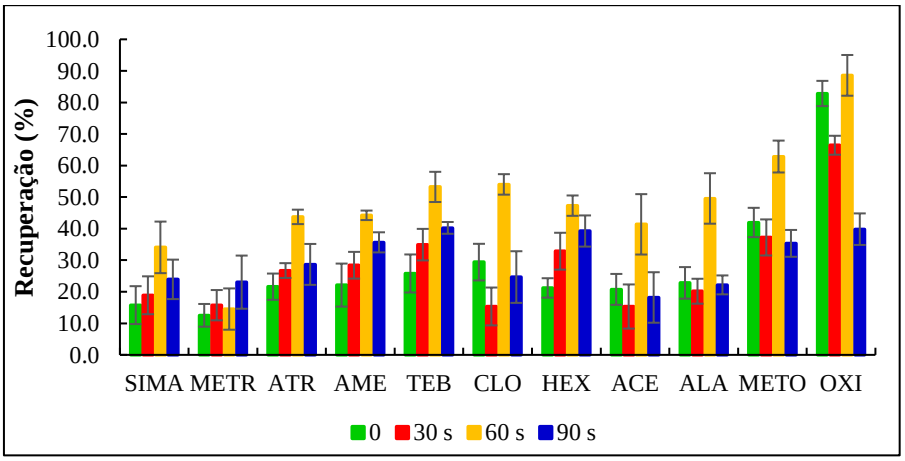


Figura A6 – Avaliação do tempo de equilíbrio (eluição) no método DPX-SiGOC18end

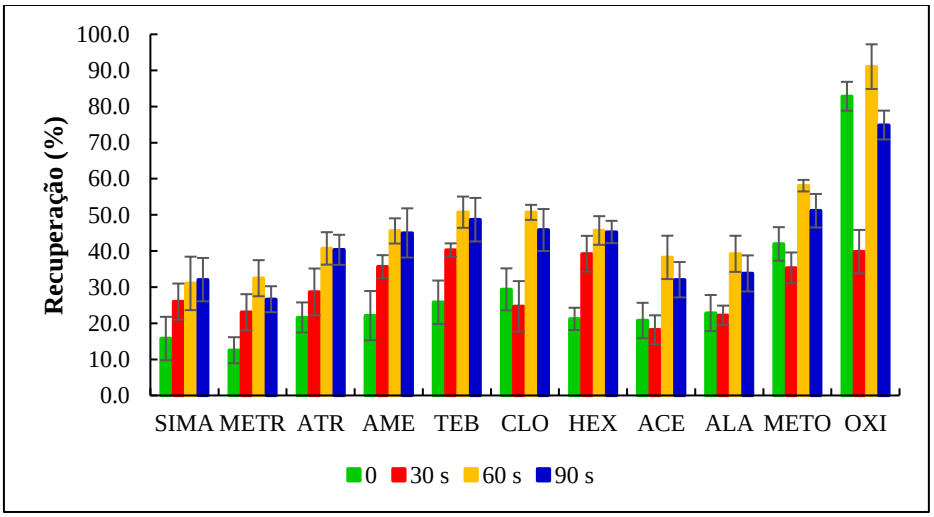


Figura A7 – Avaliação da etapa de lavagem (condicionamento) no método DPX-SiGOC18end

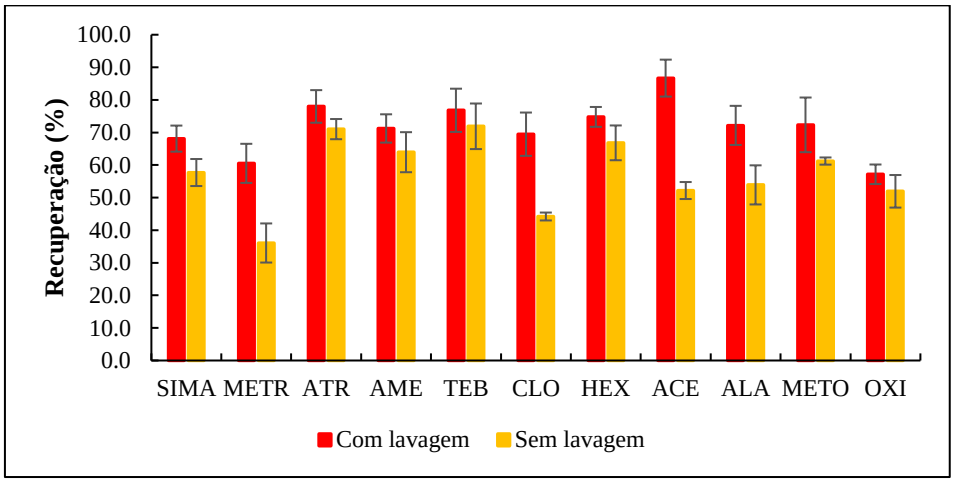
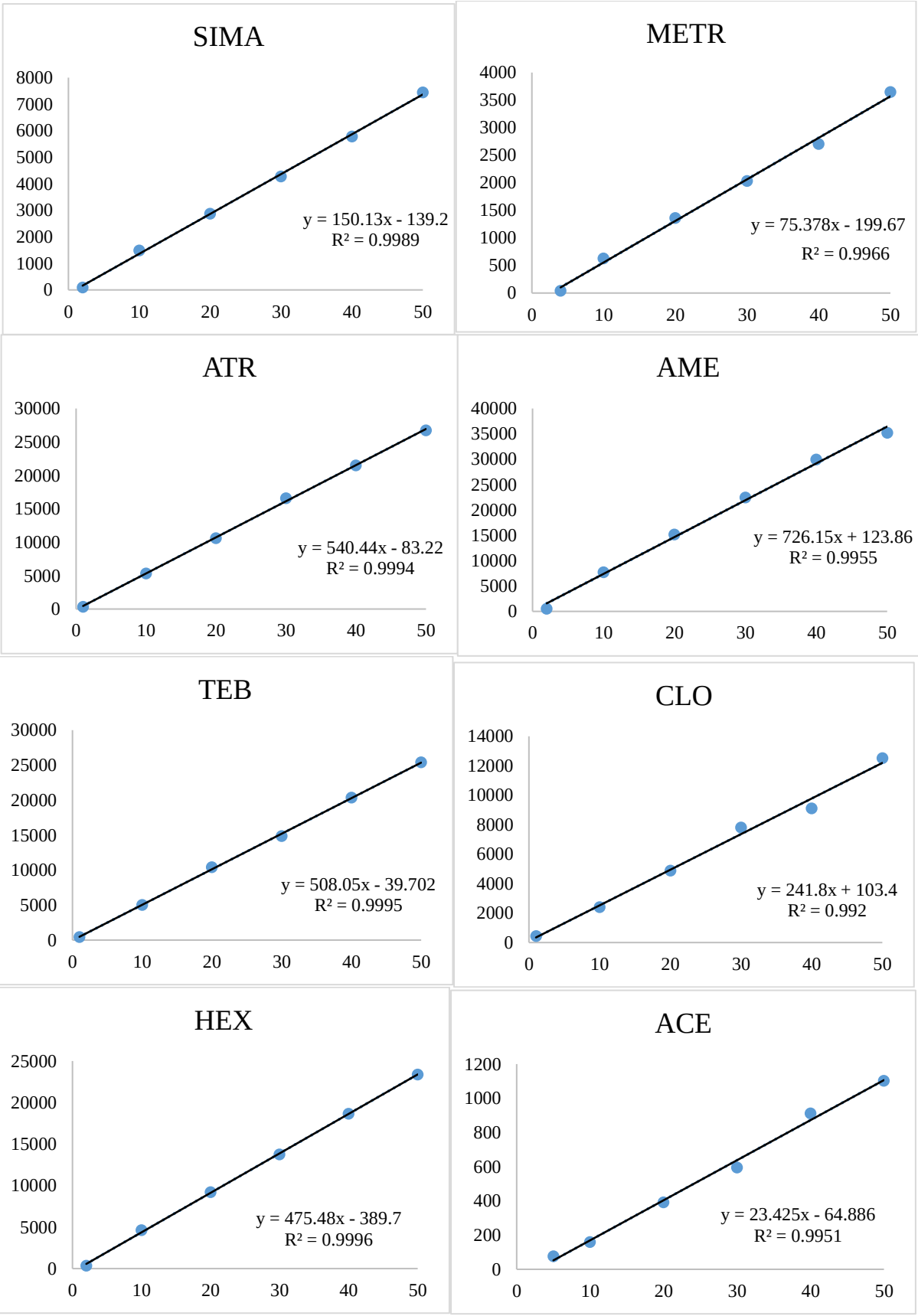
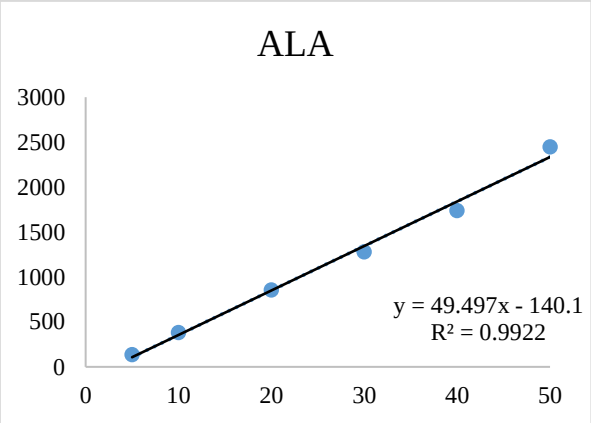
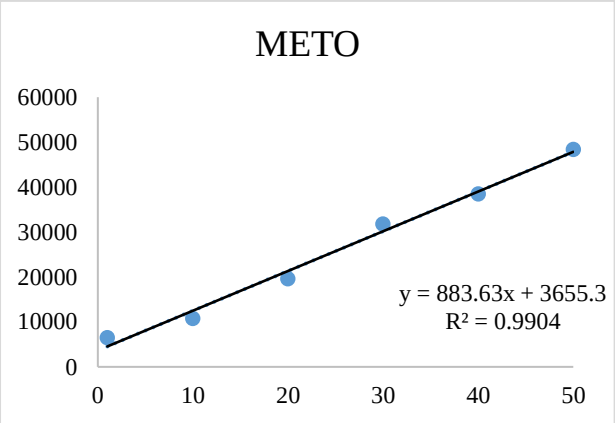


Figura A8 – Curvas analíticas dos herbicidas em garapa (y = área do pico cromatográfico; x = concentrações conhecidas do analito)




ALA
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
y = 49.497x - 140.1
R² = 0.9922


METO
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
10
20
30
40
50
y = 883.63x + 3655.3
R² = 0.9904

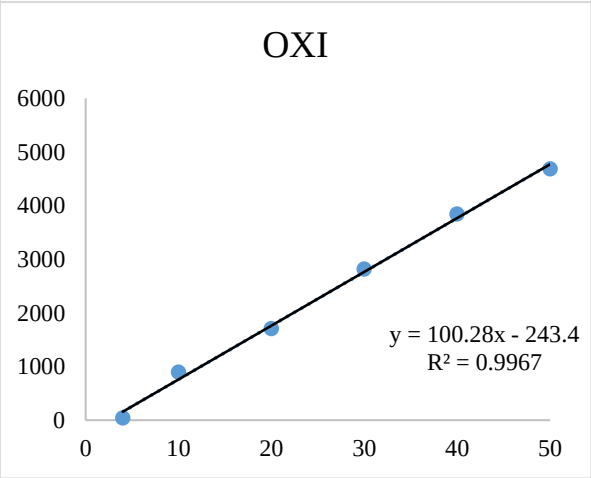
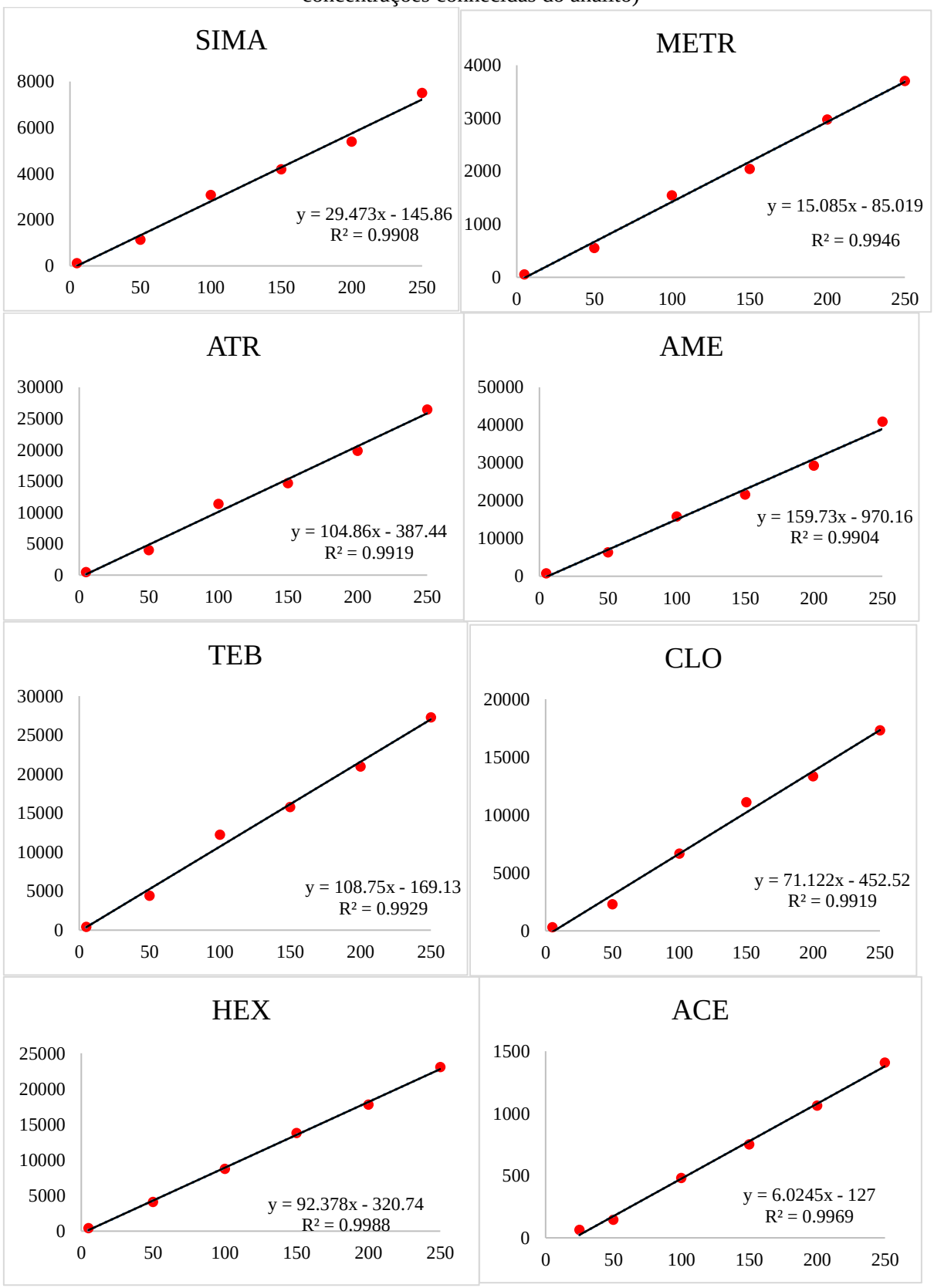
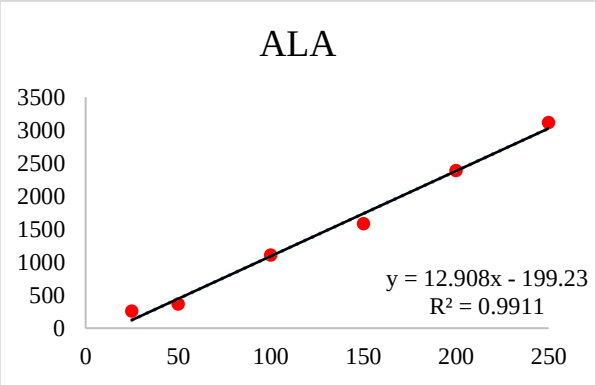
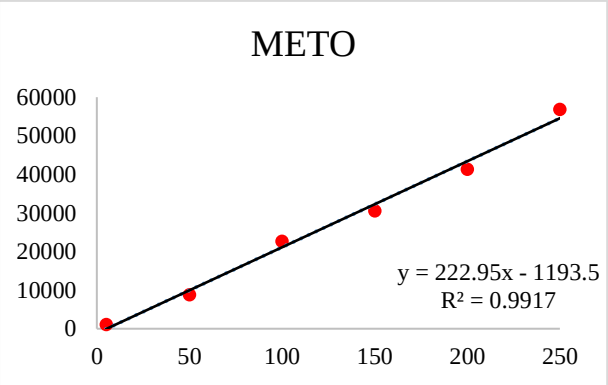

OXI
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
y = 100.28x - 243.4
R² = 0.9967

Figura A9 – Curvas analíticas dos herbicidas em rapadura (y = área do pico cromatográfico; x = concentrações conhecidas do analito)




ALA
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
y = 12.908x - 199.23
R² = 0.9911


METO
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
50
100
150
200
250
y = 222.95x - 1193.5
R² = 0.9917

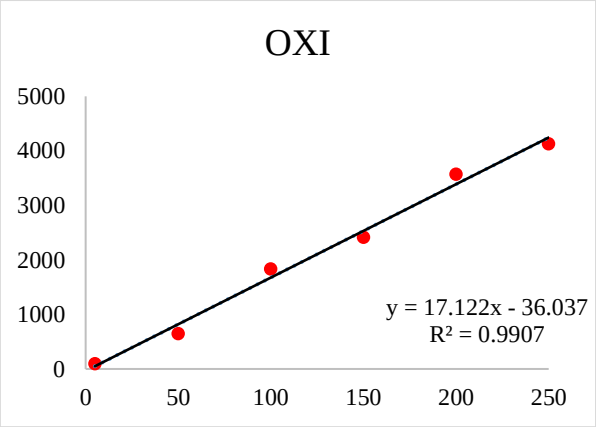
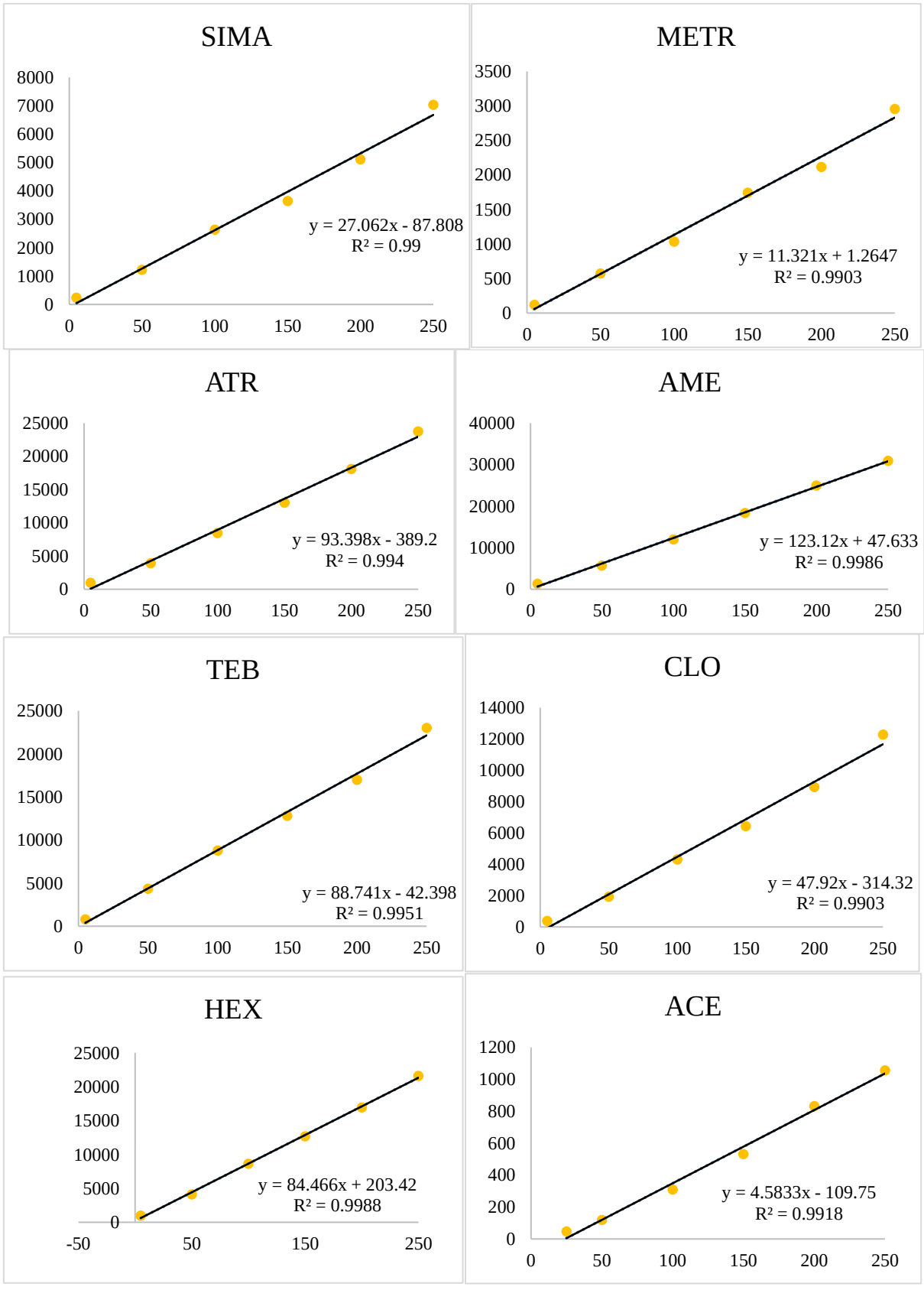
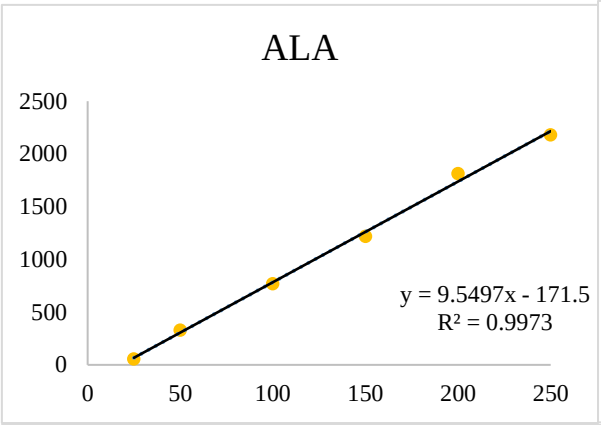
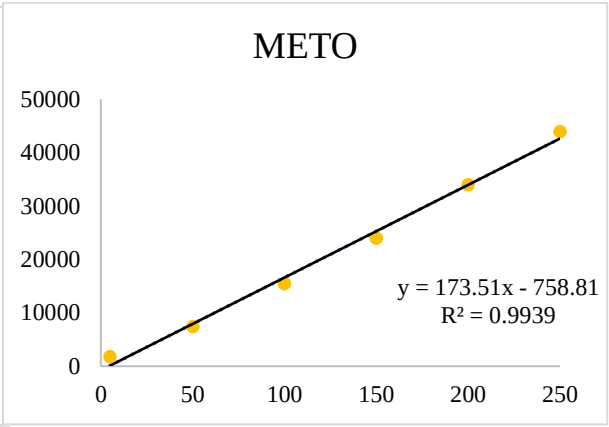

OXI
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
50
100
150
200
250
y = 17.122x - 36.037
R² = 0.9907

Figura A10 – Curvas analíticas dos herbicidas em melado (y = área do pico cromatográfico; x = concentrações conhecidas do analito)




ALA
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
y = 9.5497x - 171.5
R² = 0.9973


METO
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
50
100
150
200
250
y = 173.51x - 758.81
R² = 0.9939

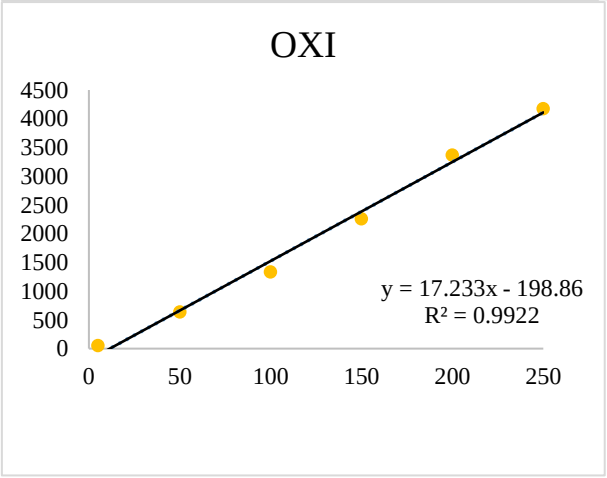
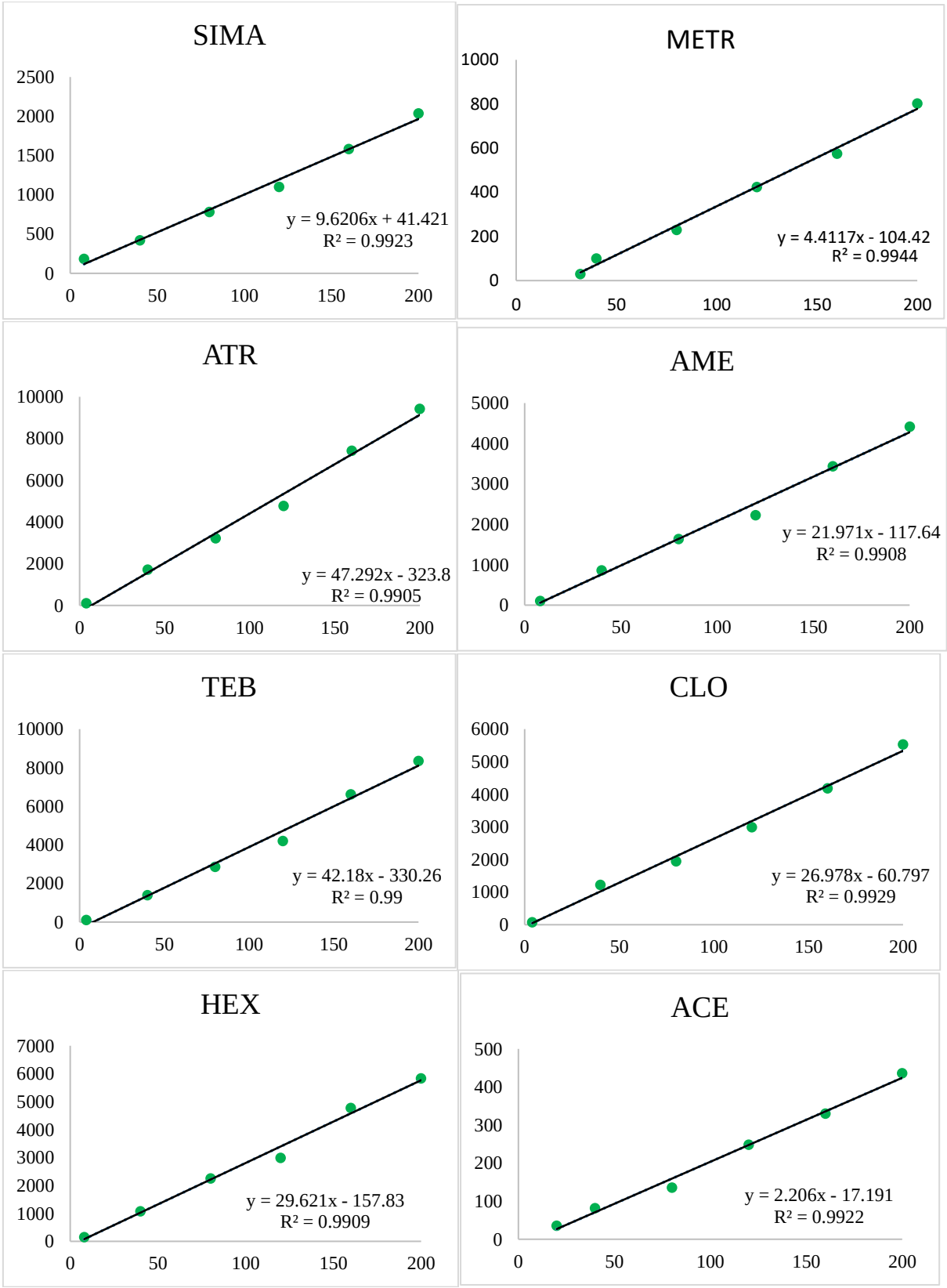
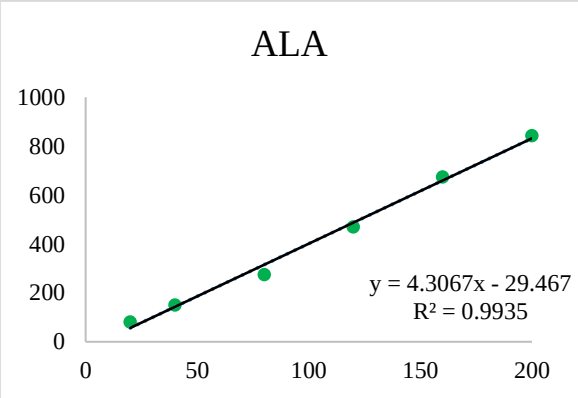
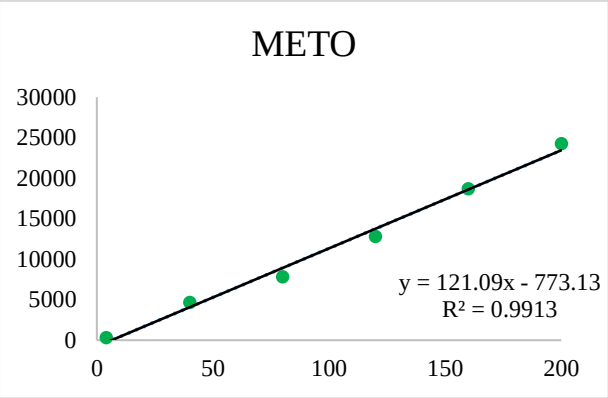

OXI
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
y = 17.233x - 198.86
R² = 0.9922

Figura A11 – Curvas analíticas dos herbicidas em cachaça (y = área do pico cromatográfico; x = concentrações conhecidas do analito)




ALA
1000
800
600
400
200
0
0
50
100
150
200
y = 4.3067x - 29.467
R² = 0.9935


METO
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
200
y = 121.09x - 773.13
R² = 0.9913

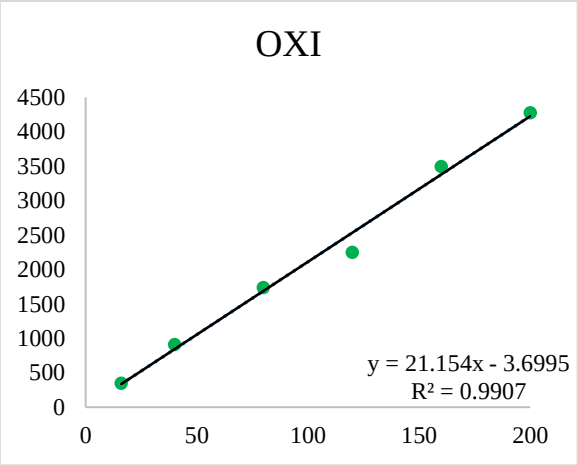

OXI
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
y = 21.154x - 3.6995
R² = 0.9907

Tabela A1 – Recuperações obtidas no método SPE-LC-MS/MS (n = 4)

Analito	Recuperação %
Simazina	30,4
Metribuzim	39,7
Atrazina	62,6
Ametrina	96,0
Tebutiurom	38,9
Clomazona	95,2
Hexazinona	48,2
Acetocloro	105,4
Alacloro	108,6
Metolacloro	93,5
Oxifluorfem	91,9

Tabela A2 – Recuperações e DPRs obtidas entre quatro extrações do método DPX-C18-LC-MS/MS (n=4)

Analito	Recuperação %	DPR
Simazina	59,1	4,7
Metribuzim	57,8	9,5
Atrazina	66,3	9,9
Ametrina	69,4	6,7
Tebutiurom	60,3	8,5
Clomazona	66,1	7,8
Hexazinona	61,8	7,2
Acetocloro	70,0	7,3
Alacloro	72,6	5,0
Metolacloro	76,5	5,4
Oxifluorfem	68,9	8,4

Tabela A3 –Recuperações e DPRs obtidas no método DPX C18-GC-MS/MS (incluindo etapa de secagem) (n = 4)

Analito	Recuperação %	DPR
Simazina	63,2	4,1
Metribuzim	52,2	4,8
Atrazina	70,5	2,3
Ametrina	76,3	6,4
Tebutiurom	64,6	4,1
Clomazona	79,6	3,3
Hexazinona	70,5	6,8
Acetocloro	77,8	2,4
Alacloro	76,5	3,0
Metolacloro	84,4	3,4
Oxifluorfem	100,4	4,5
Trifluralina	102,4	6,0

Tabela A4 – Performance do método DPX-SiGOC18end-LC-MS/MS em água e matrizes derivadas da cana-de-açúcar (n = 4)

	Recuperação (%)				
Analito	**Água**	**Garapa**	**Rapadura**	**Melado**	**Cachaça**
Simazina	62,0	47,8	49,3	48,0	32,4
Metribuzim	33,8	36,6	34,3	28,1	10,4
Atrazina	80,9	81,7	69,8	69,2	68,8
Ametrina	65,3	76,5	76,9	75,7	26,1
Tebutiurom	77,7	67,6	64,6	71,0	38,0
Clomazona	70,3	50,0	54,9	46,6	52,0
Hexazinona	70,9	64,7	56,3	59,6	29,4
Acetocloro	70,3	68,0	77,6	69,0	89,6
Alacloro	81,7	61,7	81,9	66,4	74,4
Metolacloro	90,1	74,1	88,7	72,4	99,7
Oxifluorfem	60,7	40,9	41,4	48,8	66,3

Tabela A5 – Parâmetros da linearidade, LOD e LOQ do método para garapa

Analito	**Faixa linear (ng mL^{-1})**	**Correlação (r^2)**	**Coeficiente angular (a)**	**Coeficiente linear (b)**	**LOD (ng mL^{-1})**	**LOQ (ng mL^{-1})**
Simazina	1-50	0,999	- 139,2	150,13	0,3	1,0
Metribuzim	1-50	0,997	-199,67	75,378	0,3	1,0
Atrazina	1-50	0,999	- 83,22	540,44	0,3	1,0
Ametrina	1-50	0,996	+ 123,86	726,15	0,3	1,0
Tebutiurom	1-50	0,999	- 39,702	508,05	0,3	1,0
Clomazona	1-50	0,992	+ 103,40	241,80	0,3	1,0
Hexazinona	1-50	0,999	- 389,70	475,48	0,3	1,0
Acetocloro	5-50	0,995	- 64,886	23,425	2,0	5,0
Alacloro	5-50	0,992	- 140,10	49,497	2,0	5,0
Metolacloro	1-50	0,990	+ 3655,3	883,63	0,3	1,0
Oxifluorfem	1-50	0,997	- 243,40	100,28	0,3	1,0

Tabela A6 – Parâmetros da linearidade, LOD e LOQ do método para rapadura

Analito	**Faixa linear (µg Kg^{-1})**	**Correlação (r^2)**	**Coeficiente angular (a)**	**Coeficiente linear (b)**	**LOD (µg Kg^{-1})**	**LOQ (µg Kg^{-1})**
Simazina	5-250	0,991	-145,86	29,473	1,5	5,0
Metribuzim	5-250	0,995	-85,019	15,085	1,5	5,0
Atrazina	5-250	0,992	-387,44	104,86	1,5	5,0
Ametrina	5-250	0,990	-970,16	159,73	1,5	5,0
Tebutiurom	5-250	0,993	-169,13	108,75	1,5	5,0
Clomazona	5-250	0,992	-452,52	71,122	1,5	5,0
Hexazinona	5-250	0,999	-320,74	92,378	1,5	5,0
Acetocloro	25-250	0,997	-127,00	6,0245	7,5	25,0
Alacloro	25-250	0,991	-199,23	12,908	7,5	25,0
Metolacloro	5-250	0,992	-1193,5	222,95	1,5	5,0
Oxifluorfem	5-250	0,991	-36,037	17,122	1,5	5,0

Tabela A7 – Parâmetros da linearidade, LOD e LOQ do método para melado

Analito	Faixa linear (µg Kg^{-1})	Correlação (r^2)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	LOD (µg Kg^{-1})	LOQ (µg Kg^{-1})
Simazina	5-250	0,990	-87,808	27,062	1,5	5,0
Metribuzim	5-250	0,990	+1,2647	11,321	1,5	5,0
Atrazina	5-250	0,994	-389,20	93,398	1,5	5,0
Ametrina	5-250	0,999	+47,633	123,12	1,5	5,0
Tebutiurom	5-250	0,995	-42,398	88,741	1,5	5,0
Clomazona	5-250	0,990	-314,32	47,920	1,5	5,0
Hexazinona	5-250	0,999	+203,42	84,466	1,5	5,0
Acetocloro	25-250	0,992	-109,75	4,5833	7,5	25,0
Alacloro	25-250	0,997	-171,50	9,5497	7,5	25,0
Metolacloro	5-250	0,994	-758,81	173,51	1,5	5,0
Oxifluorfem	5-250	0,992	-198,86	17,233	1,5	5,0

Tabela A8 – Parâmetros da linearidade, LOD e LOQ do método para cachaça

Analito	Faixa linear (µg L^{-1})	Correlação (r^2)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})
Simazina	8-200	0,992	+41,421	9,6206	2,4	8,0
Metribuzim	16-200	0,994	-104,42	4,4117	4,8	16,0
Atrazina	4-200	0,991	-323,8	47,292	1,2	4,0
Ametrina	32-200	0,991	-117,64	21,971	9,6	32,0
Tebutiurom	4-200	0,990	-330,26	42,180	1,2	4,0
Clomazona	4-200	0,993	-60,797	26,978	1,2	4,0
Hexazinona	8-200	0,991	-157,83	29,621	2,4	8,0
Acetocloro	20-200	0,992	-17,191	2,2060	6,0	20,0
Alacloro	20-200	0,994	-29,467	4,3067	6,0	20,0
Metolacloro	4-200	0,991	-773,13	121,09	1,2	4,0
Oxifluorfem	16-200	0,991	-3,6995	21,154	4,8	16,0

Tabela A9 – Precisão do método para garapa (n = 4)

Analito	Intra-dia (%DPR)			Inter-dia (%DPR)		
	10 (ng mL^{-1})	30 (ng mL^{-1})	50 (ng mL^{-1})	10 (ng mL^{-1})	30 (ng mL^{-1})	50 (ng mL^{-1})
Simazina	7,1	9,1	10,4	11,9	7,1	7,4
Metribuzim	9,9	5,0	4,7	8,1	4,8	5,0
Atrazina	6,5	6,5	2,2	12,9	4,6	9,6
Ametrina	1,4	1,5	2,5	12,6	1,8	12,1
Tebutiurom	1,7	6,8	6,3	14,2	2,4	9,3
Clomazona	5,5	3,2	4,3	6,6	9,0	2,3
Hexazinona	3,8	2,6	7,2	9,2	3,5	8,8
Acetocloro	2,8	5,8	5,2	9,6	6,8	5,4
Alacloro	8,4	10,7	11,0	6,9	7,4	9,8
Metolacloro	3,1	3,2	3,8	8,2	2,1	5,8
Oxifluorfem	13,7	5,8	1,1	5,6	7,5	11,5

Tabela A10 – Precisão do método para rapadura (n = 4)

Analito	Intra-dia (%DPR)			Inter-dia (%DPR)		
	50 (µg Kg^{-1})	150 (µg Kg^{-1})	250 (µg Kg^{-1})	50 (µg Kg^{-1})	150 (µg Kg^{-1})	250 (µg Kg^{-1})
Simazina	7,5	6,8	5,9	11	8,7	6,8
Metribuzim	11,1	5,3	7,7	10,2	11,1	11,4
Atrazina	6,7	4,3	3,4	5,8	8,4	9,8
Ametrina	6,5	0,9	0,9	14,7	9,3	13,7
Tebutiurom	8,7	2,4	3,1	12,2	6,8	10,5
Clomazona	13,5	3,4	2,3	10,8	8,2	6,5
Hexazinona	5,7	2,6	4,2	8,9	6,5	9,7
Acetocloro	10,4	14,8	7,9	14,7	9,9	5,6
Alacloro	14,8	5,7	11,6	3,4	12,4	4
Metolacloro	3,8	3,2	4,6	4,9	8,0	8,1
Oxifluorfem	11,2	7,8	4,2	6,1	10,5	9,2

Tabela A11 – Precisão do método para melado (n = 4)

Analito	Intra-dia (%DPR)			Inter-dia (%DPR)		
	50 (µg Kg^{-1})	150 (µg Kg^{-1})	250 (µg Kg^{-1})	50 (µg Kg^{-1})	150 (µg Kg^{-1})	250 (µg Kg^{-1})
Simazina	11,6	7,9	1,7	7,4	9,4	3,6
Metribuzim	12,7	7,6	6,1	7,4	10,6	5,1
Atrazina	5,9	6,5	12,1	8,3	6,4	9,9
Ametrina	4,8	3,1	2,9	6,8	9,7	7,1
Tebutiurom	10,1	5,7	9,9	12,5	8,0	12,4
Clomazona	7,0	7,5	11,3	9,9	7,6	8,2
Hexazinona	8,2	8,8	7,5	10,2	9,2	7,2
Acetocloro	14,5	11,3	9,2	2,7	11,5	8,1
Alacloro	14,7	14,8	6,6	14,7	12,0	5,9
Metolacloro	8,3	7,2	5,0	11,5	10,0	3,8
Oxifluorfem	8,8	7,8	6,6	10,1	7,3	6,7

Tabela A12 – Precisão do método para cachaça (n = 4)

Analito	Intra-dia (%DPR)			Inter-dia (%DPR)		
	40 (ng mL^{-1})	120 (ng mL^{-1})	200 (ng mL^{-1})	40 (ng mL^{-1})	120 (ng mL^{-1})	200 (ng mL^{-1})
Simazina	5,9	6,4	3,9	3,1	4,5	10,0
Metribuzim	12,8	12,2	10,7	17,2	11,3	10,2
Atrazina	7,3	5,0	2,5	5,0	11,0	5,7
Ametrina	6,9	8,0	3,2	18,9	11,0	6,1
Tebutiurom	8,0	4,2	3,2	11,4	13,4	13,5
Clomazona	12,5	6,2	4,8	15,7	14,8	8,4
Hexazinona	2,8	2,7	1,6	12,7	13,9	9,1
Acetocloro	11,0	6,3	6,0	14,4	12,2	12,4
Alacloro	10,5	11,0	8,9	11,4	6,9	7,4
Metolacloro	4,0	2,8	3,1	2,3	3,5	5,6
Oxifluorfem	8,6	5,0	6,2	9,8	9,7	11,8

Tabela A13 – Exatidão do método para garapa

Analitos	**10 (ng mL^{-1})**	**30 (ng mL^{-1})**	**50 (ng mL^{-1})**
Simazina	102,1	104,5	106,2
Metribuzim	105,1	104,0	104,9
Atrazina	94,8	105,0	105,1
Ametrina	104,7	104,8	104,9
Tebutiurom	100,6	100,5	104,3
Clomazona	102,5	109,2	104,8
Hexazinona	109,1	103,0	104,5
Acetocloro	92,0	97,8	103,7
Alacloro	110,1	97,8	107,9
Metolacloro	95,0	91,8	104,0
Oxifluorfem	108,3	98,0	104,4

Tabela A14 – Exatidão do método para rapadura

Analitos	**50 (µg Kg^{-1})**	**150 (µg Kg^{-1})**	**250 (µg Kg^{-1})**
Simazina	93,9	108,5	108,3
Metribuzim	101,1	104,0	105,1
Atrazina	90,7	105,8	100,8
Ametrina	97,0	105,2	108,0
Tebutiurom	91,0	105,6	109,1
Clomazona	92,2	90,3	92,5
Hexazinona	98,7	107,7	109,1
Acetocloro	101,8	101,9	105,4
Alacloro	105,1	95,0	102,7
Metolacloro	98,2	103,5	103,9
Oxifluorfem	102,9	104,8	91,6

Tabela A15– Exatidão do método para melado

Analitos	**50 (µg Kg^{-1})**	**150 (µg Kg^{-1})**	**250 (µg Kg^{-1})**
Simazina	96,7	92,1	105,2
Metribuzim	101,5	102,7	104,5
Atrazina	96,6	95,6	103,4
Ametrina	96,5	101,4	102,4
Tebutiurom	104,9	90,5	97,1
Clomazona	99,6	99,4	105,1
Hexazinona	102,0	105,8	108,2
Acetocloro	106,8	103,1	95,9
Alacloro	105,4	108,9	98,6
Metolacloro	98,0	106,6	103,0
Oxifluorfem	97,3	95,0	97,1

Tabela A16 – Exatidão do método para cachaça

Analitos	**40 (ng mL^{-1})**	**120 (ng mL^{-1})**	**200 (ng mL^{-1})**
Simazina	93,2	109,1	109,9
Metribuzim	108,9	109,4	97,1
Atrazina	89,8	98,5	98,9
Ametrina	109,7	105,7	108,1
Tebutiurom	93,1	102,9	109,2
Clomazona	105,7	90,8	109,6
Hexazinona	100,5	105,7	100,8
Acetocloro	106,2	108,8	108,7
Alacloro	104,6	92,1	109,5
Metolacloro	107,1	93,5	105,3
Oxifluorfem	100,8	105,2	102,6