

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LARA CRISTINA TEIXEIRA SOARES**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA**  
**QUANTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS**  
**ORGANOFOSFORADOS EM CAFÉ POR GC-MS E ESTUDO**  
**DA DEGRADAÇÃO DURANTE A ETAPA DE TORRA**

**Alfenas/MG**  
**2012**

**LARA CRISTINA TEIXEIRA SOARES**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EM CAFÉ POR GC-MS E ESTUDO  
DA DEGRADAÇÃO DURANTE A ETAPA DE TORRA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química; Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto.

**Alfenas/MG  
2012**

**LARA CRISTINA TEIXEIRA SOARES**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EM CAFÉ POR GC-MS E ESTUDO  
DA DEGRADAÇÃO DURANTE A ETAPA DE TORRA**

A banca examinadora abaixo assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas; Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 24/02/2012

Prof.: Álvaro José dos Santos Neto  
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças  
Instituição: Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

Prof Dr. Eduardo Costa Figueiredo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos conseguidas, não somente no campo acadêmico, mas em toda a minha vida, pela paciência e força que me dá apesar das dificuldades, e por ter me dado a graça de mais uma conquista;

Ao meu orientador, professor Dr. Álvaro José dos Santos Neto, meu agradecimento mais que especial, pelo apoio e compreensão. Sua orientação, ensinamentos e confiança foram de muita valia e me fizeram persistir durante esse tempo. Muito obrigada.

Aos meus pais e familiares pelo carinho, amizade, companheirismo e pelos deliciosos momentos de felicidade; em especial a minha mãe que sempre foi minha melhor amiga, companheira, confidente, apoio e segurança

Às minhas primas queridas: Gabriela, Isabela e Camila, pelo carinho, risadas, conversas varando as madrugadas, enfim, pelos melhores momentos juntas.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da UNIFAL, por permitir o desenvolvimento deste trabalho;

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado;

Aos professores da Pós-graduação em Química, por todo o ensino e dedicação;

A professora Dra. Claudia Torres, pelo auxílio no estágio docente;

Aos colegas de laboratório, docentes, funcionários e técnicos da Unifal que contribuíram de alguma forma durante a realização do projeto;

Aos meus professores do UNIPAM, em especial Dr. Valdir Peres e ao Dr. Antônio Taranto Goulart, que sempre me incentivaram nos caminhos da valorização da pesquisa e da ciência;

As pessoas que marcaram minha vida em Alfenas e que levarei como amigos: Mariane, Adjane, Fábio, Gabriel, aos amigos da Biomed, da República Cativeiro, do LATF e em especial Dayene e Felipe, sempre companheiros, e a Marcela e Daniele que dividiram casa, carinho e amor nos últimos dois anos, vocês são bem mais que amigas, são as irmãs que nunca tive, muito obrigada por me receberem de coração em suas vidas! Muito sucesso para vocês!

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“Para cultivar a sabedoria, é preciso  
força interior.  
Sem crescimento interno, é difícil  
conquistar a autoconfiança e a coragem  
necessárias.  
Sem elas, nossa vida se complica.  
O impossível torna-se possível com a  
força de vontade.”  
(Dalai Lama)*

## RESUMO

O café é um dos principais produtos agrícolas produzidos no Brasil, contribuindo significativamente na economia nacional. Atualmente o Brasil é o maior produtor de café do mundo e segundo maior consumidor, sendo que o maior produtor nacional é o estado de Minas Gerais. Para garantir uma alta produção agrícola os produtores rurais utilizam-se principalmente da aplicação de praguicidas nas lavouras. Dentre esses praguicidas, um dos mais utilizados é o dissulfoton, um inseticida organofosforado, sistêmico e extremamente tóxico. Os praguicidas sofrem naturalmente diversas degradações/transformações quando expostos ao ambiente, podendo gerar desde produtos mais tóxicos que o de origem, até degradados inorgânicos inofensivos. As técnicas mais utilizadas para identificação de praguicidas são as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS). Para estas análises é necessário um prévio preparo de amostras. A preparação pelo método QuEChERS possui muitas vantagens, dentre as quais, pouco gasto de solventes, rapidez na preparação, eficiência e robustez de resultados. Apesar das vantagens, não foram encontrados relatos na literatura da utilização do método para preparação de amostras de café torrado. No presente trabalho foi feito um desenvolvimento e otimização de metodologia de preparo de amostras, baseada no método de QuEChERS e análise por GC-MS para avaliar a contaminação do café com o dissulfoton e derivados (sulfona e sulfóxido), sendo posteriormente introduzidos novos praguicidas nessa análise. Adicionalmente, foram testadas substâncias chamadas “protetores de analitos”, que possuem a capacidade de evitar a degradação dos compostos de interesse no sistema de GC. Foi feita ainda uma validação do método otimizado, seguindo protocolos das agências de controle de resíduos, e, posteriormente, realizou-se a aplicação do método em amostras reais, não sendo detectados resíduos dos praguicidas nestas amostras. Foi estudado ainda a permanência dos contaminantes ao longo da etapa de torra, monitorando o tempo de torra e temperatura final no torrador, sendo verificada a total degradação dos analitos a partir do sexto minuto de torra. Com os resultados obtidos, o método mostrou-se apropriado ao preparo rápido e simples de amostras complexas, precedendo a etapa de GC-MS.

Palavras-chave: Café. Praguicidas - análise. Cromatografia de Gases e Espectrometria de Massas.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most important Brazilian crops, contributing significantly to the national economy. Currently Brazil is the largest coffee producer in the world and second largest consumer, the largest internal producer the state of Minas Gerais. To ensure a high production, farmers apply pesticides on these crops. Among these pesticides, one of the most used is disulfoton, an organophosphate insecticide, systemic and highly toxic. Pesticides undergo natural degradation/ transformation when exposure to the environment; therefore they can generate either products more toxic than the original or can degrade to simple inorganic compound. The most widely used techniques for identification of pesticides are chromatographic techniques coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS). Regarding those techniques, sample preparation is required before analysis. The QuEChERS preparation method has many advantages, for instance, it consumes small amount of solvents, provides quick preparation, is efficiency and has robustness of results. Despite these advantages, there are no published reports regarding the sample preparation of roasted coffee. In this report a sample preparation methodology was developed and optimized, based on the QuEChERS method and analysis by GC-MS, in order to evaluate the contamination of coffee with the pesticide disulfoton and its products (sulfoxide and sulfone), subsequently introducing new pesticides in that analysis. Additionally, we tested substances called "analyte protectants", which have the capacity of preventing degradation of the compounds of interest into the GC system. From the optimized method, it was made a validation, according to protocols from residual control agencies. Real samples were analyzed and no pesticide residues were detected in those samples. The persistence of contaminants was also observed throughout the roasting step, monitoring the roasting time and end temperature, being verified that total degradation of the analytes were achieved after the sixth minute of roasting. With the obtained results the method showed to be adequate to rapid and simple sample preparation of complex samples, before the GC-MS analysis step.

Keywords: Coffee. Pesticides analysis. Gas chromatography and mass spectrometry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcN – Acetonitrila

AOAC INTERNATIONAL – atualmente “*Association of Analytical Communities*”

C18 – Sílica modificada com grupo octadecil

DSPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês Dispersive Solid Phase Extration

EI – Ionização por Elétrons, do inglês Electron Ionization

EPA – Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

HAc – Ácido Acético

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

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry

Kow – coeficiente de partição octanol/água

LC – Cromatografia Líquida, do inglês Liquid Chromatography

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

m/z – razão massa/carga, do inglês mass-to-charge ratio

MS – Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry

PEG – Polietilenoglicol

PI – Padrão Interno

pKa – Função p da constante de ionização de um ácido

PLE – Extração com líquido pressurizado, do inglês Pressurized Liquid Extraction

ppm – Partes por milhão

PSA – Amina Primária e Secundária, do inglês Primary Secondary Amine

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe

rpm – Rotações por minuto

RT – Tempo de Retenção, do inglês, Retention Time

SBSE - Extração por Sorção em Barra de Agitação, do inglês Stir Bar Sorptive Extraction

SFE – Extração com fluido supercrítico, do inglês Supercritical fluid extraction

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Extration

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Microextraction

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Fórmula estrutural do dissulfoton	18
Figura 2-	Rota de degradação do Dissulfoton no solo	20
Figura 3-	Fórmula estrutural da diazinona (padrão interno)	44
Figura 4-	Cromatograma obtido no modo SIM, com o método utilizado, para soluções em extrato da amostra	45
Figura 5-	Espectros de massas obtidos por EI a 70 eV para: (I) dissulfoton; (II) sulfóxido; (III) sulfona e (IV) diazinona. Fonte: MS Search Library, 2010	47
Figura 6-	Comparação dos extratos obtidos utilizando-se como solvente de extração: metanol (I), acetonitrila (II) e acetato de etila (III).	48
Figura 7-	Comparação dos cromatogramas obtidos com a utilização de diferentes sais e tampões. Destaque para a região do cromatograma onde ocorre a eluição do pico do dissulfoton sulfona, o qual é dependente do tipo de sal ou tampão utilizado	49
Figura 8-	Gráfico de Pareto dos efeitos para os fatores estudados para os analitos: (I) dissulfoton sulfóxido; (II) dissulfoton; e (III) dissulfoton sulfona. Nível de confiança a 95%	51
Figura 9-	Superfície de resposta obtida para a combinação dos efeitos quantidades de MgSO <sub>4</sub> e de tampão acetato, mantendo-se constante a quantidade de amostra para os analitos: (I) dissulfoton sulfóxido; (II) dissulfoton; e (III) dissulfoton sulfona. Nível de confiança a 95%	52
Figura 10-	Espectros de massas obtidos por EI a 70 eV para: (I) malationa; (II) pirimifós; (III) clorpirifós.	55
Figura 11-	Comparação dos cromatogramas obtidos com e sem a utilização da cafeína como protetor de analitos	58
Figura 12-	Cromatograma obtido por GC-MS a 70 eV, para o extrato "branco" do café torrado, obtido nas condições cromatográficas descritas, no modo SIM, monitorando somente os íons de quantificação.	64
Figura 13-	Cromatograma de uma solução de praguicidas e protetores de analitos, de análise no modo SIM, utilizando-se apenas os íons utilizados na quantificação, para os analitos: (1) dissulfoton sulfóxido, (2) diazinona, (3) dissulfoton, (4) pirimifós, (5) malationa, (6) clorpirifós e (7) dissulfoton sulfona.	64
Figura 14-	Comparação das respostas obtidas com a solução em solvente contendo os analitos (série de dados 2) e com a extração a partir de uma amostra fortificada (série de dados 1), para verificação da eficiência total do método	70
Figura 15-	Comparação de curvas plotadas a partir de respostas obtidas para: (a) sulfóxido; (b) dissulfoton; (c) malationa; (d) pirimifós; (e) clorpirifós; (f) sulfona. Em amostras de café cru (linha 1) e torrado (linha 2)	72
Figura 16-	Amostras obtidas após o processo de torra. Tempos de torra de (I) 1 minuto; (II) 2 minutos; (III) 3 minutos; (IV) 4 minutos; (V) 6 minutos; (VI) 8 minutos; (VII) 10 minutos e (VIII) 12 minutos.	74
Figura 17-	Gráficos plotados para cada um dos praguicidas organofosforados estudados, a partir de respostas obtidas no teste de degradação ao longo da torra (de 0 a 12 minutos). Neste teste a amostra foi fortificada com todos os praguicidas estudados no nível mais alto da faixa testada.	76

Figura 18-	Gráficos plotadas para o dissulfoton e para seu produto de degradação, sulfóxido, a partir de respostas obtidas no teste de degradação ao longo da torra (de 0 a 12 minutos). Neste teste a amostra foi fortificada somente com o analito dissulfoton no nível mais alto da faixa linear.	77
Fluxograma 1-	Representação do método de QuEChERS original	24
Fluxograma 2-	Método de QuEChERS para a análise de organofosforados em café torrado e moído antes da otimização	32
Fluxograma 3-	Método de QuEChERS otimizado para a análise de organofosforados em café torrado e moído	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Condições para a torrefação de café	17
Tabela 2-	Classificação toxicológica dos praguicidas	18
Tabela 3-	Combinações de sorventes utilizadas	36
Tabela 4-	Variáveis e seus níveis usadas em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner	40
Tabela 5-	Cálculos de efeito de matriz, recuperação e eficiência do método	41
Tabela 6-	Relação de tempos de retenção, fórmulas moleculares e valores teóricos dos coeficientes de partição dos analitos estudados.	45
Tabela 7-	Parâmetros utilizados no método cromatográfico	46
Tabela 8-	Valores de áreas obtidos para diferentes sais e tampões.	49
Tabela 9-	Planejamento fatorial e respostas (áreas dos picos) obtidas para os analitos.	50
Tabela 10-	Valores de recuperação obtidos com diferentes sorventes.	53
Tabela 11-	Valores de recuperação obtidos com diferentes combinações de sorventes.	54
Tabela 12-	Combinações de sorventes utilizadas e recuperações obtidas.	54
Tabela 13-	Valor do coeficiente de partição, massas monitoradas e tempos de retenção obtidos para diferentes analitos.	56
Tabela 14-	Valores de áreas, obtidos utilizando-se diferentes protetores de analitos.	57
Tabela 15-	Valores de áreas, recuperações e desvio padrão obtidos para diferentes combinações dos protetores de analitos.	59
Tabela 16-	Valores de áreas, recuperações e efeito de matriz, obtidos para diferentes concentrações dos protetores de analitos.	61
Tabela 17-	Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os praguicidas no extrato de café torrado obtido pelo método de QuEChERS e detecção por GC-MS	65
Tabela 18-	Valores de LD e LQ, em extrato de matriz	65
Tabela 19-	Valores de coeficientes de variação ( $RSD_a\%$ ) obtidos nos testes de repetitividade.	66
Tabela 20-	Valores de coeficientes de variação ( $RSD_b\%$ ) obtidos nos testes de precisão intermediária	66
Tabela 21-	Percentuais de recuperação obtidos para o método de QuEChERS em café torrado, utilizando detecção por GC-MS	67
Tabela 22-	Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner	68
Tabela 23-	Valores de efeito matriz nas respostas dos praguicidas preparadas em solvente e no extrato da matriz de café torrado	69
Tabela 24-	Condições de torra das amostras contaminadas com todos os analitos	73
Tabela 25-	Condições de torra das amostras contaminadas apenas com dissulfoton	73
Tabela 26-	Perda percentual de analitos durante a etapa de torra	75
Tabela 27-	Perda percentual de dissulfoton e degradação do analito ao seu subproduto ao longo da etapa de torra	75

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
2	<b>REVISÃO TEÓRICA.....</b>	17
2.1	<b>Café.....</b>	17
2.2	<b>Praguicidas.....</b>	17
2.2.1	<i>Degradação de praguicidas.....</i>	19
2.3	<b>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....</b>	20
2.4	<b>Preparação das amostras para análises em sistemas de GC-MS....</b>	21
2.4.1	<i>Métodos tradicionais utilizados para análise residual em alimentos.....</i>	21
2.4.1.1	<i>Método de Mills.....</i>	21
2.4.1.2	<i>Método de Luke.....</i>	21
2.4.1.3	<i>Método Acetato de Etila.....</i>	22
2.4.1.4	<i>Método Mini-Luke.....</i>	22
2.4.2	<i>Novos métodos de análise residual em alimentos.....</i>	23
2.4.2.1	<i>QuEChERS.....</i>	23
2.5	<b>Efeito de Matriz.....</b>	25
2.6	<b>Protetores de analitos.....</b>	27
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	29
4	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	30
4.1	<b>Equipamentos e Reagentes.....</b>	30
4.1.1	<i>Equipamento GC-MS utilizado.....</i>	31
4.2	<b>Testes Preliminares.....</b>	31
4.2.1	<i>Seleção do padrão interno.....</i>	32
4.2.2	<i>Escolha dos íons a serem monitorados.....</i>	33
4.3	<b>Otimização do método para análise de praguicidas em café torrado e moído.....</b>	33
4.3.1	<i>Otimização da etapa de extração.....</i>	33
4.3.1.1	<i>Adição de água à amostra.....</i>	34
4.3.1.2	<i>Solvente de extração.....</i>	34
4.3.1.3	<i>Sal / tampão.....</i>	35
4.3.1.4	<i>Planejamento Fatorial para quantidade de amostra e sais.....</i>	35
4.3.2	<i>Otimização da etapa de limpeza.....</i>	35
4.4	<b>Protetores de analitos.....</b>	36
4.5	<b>Validação do método.....</b>	38
4.5.1	<i>Especificidade/ Seletividade.....</i>	38
4.5.2	<i>Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	38

4.5.3	<i>Faixa linear – Linearidade</i> .....	38
4.5.4	<i>Precisão</i> .....	39
4.5.5	<i>Robustez</i> .....	39
4.5.6	<i>Efeito matriz, eficiência total do método e exatidão</i> .....	40
4.6	<i>Aplicação em amostras de café torrado</i> .....	41
4.7	<i>Estudo da degradação dos praguicidas durante a etapa de torra</i> ...	41
4.7.1	<i>Preparo da solução</i> .....	42
4.7.2	<i>Torra do café</i> .....	42
4.7.3	<i>Classificação da torra</i> .....	43
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1	<b>Testes Preliminares</b> .....	44
5.1.1	<i>Seleção do Padrão Interno</i> .....	44
5.1.2	<i>Condições de separação dos analitos</i> .....	44
5.1.3	<i>Escolha dos íons a serem monitorados</i> .....	46
5.2	<b>Otimização da etapa de extração</b> .....	48
5.2.1	<i>Adição de água a amostra</i> .....	48
5.2.2	<i>Solvente de extração</i> .....	48
5.2.3	<i>Escolha do sal / tampão</i> .....	49
5.2.4	<i>Planejamento Fatorial para quantidade de amostra e sais</i> .....	49
5.3	<b>Otimização da etapa de limpeza</b> .....	53
5.4	<b>Protetores de analitos</b> .....	54
5.4.1	<i>Teste da adição de protetores de analitos</i> .....	56
5.4.2	<i>Teste da combinação de protetores</i> .....	58
5.4.3	<i>Teste da concentração dos protetores de analitos</i> .....	60
5.5	<b>Validação do método de QuEChERS</b> .....	63
5.5.1	<i>Seletividade / Especificidade</i> .....	63
5.5.2	<i>Curva analítica</i> .....	64
5.5.3	<i>Determinação dos valores de LD e LQ</i> .....	65
5.5.4	<i>Ensaio para avaliação precisão (repetitividade e precisão intermediária)</i> .....	66
5.5.5	<i>Ensaio de Recuperação</i> .....	67
5.5.6	<i>Teste de Robustez (Youden)</i> .....	67
5.5.7	<i>Efeito de matriz</i> .....	68
5.5.8	<i>Eficiência total do método</i> .....	69
5.6	<b>Aplicação do método a amostras comerciais de café torrado</b> .....	71
5.7	<b>Estudo da degradação dos praguicidas durante a etapa de torra</b>	71

5.7.1	<i>Comparação das respostas do método para matrizes de café cru e torrado.....</i>	71
5.7.2	<i>Grau de torra dos grãos.....</i>	73
5.7.3	<i>Degradação de organofosforados.....</i>	74
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	79
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	81

## 1 INTRODUÇÃO

O café tem lugar de destaque na economia e história nacional, sendo um dos principais produtos de exportação. No Brasil, as regiões que mais se destacam na produção de café são a do Cerrado e a do Sul de Minas Gerais.

Por causa do ataque de pragas às plantações, muitos produtos químicos são utilizados na cultura do café. Esses produtos, entretanto, podem causar muitos prejuízos ambientais, além de certos efeitos adversos à saúde humana, tais como danos ao sistema nervoso central e periférico, ação imunodepressora e câncer (CALDAS e SOUZA, 2000).

Praguicidas organofosforados (OP) são aqueles que apresentam as funções reativas P=O ou P=S em suas estruturas, essa classe de praguicidas possui ainda baixa persistência ambiental, isto é, eles são rapidamente e facilmente degradados no meio ambiente, sob condições normais (MOL et al., 2003). Os praguicidas, tradicionalmente, devem ser degradados em outras formas inofensivas, porém, nem sempre isso acontece. Além disso, eles e seus produtos apresentam mobilidade através do vento, lixiviação, escoamento, dentre outros (RAMOS et al., 2010).

Por causa das reações de degradação do praguicida no ambiente e ação de agentes naturais de clima e tempo, o nível de praguicidas no solo e plantas torna-se muito baixo, sendo necessário, portanto, escolher técnicas que possuam limites de detecção apropriados. Dentre as técnicas mais utilizadas destaca-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Essa técnica necessita de uma prévia preparação de amostras, utilizando métodos que apresentem boa recuperação, sensibilidade e precisão, baixo custo, rapidez, robustez e segurança. Dentre os métodos mais utilizados atualmente para amostras sólidas de alimentos, destaca-se o método de QuEChERS (sigla para rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro; do inglês Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), que possui quase todas as características desejáveis a um método de extração. O método baseia-se em uma extração com solventes de média ou alta polaridade, seguida de uma etapa de “*salting-out*”, isto é, adição de sais para promover a extração de analitos mais polares, e por fim uma limpeza com extração em fase sólida dispersiva (dSPE).

Muitos estudos já realizados utilizaram o método de QuEChERS para extração de praguicidas, em diferentes matrizes, como por exemplo: uva (BANERJEE et al., 2007); uva, romã e manga (BANERJEE et al., 2010); maçã, ervilha e limão (LEHOTAY et al., 2010);

sucos de vegetais (NGUYEN et al., 2009); solos (RAMOS et al., 2010); soja (PIZZUTTI et al., 2009); e sucos de frutas (ROMERO-GONZÁLEZ, et al., 2008).

A quantificação de alguns praguicidas em análises por GC-MS é afetada por um fenômeno conhecido por efeito de matriz. Geralmente, quando injetadas apenas soluções de padrões em solventes são obtidos como respostas picos cromatográficos pequenos, os quais se apresentam maiores na presença de matriz. A explicação mais aceita é a de que os componentes da matriz “preenchem” os sítios ativos da coluna de GC levando a menor interação do analito na coluna e, conseqüentemente, menos perdas e melhor forma dos picos (MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Em virtude do grande emprego do dissulfoton em lavouras de café, faz-se interessante um estudo do praguicida, bem como dos eventuais produtos gerados a partir da sua degradação, tanto no fruto quanto nos produtos obtidos a partir do seu processamento. O presente estudo objetivou a otimização das condições de um método QuEChERS e análise por GC-MS, para quantificação de dissulfoton e alguns de seus produtos em café torrado, estudando-se ainda o efeito de diferentes substâncias que funcionam como protetores de analitos.

Foi realizado um levantamento bibliográfico e verificou-se uma escassez de estudos de desenvolvimento de metodologias para identificação e quantificação de praguicidas em grãos de café; sendo que dentre os trabalhos encontrados dois deles apresentaram um grande consumo de materiais, especialmente solventes orgânicos (OLIVEIRA et. al, 2002; CETINKAYA et. al, 1984) e outro, feito baseado no método de QuEChERS (Chung e Chan, 2010) porém no mesmo não há claras explicações quando o tipo de amostra utilizada, isto é, o grau de processamento do fruto que estava sendo estudado, o que justifica um trabalho a respeito do assunto.

## 2 REVISÃO TEÓRICA

### 2.1 Café

Uma das lendas mais difundidas é a de que o fruto foi descoberto na Etiópia. A partir do século XVII o café começou a ser saboreado no Continente Europeu, trazido por viajantes. A partir de então, o cultivo de café foi levado para outras colônias europeias, foi por meio das Guianas que chegou ao norte do Brasil (ABIC, 2009).

No Brasil, o café difundiu-se inicialmente pelo Vale do Paraíba (Rio de Janeiro e São Paulo), Sul de Minas e Espírito Santo. A participação do estado de Minas Gerais na produção cafeeira é muito significativa, sendo que, no estado, as regiões do Cerrado e do Sul de Minas vem se destacando por produzirem cafés de melhor qualidade, que têm sido cada vez mais procurados (NASCIMENTO, 2006).

Dependendo do mercado consumidor, varia-se o grau de torrefação, produzindo-se cafés de colorações mais claras, apreciados nos Estados Unidos, até colorações mais intensas, apreciados na Europa. No Brasil, as torras média e moderadamente escura são mais utilizadas (TOCI et al., 2006). Na Tabela 1 são mostradas as condições de torrefação do café para cada nível de torra.

TABELA 1 Condições para a torrefação de café

Torra	Temperatura final (°C)	Tempo	Cor dos grãos
Moderadamente Clara	200 ( $\pm$ 20)	5 min	Marrom claro
Média	200 ( $\pm$ 20)	8 min	Marrom escuro
Moderadamente escura	200 ( $\pm$ 20)	10 min	Preto

Fonte: ATELIÊ, 2009

### 2.2 Praguicidas

Há mais de dois mil anos os agricultores têm utilizado substâncias que previnem os danos causados por pragas. A qualidade e volume de produtos obtidos nas culturas agrícolas podem ser afetados quando não se previne adequadamente o ataque de pragas, tais como insetos, fungos ou plantas daninhas.

Segundo a *US Environmental Protection Agency* (EPA, 2009), um praguicida é qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou

mitigar qualquer praga. Embora muitas vezes mal interpretado para se referir apenas aos inseticidas, o termo também se aplica aos herbicidas, fungicidas, e várias outras substâncias utilizadas no controle de pragas. O termo praguicida abrange ainda qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a ser utilizada como regulador vegetal, desfolhante ou dessecante.

A utilização de praguicidas no meio rural tem trazido graves consequências ao ambiente e à saúde do trabalhador, devido à alta toxicidade dos produtos empregados, combinada com a falta de equipamentos de segurança e baixo nível socioeconômico e cultural da maioria dos trabalhadores rurais (SILVA et al., 2001).

Por determinação, os praguicidas devem apresentar nos rótulos uma faixa com a cor indicativa de sua classe toxicológica como mostrado na Tabela 2. Essa classificação também está relacionada à ação do grupo químico (COGO, 2008).

TABELA 2 Classificação toxicológica dos praguicidas

Classe I	Rótulo Vermelho	Extremamente tóxico	*DL <sub>50</sub> = 0-50 mg kg <sup>-1</sup>
Classe II	Rótulo Amarelo	Altamente tóxico	*DL <sub>50</sub> = 50-500 mg kg <sup>-1</sup>
Classe III	Rótulo Azul	Medianamente tóxico	*DL <sub>50</sub> = 500-5000 mg kg <sup>-1</sup>
Classe IV	Rótulo Verde	Pouco tóxico	*DL <sub>50</sub> > 5000 mg kg <sup>-1</sup>

\*DL<sub>50</sub> : quantidade de uma substância que é necessário ingerir ou administrar para provocar a morte de 50% da população em estudo.

Fonte: COGO, 2008.

Dentre os principais praguicidas utilizados na cafeicultura destaca-se o dissulfoton, um inseticida organofosforado, sistêmico e extremamente tóxico – classe I de toxicidade, introduzido pela Bayer em 1956 (CHAPMAN et al., 1994). Sua estrutura é mostrada na Figura 1.

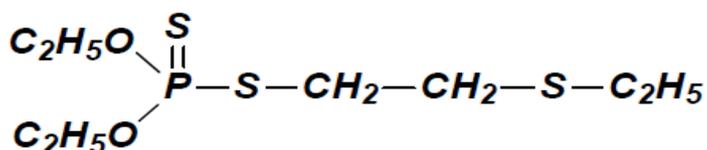


Figura 1 Fórmula estrutural do dissulfoton  
 FONTE: FARIA, 2003.

O dissulfoton possui fórmula molecular C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>PS<sub>3</sub>, nomenclatura oficial (segundo a IUPAC) 0,0-dietil-S[2-(etiltio)etil]fosforoditioato, massa molecular de 274,41 g/mol. Apresenta-se como um óleo incolor, odor característico de enxofre, ponto de fusão > -25 °C,

ponto de ebulição de 128 °C, densidade 1,14 g/cm<sup>3</sup>, solubilidade em água de 15 mg/L a 20 °C, e solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Em formulações é normalmente encontrado como um óleo amarelado (PESTICIDES DOCUMENTS, 1988).

Os compostos organofosforados, assim como os carbamatos, apresentam mecanismo comum de ação pela inibição da acetilcolinesterase, sendo os principais responsáveis pelas contaminações no meio rural. Entretanto possuem a vantagem de serem menos persistentes no solo e não apresentar atividades bioacumulativas, em comparação aos organoclorados (SILVA et al., 2001).

A alta toxicidade dos organofosforados é devida à formação de complexos com a acetilcolinesterase, causando um acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas. O acúmulo de acetilcolina pode induzir diversos sinais clínicos no sistema nervoso central, os quais podem resultar em inquietação, ataxia, convulsão, depressão e coma. Os sinais clínicos de ação tardia são caracterizados por dificuldade locomotora. A morte pode ocorrer por insuficiência cardíaca e respiratória. (GRECCO et al., 2009).

### ***2.2.1 Degradação de praguicidas***

Os praguicidas podem sofrer degradação, gerando subprodutos. O termo degradação tem sido utilizado para a descrição de transformações de todo o tipo, desde aquelas que produzem produtos mais tóxicos que o composto inicial, incluindo até mesmo a inativação, assim como a completa mineralização do produto até CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, etc (FARIA, 2003). Resíduos de praguicidas podem persistir no ambiente por vários dias, podendo ocorrer degradação biótica ou abiótica, com a formação de diversos produtos, que podem ser inclusive mais tóxicos que o composto original (LACORTE e BARCELÓ, 1995).

O inseticida dissulfoton é um tiofosforado classificado como pouco persistente e com pequeno efeito residual, porém seus subprodutos podem permanecer no ambiente por longos períodos. Segundo estudo de Ibrahim, et al., 1969, citado por FARIA, 2003, o dissulfoton passa pelas degradações representadas na Figura 2:

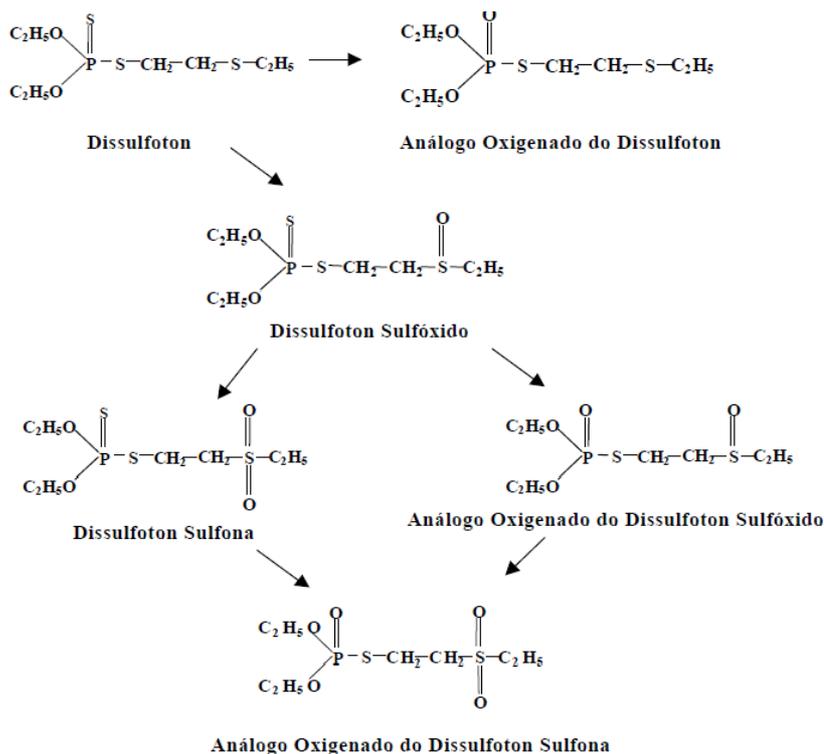


Figura 2 Rota de degradação do Dissulfoton no solo

Fonte: IBRAHIM, 1969 *apud* FARIA, 2003.

### 2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Cromatografia gasosa é a principal técnica analítica utilizada para a separação de compostos voláteis. Ela combina rapidez de análise, resolução, facilidade de operação, excelência em resultados quantitativos e custo moderado. Infelizmente, sistemas de GC não podem confirmar a identidade ou estrutura de acordo com o pico. Tempos de retenção são relacionados aos coeficientes de partição e pontos de ebulição, os quais não são únicos, portanto, geralmente os dados de GC não devem ser usados, sozinhos, para identificação de um composto (McMASTER, 2008).

Em GC, para conseguir a forma ideal dos picos e maximizar a resolução deve-se empregar o mínimo volume de amostra. Diversos detectores podem ser utilizados, sendo que as principais características desejáveis a um detector são: sensibilidade elevada, baixo nível de ruído, boa resposta (universal ou seletiva), ampla faixa de linearidade, e baixos limites de detecção e quantificação. Além disso: baixo custo, simplicidade, fácil disponibilidade e durabilidade elevada são desejadas (LANÇAS, 1993).

A espectroscopia de massas, por outro lado, é uma das técnicas mais ricas em informação e dados. A técnica pode ser utilizada tanto para identificação qualitativa de

compostos desconhecidos (massa molecular, composição e estrutura), quanto para quantificação; além do que, exige quantidades muito pequenas de amostras. Os sistemas de GC e MS são, portanto, muito compatíveis (McMASTER, 2008).

## **2.4 Preparação das amostras para análise em sistemas de GC-MS**

Antes da introdução da amostra no sistema cromatográfico é necessária uma prévia preparação para a dissolução dos analitos, concentração de analitos para posterior detecção e identificação, além da remoção dos interferentes dessa amostra.

O objetivo do preparo de amostras é, portanto, tornar uma matriz real disponível para injeção em um sistema cromatográfico ou outro sistema analítico. Além disso, o preparo de amostras deve remover interferentes presentes na matriz, aumentando a seletividade e, se necessário, aumentando a sensibilidade do método, pelo aumento da concentração do analito (MARTEL, 2008).

### ***2.4.1 Métodos tradicionais utilizados para análise residual em alimentos***

#### *2.4.1.1 Método de Mills*

O primeiro método multiresidual para extração de praguicidas foi desenvolvido por Mills et al. na década de 1960, nos laboratórios do *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). O método baseia-se em uma extração com acetonitrila (AcN) sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não-gordurosas. É feita uma adição de água ao extrato, seguida de uma etapa subsequente de partição, promovida através da adição de solventes apolares (éter de petróleo ou hexano) (PRESTES et al., 2009).

#### *2.4.1.2 Método de Luke*

O desenvolvimento e aplicação de praguicidas com características mais polares demandou o desenvolvimento de novos métodos de extração que incluíssem esses compostos. Em 1975, Luke et al. desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano), sendo utilizados

100 mL de cada. Com o objetivo de obter-se maiores percentuais de recuperação para os compostos polares, adiciona-se cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa para favorecer a transferência desses para a fase orgânica, esta etapa de adição de sais é chamada de “*salting-out*” (DIEZ et al., 2006; PRESTES et al., 2009)

#### 2.4.1.3 Método Acetato de Etila

Em 1976 Krijgsman et al., com o intuito de melhorar os resultados obtidos com o método de Luke, propuseram a extração de praguicidas utilizando acetato de etila, sendo que a imiscibilidade entre o solvente e água tornou desnecessária a adição de solventes apolares (PRESTES et al., 2009). O método consiste em uma extração com acetato de etila e uma adição subsequente de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e uma etapa de limpeza utilizando Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) ou florisil. Esse método não melhorou apenas a extração de compostos polares, quando comparado ao método de Luke, como também aumentou os co-extrativos polares da matriz (DIEZ, et al., 2006).

#### 2.4.1.4 Método Mini-Luke

Foi introduzido, nos anos 80, um procedimento de extração denominado mini-Luke, baseado no procedimento do método de Luke, porém utilizando-se uma menor quantidade de solventes (MARTEL, 2008). O método consiste na análise de 15 g de frutas ou vegetais, adicionando 30 mL de acetona, sendo a mistura agitada em homogeneizador por cerca de 30 segundos. Posteriormente, 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano são adicionados, agitando-se novamente em homogeneizador. A água coextraída presente na fase orgânica é retirada com sulfato de sódio anidro. O extrato é centrifugado e a parte líquida é retirada, sendo necessária uma evaporação do extrato antes da injeção no sistema cromatográfico (DIEZ et al., 2006; MARTEL, 2008). Porém, esse método apresentava baixas recuperações para analitos polares. Para sanar as dificuldades do método, nos anos 90, foi adicionada uma modificação ao método mini-Luke, sendo adicionado sulfato de sódio na etapa de extração, obtendo-se assim melhor recuperação desses analitos (MARTEL, 2008).

Foi comprovado por estudos posteriores que o sulfato de sódio é menos eficiente na remoção de água residual do extrato do que o de magnésio, sendo que esse tem sido amplamente utilizado nos estudos mais recentes (DIEZ, 2006).

A maior vantagem desse método é a rapidez na extração e as principais desvantagens são o uso de solventes clorados, que são muito poluentes, e uma etapa de limpeza, que muitas vezes é necessária.

#### ***2.4.2 Novos métodos de análise residual em alimentos***

Durante os anos 1990, por causa das fortes pressões de ambientalistas e também por fatores relacionados à saúde humana, ocorreu um grande desenvolvimento de métodos alternativos de extração baseados na redução dos volumes de solventes. Entre esses novos métodos podemos citar a extração em fase sólida (SPE), que também tem sido empregada com frequência na etapa de purificação do extrato para amostras de alimentos. Outros métodos que foram desenvolvidos nesse período também tinham como objetivo a simplificação de etapas como, por exemplo, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e microextração em fase sólida (SPME). Em 1999, foi proposta a extração por sorção em barra de agitação (SBSE), que fornece baixos limites de detecção, especialmente para analitos hidrofóbicos. Extração com fluido supercrítico (SFE), extração com líquido pressurizado (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE) são exemplos de métodos que apresentam, dentre outras características, elevada eficiência. Entretanto geralmente demandam investimento considerável em instrumentação. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de praguicidas que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, esses procedimentos podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo (PRESTES et al., 2009).

##### ***2.4.2.1 QuEChERS***

Em 2003, Anastassiades et al. com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de praguicidas denominado QuEChERS, sigla para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro).

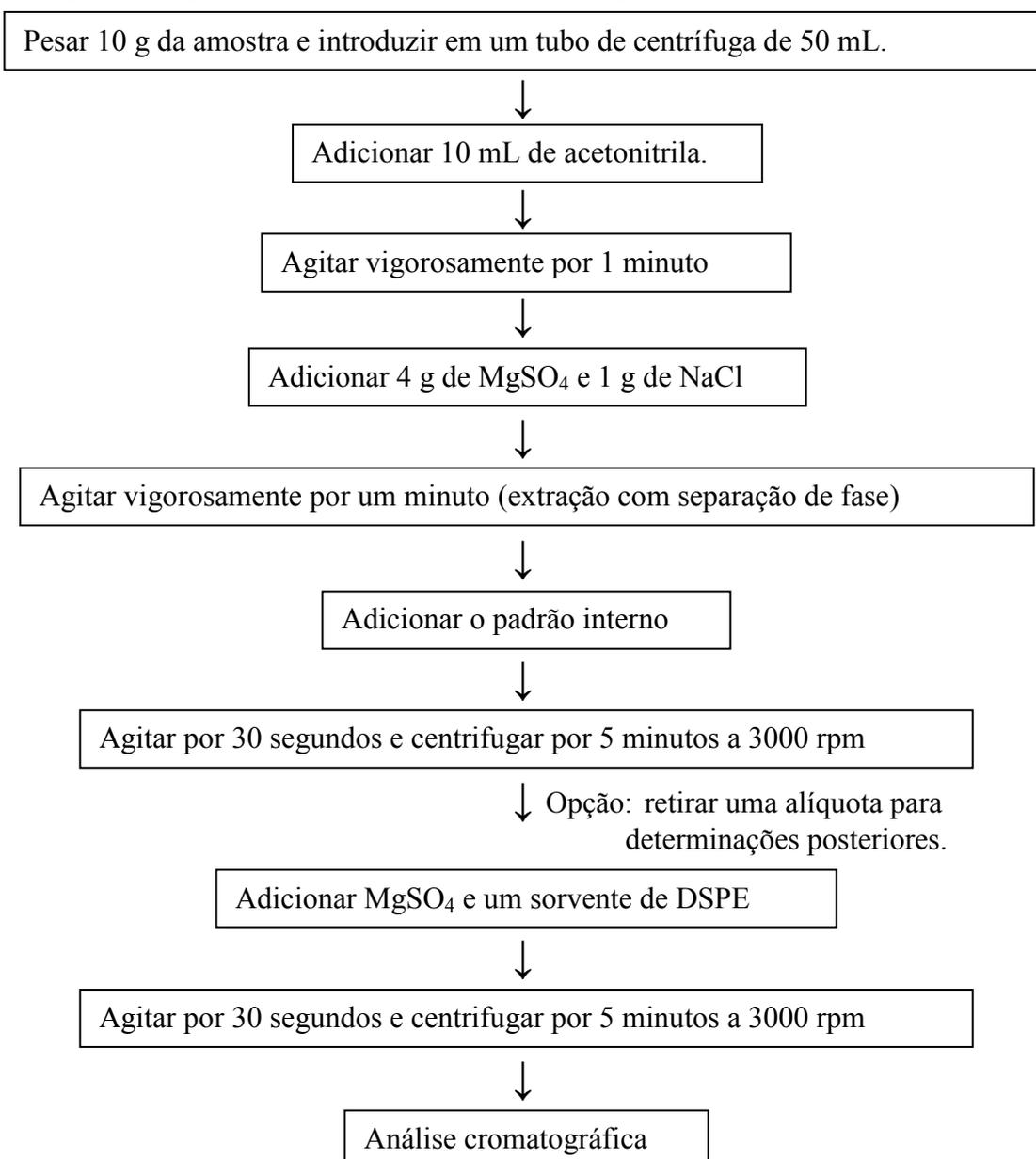
Ensaio de proficiência empregando QuEChERS apresentaram robustez, sendo reproduzíveis em ensaios inter-laboratoriais. Nos Estados Unidos, o procedimento foi adotado

em 2007 como sendo o método oficial da AOAC INTERNACIONAL para determinação de praguicidas em alimentos (PAYÁ et al., 2007).

Ele consiste de uma extração com solventes, seguido de uma etapa de adição de sais, para promover a extração de analitos mais polares, causando um aumento da força iônica, diminuição da solubilidade de analitos na fase aquosa e aumento da solubilidade na fase orgânica. Por fim, é feita limpeza (*clean-up*) do extrato, que consiste em uma extração em fase sólida dispersiva (dSPE), isto é, uma mistura de solventes adequados que são dispersos no extrato de matriz, e são escolhidos de acordo com os coextraídos que se deseja remover.

O método de QuEChERS tradicionalmente utilizado está descrito no Fluxograma 1.

Fluxograma 1 Representação do método de QuEChERS original



Fonte: PRESTES et al., 2009

Diversos trabalhos na literatura reportam a utilização de QuEChERS para a extração de multirresidual em amostras de alimentos, dentre eles: 90 praguicidas em suco de frutas por UPLC-MS/MS (ROMERO-GONZÁLEZ, et al., 2008); 140 praguicidas em uva, cebola, limão e tomate por GC-MS e HPLC-IT/MS (LESUEUR et al., 2008); 82 praguicidas em uva por LC-MS/MS (BANERJEE et al., 2007); 95 praguicidas em diversos alimentos por LC-MS (CHUNG et al., 2010); 32 praguicidas em maçã, ervilha e limão por LC-MS/MS e GC-MS (LEHOTAY et al., 2010); 118 praguicidas em sucos de vegetais por GC-MS e LC-MS/MS (NGUYEN et al., 2009); 169 praguicidas em soja por LC-MS/MS (PIZZUTTI et al., 2009); e 50 praguicidas em uva, romã, e manga em GC-IT/MS (BANERJEE et al., 2010).

## 2.5 Efeito de Matriz

Na análise de praguicidas e outros analitos em geral por GC-MS, a melhor intensidade e qualidade dos picos depende de certas variáveis, tais como (ANASTASSIADES et al., 2003b):

- a estabilidade dos analitos na solução da amostra;
- completa transferência dos analitos a partir do local de injeção para a coluna;
- a não distorção e alargamento dos picos durante o processo de separação.

Nas análises por cromatografia gasosa, a exatidão e precisão de resultados são imprescindíveis, portanto, qualquer possível fonte de erros deve ser investigada e solucionada, tal como o efeito de matriz. Esse fenômeno, o qual acarreta um aumento ou diminuição da resposta cromatográfica induzida pelos componentes da matriz explica as altas ou baixas taxas de recuperação obtidas em algumas análises (longe de 100%) de praguicidas e as baixas precisões dos resultados (PINHO et al., 2010).

O efeito de matriz, além de gerar recuperações acima de 100%, pode causar outras alterações na análise, tais como (PINHO, 2009):

- Mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas do analito no sistema cromatográfico, fornecendo uma baixa resposta, ou dificultando a integração do pico devido aos interferentes;
- Erro na identificação do analito, sendo esse identificado erroneamente, gerando um falso positivo, porém esse problema pode ser, muitas vezes, contornado com a utilização de um espectrômetro de massas;

- Aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Esse tipo de erro ocorre quando interferentes voláteis são eluídos no mesmo tempo de retenção dos analitos;
- Extinção do sinal do detector, ou seja, diminuição do sinal do analito (esse erro é mais comum aos detectores fotométricos de chama).

O efeito de matriz é mais perceptível em análises pelo espectrômetro de massas do que naquelas que usam detector fotométrico de chama ou detector de nitrogênio fósforo, em função da maior detectabilidade (PINHO, 2009).

Quando as soluções-padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia gasosa, os sítios ativos da linha de inserção (*insert liner*) estão disponíveis para retenção dos analitos e assim, uma menor quantidade é transferida para a coluna e detectada (PINHO, 2009). Já quando uma amostra real é injetada, os componentes da matriz tendem a bloquear os sítios ativos (grupos silanóis livres, principalmente) na entrada do GC e coluna, reduzindo assim as perdas de analitos suscetíveis causada por adsorção ou degradação nesses sítios ativos. Esse fenômeno resulta em maiores sinais do analito na matriz do que na solução em solvente puro, levando a uma superestimação das respostas nas amostras analisadas (MASTOVSKÁ et al., 2005).

Uma variedade de fatores está envolvida na superestimação da resposta devido aos efeitos de matriz, dentre os quais: número e tipo de sítios ativos na entrada e na coluna do GC; estrutura química e concentração dos analitos; temperatura de injeção; tempo de interação dos analitos com o sistema GC (função de vazão, pressão, volume de injeção, expansão do solvente, diâmetro da coluna, e tempo de retenção); tipo de matriz (ANASTASSIADES et al., 2003b).

Uma correta quantificação de analitos depende da compensação consistente para o efeito sobre a resposta induzida pela matriz. Idealmente, a causa do efeito (silanóis, íons metálicos, e outros sítios ativos do sistema GC) deveria ser eliminada para resolver o problema. No entanto, é praticamente impossível fazer uma superfície inerte, durável, de baixo custo, e tolerante ao calor para a análise de GC (ANASTASSIADES et al., 2003b; MASTOVSKÁ et al., 2005).

Os analistas utilizam muitas vezes métodos alternativos de calibração para compensar o efeito. As abordagens mais comuns incluem o uso dos métodos de superposição da matriz, adição de padrão e uso de padrões internos deuterados (MASTOVSKÁ et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2003b; WANG et al., 2011):

Todas essas técnicas exigem trabalho e custos extras, além disso, elas ainda podem levar a erros de quantificação, porque a extensão do efeito depende da concentração do analito e da composição da matriz (no caso de adição de padrão e da superposição de matriz, respectivamente).

## 2.6 Protetores de analitos

Erney e colaboradores (1993) foram idealizadores do método da adição de compostos que iriam impedir/minimizar as interações dos praguicidas com os sítios ativos no sistema GC. No entanto, foram estudados apenas oito diferentes "reagentes mascarantes", e não houve solução para fins de análise multirresidual de praguicidas.

Posteriormente, em um amplo estudo, feito por Anastassiades et al. (2003), foram avaliados mais de 90 compostos químicos diferentes, protetores de analitos em potencial; com o objetivo de encontrar compostos que interagem fortemente com os sítios ativos, proporcionando aumento da resposta do analito, sem efeitos indesejáveis, tais como a degradação da substância, adsorção ou deterioração do sistema GC. Esses protetores são aplicados no extrato da matriz e na solução em solvente puro, para aumento do sinal em ambas, mantendo igualdade entre as respostas. Em geral, capacidade de ligação de hidrogênio, e volatilidade (tempo de retenção) dos protetores analitos foram os fatores mais importantes no sentido de melhoria. Sendo que esses protetores mostraram-se mais eficientes para proteção de analitos com eluição em tempo de retenção próximo ao seu (ANASTASSIADES et al., 2003b).

O agente de proteção deve preencher os sítios ativos ao mesmo tempo em que o praguicida de interesse é mais suscetível às interações com estes sítios ativos. Isso significa que as volatilidades do protetor de analito e do analito devem ser semelhantes.

As características de um agente de proteção ideal incluem (CAJKA et al., 2005):

- ser reativo com o sistema de GC e não induzir a degradação dos analitos;
- não se deteriorar na coluna de GC ou detector;
- não interferir na detecção;
- não se acumular no injetor do GC ou em outro lugar no sistema;
- ser amplamente disponível, barato e não tóxico;
- ser solúvel no solvente de interesse.

Os principais benefícios de usar protetores de analito nas análises quantitativas incluem (WANG et al., 2011):

- a intensidade e a forma dos picos do analito são melhoradas;
- identificação e integração de pico são mais fáceis e precisas;
- maior seletividade, menores limites de detecção e quantificação, e maior confiança nos resultados podem ser alcançados;
- o uso de protetores de analitos são aceitos em todas as agências de regulamentação;
- a abordagem é muito fácil, rápida e barata;
- é necessária uma menor manutenção do sistema de GC.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram desenvolver e otimizar metodologias de preparo de amostras e análise por GC-MS para avaliar a contaminação do café com o praguicida dissulfoton e dois de seus produtos de degradação. Além de analisar as variáveis que pudessem interferir negativamente e positivamente nas análises. Após a otimização fez-se a validação do método, para verificar se estava dentro das normas e seria possível de ser aplicado a amostras reais, por fim foi feita a aplicação do método em amostras comerciais obtidas na região de Alfenas.

Pretendeu-se ainda, verificar a permanência dos praguicidas no café e a presença de possíveis produtos de degradação/transformação gerados no seu processamento.

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica para preparo de amostras e determinação de dissulfoton, e seus produtos sulfona e sulfóxido, em amostras de café torrado.
- Ampliação da análise para outros praguicidas relacionados e verificação da eficácia de determinadas substâncias, chamadas “protetores de analitos”, em impedir perdas no sistema cromatográfico.
- Validação do método, sendo observados os seguintes parâmetros: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, robustez, recuperação e efeito de matriz.
  - Aplicação do método a amostras comerciais de café torrado;
  - Teste da validade do método ao ser aplicado a amostras de café cru;
  - Verificação da degradação/transformação dos analitos em amostras de café durante o processo de torra do fruto, sendo avaliados diversos parâmetros para estipulação do grau de torra.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos e reagentes

Acetonitrila,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , grau UV/HPLC espectroscópico (Vetec);  
Álcool metílico (metanol),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , grau UV/HPLC (Dinâmica reagentes analíticos LTDA);  
Acetato de etila,  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ , grau UV/HPLC espectroscópico (Vetec);  
Ácido acético glacial P.A.,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Furlab);  
Fosfato monobásico anidro, 98-102%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Neon comercial LTDA.);  
Fosfato dibásico anidro, 99%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Dinâmica reagentes analíticos);  
PSA, Primary secondary amine, (Varian);  
Silica modificada com octadecil, C18 (Fisher Scientific);  
Sulfato de magnésio anidro,  $\text{MgSO}_4$  P.A. (Vetec);  
Cloreto de sódio,  $\text{NaCl}$  P.A. (Impex);  
Bicarbonato de sódio,  $\text{NaHCO}_3$  P.A. (Sigma-Algrich);  
Acetato de sódio anidro,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  P.A. (Synth);  
Cafeína, 99%,  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ ,  $\text{MM} = 194,19 \text{ g mol}^{-1}$  (Sigma-aldrich);  
Arabinose D(-),  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,  $\text{MM} = 150,10 \text{ g mol}^{-1}$  (Proquímios);  
Frutose Puríssima,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ,  $\text{MM} = 180,12 \text{ g mol}^{-1}$  (Isofar);  
Sorbitol D(-),  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ,  $\text{MM} = 182,14 \text{ g mol}^{-1}$  (Vetec);  
Polietilenoglicol 300, PEG 300,  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_7$ ,  $\text{MM} = 282 \text{ g mol}^{-1}$  (Vetec);  
Xilose Puríssima,  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,  $\text{MM} = 150,13 \text{ g mol}^{-1}$  (Isofar);  
Galactose D(+) Puríssima,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ,  $180,16 \text{ g mol}^{-1}$  (Vetec);  
Micropipetadores de 5-50  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  e 100-1000  $\mu\text{L}$  (Digipet)  
Balança analítica SHIMADZU® AY220;  
Banho Ultra-sônico - Unique Ultra Cleaner;  
Sistema purificador de água Milli-Q, Millipore®, Brasil;  
Balança analítica KERN® 410;  
Centrífuga QUIMIS® 0222 TM216;  
Agitador tipo Vortex com controle de velocidade Certomat® MV - B. Brain Biotech International  
Torrador e moedor domésticos

#### **4.1.1 Equipamento GC-MS utilizado**

Foi utilizado um equipamento GCMS QP2010® Shimadzu que possui um cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas destinados a análises qualitativas e quantitativas, com identificação por varredura total de íons (Scan), assim como o monitoramento de íons selecionados (SIM). Foram utilizados:

Cromatógrafo a gás GC-2010 de alta resolução com coluna cromatográfica capilar apolar RTX5-MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 um de espessura de filme;

Fonte de Ionização por Elétrons (EI) com controle de temperatura independente e com filamento de energia e corrente variável, utilizado a 70 eV; Amostrador automático AOC-20i+s (Shimadzu, Japão); Software GCMSolutions, usado para controlar o GCMS-QP2010 e executar aquisição e análise de dados.

#### **4.2 Testes Preliminares**

Inicialmente foi feita uma injeção de padrões em acetonitrila no sistema de GC-MS a fim de se identificar e ajustar os tempos de retenção dos analitos. O método de separação e identificação foi feito nas seguintes condições:

Temperatura do injetor igual a 250°C.

Injeção split na razão de 1:5.

Volume de injeção de 1 µL.

Programação da temperatura da coluna: temperatura inicial de 90 °C subindo até 100 °C em uma razão de 30 °C/minuto, e posteriormente uma razão de 12 °C/minuto até 150 °C, subindo depois em uma razão de 40 °C/minuto até 275 °C, mantendo-se nesta temperatura por 3 minutos.

O controle de vazão foi baseado na velocidade linear do gás de arraste hélio (He) 99,995% de pureza, White Martins; pressão de 120,6 KPa, e velocidade igual a 48,2 cm/seg.

Temperatura do detector igual a 200 °C.

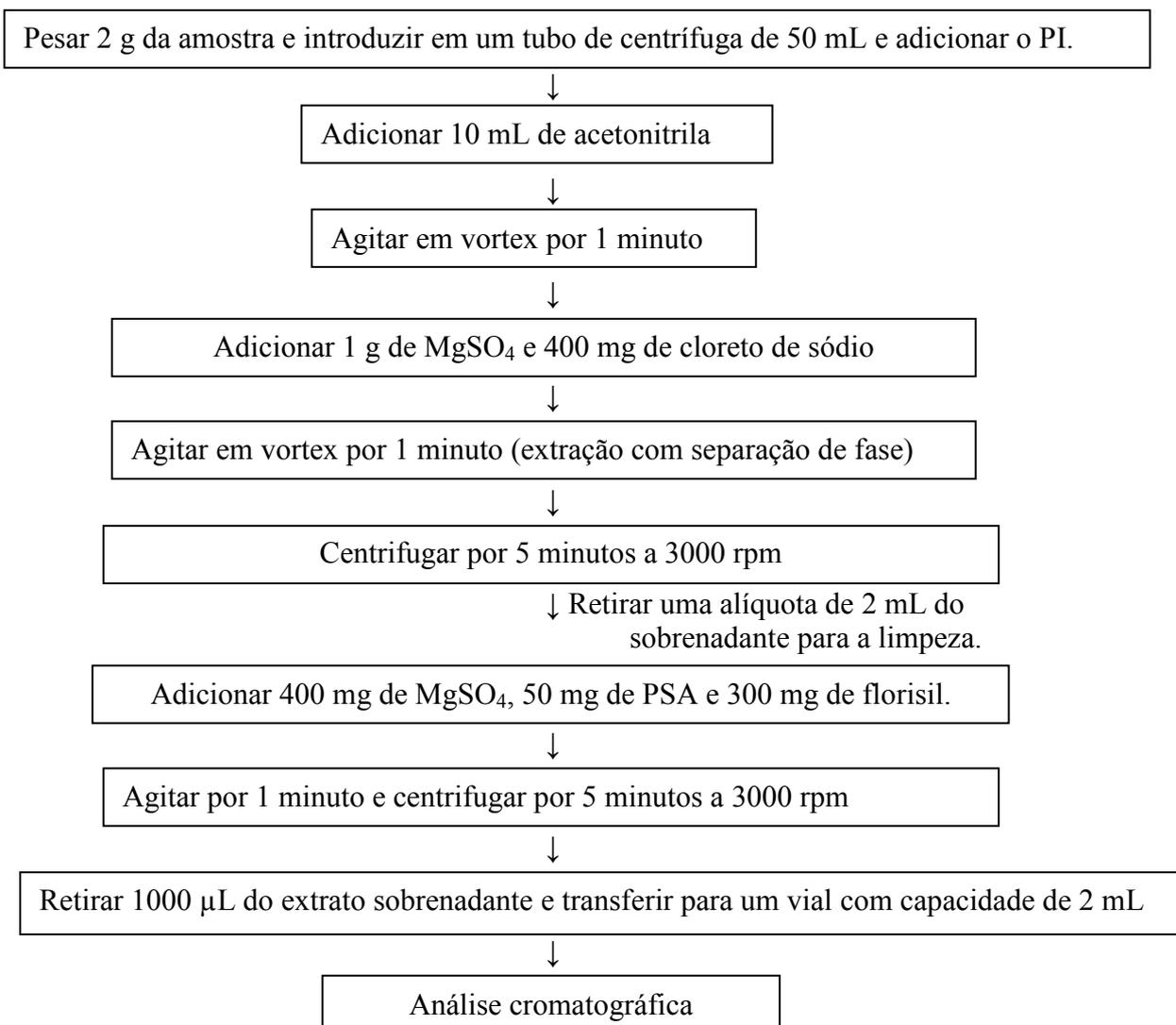
Temperatura da interface igual a 250 °C.

Foi feita aquisição no modo varredura (Scan), com monitoramento entre 40 e 390 m/z.

Foram injetados extratos das amostras fortificadas com os analitos, a fim de se verificar a presença de interferentes na matriz, próximos aos tempos de retenção dos analitos,

sendo utilizado o método de QuEChERS, conforme descrito no Fluxograma 2 e nas mesmas condições cromatográficas listados no procedimento acima.

Fluxograma 2 Método de QuEChERS para a análise de organofosforados em café torrado e moído antes da otimização.



#### 4.2.1 Seleção do Padrão Interno

A escolha do padrão interno foi feita mediante a observação dos seguintes critérios: era necessário um praguicida organofosforado com características físico-químicas semelhantes às das dos analitos a serem quantificados, que possuísse tempo de retenção próximo a esses analitos, e que possuísse pouca ou nenhuma utilização pelos cafeicultores da região. Além disso, o padrão interno não deveria apresentar interferências com outros picos

cromatográficos. Foi escolhida então a diazinona, que estava disponível no laboratório e este praguicida não é permitido para cultura do café (MAPA, 2010). Além disso, foram testadas amostras de café torrado e as elas apresentaram-se livres do contaminante escolhido.

#### **4.2.2 Escolha dos íons a serem monitorados**

Para as etapas de otimização, as análises cromatográficas foram feitas no modo SIM. Os valores a serem monitorados foram escolhidos de acordo com os espectros de massas presentes na *MS Search Library*. A partir dos primeiros resultados, foram escolhidos os íons com as razões  $m/z$  que seriam utilizadas para a quantificação, sendo que essas  $m/z$  foram escolhidas de acordo com as razões sinal/ruído obtidas.

### **4.3 Otimização do método para análise de praguicidas em café torrado e moído**

#### **4.3.1 Otimização da etapa de extração**

A partir do método de QuEChERS apresentado inicialmente por Anastassiades et al. (2003) foram feitas modificações a fim de obter melhores resultados de extração dos compostos em estudo nas amostras de café torrado e moído comercial.

As amostras utilizadas para as etapas de otimização e validação dos experimentos, foram isentas de resíduos dos praguicidas estudados além de outros interferentes próximos do tempo de retenção destes analitos.

Para os experimentos de otimização foram utilizadas amostras comerciais de café torrado e moído obtidas em supermercados da região de Alfenas-MG. Estas amostras ao serem injetados em sistema de GC-MS, após o processo de extração e limpeza, tiveram confirmada a ausência dos praguicidas estudados. A escolha das amostras convencionais foi feita pelo fato destas serem mais consumidas pela população do que as amostras orgânicas.

Por meio de um teste comparativo entre as amostras orgânicas e convencionais verificou-se que nenhuma delas apresentou a presença de contaminação, segundo a metodologia utilizada.

Para melhor conservação, após abertura das embalagens, as amostras foram protegidas contra umidade, luz e calor.

Para os testes iniciais foi utilizado o procedimento descrito no Fluxograma 2, sendo que essa etapa foi otimizada posteriormente. Foi utilizada uma concentração de 5  $\mu\text{g/g}$  de

cada analito, e um split de 1:5 no sistema cromatográfico. As demais condições cromatográficas foram iguais as descritas anteriormente.

#### *4.3.1.1 Adição de água à amostra*

Normalmente, nas extrações pelo método de QuEChERS, são utilizados 10 gramas de amostra, extraídos em 10 mL de solvente, porém, essa proporção é válida apenas para amostras com um alto teor de água. As amostras com um baixo teor de umidade (<80%) muitas vezes requerem a adição de água antes da extração inicial; e a água adicionada deve estar em baixa temperatura (por exemplo, inferior a 4 ° C) para compensar o calor produzido pela adição dos sais que apresentam dissociação exotérmica. Quando utilizadas amostras contendo <25% de água (por exemplo, cereais, frutos secos, mel, especiarias) o tamanho da amostra para análise pode ter que ser reduzido (por exemplo, 1-5 g), dependendo da quantidade de co-extrativos da matriz esperados no extrato final (ANASTASSIADES et al., 2003).

Nesta etapa de testes do presente estudo foram separados aproximadamente 30 gramas da amostra e adicionados 30 mL de água padrão Milli-Q® mantida em geladeira, com uma temperatura < 10 °C. A mistura foi homogeneizada em graal com pistilo. Houve a comparação entre a amostra preparada com e sem a adição de água.

#### *4.3.1.2 Solvente de extração*

Um dos pontos fundamentais para desenvolvimento de um método de extração é a escolha do solvente de extração. O solvente ideal é aquele que possibilite a extração de uma ampla variedade de praguicidas de diferentes polaridades; apresentem seletividade durante o procedimento de extração; capacidade de separação de água; além de apresentar baixo custo e baixa toxicidade (ANASTASSIADES et al., 2003). Além disso, o solvente deve ser compatível com os analitos e com a técnica cromatográfica utilizada, para evitar-se a troca de solventes (MASTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

Foi feito um teste a fim de se verificar a eficiência de extração de diferentes solventes. Foram escolhidos solventes de média e alta polaridade (acetonitrila, metanol e acetato de etila). Nesse teste foram observados apenas aspectos visuais do extrato obtido, tais como viscosidade e coloração.

#### 4.3.1.3 Sal / tampão

Após a escolha do solvente mais adequado, foi feito um teste para comparação de respostas obtidas (área de pico dos analitos) ao utilizar diferentes sais. A adição de sais para promover o efeito “*salting out*” tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo, especialmente por melhorar os percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade desses compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (PRESTES et al., 2009).

Foi feita uma proporção em mols para todos os sais e tampões utilizados, a partir dos valores descritos no Fluxograma 3, de 400 mg de NaCl, isto é, de aproximadamente 6,8 mmols de cada. Foram testados, nessa etapa, os sais NaHCO<sub>3</sub>, NaCl e os tampões HAc/NaAc(1:1) e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1:1).

#### 4.3.1.4 Planejamento Fatorial para quantidade de amostra e sais

Após a escolha do sal mais adequado para promover o “*salting out*”, para avaliar a influência de certos fatores de extração (quantidade de sal MgSO<sub>4</sub>, quantidade de tampão HAc/NaAc e quantidade de amostra) e suas interações, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com ponto central, composto de 11 ensaios. Os níveis de máximo e mínimo selecionados para os fatores foram de 2,0 e 3,0 g de amostra; 0,2 e 1,2 g de MgSO<sub>4</sub>; e 4,7 e 10,2 mmol do tampão de HAc/NaAc (1:1). Estes níveis foram escolhidos por abranger os valores que estavam sendo utilizados.

#### 4.3.2 Otimização da etapa de limpeza

Após a otimização da etapa de extração, faz-se necessário também otimizar a etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato da amostra. A atenção dada às etapas de extração e limpeza é fundamental, devido à sensibilidade de aparelhos modernos que garantem baixíssimos limites de detecção (BULDINI et al., 2002), além de diminuir as necessidades de manutenção do sistema cromatográfico (PRESTES et al., 2009).

Para a otimização da etapa de limpeza, foram realizados vários ensaios utilizando os sorventes: florisil, sílica com amina primária e secundária (PSA), sílica octadecil (C18) e sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>).

O primeiro experimento realizado para otimização da etapa de limpeza foi um teste dos sorventes utilizados separadamente, para verificar a eficiência na limpeza e eventuais perdas na recuperação dos analitos.

Esse teste foi feito transferindo-se 2 mL do extrato líquido, resultante dos ensaios de extração já otimizados, para um tubo de vidro (capacidade de 15 mL) já contendo os sorventes, sendo realizada uma agitação em vortex por 1 minuto seguida de centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. Ao final, o extrato limpo foi injetado no sistema cromatográfico.

Foram testados os seguintes sorventes: PSA (200 mg), florisil (400 mg), C18 (400 mg) e  $MgSO_4$  (800 mg).

Posteriormente foi feito um novo teste a fim de verificar a eficiência de limpeza do extrato e de recuperação dos analitos utilizando diferentes combinações entre os sorventes que se apresentaram mais eficientes, quanto à limpeza e recuperação, na etapa anterior.

As combinações utilizadas nesses testes assim como as quantidades de cada sorvente estão descritas na Tabela 3. Sendo que, após a escolha da melhor combinação dentre as descritas, foi feita uma comparação entre o extrato limpo com a combinação de sorventes escolhida com e sem a adição de 400 mg de  $MgSO_4$  ao conjunto de sorventes, verificando o aspecto de limpeza dos extratos e a recuperação dos analitos.

TABELA 3 Combinações de sorventes utilizadas

Teste de clean-up	Tipo e quantidade de sorventes
Teste A	200 mg de C18 e 200 mg de florisil
Teste B	200 mg de C18 e 100 mg de PSA
Teste C	200 mg de florisil e 100 mg de PSA
Teste D	135 mg de C18, 135 mg de florisil e 66 mg de PSA

#### 4.4 Protetores de analitos

Nos testes de protetores de analitos foram incluídos outros organofosforados. Nas etapas de otimização anteriores utilizou-se o dissulfoton, principal analito que está sendo estudado no presente projeto, assim como seus produtos de transformação. Entretanto, em análises de rotina, é necessária a identificação e quantificação de diferentes praguicidas; e o método QuEChERS é reconhecido por sua universalidade de aplicações. Sendo assim, utilizou-se o dissulfoton e seus produtos de transformação como compostos representativos de diferentes polaridades e volatilidades relativas, para as etapas de otimização, tendo em vista

que o comportamento dos praguicidas dessa classe não difere muito. Isso é observado pelos tempos de retenção dos produtos de degradação nos extremos da separação cromatográfica, enquanto os inseticidas organofosforados (IOF) estão ao centro. Além disso, como as respostas mais críticas a serem melhorada eram as dos produtos de degradação, o IOF (dissulfoton) foi usado mais como uma referência para constatar que a condição ótima para os produtos de degradação, mesmo que não sendo a ótima para os IOF, não faria com que eles tivessem um prejuízo tão grande na condição escolhida.

Devido aos analitos incluídos nessa etapa de testes terem os tempos de retenção próximos ao tempo do dissulfoton e do PI diazinona, foi feita uma mudança na programação de temperatura do método cromatográfico, para uma correta separação dos compostos. As outras condições do método permaneceram iguais.

A nova programação da temperatura da coluna foi: temperatura inicial de 90 °C até 100 °C em uma razão de 30 °C/minuto, e posteriormente uma razão de 12 °C/minuto até 160 °C, depois em uma razão de 40 °C/minuto até 220 °C, posteriormente, uma razão de 12 °C/minuto até 260 °C e, por fim, subindo na razão de 40 °C/minuto até 300 °C, obtendo-se um tempo total de corrida de 11,67 minutos.

No teste da adição de protetores de analitos foi avaliada a eficiência individual de diversos compostos, que eram adicionados aos extratos finais de amostras de café, obtidos pelo método QuEChERS já otimizado. Foi feita a comparação de respostas obtidas com e sem a adição das substâncias.

Foram testados os protetores: arabinose, xilose, galactose, frutose, PEG 300, sorbitol e cafeína. A escolha dos compostos foi feita com base em estudos anteriores (Anastassiades et al, 2003b), onde confirmou-se o potencial de interação com o sistema cromatográfico, além de serem materiais disponíveis no laboratório.

Após verificação das substâncias mais adequadas na proteção dos analitos em estudo, foram avaliadas diferentes combinações entre aqueles que se mostraram mais eficientes.

Por fim, após otimização da melhor combinação de protetores, foi otimizada a concentração ideal destes protetores para melhor resultado na análise. Idealmente, uma baixa concentração de protetores de analito deve ser suficiente para o efeito de aumento da resposta (ANASTASSIADES et al., 2003b). Foram avaliadas nesse teste as concentrações de: 0,3 mg mL<sup>-1</sup>; 1 mg mL<sup>-1</sup>; e 5 mg mL<sup>-1</sup>.

## **4.5 Validação do método**

Após serem definidas as melhores condições de separação cromatográfica dos praguicidas, método de extração e limpeza, foi feita a validação do método analítico.

Os parâmetros analíticos, ou figuras analíticas de mérito, avaliados no presente trabalho foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica e linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (através de ensaios de recuperação) e efeito de matriz.

### ***4.5.1 Especificidade/ Seletividade***

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI, 2004). A seletividade do método no presente estudo foi garantida devido a utilização de um espectrômetro de massas, que monitora razões de massa/carga específicas para cada analito.

### ***4.5.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)***

O limite de detecção representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (LANÇAS, 2004). No presente trabalho, foi utilizado para cálculo do LD o método da relação sinal:ruído, que compara o sinal do analito ao ruído da linha de base. Foi utilizada a relação de 3:1, como valor de limite de detecção. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo do limite de quantificação (LQ), que corresponde à menor concentração do analito possível de ser detectada e quantificada (LANÇAS, 2004), e corresponde à relação de sinal:ruído 10:1.

### ***4.5.3 Faixa linear - Linearidade***

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer respostas diretamente proporcionais à quantidade dos analitos estudados na amostra, dentro de determinada faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie é descrita numa equação de reta chamada de curva analítica (BARROS NETO et al., 2002). As extrações foram feitas utilizando o método analítico otimizado, em cinco níveis de concentração (LQ, 2,5\*LQ, 10\*LQ, 20\*LQ e 40\*LQ), este procedimento foi feito em sextuplicata.

A partir das respostas obtidas foi construída a curva analítica para cada um dos compostos estudados, obtendo-se a partir dos valores a média da área dos picos cromatográficos em cada nível, para cada praguicida, assim como o valor de RSD (%) em cada um destes níveis, a equação da curva analítica, e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

#### **4.5.4 Precisão**

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, sob condições definidas. A precisão é definida por valores em porcentagem de desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%).

A precisão do método foi avaliada de acordo com os valores de repetitividade ( $RSD_a$ ) ou precisão intradia, isto é, o valor de variação obtido entre as replicatas de experimentos realizados no mesmo dia, avaliada a partir dos desvios obtidos das extrações utilizadas para construção da curva analítica, em mesmo laboratório e mesmo analista. Também estão descritos os valores de precisão intermediária ( $RSD_b$ ) onde está demonstrada a variação obtidos entre as replicatas de experimentos realizados em três dias diferentes, em três pontos de concentração, no mesmo laboratório e pelo mesmo analista.

Em métodos de análise de traços, tais como no presente estudo, são geralmente aceitos valores de CV de até 20%, chegando a ser aceitos níveis mais altos, especialmente para amostras complexas, tais como de alimentos.

#### **4.5.5 Robustez**

O teste de robustez é indicado para medir a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas variações (INMETRO, 2003). Um método é considerado robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada de seus parâmetros (RIBANI, 2004). A robustez de um método é verificada introduzindo pequenas mudanças, que refletem alterações que podem ocorrer quando o método é executado em outros laboratórios, por analistas e equipamentos diferentes.

Para determinação da robustez do método no presente trabalho foi realizado o teste introduzido por Youden e Steiner (Youden e Steiner, 1975). Este teste consiste em uma análise multivariada de sete variáveis que podem influenciar nos resultados analíticos, através da realização de oito experimentos, conforme descrito na Tabela 4. As sete variáveis selecionadas no experimento foram: marca do solvente, tempo da primeira agitação, tempo da primeira centrifugação, velocidade da primeira centrifugação, tempo da segunda agitação, concentração dos protetores de analitos e tempo da segunda centrifugação.

As condições nominais das variáveis foram denotadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos foram denotados pelas letras minúsculas correspondentes a, b, c, d, e, f e g. A partir dos resultados obtidos, o efeito de cada variável foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das 4 análises nos níveis nominais e a média dos resultados das 4 análises feitas nos níveis alternativos das variáveis. Considerando o desvio padrão relativo (CV) obtido entre os 8 resultados, os valores de efeito maior do que o desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois, foram considerados significantes, isto é, alteram a resposta analítica.

TABELA 4 Variáveis e seus níveis usadas em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo 1ª agitação	1 minuto	2 minutos	A	a	A	a	A	a	A	a
Velocidade 1ª centrifugação	3000 rpm	3500 rpm	B	b	b	B	B	b	b	B
Tempo 1ª centrifugação	5 minutos	6 minutos	C	C	c	c	C	c	C	C
Tempo 2ª agitação	1 minuto	2 minutos	D	D	d	d	D	D	d	d
Concentração dos protetores	1 mg mL <sup>-1</sup>	0,9 mg mL <sup>-1</sup>	E	e	E	e	e	E	e	E
Tempo 2ª centrifugação	5 minutos	6 minutos	F	F	F	F	f	f	f	f
Marca do solvente	Marca A	Marca B	G	g	g	G	g	G	G	g
Respostas obtidas			s	t	u	v	w	x	y	z

#### 4.5.6 Efeito matriz, eficiência total do método e exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre uma resposta obtida na utilização do método e um valor aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados (CRM); comparação de

métodos; ensaios de recuperação; e adição de padrão. As medições de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade em se obterem CRM (que, para certas aplicações, nem existem) e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo), em um determinado número de ensaios.

O efeito de matriz mede a influência que os componentes da amostra apresentam sobre a resposta dos analitos (conforme especificado no item 2.5).

No presente estudo o teste de exatidão foi feito a partir de cálculos de recuperação, comparando-se as respostas obtidas do extrato de amostra fortificada antes da extração (CI) com um extrato de matriz fortificado antes da injeção no sistema cromatográfico, após a extração (CF); também preparação de soluções dos analitos em solvente (SS). A partir da comparação entre as respostas obtidas nestas soluções puderam ser calculados os valores de recuperação, efeito matriz e eficiência total do método, conforme apresentado nas equações da Tabela 5.

TABELA 5. Cálculos de efeito de matriz, recuperação e eficiência do método

Parâmetro	Cálculo
Efeito de matriz	$ME (\%) = CF/SS \times 100$
Recuperação	$RE (\%) = CI/CF \times 100$
Eficiência	$PE(\%) = CI/SS \times 100 = (ME \times RE)/100$

Fonte: MATUSZEWSKI et. al, 1998

#### 4.6 Aplicação em amostras de café torrado

Após a validação do método ele foi aplicado a amostras obtidas no comércio e zona rural da região de Alfenas. Foram utilizados doze lotes de amostras diferentes.

#### 4.7 Estudo da degradação dos praguicidas durante a etapa de torra

Conforme descrito nas etapas anteriores, o método QuEChERS foi otimizado e validado para amostras de café torrado, sendo necessário, portanto, uma prévia verificação de adequação do método para a aplicação em amostras de café cru. Na adaptação foi feita uma comparação das respostas obtidas, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, repetibilidade, recuperação, além do efeito de matriz comparado. A verificação segue os mesmos procedimentos adotados para avaliação dos parâmetros em amostras de café torrado.

Após a verificação da adequação do método para amostras de café seco, foram calculadas as porcentagens de cada um dos analitos perdida ao longo da torra; para isso, a amostra foi dividida em duas alíquotas, para realização de dois estudos paralelos:

Alíquota 1 (250 g) – foi realizado um estudo onde contaminou-se a amostra com todos os praguicidas organofosforados que estão sendo estudados, e verificou-se a permanência deles durante o processo de torra, sendo monitorados o tempo e a temperatura final de cada uma das amostras.

Alíquota 2 (250 g) – foi feito um estudo paralelo, contaminando a amostra apenas com o analito dissulfoton, para verificação da permanência dele na amostra de café assim como a sua degradação em seus produtos imediatos, sulfóxido e sulfona.

#### ***4.7.1 Preparo da solução***

Foram preparados 100 mL de uma solução em acetonitrila contendo todos os analitos para contaminação de 250 g de amostra. Paralelamente foram preparados 100 mL de uma solução contendo apenas o analito dissulfoton para contaminação de 250 g de amostra. Para maior homogeneização da solução na amostra foi feita agitação vigorosa e secagem em atmosfera de N<sub>2</sub>. Após a contaminação as amostras foram mantidas em freezer a temperatura de aproximadamente -8 °C.

#### ***4.7.2 Torra do café***

As amostras foram divididas em alíquotas de 25 g e torradas utilizando-se um torrador doméstico obtido em uma loja de produtos agropecuários de Alfenas. Essas alíquotas foram torradas em diversos tempos (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos). O torrador foi aquecido por 10 minutos antes de iniciar-se a torra, sendo neste prévio aquecimento obtida a temperatura de aproximadamente 190 °C. Após a torra foi imediatamente medida a temperatura final e realizada a retirada do café torrado, para análises posteriores. Entre a realização das torras foi feita uma limpeza do torrador utilizando água e álcool etílico comercial.

A partir dos resultados obtidos foram construídos gráficos das perdas de massa dos analitos durante o processo de torra.

### ***4.7.3 Classificação da torra***

A classificação da torra foi feita através dos fatores comparados: perda de massa da amostra na torra, temperatura final da torra, além de serem fotografadas as amostras nos diferentes tempos de torra para comparação de suas colorações.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Testes preliminares

#### 5.1.1 Seleção do Padrão Interno

O praguicida selecionado como padrão interno foi a diazinona em função da disponibilidade e de ser adequado ao procedimento, conforme critérios descritos. Seguem as informações sobre esse praguicida.

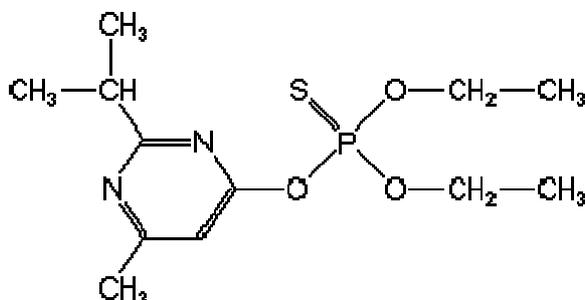


Figura 3. Fórmula estrutural da diazinona (padrão interno).

Fonte: *MS Search Library*

Fórmula bruta: C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS

Grupo químico: organofosforados

Classe: inseticida

Classificação toxicológica: classe II, altamente tóxico.

Nome químico: *O,O*-diethyl *O*-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate.

Número no *Chemical Abstracts Service*: 333-41-5

Ingestão diária aceitável: 0,002 mg.kg<sup>-1</sup> p.c.

Massa molar: 304,35 g mol<sup>-1</sup>

#### 5.1.2 Condições de separação dos analitos

Nas condições de separação cromatográfica adotadas foi obtido o cromatograma mostrado na Figura 4. Os tempos de retenção obtidos, fórmula molecular e coeficiente de partição octanol/água (k<sub>ow</sub>) estão relacionados na Tabela 6.

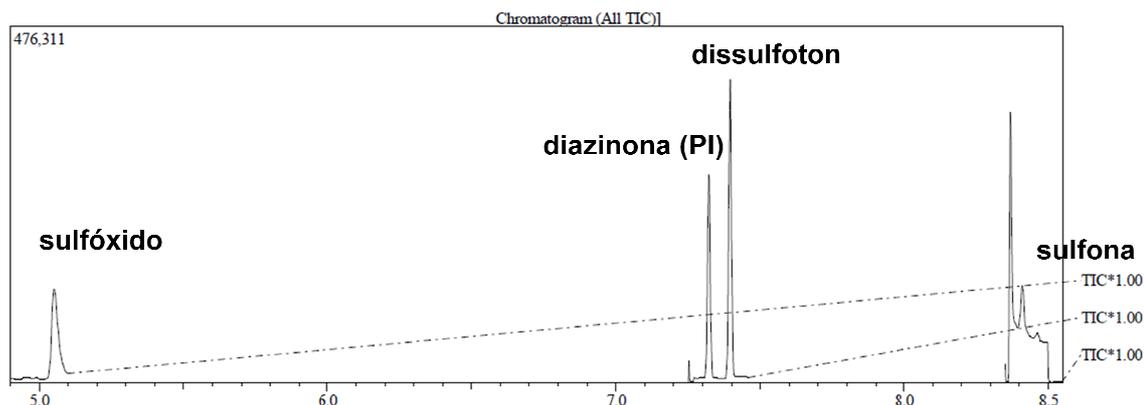


Figura 4. Cromatograma obtido no modo SIM, com o método utilizado, para extrato de matriz.

TABELA 6 Relação de tempos de retenção, fórmulas moleculares e valores teóricos dos coeficientes de partição dos analitos estudados.

Analito	TR (minutos)	Fórmula molecular	Kow
Dissulfoton sulfóxido	5,037	$C_8H_{19}O_3PS_3$	$1,73 \pm 0,55$
Diazinona (PI)	7,314	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	$3,81 \pm 0,40$
Dissulfoton	7,387	$C_8H_{19}O_2PS_3$	$3,31 \pm 0,31$
Dissulfoton sulfona	8,400	$C_8H_{19}O_4PS_3$	$1,87 \pm 0,51$

Segundo valores de coeficientes de partição octanol/água (Kow) obtidos a partir de cálculos teóricos, o sulfóxido tem o menor valor de Kow, seguido por sulfona e dissulfoton, sendo, portanto, esperado que a ordem de retenção dos analitos na coluna apolar fosse: sulfóxido, sulfona e dissulfoton. Entretanto, o dissulfoton possui um menor ponto de ebulição e maior pressão de vapor, seguido de sulfóxido e sulfona. Sendo, portanto, que a combinações de características físico-químicas, justifica a ordem de retenção dos analitos na coluna.

Não foram observados picos de interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos. Porém, alguns picos de concomitantes apresentaram resposta bastante intensa no detector, especialmente nos tempos de retenção 7,6 (cafeína); 10,1 e 10,4 minutos (ácidos orgânicos). Como alternativa para contornar esse problema, sem ocasionar desgaste do equipamento na análise, o filamento da fonte de ionização do espectrômetro de massas foi desligado nos tempos de 7,5 a 7,8 e após 9 minutos. Esse procedimento não prejudicou a análise dos compostos de interesse, mas é uma forma de preservar o desgaste do filamento da fonte na ionização de compostos abundantes, mas que não são de interesse.

### 5.1.3 Escolha dos íons a serem monitorados

A partir dos resultados obtidos nos primeiros testes, foram escolhidas as razões m/z para serem monitoradas para cada analito (de acordo com a *MS Search Library*). Os espectros de massas esperados, assim como as fórmulas estruturais de cada um dos analitos, encontram-se na Figura 5. Na Tabela 7, são apresentadas as razões m/z que foram monitoradas, os íons escolhidos para a quantificação estão apresentados em destaque, sendo que estes íons foram escolhidos por apresentarem maior valor da razão de S/N (sinal/ruído):

TABELA 7 Parâmetros utilizados no método cromatográfico

Analito	Razões m/z monitoradas	Tempo de retenção	Janela (min)
Dissulfoton sulfóxido	<b>97</b> , 153 e 212	5,037	4,90 - 5,10
Diazinona	137, <b>179</b> e 304	7,314	7,25 - 7,45
Dissulfoton	<b>88</b> , 142, 274	7,387	7,25 - 7,45
Dissulfoton sulfona	125, <b>153</b> e 213	8,400	8,35 - 8,55

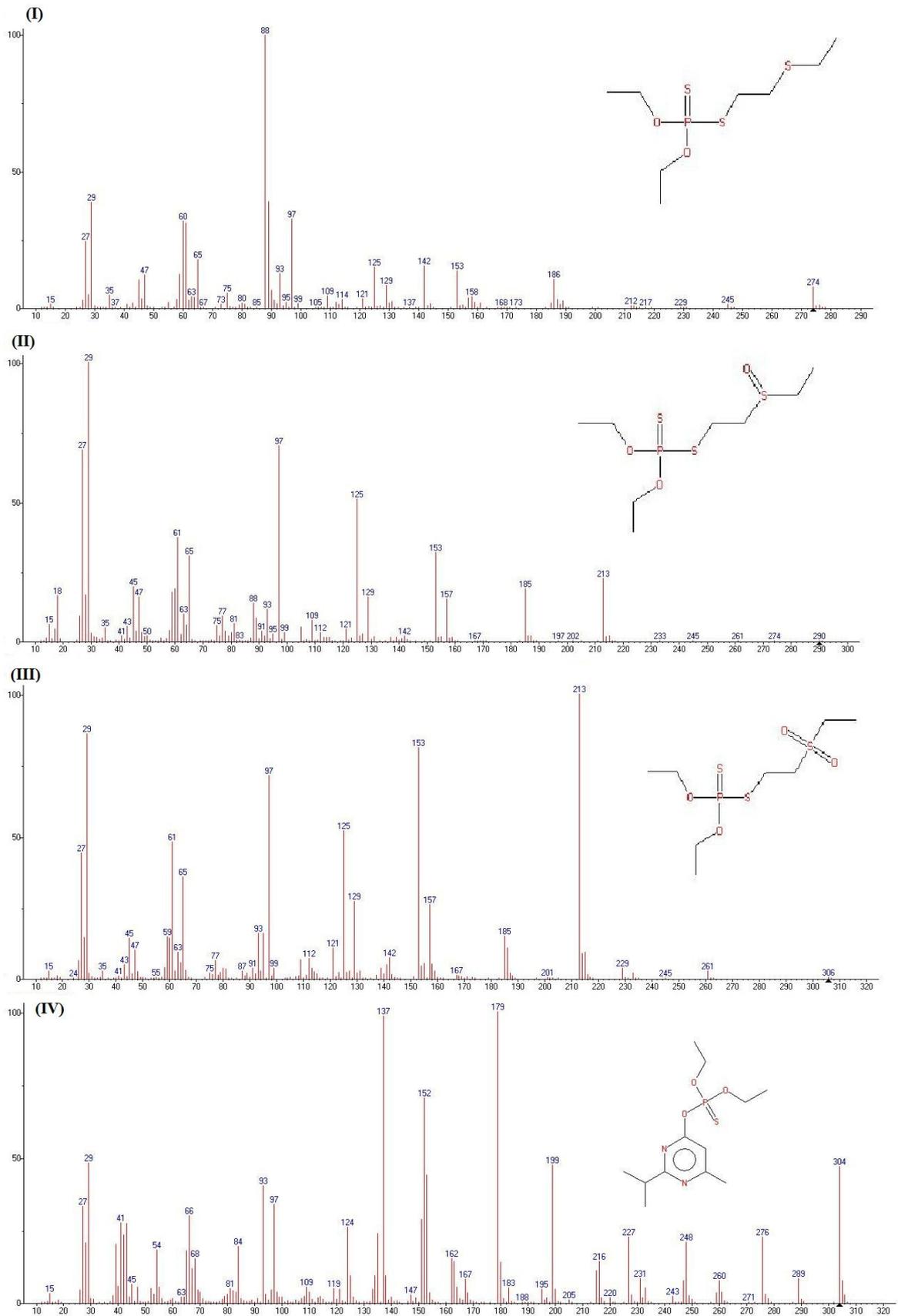


Figura 5. Espectros de massas obtidos por EI a 70 eV para: (I) dissulfoton; (II) sulfóxido; (III) sulfona e (IV) diazinona.

Fonte: MS Search Library, 2010.

## 5.2 Otimização da etapa de extração

### 5.2.1 Adição de água a amostra

Houve a comparação entre a amostra preparada com e sem a adição de água, conforme descrito no item 4.3.1.1. Segundo Anastassiades et al., é recomendada a adição de água antes da extração em amostras secas. Entretanto, no presente teste, não houve separação entre as fases na amostra em que havia sido adicionada a água, mesmo após a centrifugação. Posteriormente, repetiu-se o teste triplicando a quantidade de sal, para tentar promover a partição, entretanto, mesmo após essa tentativa não foi obtido sucesso para separação das fases. Assim, após as tentativas, decidiu-se não adicionar água à amostra nas etapas posteriores de otimização do método.

### 5.2.2 Solvente de extração

Conforme descrito no item 4.3.1.2, nos ensaios para a escolha do solvente de extração, foi observado apenas o aspecto visual dos extratos. Devido à presença de coextrativos da amostra, tais como corantes, o extrato antes da etapa de limpeza apresenta-se com uma coloração marrom escura muito intensa, de difícil remoção.

Observando os extratos visualmente, apenas o extrato obtido utilizando-se acetonitrila teve um aspecto satisfatoriamente limpo (Figura 6), para ser injetado no sistema de GC-MS, sendo, portanto, esse o solvente escolhido para as etapas posteriores.

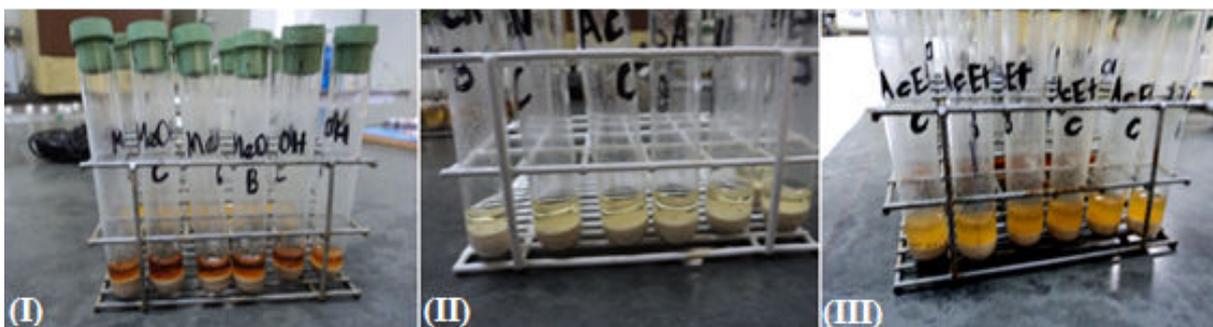


Figura 6. Comparação dos extratos obtidos utilizando-se como solvente de extração: metanol (I), acetonitrila (II) e acetato de etila (III).

### 5.2.3 Escolha do sal / tampão

Os experimentos nessa etapa foram feitos conforme descrito no item 4.3.1.3, sendo testados os sais  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{NaCl}$  além dos tampões  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Observando as respostas obtidas nos ensaios, na Figura 7 e na Tabela 8, pode-se concluir que os melhores resultados foram obtidos utilizando o tampão  $\text{HAc}/\text{NaAc}$ , que parece funcionar como um agente protetor, impedindo a degradação da sulfona na coluna.

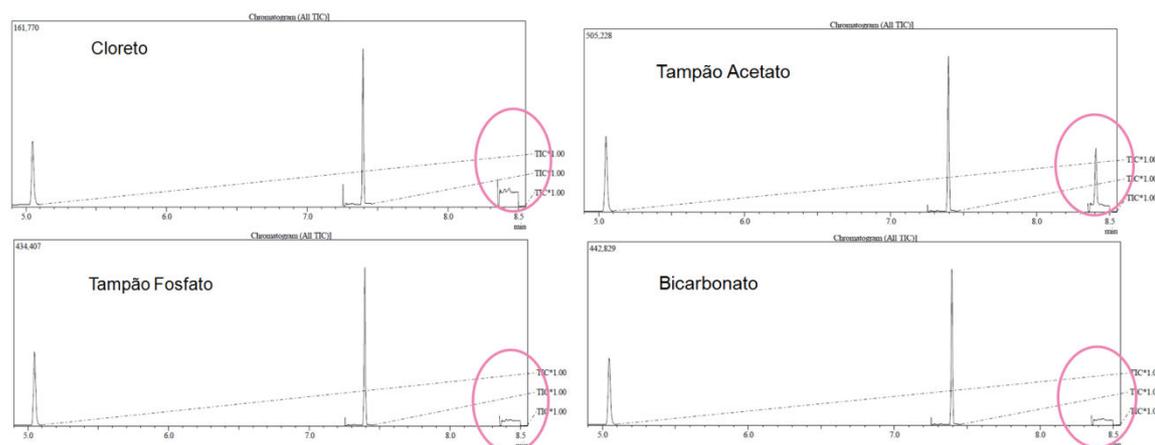


Figura 7 Comparação dos cromatogramas obtidos com a utilização de diferentes sais e tampões. Destaque para a região do cromatograma onde ocorre a eluição do pico do dissulfoton sulfona, o qual é dependente do tipo de sal ou tampão utilizado.

TABELA 8 Valores de áreas obtidos para diferentes sais e tampões.

	Sulfóxido	Dissulfoton	Sulfona
$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$	37855	114601	540
$\text{NaCl}$	35174	117036	338
$\text{NaAc}/\text{HAc}$	51236	131819	20424
$\text{NaHCO}_3$	35716	106169	562

Esse passo opcional de tamponar o meio na etapa de extração é especialmente útil para os praguicidas que são instáveis a variações de pH e para os analitos que geram cauda ou se ligam à coluna capilar de GC.

### 5.2.4 Planejamento Fatorial para quantidade de amostra e sais

Conforme descrito no item 4.3.1.4, após a escolha do tampão adequado às análises, foi feita uma otimização da quantidade de amostra e de tampão a ser empregada nas análises.

Para isso, foi feito um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central, conforme descrito na Tabela 9.

A escolha das quantidades a serem usadas no planejamento fatorial baseou-se na experiência inicial obtida com 2,0 g de amostra. Não foram testados valores maiores que 3,0 g de amostra, pois a análise se tornaria inviável devido a grande absorção de solvente pela matriz.

TABELA 9 Planejamento fatorial e respostas (áreas dos picos) obtidas para os analitos.

Fatores	Níveis					
	Sigla	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)		
Quantidade de amostra (g)	QA	2,0	2,5	3,0		
Quantidade de sal MgSO <sub>4</sub> (mg)	QS	0,2	0,7	1,2		
Quantidade de tampão (mmol)	QT	4,7	7,45	10,2		
Experimento	QA	QS	QT	R. Sulfóxido	R. Dissulfoton	R. Sulfona
1	-	-	-	9575	106728	15092
2	+	-	-	13062	167778	25650
3	-	+	-	8988	109569	20266
4	+	+	-	13142	175723	27445
5	-	-	+	9090	104788	20389
6	+	-	+	13628	166235	27874
7	-	+	+	8455	106712	16792
8	+	+	+	13638	194949	22508
9	0	0	0	10017	129514	14514
10	0	0	0	10417	137487	16493
11	0	0	0	10162	135487	14352

A significância dos efeitos relacionados aos fatores estudados foi avaliada através da Análise de Variância (ANOVA) e graficamente representada pelo Diagrama de Pareto (Figura 8). Pelo Diagrama de Pareto, a significância dos fatores ocorre quando o comprimento das barras horizontais é superior a linha vertical dada por  $p = 0,05$ .

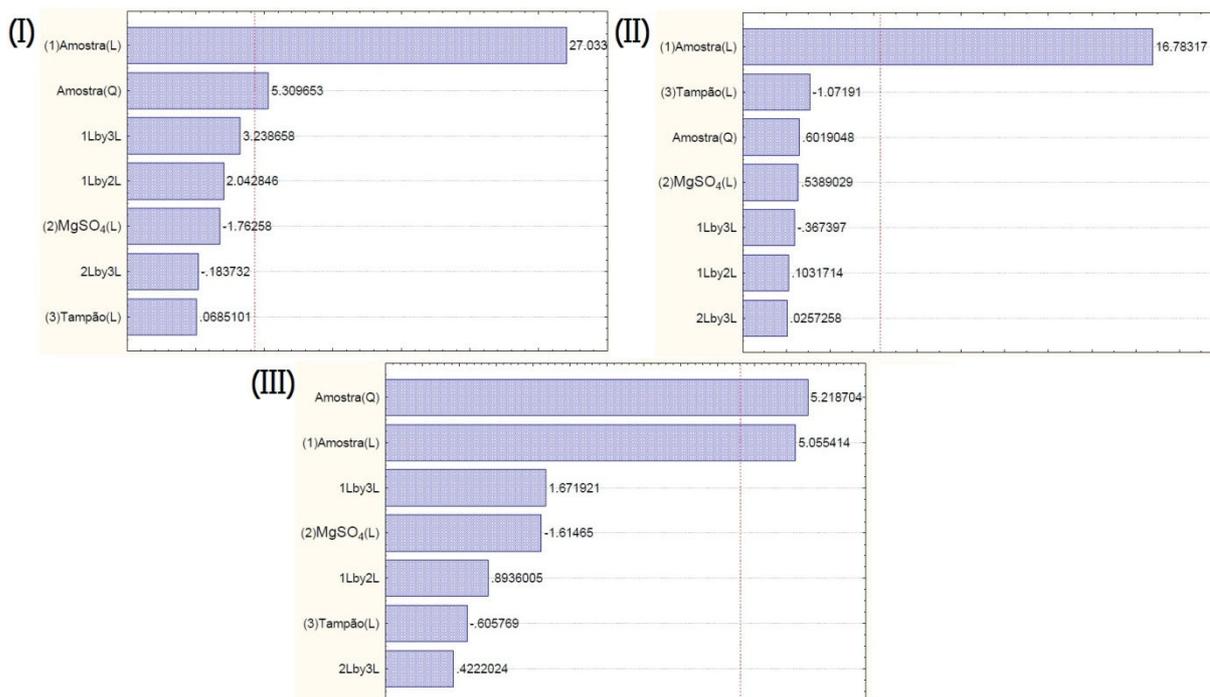


Figura 8 Gráfico de Pareto dos efeitos para os fatores estudados para os analitos: (I) dissulfoto sulfóxido; (II) dissulfoto; e (III) dissulfoto sulfona. Nível de confiança a 95%.

Pela análise do Diagrama de Pareto conclui-se que o fator quantidade de amostra (QA) foi significativo para todos os analitos, tendo um efeito positivo. Isto acontece, pois um aumento de amostra representa uma maior massa dos analitos presente no extrato que foi injetado no sistema cromatográfico.

Devido a essa resposta obtida, a otimização das quantidades de MgSO<sub>4</sub> e de tampão acetato (combinação entre HAc e NaAc), foi feita através da construção de superfície de resposta 2D, mantendo-se constante a quantidade de amostra em 3,0 g.

Os gráficos de superfície de resposta obtidos encontram-se na Figura 9.

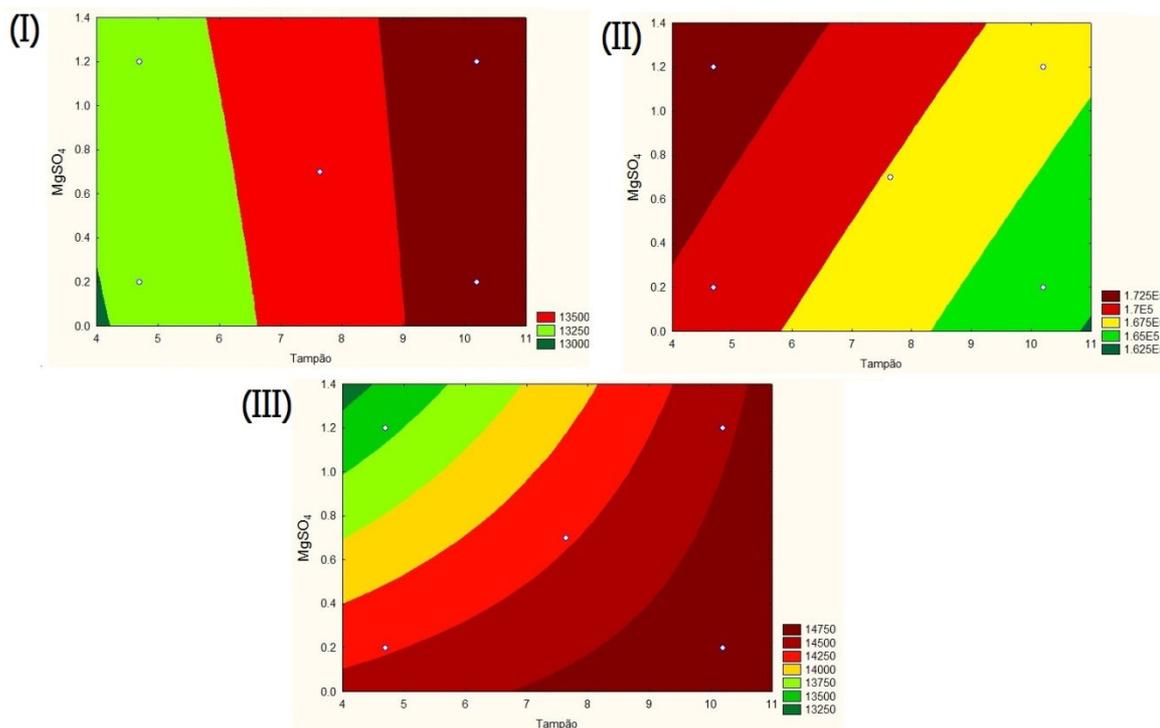


Figura 9 Superfície de resposta obtida para a combinação dos efeitos quantidades de MgSO<sub>4</sub> e de tampão acetato, mantendo-se constante a quantidade de amostra para os analitos: (I) dissulfoton sulfóxido; (II) dissulfoton; e (III) dissulfoton sulfona. Nível de confiança a 95%.

Observa-se nos gráficos de superfície de resposta que uma maior quantidade de tampão melhora a resposta de dissulfoton sulfona e dissulfoton sulfóxido, mas piora a área do pico de dissulfoton. Já a quantidade de MgSO<sub>4</sub> na maior concentração do tampão é indiferente para sulfóxido; no caso do dissulfoton, uma maior quantidade de MgSO<sub>4</sub> garante uma melhor resposta cromatográfica; e para a sulfona um aumento de MgSO<sub>4</sub> proporciona um efeito negativo na resposta.

Como os produtos de degradação fornecem as respostas mais críticas a serem melhoradas, isto é, esses analitos apresentam valores de área menos significativos e, portanto, há uma maior necessidade de otimização nas suas respostas, a condição considerada adequada foi aquela onde houve um aumento de área mais significativo para sulfóxido e sulfona.

Observando a Figura 9, conclui-se que uma menor quantidade de MgSO<sub>4</sub>, garante a melhor resposta dos analitos (sulfona e sulfóxido), enquanto um aumento na quantidade de tampão proporciona também um aumento na área dos picos dos produtos do dissulfoton. Isto provavelmente ocorre devido ao efeito de proteção garantido pelo ácido acético, que impede a interação dos analitos com a coluna cromatográfica e com os componentes da amostra.

As condições adequadas para as análises posteriores, obtidas de acordo com esse teste foram de 3 gramas de amostra 10,2 mmol de tampão e 200 mg de sulfato de magnésio anidro.

### 5.3 Otimização da etapa de limpeza

Foram feitos os experimentos, conforme descrito no item 4.3.2, sendo possível, desse modo, a escolha do sorvente ou combinação de sorventes mais eficiente na limpeza e na recuperação dos analitos. Devido à grande quantidade de corantes e outras impurezas na matriz é importante haver uma limpeza eficiente do extrato antes de injetá-lo no sistema cromatográfico, para manter a coluna cromatográfica limpa e o extrato livre de interferentes.

Esse experimento foi feito a fim de verificar os sorventes mais eficientes para efetuar a limpeza dos extratos sem prejudicar a recuperação dos analitos. Os valores de recuperação de cada analito nos ensaios encontram-se na Tabela 10.

TABELA 10 Valores de recuperação obtidos com diferentes sorventes.

Sorvente	Sulfóxido	Dissulfoton	Sulfona
PSA (200 mg)	100,8%	99,9%	107,3%
Florisil (400 mg)	98,0%	98,7%	109,0%
C18 (400 mg)	106,0%	98,6%	114,5%

Observando-se os valores de recuperação obtidos, conclui-se que nenhum dos analitos apresentou perdas significativas, ao se utilizar quaisquer dos solventes na etapa de limpeza do extrato. Os extratos ainda apresentaram, visualmente, o mesmo aspecto quanto à limpeza, exceto aquele que foi limpo apenas com  $MgSO_4$ , que devido ao aspecto visual, muito sujo, não foi injetado no sistema cromatográfico.

A partir destes resultados, testou-se a combinação entre os sorventes que se apresentaram mais eficientes na limpeza dos extratos. Na Tabela 11 estão descritos os ensaios realizados, assim como os valores de recuperação obtidos para cada um dos analitos.

Observando visualmente o aspecto dos extratos, a limpeza mais eficiente foi obtida com a combinação utilizada no teste C (200 mg de florisil e 100 mg de PSA). Como, além disso, nesse teste obteve-se a melhor recuperação, esta combinação foi escolhida para os experimentos posteriores.

TABELA 11 Valores de recuperação obtidos com diferentes combinações de sorventes

Teste de clean-up	Recuperação	Recuperação	Recuperação
	Sulfóxido (%)	Dissulfoton (%)	Sulfona (%)
200 mg de C18 e 200 mg de florisil	99,3%	104,2%	141,3%
200 mg de C18 e 100 mg de PSA	69,8%	101,4%	110,6%
200 mg de florisil e 100 mg de PSA	95,5%	99,4%	106,6%
135 mg de C18, 135 mg de florisil e 66 mg de PSA	70,8%	101,9%	108,6%

Por fim, foi feito um teste para verificar a diferença na limpeza do extrato utilizando-se o  $MgSO_4$ , juntamente com os sorventes escolhidos a partir dos testes anteriores, nas mesmas quantidades testadas. Os sorventes utilizados, suas respectivas quantidades, e os valores de recuperação obtidos encontram-se na Tabela 12.

TABELA 12 Combinações de sorventes utilizadas e recuperações obtidas.

Teste de clean-up	Sulfóxido (%)	Dissulfoton (%)	Sulfona (%)
200 mg de florisil e 100 mg de PSA	95,5%	99,4%	106,6%
200 mg de florisil, 400 mg de $MgSO_4$ e 100 mg de PSA	107,3%	99,7%	121,4%

Observando o aspecto visual dos extratos, ao adicionar-se  $MgSO_4$  aos outros sorventes, houve uma significativa melhora no aspecto visual do extrato, e como não houve variações significativas na recuperação, a combinação entre os sorventes florisil, PSA e  $MgSO_4$  foi escolhida para a limpeza da amostra.

#### 5.4 Protetores de analitos

Conforme descrito no item 4.4, nessa etapa dos testes foram incluídos outros analitos organofosforados – malationa, pirimifós e clorpirifós. Os espectros de massa esperados para os analitos encontram-se na Figura 10.

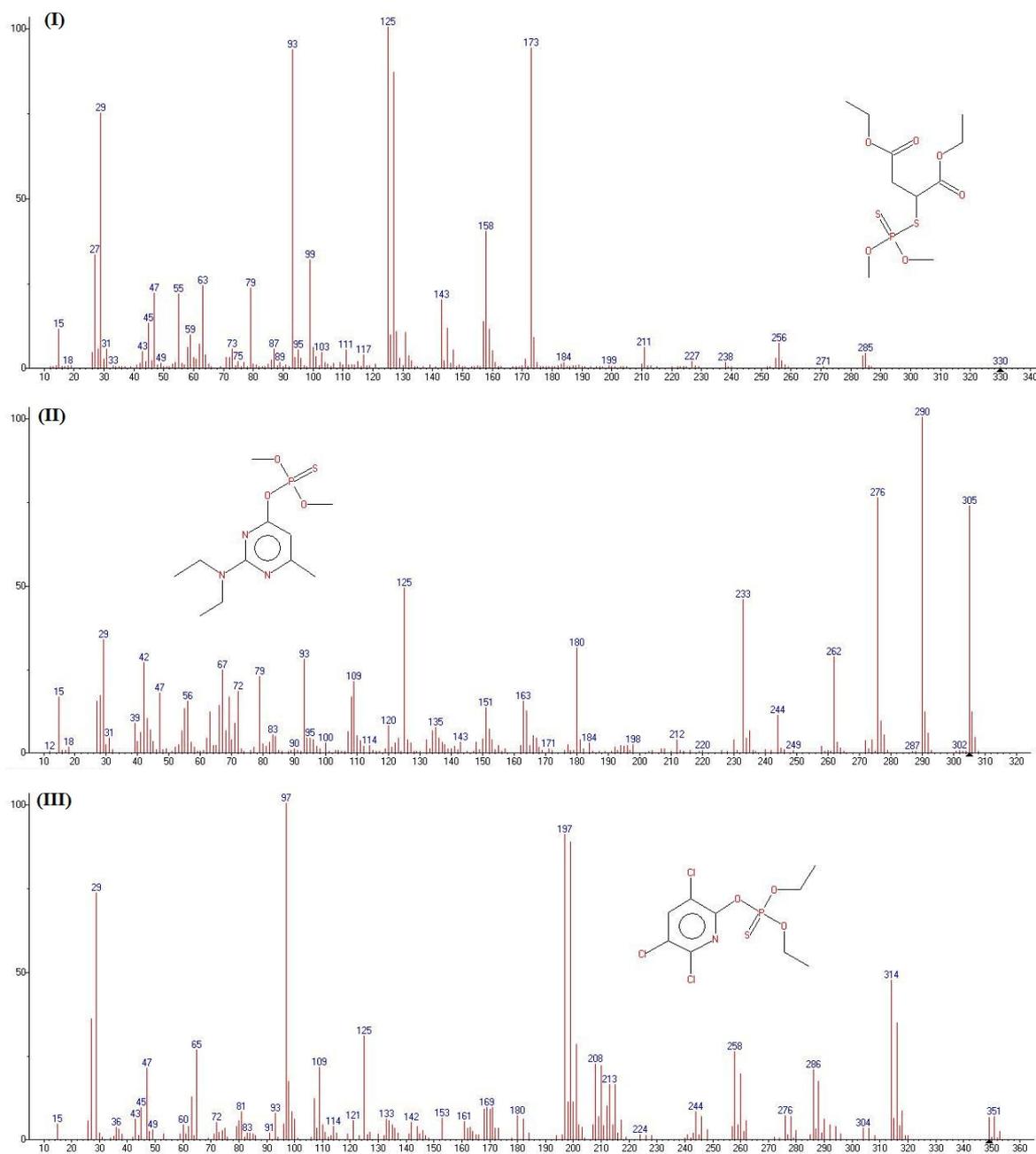


Figura 10 Espectros de massas obtidos por EI a 70 eV para: (I) malation; (II) pirimifós; (III) clorpirifós.  
 Fonte: MS Search Library, 2010.

Como houve alteração no controle da temperatura da coluna, os tempos de retenção foram alterados. Os valores de razões  $m/z$  dos analitos, escolhidos para ser monitorados, de acordo com os espectros de massas obtidos; assim como os valores dos coeficientes de partição e tempos de retenção obtidos encontram-se na Tabela 13. Os valores de  $m/z$ , escolhidos para a quantificação, isto é, aqueles que apresentaram maiores valores de S/N, estão em destaque.

TABELA 13. Valor do coeficiente de partição, massas monitoradas e tempos de retenção obtidos para diferentes analitos.

Analito	Valor de Log P (Kow)	Massas monitoradas	Tempo de retenção	Janela (min)
Dissulfoton sulfóxido	1,73 ± 0,55	97, 153 e <b>212</b>	5,099 minutos	4,70 a 6,00
Diazinona	3,81 ± 0,40	137, <b>179</b> e 304	7,994 minutos	7,60 e 8,35
Dissulfoton	3,31 ± 0,31	88, 186 e <b>274</b>	8,092 minutos	7,60 e 8,35
Pirimifós	4,00 ± 0,44	276, 290 e <b>305</b>	8,763 minutos	8,48 e 9,50
Malationa	2,93 ± 0,35	93, 125 e <b>173</b>	8,854 minutos	8,48 e 9,50
Clorpirifós	4,77 ± 0,40	97, 197 e <b>314</b>	8,997 minutos	8,48 e 9,50
Dissulfoton sulfona	1,87 ± 0,51	125, <b>153</b> e 213	9,787 minutos	9,50 e 10,20

#### 5.4.1 Teste da adição de protetores de analitos

Foi realizado um teste de adição de substâncias chamadas “protetores de analitos”, que possuem a característica de evitar perdas de analitos no sistema cromatográfico, além de aumentar a resolução dos picos e diminuir efeitos de matriz. O princípio se deve a alta afinidade dessas substâncias com os sítios ativos da coluna cromatográfica, tais como os grupos silanóis.

Foi notável a diferença na resposta dos analitos nos extratos onde foram adicionados protetores de analitos, se comparados aos extratos sem a sua adição, uma diferença ainda mais notável foi observada na resposta dos padrões em acetonitrila pura.

Os valores de área obtidos para o extrato fortificado assim como para os padrões encontram-se na Tabela 14.

TABELA 14 Valores de áreas obtidos utilizando-se diferentes protetores de analitos.

		Sulfóxido	Diazinona	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
Arabinose	Áreas em solvente	19198	10527	58768	19015	21165	7107	10501
	Áreas em matriz	41622	25218	131807	49550	94994	16916	11595
Sorbitol	Áreas em solvente	23706	14177	78131	26940	27798	9614	17706
	Áreas em matriz	41348	25552	132729	47399	96410	16716	13028
Cafeína	Áreas em solvente	22382	12959	70842	25276	26354	9247	15831
	Áreas em matriz	42134	26692	132824	45638	86998	19678	10687
Frutose	Áreas em solvente	16623	9792	54701	16195	19200	6512	9332
	Áreas em matriz	41942	26123	129490	49286	93430	16801	10739
Xilose	Áreas em solvente	25414	12696	69909	24790	24782	9004	16014
	Áreas em matriz	41028	25572	132175	46702	86307	16778	10773
PEG 300	Áreas em solvente	24547	15806	111506	22748	29633	10544	14388
	Áreas em matriz	43220	25684	146896	44505	91843	16435	12114
Nenhum protetor	Áreas em solvente	15123	9345	52433	15868	18363	6216	8998
	Áreas em matriz	41666	25142	128358	51137	98514	17162	8182

A Tabela 14 mostra a significativa melhora conseguida com a utilização de protetores de analitos para análises multirresiduais, sendo que a melhora nas áreas dos picos cromatográficos é conseguida, principalmente, para analitos de tempos de retenção próximos aos dos protetores.

Observando os valores de áreas, além da resolução dos cromatogramas da Figura 11, que compara respostas obtidas com e sem a utilização de cafeína como protetor de analitos, pode-se concluir que as melhores respostas são conseguidas com a utilização de PEG 300 e cafeína. Um dos motivos para essa melhora pode ser a proximidade dos tempos de retenção dessas substâncias com o da maioria dos analitos estudados e a alta afinidade dos mesmos com a coluna cromatográfica, obtida pela quantidade de elétrons livres nas suas estruturas para realização de ligações de hidrogênio. Já foi provado em estudos anteriores (MASTOVSKÁ et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2003b) que a capacidade de realizar ligações de hidrogênio é um fator muito relevante na escolha de um protetor de analitos.

Foi observada eficiência também na utilização de açúcares, em especial arabinose e frutose, para praticamente todos os analitos, isto se deve aos grupos carbonila, que são altamente reativos e, ao interagir com os componentes da amostra, produzem diversos produtos de degradação, que eluem ao longo do cromatograma, protegendo analitos de diferentes volatilidades (MASTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

A Figura 11 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos nas injeções das soluções padrão em acetonitrila, com e sem a utilização do protetor de analitos que se mostrou mais eficiente na melhora dos parâmetros cromatográficos (resolução, área e altura do pico).

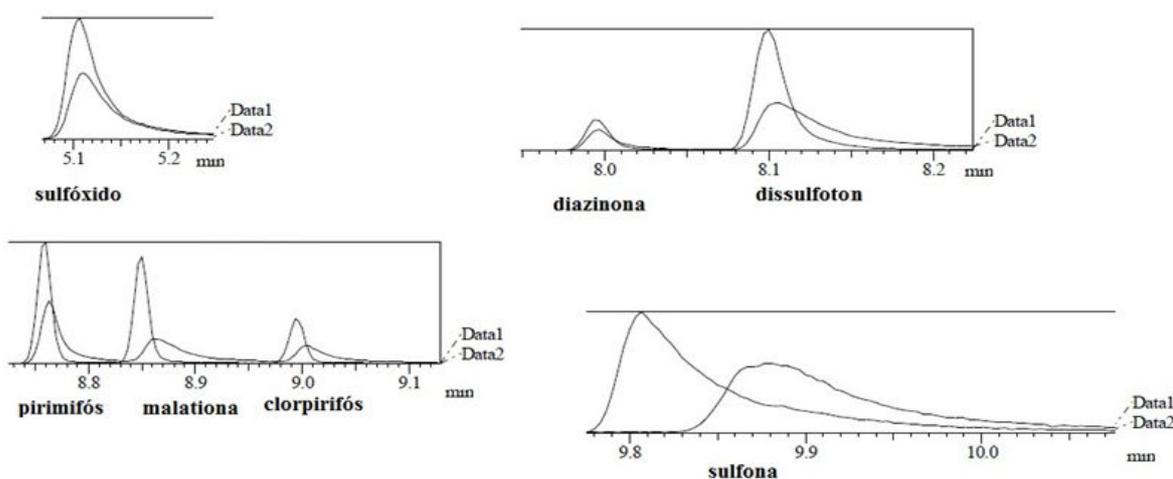


Figura 11 Comparação dos cromatogramas obtidos com e sem a utilização da cafeína como protetor de analitos.

#### 5.4.2 Teste da combinação de protetores

Tabela 15. Valores de áreas, recuperações e desvio padrão obtidos para diferentes combinações dos protetores de analitos.

		Sulfóxido	Diazinona	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona	
PEG 300+	Desvio padrão relativo	2,79%	3,63%	8,89%	3,49%	5,19%	4,01%	7,04%	
	Cafeína	Áreas obtidas	3325	3968	21096	4534	2766	1544	4348
	Recuperação	99,6%	100%	103,8%	80,2%	128,1%	106,5%	97,4%	
PEG 300+	Desvio padrão relativo	0,88%	2,85%	7,18%	3,03%	6,59%	0,89%	13,81%	
	Cafeína + Arabinose	Áreas obtidas	3048	3782	18956	3966	2809	1431	3974
	Recuperação	100,3%	100%	98,8%	71,3%	126,9%	107,8%	93,9%	
PEG 300+	Desvio padrão relativo	3,07%	7,26%	1,13%	2,05%	4,03%	1,17%	16,09%	
	Cafeína + Frutose	Áreas obtidas	3096	3721	18130	3611	2839	1416	3170
	Recuperação	109,0%	100%	99,8%	71,2%	122,8%	108,4%	78,7%	

De acordo com as respostas obtidas, foi feita uma otimização das combinações entre os protetores que se mostraram mais eficientes para melhora de área e altura dos picos além de serem avaliados os seguintes parâmetros de separação cromatográfica: resolução, área e altura dos picos além de recuperação, efeito de matriz e eficiência total do processo. Foram testadas as combinações: PEG e cafeína; PEG, cafeína e arabinose; PEG, cafeína e frutose, na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de cada protetor. Nesse teste foram avaliados os valores de área e altura do pico, resolução, além de recuperação e repetibilidade. Os resultados obtidos no teste de combinação dos protetores encontram-se na Tabela 15.

Observando os valores obtidos na Tabela 15, pode-se concluir que a combinação de protetores que se mostrou mais eficiente foi a de PEG 300 + cafeína, sendo essa escolhida para os testes posteriores. Além disso, a combinação apresentou melhor resolução dos picos, nos cromatogramas da amostra.

Além dos melhores valores de área, recuperação e repetibilidade, é conveniente, em longo prazo, não se utilizarem açúcares como protetores de analitos, pois um uso constante pode acarretar uma “caramelização” do sistema cromatográfico (ANASTASSIADES et al., 2003b).

#### ***5.4.3 Teste da concentração dos protetores de analitos***

Após a escolha da melhor combinação de protetores a ser utilizada, foi otimizada a melhor concentração desses protetores sendo testadas as concentrações de 0,3; 1 e  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  para cada um dos protetores nas amostras de café, sendo avaliados os valores de área, recuperação e efeito de matriz.

Os valores de área, recuperação e efeito matriz obtidos para diferentes concentrações dos protetores encontram-se na Tabela 16.

TABELA 16 Valores de áreas, recuperações e efeito de matriz, obtidos para diferentes concentrações dos protetores de analitos.

		Sulfóxido	Diazinona	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
PEG 300+	Recuperação obtida	105,1%	100%	102,2%	78,0%	101,0%	98,76%	102,09%
Cafeína (0,3 mg.mL <sup>-1</sup> )	Áreas obtidas	36127	34511	100460	57811	35141	17477	17610
	Efeito de matriz	95,6%	90,04%	90,7%	90,2%	112,6%	105,90%	137,29%
PEG 300+	Recuperação obtida	104,5%	100%	98,3%	95,0%	105,5%	101,23%	112,05%
Cafeína (1 mg.mL <sup>-1</sup> )	Áreas obtidas	38149	40143	114747	57524	36900	17527	18998
	Efeito de matriz	98,9%	104,5%	107,0%	99,5%	102,21%	104,80%	112,42%
PEG 300+	Recuperação obtida	95,9%	100%	103,4%	103,2%	100,3%	107,07%	33,39%
Cafeína (5 mg.mL <sup>-1</sup> )	Áreas obtidas	28794	48793	101128	35367	29764	16042	4880
	Efeito de matriz	86,0%	77,1%	84,9%	78,5%	69,9%	90,75%	95,28%

Observando na Tabela 16 os valores de áreas, recuperação e efeito de matriz obtidos no teste, pode-se concluir que as melhores respostas obtidas foram com a concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> dos protetores, sendo, portanto, essa concentração adotada para os testes de validação da metodologia.

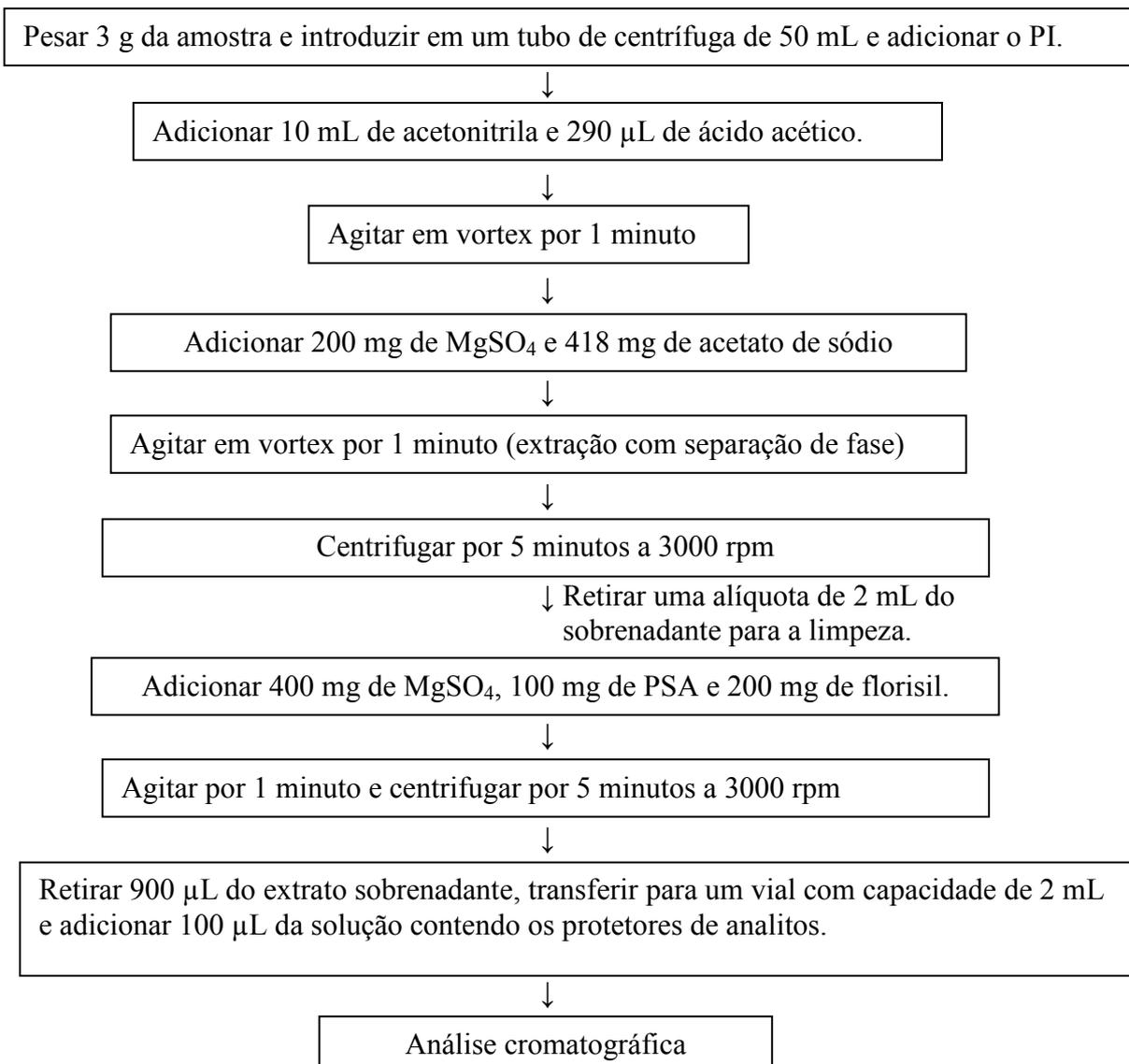
O valor de área de diversos analitos cai quando é utilizada uma maior concentração dos protetores. Uma explicação para esse fenômeno ainda não foi relatada na literatura, todavia dado o comportamento desses compostos como “protetores”, uma eventual explicação seria que uma massa excessiva adicionada ao extrato da amostra pode gerar uma competição e/ou discriminação dos analitos no processo de divisão de fluxo para a entrada da coluna. Outra hipótese seria a coeluição desses compostos com alguns dos analitos, prejudicando a sua ionização na fonte do GC-MS. De qualquer maneira verificou-se que a quantidade de 1 mg mL<sup>-1</sup> de extrato foi suficiente para uma adequada análise, evitando-se assim uma sobrecarga desnecessária do sistema GC-MS.

Pode-se observar ainda que o fenômeno de diminuição de efeito de matriz devido à adição dos protetores é muito significativo. Conforme se aumenta a concentração dos protetores de analitos na solução, o valor de efeito de matriz diminui. A concentração de 0,3 mg mL<sup>-1</sup> parece não ser suficiente para uma diminuição satisfatória no efeito de matriz em alguns dos analitos, isto é, ainda há um efeito positivo de matriz. Já na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> dos protetores, há um efeito de matriz negativo, o que também não é adequado em uma análise cromatográfica, sendo mais correto, por isso, a escolha da concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Após a otimização das etapas de extração e limpeza do método de QuEChERS, além da avaliação de diferentes tipos e quantidades de protetores, obteve-se um método otimizado a ser utilizado nas etapas de validação e aplicação do método.

No Fluxograma 3 está apresentado o método de QuEChERS otimizado conforme as descrições anteriores.

Fluxograma 3 Método de QuEChERS otimizado para a análise de organofosforados em café torrado e moído.



## 5.5 Validação do método de QuEChERS

### 5.5.1 Seletividade / Especificidade

A Figura 12 apresenta um cromatograma obtido por GC-MS a 70 eV de um extrato "branco" do café torrado, onde pode ser observada a ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados. Sendo possível, assim, a utilização da técnica para a validação do método analítico.

Já a Figura 13 apresenta um cromatograma obtido nas mesmas condições, a partir da extração de uma amostra de café torrado fortificada com uma solução dos analitos estudados.

Pode-se observar que a separação ocorre de forma seletiva, devido à utilização do espectrômetro de massas com monitoramento de razões de  $m/z$  específicas para cada um dos analitos.

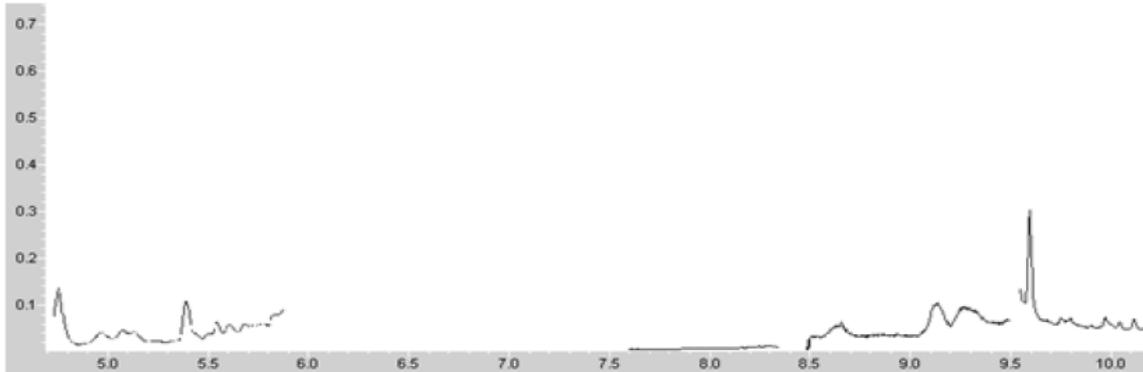


Figura 12 Cromatograma obtido por GC-MS a 70 eV, para o extrato "branco" do café torrado, obtido nas condições cromatográficas descritas, no modo SIM, monitorando somente os íons de quantificação.

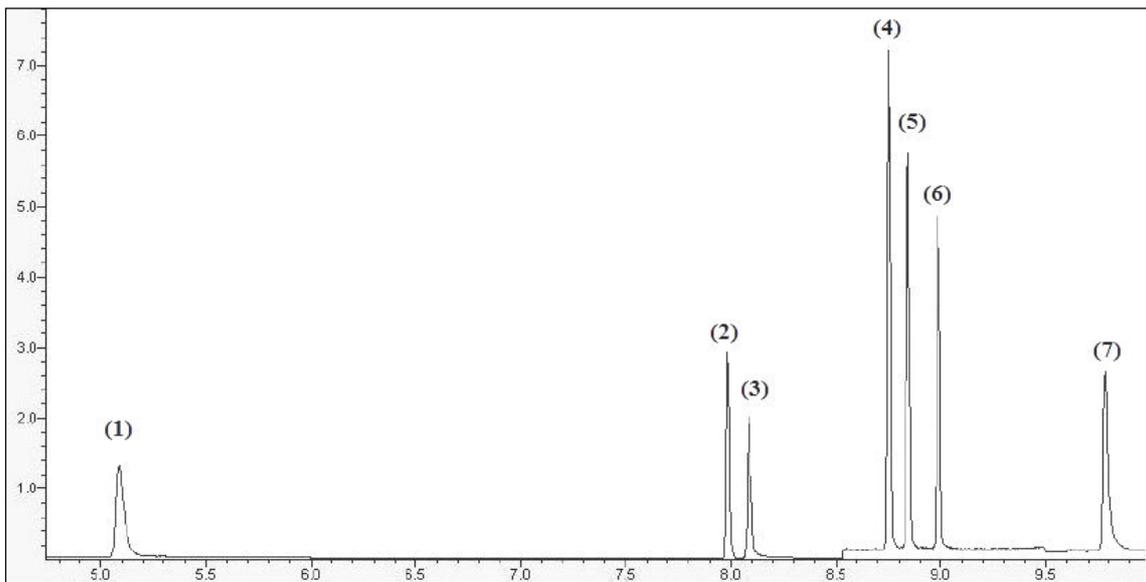


Figura 13 Cromatograma de uma solução de praguicidas e protetores de analitos, de análise no modo SIM, utilizando-se apenas os íons utilizados na quantificação, para os analitos: (1) dissulfoton sulfóxido, (2) diazinona, (3) dissulfoton, (4) pirimifós, (5) malationa, (6) clorpirifós e (7) dissulfoton sulfona.

### 5.5.2 Curva analítica

As curvas analíticas foram construídas a partir do LQ, até 40 vezes o seu valor. Os valores de LQ, as equações de reta obtidas, os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e intervalos lineares para cada praguicida estão representados na Tabela 17.

TABELA 17 Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os praguicidas no extrato de café torrado obtido pelo método de QuEChERS e detecção por GC-MS

Praguicida	Equação da reta $y = ax + b$	$r^2$	Intervalo linear (amostra)
Dissulfoton sulfóxido	$y = 0,0009x + 0,2072$	0,989	200- 8000 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Dissulfoton	$y = 0,0063x - 0,0627$	1,000	40- 1600 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Malationa	$y = 0,003x - 0,1332$	0,997	200-8000 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Pirimifós	$y = 0,0141x + 1,1354$	0,987	60-2400 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Clorpirifós	$y = 0,0094x + 0,3509$	0,998	120-4800 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Dissulfoton sulfona	$y = 0,0015x + 0,5941$	0,978	200-8000 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Observando a Tabela 17 pode-se concluir que todos os analitos mostraram valores de linearidade adequados, isto é, apresentaram respostas proporcionais a concentração.

### 5.5.3 Determinação dos valores de LD e LQ

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação do método estão demonstrados na Tabela 18 para os praguicidas do presente estudo. As soluções foram preparadas a partir das amostras fortificadas nas concentrações descritas.

Os valores foram obtidos a partir da relação Sinal: Ruído, sendo o LD um valor de 1:3 e o LQ um valor de 1:10, no mínimo, além de valores adequados de precisão e exatidão.

TABELA 18 Valores de LD e LQ, em extrato da matriz.

Praguicida	Valor de LD <sub>a</sub>	Valor de LQ <sub>a</sub>
Dissulfoton sulfóxido	50 $\text{ng g}^{-1}$	200 $\text{ng g}^{-1}$
Dissulfoton	10 $\text{ng g}^{-1}$	40 $\text{ng g}^{-1}$
Malationa	50 $\text{ng g}^{-1}$	200 $\text{ng g}^{-1}$
Pirimifós	15 $\text{ng g}^{-1}$	60 $\text{ng g}^{-1}$
Clorpirifós	30 $\text{ng g}^{-1}$	120 $\text{ng g}^{-1}$
Dissulfoton sulfona	50 $\text{ng g}^{-1}$	200 $\text{ng g}^{-1}$

Conforme demonstrado na Tabela 18, os praguicidas dissulfoton, pirimifós e clorpirifós apresentaram baixos limites de detecção e quantificação, demonstrando que estes praguicidas apresentam boas respostas no sistema de GC-MS, quando comparado aos

produtos de degradação do dissulfoton (sulfóxido e sulfona). Os produtos de degradação apresentaram menores sinais analíticos no detector, apesar de possuírem valores de recuperação bem próximos. Essa diferença deve-se à estrutura desses compostos, a qual lhes garante características, tais como: maior polaridade e eletronegatividade o que dificulta a ionização no equipamento de GC-MS utilizado. Por sua vez, a malationa apresentou baixo sinal analítico devido ao ruído da linha de base obtido com o seu íon de quantificação.

Estes limites de detecção e quantificação podem ser considerados satisfatórios, especialmente devido à complexidade da matriz apresentada. Baixos limites foram conseguidos apesar de o método apresentado não possui pré concentração, devido a sensibilidade da técnica de GC-MS. Na legislação brasileira não são apresentados limites de resíduos para amostras de café torrado.

#### 5.5.4 Ensaios para avaliação precisão (repetitividade e precisão intermediária)

As Tabelas 19 e 20 apresentam a precisão do método em dois níveis: repetitividade ou precisão intradia ( $RSD_a$ ) e precisão intermediária ou interdias ( $RSD_b$ ).

TABELA 19 Valores de coeficientes de variação ( $RSD_a$ %) obtidos nos testes de repetitividade

Nível de fortificação	Sulfóxido	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
Ponto 1	14,8%	7,1%	8,6%	9,0%	5,8%	2,0%
Ponto 2	0,9%	3,0%	7,4%	5,0%	1,4%	6,3%
Ponto 3	3,8%	3,7%	6,9%	5,8%	6,1%	3,4%
Ponto 4	4,1%	6,2%	6,2%	7,0%	3,3%	3,0%
Ponto 5	4,0%	4,0%	8,3%	10,3%	7,3%	8,3%

TABELA 20 Valores de coeficientes de variação ( $RSD_b$ %) obtidos nos testes de precisão intermediária

Nível de fortificação	Sulfóxido	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
Ponto 1	17,8%	7,6%	4,2%	9,7%	19,9%	20,1%
Ponto 3	14,5%	0,4%	1,2%	1,1%	4,0%	15,3%
Ponto 5	11,8%	0,8%	16,1%	10,5%	12,6%	17,5%

Como pode ser verificado nestas tabelas os valores de repetitividade e precisão intermediária variaram entre 0,9% - 14,8% e 0,4% - 20,1%, respectivamente. São recomendados valores de  $RSD \leq 20\%$  (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2007), entretanto aceita-se níveis maiores de 20% em alguns casos de matrizes complexas (como de alimentos)

a níveis de traços (ppb). Estes valores são considerados adequados, especialmente se for levada em conta a complexidade da matriz estudada.

### 5.5.5 Ensaio de Recuperação

Na Tabela 21 estão apresentados os valores de recuperação obtidos com as fortificações da amostra em diferentes níveis de concentração, para os diferentes praguicidas organofosforados, conforme cálculo descrito na Tabela 5.

TABELA 21 Percentuais de recuperação obtidos para o método de QuEChERS em café torrado, utilizando detecção por GC-MS.

Fortificação	Sulfóxido	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
Ponto 1	110,8 %	103,6%	86,4%	132,9%	101,7%	83,6%
Ponto 3	114,4%	102,2%	98,3%	124,5%	107,7%	81,7%
Ponto 5	107,2%	100,6%	100,4%	112,9%	102,8%	87,8%

Os valores de recuperação variaram entre 81,7% e 132,9%, sendo este último valor fora da recomendação especificada para a amostra, estando em um nível mais alto, foi feito então um teste F para comparar se havia diferença significativa entre os extratos da amostra contaminados antes e após a extração, sendo que os valores de F obtidos para todos os analitos não foram significativos, isto é,  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$  ( $n=4$ ) estando, desta forma, de acordo com as recomendações -  $F_{\text{calculado}} (0,08 - 3,40) < F_{\text{tabelado}} (4,26)$ .

Os altos valores de recuperação que, normalmente, são obtidos para o método de QuEChERS, podem ser explicados pelo maior tempo de interação entre os analitos e os componentes da matriz. Dessa forma, os parâmetros citados apresentam-se dentro do intervalo recomendado, sendo, portanto, um método em acordo com as recomendações.

### 5.5.6 Teste de Robustez (Youden)

Os resultados das análises realizadas no ensaio de robustez foram utilizados para calcular o efeito de cada variável (diferença entre a média dos resultados das 4 análises com letra maiúscula e a média dos resultados das 4 análises com letra minúscula), bem como o desvio padrão relativo entre os 8 resultados. Valores de efeito maior que o desvio padrão multiplicado pela raiz de dois ( $s*\sqrt{2}$ ) são considerados significativos. Observando a Tabela 22, pode-se concluir que nenhum efeito foi maior do que o critério  $s*\sqrt{2}$ , isto é, nenhum dos

fatores testados influencia significativamente a resposta analítica. A partir desses resultados pode-se concluir que o método é robusto para todas as variáveis consideradas no domínio experimental utilizado.

TABELA 22 Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner.

	sulfóxido	dissulfoton	pirimifós	malationa	clorpirifós	sulfona
Tempo 1ª agitação	11,65%	7,36%	7,62%	10,82%	9,54%	7,41%
Velocidade 1ª centrifugação	-10,04%	-2,95%	-7,33%	-10,18%	-8,81%	-12,31%
Tempo 1ª centrifugação	4,62%	5,64%	6,36%	5,49%	4,30%	-1,99%
Tempo 2ª agitação	-0,89%	-4,56%	-1,07%	-3,60%	-2,82%	-5,59%
Concentração protetores	11,59%	7,06%	6,25%	4,49%	6,81%	8,33%
Tempo 2ª centrifugação	15,31%	4,31%	2,83%	11,91%	10,71%	5,77%
Marca do solvente	-10,03%	-8,09%	-7,73%	-10,27%	-8,19%	-7,93%
$s * \sqrt{2}$	20,40%	11,94%	12,20%	17,42%	15,55%	15,25%

### 5.5.7 Efeito de matriz

Conforme citado no item 2.5, o efeito matriz é um fenômeno conhecido por traduzir de forma muitas vezes errônea, as reais concentrações dos analitos em determinada matriz. Para diminuição do efeito de matriz, no presente trabalho, foram empregadas substâncias chamadas de protetores de analitos, conforme descrito no item 5.4.

O efeito matriz pode sofrer variações de acordo com a amostra e condições dos equipamentos utilizados, portanto deve ser avaliada constantemente.

A Tabela 23 apresenta comparação entre as respostas obtidas a partir de diferentes níveis de concentração dos analitos em soluções de extrato de amostra fortificada e de soluções preparadas em solvente. Os cálculos foram feitos conforme descrito na Tabela 5.

TABELA 23 Valores de efeito matriz nas respostas dos praguicidas preparadas em solvente e no extrato da matriz de café torrado

Efeito de matriz	Sulfóxido	Dissulfoton	Pirimifós	Malationa	Clorpirifós	Sulfona
Ponto 1	99,8%	125,6%	97,1%	131,8%	99,9%	112,6%
Ponto 2	88,5%	93,1%	93,6%	85,0%	101,2%	99,8%
Ponto 3	129,1%	101,2%	113,6%	94,4%	100,7%	82,6%
Ponto 4	114,4%	97,1%	105,4%	95,3%	98,4%	85,6%
Ponto 5	113,7%	101,2%	108,5%	105,0%	104,7%	96,6%

Observando esta tabela pode-se concluir que o efeito de matriz foi mínimo, o que pode ser explicado especialmente devido à utilização de protetores de analitos. Ainda assim é recomendada a utilização de uma curva analítica preparada no extrato da matriz, para, com isso, evitar resultados errôneos.

#### **5.5.8 Eficiência total do método**

Os gráficos analíticos da Figura 14 representam a comparação das respostas obtidas a partir das soluções em solvente e daquelas em amostras fortificadas. Como pode ser observado o método apresentou valores de eficiência total adequados. Estes valores obtidos, bem próximos de 100%, podem ser explicados pela utilização do método de QuEChERS que, conforme comprovado em estudos anteriores, apresenta bons valores de recuperação, combinado ao efeito de matriz que é drasticamente reduzido ao se utilizar protetores de analitos.

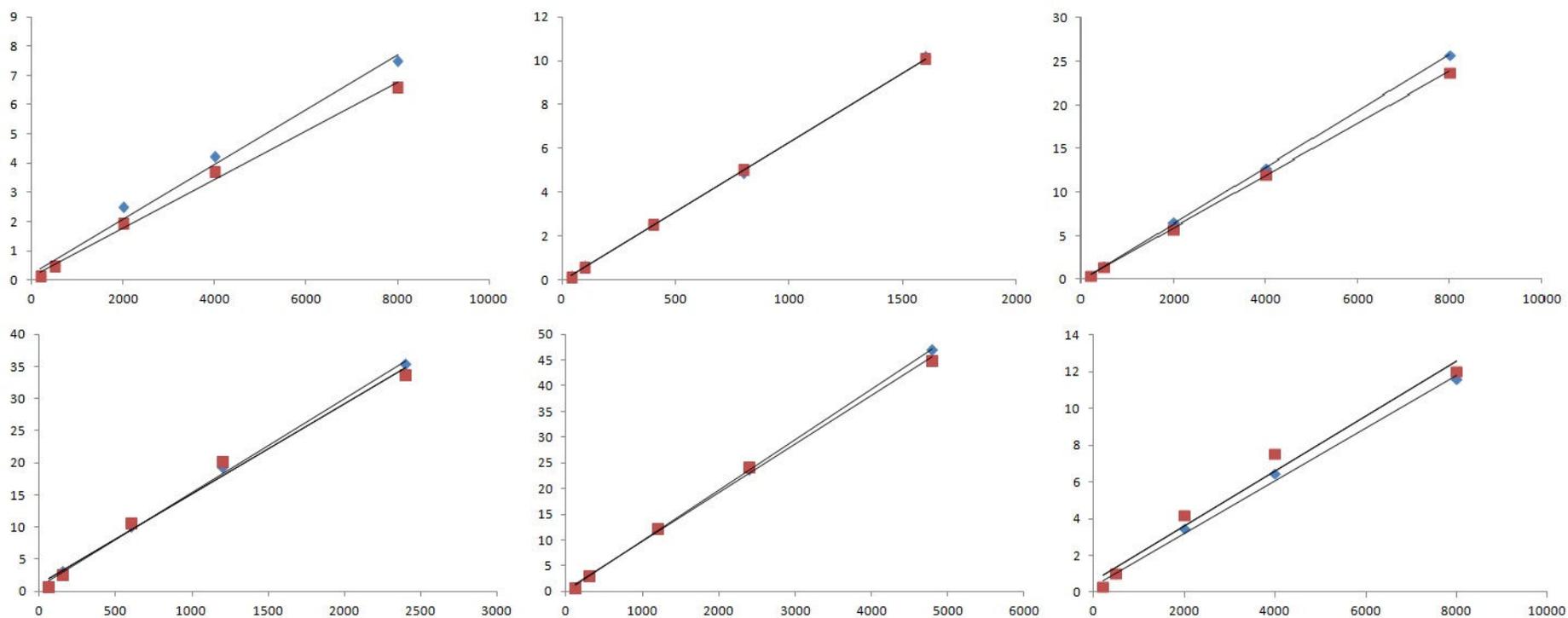


Figura 14 Comparação das respostas obtidas com a solução em solvente contendo os analitos (série de dados 2) e com a extração a partir de uma amostra fortificada (série de dados 1), para verificação da eficiência total do método.

## 5.6 Aplicação do método a amostras comerciais de café torrado

O método de QuEChERS, após ser validado, foi aplicado na determinação de resíduos dos analitos: dissulfoton sulfóxido, dissulfoton, malationa, clorpirifós, pirimifós e dissulfoton sulfona em doze lotes de amostras diferentes. Não foram encontrados resíduos dos praguicidas organofosforados nas amostras estudadas.

## 5.7 Estudo da degradação dos praguicidas durante a etapa de torra

A partir do resultado conseguido na aplicação do método a amostras comerciais, no qual todas as amostras mostraram-se livres dos contaminantes estudados, foi feito o teste de degradação e permanência dos praguicidas ao longo da etapa de torra. Para tanto, foi feito um teste de degradação do método para amostras de café cru. As amostras de café cru utilizadas foram obtidas na forma de grãos, de produtores rurais da região de Alfenas e moídas previamente à extração.

### 5.7.1 Comparação das respostas do método para matrizes de café cru e torrado

Conforme mencionado anteriormente, o método de QuEChERS foi otimizado para amostras de café torrado, sendo necessário, portanto, uma verificação de adequação do método para a aplicação em amostras de café cru. Nesta adaptação foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, recuperação, efeito de matriz.

Os valores de coeficientes de variação ( $RSD_a\%$ ) obtidos nos testes de repetitividade para café cru variaram de 2,28 a 23,06%. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) variaram de 0,969 (malationa) a 0,998 (sulfona). Já os percentuais de recuperação obtidos para o método de QuEChERS em café cru, utilizando detecção por GC-MS, variaram entre 69,2 – 127,4%.

Observando os valores dos parâmetros do método obtido, pode-se concluir que o método é adequado para análises de café cru e torrado simultaneamente, sendo possível, dessa forma, avaliar a degradação dos analitos durante a torra. Como pode ser observado na Figura 15 as respostas dos analitos nas duas matrizes foram bem semelhantes, mais uma vez demonstrando a robustez do método.

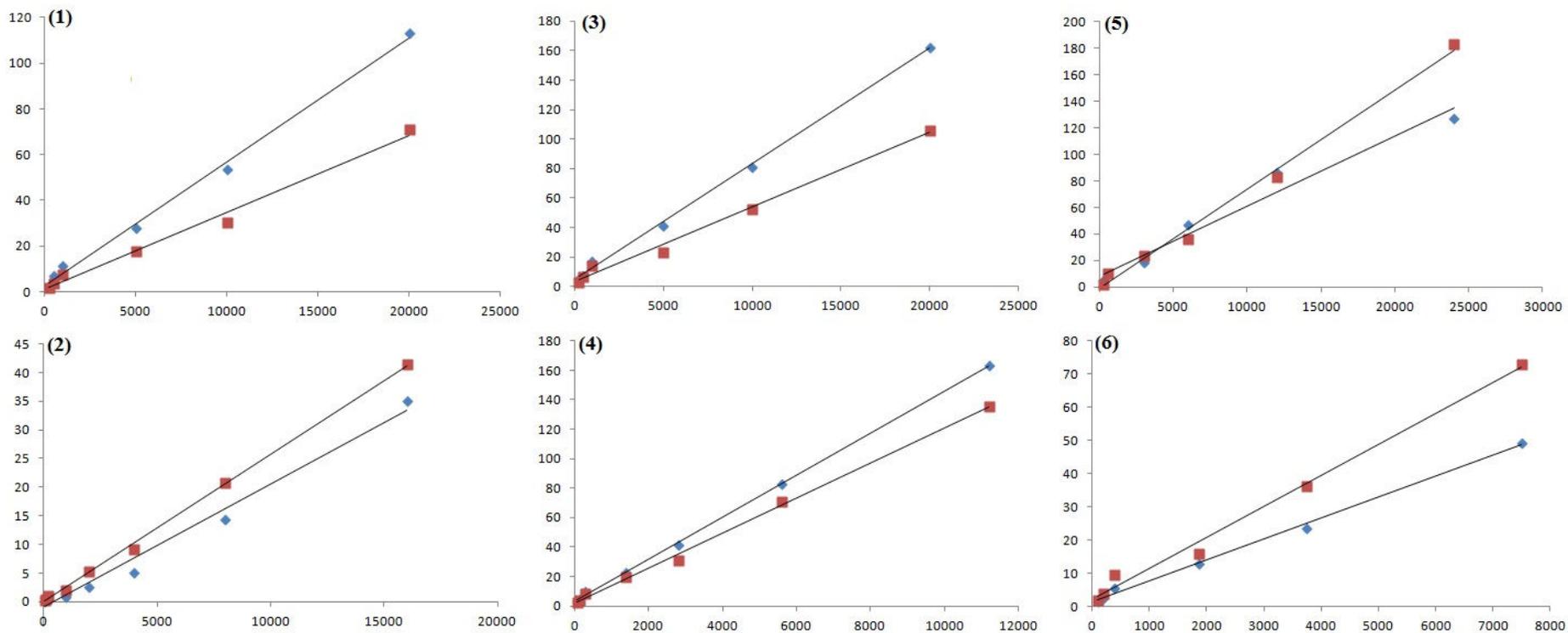


Figura 15 Comparação de curvas plotadas a partir de respostas obtidas para: (1) sulfoxido; (2) dissulfoton; (3) sulfona; (4) pirimifos; (5) malationa; (6) clorpirifos. Em amostras de café cru (linha 1) e torrado (linha 2).

### 5.7.2 Grau de torra dos grãos

O grau de torra obtido foi avaliado segundo os parâmetros: perda de massa durante a torra, temperatura final e coloração dos grãos. Os resultados desta etapa encontram-se nas Tabelas 24 e 25 e na Figura 16.

TABELA 24 Condições de torra das amostras contaminadas com todos os analitos

Temperatura torrador	Tempo (min)	Temperatura final	Peso inicial (g)	Massa final de amostra	Perda de massa
190 °C	0 min	-	25 g	25,024 g	0%
	1 min	105 °C		22,889	8,44%
	2 min	125 °C		21,283	14,87%
	3 min	150 °C		20,997	16,01%
	4 min	155 °C		19,760	20,96%
	6 min	175 °C		18,900	24,40%
	8 min	185 °C		17,190	31,24%
	10 min	198 °C		18,090	27,64%
	12 min	213 °C		16,140	35,44%

TABELA 25 Condições de torra das amostras contaminadas apenas com dissulfoton

Temperatura torrador	Tempo (min)	Temperatura final	Peso inicial (g)	Massa final de amostra	Perda de massa
190 °C	0		25 g	25 g	0%
	1	103 °C		23,399	6,40%
	2	130 °C		22,306	10,78%
	3	147 °C		21,152	15,39%
	4	155 °C		19,931	20,28%
	6	173 °C		17,854	28,58%
	8	182 °C		16,059	35,76%
	10	197 °C		17,043	31,83%
	12	215 °C		14,828	40,69%

Os valores obtidos nas Tabelas 24 e 25 mostram que há uma perda de massa crescente, durante o processo de torra, o que pode ser explicado pela perda de água e outros compostos, devido ao aquecimento da amostra a temperaturas muito altas.



Figura 16. Amostras obtidas após o processo de torra. Tempos de torra de (I) 1 minuto; (II) 2 minutos; (III) 3 minutos; (IV) 4 minutos; (V) 6 minutos; (VI) 8 minutos; (VII) 10 minutos e (VIII) 12 minutos.

A Figura 16 mostra o grau de torra dos analitos, ilustrando o que é descrito na Tabela 1, que o café mais apreciado no Brasil é a torra moderadamente escura, de aproximadamente 6 minutos de torra.

### ***5.7.3 Degradação de organofosforados***

Após o processo de torra, as amostras de café foram analisadas quanto ao teor dos diferentes inseticidas organofosforados. A Tabela 26 mostra os valores percentuais de perda/degradação dos analitos estudados durante a etapa de torra para as amostras contaminadas com todos os praguicidas do estudo. A Tabela 27 mostra a perda de dissulfoton e a degradação natural a sulfóxido.

TABELA 26 Perda percentual de analitos durante a etapa de torra

Tempo (min)	Perda de sulfóxido	Perda de dissulfoton	Perda de malationa	Perda de pirimifós	Perda de clorpirifós	Perda de sulfona
0	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1	30,43%	84,85%	84,27%	71,40%	77,63%	26,04%
2	56,21%	89,27%	92,34%	83,43%	80,49%	64,57%
3	92,01%	96,96%	99,28%	96,60%	96,39%	97,89%
4	98,69%	98,82%	99,46%	97,49%	97,52%	100%
6	100%	100%	100%	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%	100%	100%	100%
10	100%	100%	100%	100%	100%	100%
12	100%	100%	100%	100%	100%	100%

TABELA 27 Perda percentual de dissulfoton e degradação do analito ao seu subproduto ao longo da etapa de torra

Tempo (min)	Perda de dissulfoton (%)	Conc. sulfóxido ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. dissulfoton ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sulfóxido/Dissulfoton
0	0	1125	5460	0,17
1	73,2	645	1598	0,43
2	90,6	285	562	0,58
3	94,5	0	325	
4	96,8	0	189	
6	100	0	0	
8	100	0	0	
10	100	0	0	
12	100	0	0	

Pode-se observar nas respostas obtidas que a partir do tempo de 6 minutos de torrefação, todos os organofosforados estudados estão completamente degradados. Conforme mostrado na Tabela 1 e confirmado na Figura 16, o padrão de torra dos cafés comercializados no Brasil é geralmente de 6 a 8 minutos (torra média a moderadamente escura), assim, o café que chega ao consumidor final provavelmente está livre da classe de praguicidas organofosforados.

As Figuras 17 e 18 mostram as respostas dos analitos obtidas ao longo da etapa de torra do café.

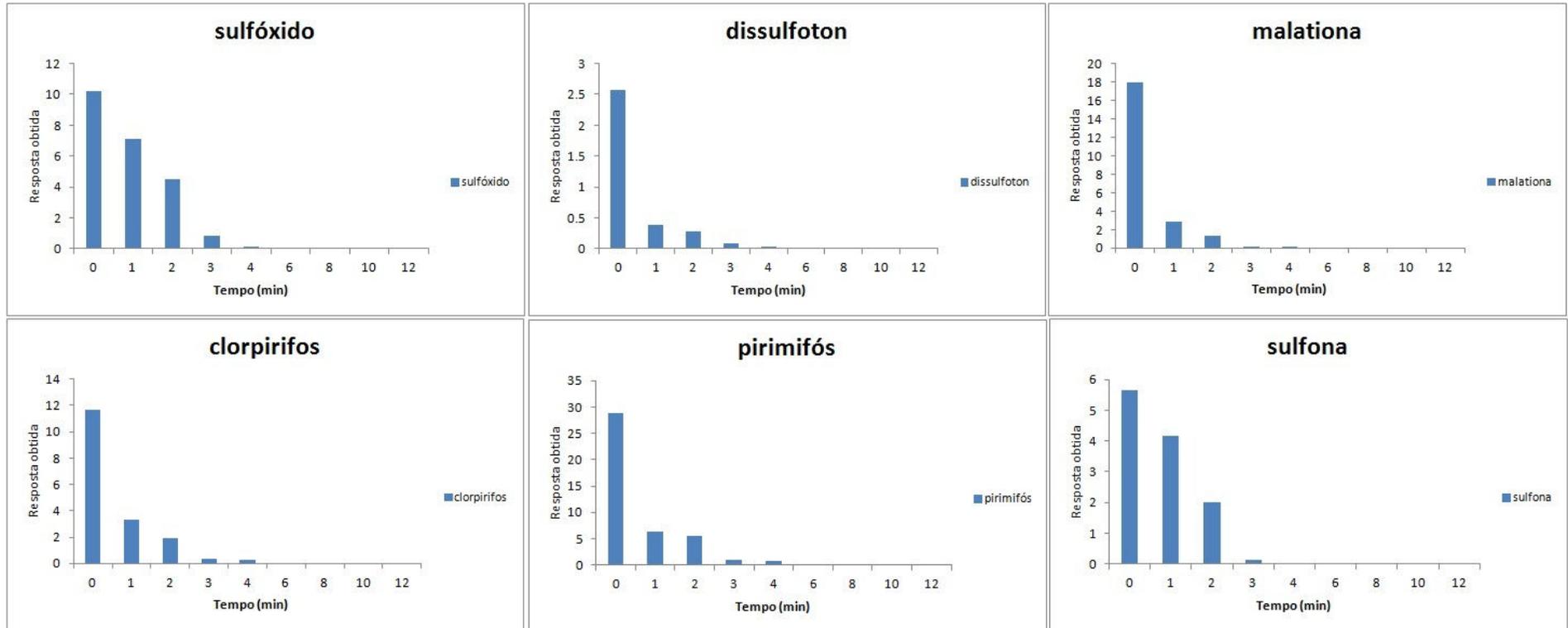


Figura 17 Gráficos plotados para cada um dos praguicidas organofosforados estudados, a partir de respostas obtidas no teste de degradação ao longo da torra (de 0 a 12 minutos). Neste teste a amostra foi fortificada com todos os praguicidas estudados no nível mais alto da faixa testada.

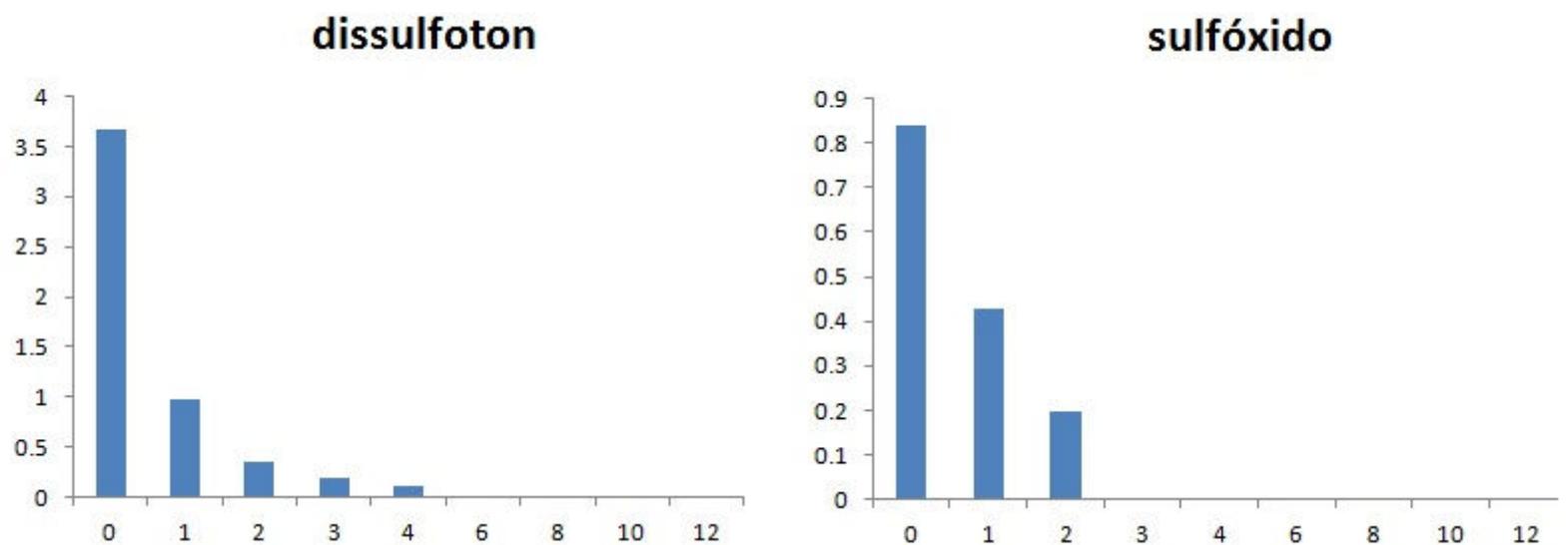


Figura 18 Gráficos plotadas para o dissulfoton e para seu produto de degradação, sulfóxido, a partir de respostas obtidas no teste de degradação ao longo da torra (de 0 a 12 minutos) da amostra contaminada apenas com dissulfoton. Neste teste a amostra foi fortificada somente com o analito dissulfoton no nível mais alto da faixa linear testada.

Os praguicidas organofosforados são compostos voláteis, por isso, adequados de serem analisados por equipamentos de GC-MS, e teoricamente, sofrem degradação após aquecimento intenso da amostra. Neste trabalho foi avaliada esta degradação em diferentes tempos de torra, sendo monitorada também a temperatura ao final do processo. Foi avaliada a porcentagem de analito perdida ao longo do processo. Conforme o esperado ocorre uma queda nos níveis dos praguicidas ao longo da etapa de torra, sendo que após o sexto minuto todos os praguicidas estão completamente degradados. Conforme mostrado na Tabela 1, o tempo de torra média, que é típico do café comercializado no Brasil, é aproximadamente de 6 minutos, sendo, portanto possível concluir que os cafés comercializados para consumo humano se apresentam livres de contaminantes desta classe.

## 6 CONCLUSÕES

O método QuEChERS otimizado, juntamente com a separação e detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas mostrou-se adequado e eficiente para determinação de dissulfoton e dois de seus produtos de transformação em amostras de café torrado e moído comercial. Adicionalmente, outros compostos organofosforados foram avaliados e também mostraram adequados parâmetros de recuperação e comportamento cromatográfico, demonstrando a capacidade multiresidual de análise do método proposto para alguns representantes dessa classe de praguicidas. Dentre as vantagens inerentes ao método destacam-se a facilidade e rapidez no preparo de amostra, baixo custo, e pouca utilização de solventes. Já uma desvantagem relevante do método, é que esse não possui fator de pré-concentração; entretanto, ao utilizarem-se técnicas de detecção muito sensíveis, tais como a espectrometria de massas, podem ser alcançados limites de detecção e quantificação suficientemente baixos.

Foi demonstrado ainda que a utilização de um tampão adequado pode evitar a degradação ou perda de analitos sensíveis a variações de pH, e também que os praguicidas organofosforados comportam-se de maneira muito similar, sendo que com uma otimização feita apenas com o dissulfoton e dois de seus produtos, obteve-se um método que forneceu boas respostas a todos os analitos estudados.

O emprego de protetores de analitos é uma forma de impedir que os analitos se liguem ao sistema cromatográfico, impedindo perdas nas análises. Ao evitar a perda de analitos no sistema cromatográfico, os protetores de analitos também promovem uma diminuição nos valores de LD e LQ do método. Além da preservação dos analitos e conseqüente aumento de área, os protetores ainda apresentaram melhoras na repetibilidade, resolução cromatográfica e recuperação dos analitos estudados.

O método avaliado mostrou-se eficaz na identificação e quantificação de praguicidas organofosforados estudados, o que pode ser comprovado pelos valores dos parâmetros analíticos do método ou figuras de mérito que foram avaliados.

Conforme o esperado ocorre uma queda nos níveis dos praguicidas ao longo da etapa de torra. Desta forma, pôde-se confirmar que o processo de torrefação é eficiente na remoção de contaminantes organofosforados das amostras de café, e que a completa remoção acontece a partir do sexto minuto, sendo este tempo o mais comum para torras de café no Brasil, ou

seja, os cafés destinados ao consumidor apresentam-se livres de contaminantes devido ao processamento dado ao alimento.

Pode-se concluir ainda que o praguicida dissulfoton degrada-se naturalmente ao seu produto de degradação dissulfoton sulfóxido em atmosfera e também nas primeiras etapas de torrefação e que após o sexto minuto este analito também está totalmente degradado.

Enfim, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que estudos envolvendo o método de QuEChERS são muito promissores, em especial ao utilizar-se técnicas de detecção seletivas e também substâncias “protetoras de analitos”. Por fim, o método desenvolvido mostra-se como excelente alternativa aos pouquíssimos trabalhos reportados para a análise de praguicidas em café torrado e cru, os quais, além de serem antigos, utilizam volumes muitíssimo maiores de solventes mais voláteis e tóxicos do que a acetonitrila.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ (ABIC). **A lenda do café**. Disponível em: <[www.abic.com.br/alendadocafe.html](http://www.abic.com.br/alendadocafe.html)> Acesso em: 13 abr. 2010.

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

ANASTASSIADES, M.; MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1015, p. 163–184, 2003b.

ATELIÊ DO CAFÉ. **Sobre café – história do café**. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.ateliedocafe.com.br/sobre/Sobre.aspx?pagina=10>>. Acesso em: maio 2010.

BANERJEE, K., et al. Multiresidue Analysis of 50 Pesticides in Grape, Pomegranate, and Mango by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: Washington, v. 58, p. 1447-1454, 2010.

BANERJEE, K., et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1173, p. 98-109, 2007.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C.U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**: São Paulo, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 975, p. 47-70, 2002.

CAJKA, T., et al. Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC–MS analysis of pesticide residues. **Journal Separation Science**: Weinheim, v. 28, p. 1048-1060, 2005.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista da Saúde Pública**: São Paulo, v. 34, p. 529-537, 2000.

CETINKAYA, M., et al. Untersuchung von Organochlor-Pesticidriickstiinden in Roh- und Riistkaffee und deren Abbauverhalten beim Ri stprozeB. **Z Lebensm Unters Forsch**: Berlim, v. 179, p. 5-8, 1984.

CHAPMAN, R. A.; TOLMAN, J. H.; COLE, C. The effect of multiple applications of disulfoton on enhanced microbial degradation in soil and subsequent uptake of insecticidal chemicals by potato plants. **Journal of Environmental Science and Health**: New York, v. B29, p. 485-506, 1994.

CHUNG S. W. C.; CHAN B. T. P. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1217, p. 4815-4824, 2010.

COGO, J. P. **Determinação de resíduos de pesticidas em plantas de arroz empregando QuEChERS modificado e GC-ECD**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

DIEZ, C., et al. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1131 p. 11-23, 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USA (EPA), **About pesticides**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/>> Acesso em: 19 de abr. de 2010.

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection, **Journal of Chromatography A**: New York, v. 638, p. 57-63, 1993.

FARIA, A. M., **Dissulfoton: avaliação da mobilidade e extração ponto nuvem**. 2003. 137 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GRECCO, F. B., et al. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**: Rio de Janeiro, v. 29, p. 211-214, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO), **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, São Paulo, 2003. 35 p.

LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 712, p. 103-112, 1995.

LANÇAS, F. M.; **Cromatografia em fase gasosa**. Acta: São Carlos, 1993. v.1. 240 p.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. RiMa: São Carlos, 2004, 62 p.

LEHOTAY, S. J., et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1217, p. 2548–2560, 2010.

MARTEL, S. **Comparação dos métodos de extração QuEChERS e mini-Luke modificados na determinação de resíduos de pesticidas piretróides em tomate empregando GCxGC-uECD**. 2008. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.; ANASTASSIADES M. Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. **Analytical Chemistry**: Washington, v. 77, p. 8129-8137, 2005.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Matrix Effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. **Analytical Chemistry**: Washington, v. 70, p. 882-889, 1998

McMASTER, Marvin C. **GC-MS: a practical user's guide**. 2 ed. Hoboken: John Wiley. 2008. 180 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução normativa nº 26**, 8 out. 2010. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/publicue/media/CONS\\_leg\\_IN026.pdf](http://www.abic.com.br/publicue/media/CONS_leg_IN026.pdf)>. Acesso em: 02 abr. 2011.

MOL, H. G. J.; DAM, R. C. J.; STEIJGER, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1015, p. 119-127, 2003.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa do café arábica**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

NGUYEN, T. D.; LEE, G. H.; YUN, M. Y. A multiresidue method for the determination of 118 pesticides in vegetable juice by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal Agricultural Food Chemistry**: Washington, v. 57, p. 10095-10101, 2009.

OLIVEIRA, J. J. V., et al. Avaliação dos níveis residuais de clorpirifós, diclorvós e paration metílico na borra e na bebida de café. **Revista Brasileira Toxicologia**: São Paulo, v. 15, n.2, p. 75-78, 2002.

PAYÁ, P., et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**: Heidelberg, v. 389, p. 1697-1714, 2007.

PESTICIDES DOCUMENTS. **Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations**. Mar. 1988. Disponível em: <[http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest68\\_e.html](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest68_e.html)>. Acesso em 03 Apr. 2010.

PINHO, G. P. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

PINHO, G. P., et al. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**: São Paulo, v. 33, p. 909-913, 2010.

PIZZUTTI, I. R., et al. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**: New York, v. 1216, p. 4539–4552, 2009.

PRESTES, O. D., et al. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à a espectrometria de massas. **Química Nova**: São Paulo, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

RAMOS, M. A., et al. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**: Heidelberg, v. 396, p. 2307-2319. 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**: São Paulo, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**: Oxford, v. 76, p. 211–225, 2008.

SILVA, J. J. O., et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista da Saúde Pública**: São Paulo, v. 35, p. 130-135, 2001.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**: São Paulo, v.29, p. 965-971, 2006.

WANG, Y., et al. Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography–mass spectrometry using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**: Amsterdam, v. 1218, p. 334–342, 2011.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry**. AOAC: Arlington, 1975. 88 p.