

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ROBERTA DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ PARA O PROCESSAMENTO DE ERVA-
MATE COMERCIAL, NA ANÁLISE DE RESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO**

Porto Alegre, janeiro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ROBERTA DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ PARA O PROCESSAMENTO DE ERVA-
MATE COMERCIAL, NA ANÁLISE DE RESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de conclusão de curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Porto Alegre, janeiro de 2013.

Agradeço a Deus, sempre! À minha família por todo o apoio, carinho, em especial aos meus pais Claudete e Nilton pela dedicação, por todo amor, compreensão, conversas, conselhos, incentivo, pelo colinho e abraço amigo sempre que precisei. Ao meu namorado pelas grandes ajudas, atenção e carinho a mim dedicados, pelo amor sempre demonstrado e pela parceria nos jogos do tricolor. Faço um agradecimento ao pessoal “Tudo de Bom” da Seção Contaminantes do Lacen-RS pela compreensão, disponibilidade do laboratório para parte deste trabalho, assim como pelo carinho, amizade e pelas muitas gargalhadas. Não posso deixar de agradecer aos grandes amigos e amigas que a UFRGS me proporcionou, pelos estudos, preocupação comigo, pelos encontros no “lá”, churrascos e indiadas, afinal estamos juntos desde o primeiro semestre! Às grandes amigas da química encontradas em uma fase bem complicada, que me deram colo, conselhos e torceram muito pela minha felicidade. Ao Duda pelas caronas e companhia até o Campus do Vale e pela velha amizade. Agradeço também à orientadora Prof^ª Dr^ª Tânia Pizzolato pela orientação, aprendizado e paciência e aos queridos amigos do laboratório D-107 (lê-se cento e sete) por aturarem os “barulhos” durante os experimentos do meu trabalho, pelo carinho e pelos momentos de diversão e descontração, almoços e tudo mais. Valeu gente, sem todos vocês fazendo parte da minha vida, nada disso valeria a pena!

*“Hoje eu acordei mais cedo, tomei sozinho o chimarrão
procurei a noite na memória... procurei em vão
hoje eu acordei mais leve (nem li o jornal)
tudo deve estar suspenso... nada deve pesar
ainda era noite, esperei o dia amanhecer
como quem aquece a água sem deixar ferver
hoje eu acordei, agora eu sei viver no escuro
até que a chama se acenda
verde... quente... erva... ventre... dentro...
entranhas
mate amargo noite adentro estrada estranha
illex paraguarienses
relax... agora, paciência”*

Ilex Paraguarienses - Humberto Gessinger

RESUMO

A erva-mate é uma planta nativa do Brasil e Paraguai, cujo consumo se dá basicamente em forma de chimarrão, chá ou tererê. O recente aumento no consumo de erva-mate comercial torna o uso de pesticidas interessante do ponto de vista econômico, uma vez que reduz as perdas por pragas. Porém, a presença de resíduos desses agrotóxicos pode ser prejudicial ao ambiente e à saúde, devendo haver controle dos mesmos. A análise de resíduo de agrotóxicos em alimentos é geralmente realizada por GC-MS ou LC-MS, porém o maior agravante é que ainda não há legislação específica para uso de agrotóxicos em erva-mate. Além disso, trata-se de uma matriz complexa, principalmente por possuir clorofila, pigmento que fica retido na coluna cromatográfica, prejudicando todo o sistema, de forma que aumenta necessidade de manutenção desse sistema. Neste contexto, o presente trabalho avaliou quatro métodos de extração para análise de resíduo de agrotóxicos em erva-mate comercial, que foram: por ultrassom, por solvente em Shaker, por MSPD e por QuEChERS. Foram avaliadas as extrações com uso de dois solventes (água e acetonitrila), além de diferentes massas (aproximadamente 1,0 g e 5,0 g) de uma mesma amostra previamente peneirada que foi submetida aos quatro métodos separadamente. Posteriormente foi realizada análise em UV-Vis (de 200 nm a 800 nm). Os extratos em melhor condição de extração, que corresponderam aos que foram usados aproximadamente 1,0 g de amostra e cujo solvente foi acetonitrila, foram submetidos a radiação infravermelho e ultravioleta também separadamente, permanecendo diferentes tempos sob radiação, na tentativa de degradar a clorofila presente. Mesmo que sem sucesso, houve a tentativa de degradação da clorofila com uso de peróxido de hidrogênio. Novamente foi medido espectro eletrônico e comparado ao anterior, em que foi constatada maior degradação da clorofila utilizando lâmpada ultravioleta por 120 minutos. Esses mesmos extratos foram analisados por CLAE-UV, usando comprimento de onda de 270 nm, o que apresentou melhor condição para identificar os picos dos cinco padrões de agrotóxicos estudados (carbendazim, carbofuran, chlorfenvinphos, chlorpyrifos e tebuconazole). A melhor situação visualizada através da CLAE-UV, foi aquela em o extrato permaneceu por 30 minutos sob radiação IV, pois teve menor interferência da matriz. Também foi avaliado o teor de umidade em amostras, cujos processamentos se deram de maneiras diferentes. O teor de umidade se mostrou de acordo com a legislação e não houve diferença significativa do teor de umidade entre os dois processamentos usados.

Palavras-chave: Pesticidas, Erva-Mate, QuEChERS, Extração por solvente, MSPD, Extração por Ultrassom, CLAE-UV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da clorofila <i>a</i> .	15
Figura 2 – Espectro eletrônico da clorofila <i>a</i> .	16
Figura 3 – Exemplos de estruturas da fase estacionária.	16
Figura 4- Cores complementares do espectro eletromagnético.	17
Figura 5 – Estruturas dos agrotóxicos usadas neste estudo: <i>a</i>) Carbendazim; <i>b</i>) Carbofurano; <i>c</i>) Clorpirifós; <i>d</i>) Tebuconazol ; <i>e</i>) Clorfenvinfós.	20
Figura 6 – Fluxograma do método QuEChERS original proposto por Anastassiades et. al. em 2003.	24
Figura 7 – Estrutura do PSA (amina primária-secundária).	26
Figura 8 – (<i>a</i>) A radiação incidente igual a P_0 pode ser absorvida pelo analito, resultando em um feixe de menor potência P transmitido ao detector. (<i>b</i>) De acordo com as diferenças de energia, ocorre a absorção. (<i>c</i>) Espectro de absorção resultante.	27
Figura 9 – Ilustração da experiência de Tswett 1906	28
Figura 10 - Diagrama descrevendo (<i>a</i>) a separação de componentes A e B de uma mistura em uma coluna cromatográfica e (<i>b</i>) o cromatograma gerados pelos diferentes os tempos de retenção.	29
Figura 11 - Tipos de Cromatografia a partir de estados físicos das fases.	30
Figura 12 - Esquema apresentado diferentes tipos de interação: (<i>a</i>) Adsorção, (<i>b</i>) Partição, (<i>c</i>) Troca Iônica e (<i>d</i>) Exclusão	31
Figura 13 – Esquema de componentes típicos de um equipamento de CLAE.	32
Figura 14 - Válvula de amostragem de 6 vias	33
Figura 15 – Detector UV-Visível para CLAE	34
Figura 16 – Fluxograma do procedimento utilizado para o método de extração QuEChERS.	40
Figura 17 – Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 1,0 g e usando água como solvente.	44
Figura 18 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 5,0 g e usando água como solvente	44
Figura 19 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 1,0 g e usando acetonitrila como solvente	45
Figura 20 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 5,0 g e usando acetonitrila como solvente	45
Figura 21 - Comparação do espectro eletrônico da solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P, antes e após certos tempos de radiação infravermelho.	47
Figura 22 – Comparação do espectro eletrônico da solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P, antes e após certos tempos de radiação ultravioleta.	48
Figura 23 – Comparação entre os extratos obtidos por ultrassom com e sem radiação UV e IV por 120 min.	48
Figura 24 - Espectro eletrônico do extrato US 3 da amostra A-P, com e sem adição de peróxido de hidrogênio	49
Figura 25 – Cromatograma dos padrões de agrotóxicos em CLAE-UV. Legenda: 1) Carbendazim, 2) Carbofuran, 3) Tebuconazole, 4) Chlorfenvinphos, 5) Chlorpyrifos - (A)	

cromatograma mostrando os picos dos cinco analitos; (B) cromatograma com expansão da região entre 4,51 min e 8,42 min.	50
Figura 26 - Cromatograma dos extratos US 3após radiados com UV em CLAE-UV	51
Figura 27 - Cromatograma dos extratos US 3após radiados com IV em CLAE-UV.....	51
Figura 28 - Cromatograma do extrato US, após 60 min de radiação UV em CLAE-UV	52
Figura 29 - Cromatograma do extrato US, após 60 min de radiação IV em CLAE-UV.....	52
Figura 30 - Cromatograma da solução de padrões de agrotóxicos em 50% acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.	53
Figura 31 - Cromatograma da solução contendo 50% do extrato US 3 usado radiação UV por 60 minutos fortificado com padrões de agrotóxicos em acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.....	53
Figura 32 - Cromatograma da solução contendo 50% do extrato US 3 usado radiação IV por 30 minutos fortificado com padrões de agrotóxicos em acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.....	54
Figura 33 - Sobreposição dos cromatogramas das soluções A, B e C, por CLAE-UV.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns dos principais ingredientes ativos de hortifrutigranjeiros, seu respectivo grupo químico, classe e culturas autorizadas no Brasil.....	18
Tabela 2 - Tipo de equilíbrio de acordo com a fase estacionária	31
Tabela 3 - Relação de amostras processadas.	36
Tabela 4 – Condições das extrações realizadas.	38
Tabela 5 –Gradiente utilizado na CLAE-UV.	42
Tabela 6– Resultados para teor de umidade nas amostras.....	43
Tabela 7 – Tempos de retenção dos padrões de agrotóxicos usados.....	50
Tabela 8- Valores correspondentes às áreas de cada pico e o percentual de recuperação do analito.	55

LISTA DE ABREVIACOES

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Espectrofotométrico na Região do UV

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GC-MS - Cromatografia à Gás com deteco por Espectrometria de Massas

GC-MS/MS - Cromatografia à Gás com deteco por Espectrometria de Massas

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV – Infravermelho

LC-MS - Cromatografia à Líquido com deteco por Espectrometria de Massas em *Tandem*

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida com deteco por Espectrometria de Massas em *Tandem*

MSPD - *Matrix Solid-Phase Dispersion*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

MAPA – Ministério da Agricultura

MS – Espectrmetro de Massas

PARA – Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxicos em Alimentos

QhEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

SINDIMATE - Sindicato da Indústria do Mate no Rio Grande do Sul

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	ERVA-MATE.....	12
3.1.1	Efeito de matriz	14
3.1.2	Clorofila.....	15
3.2	AGROTÓXICOS.....	17
3.2.1	Métodos de Quantificação de Agrotóxicos	20
3.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	21
3.3.1	Extração por Ultrassom	22
3.3.2	Extração por Solvente (Shaker).....	23
3.3.3	Extração por MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida).....	23
3.3.4	QuEChERS.....	23
3.4	ESPECTROSCOPIA MOLECULAR	26
3.5	CROMATOGRAFIA.....	27
3.5.1	Cromatografia a Gás.....	31
3.5.2	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	32
3.5.3	Detectores	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	35
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	35
4.3	LIMPEZA DO MATERIAL.....	36
4.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	36
4.5	TEOR DE UMIDADE.....	37
4.6	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	37
4.6.1	Condições dos experimentos de extração.....	37
4.6.2	Extração por Ultrassom	38
4.6.3	Extração por Solvente (Shaker).....	39
4.6.4	MSPD	39
4.6.5	QuEChERS.....	39

4.7	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO QUANTO À MATRIZ.....	41
4.8	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DA MATRIZ	41
4.8.1	Degradação por Infravermelho e Ultravioleta.....	41
4.8.2	Degradação com peróxido de hidrogênio.....	41
4.9	ANÁLISE POR CLAE-UV	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ENSAIO DE TEOR DE UMIDADE.....	43
5.1.1	Processamento das amostras.....	43
5.2	AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS	44
5.2.1	Escolha do solvente extrator.....	46
5.2.2	Massa de amostra e volume do solvente	46
5.2.3	Extrato para estudos de degradação.....	46
5.2.4	Degradação da clorofila presente na matriz	47
5.3	DETERMINAÇÕES POR CROMATOGRAFIA À LÍQUIDO	50
5.3.1	Condições de análise dos agrotóxicos	50
5.3.2	Degradação da clorofila presente na matriz	51
5.3.3	Efeito de Matriz com relação à resposta dos analitos.....	52
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate é um produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de “*Ilex paraguariensis*”, na forma inteira ou moída obtidos através de tecnologia apropriada. É uma planta nativa do Brasil e Paraguai, produtora de folhas multiuso. Seu consumo é praticamente *in natura* e se dá basicamente através de chimarrão e tererê, especialmente em países da América do Sul. Devido ao crescimento do consumo de erva-mate, e conseqüente aumento na produção, o interesse no uso de pesticidas nesta cultura tem aumentado a fim de reduzir as perdas por pragas, mesmo não havendo legislação específica de agrotóxicos para esta cultura. Com isso, há a necessidade do controle desses agrotóxicos na erva-mate comercializada.

Os pesticidas possuem um importante papel no crescimento da agricultura, evitando grandes perdas originadas pela existência de pragas. Porém, atualmente também há uma grande preocupação envolvendo a presença de resíduos desses pesticidas contaminando alimentos, solo, água, pelos danos que tais resíduos causam principalmente à saúde humana. Sendo assim, secretarias, órgãos e agências ligadas à saúde, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinam quais os limites máximos de resíduos de agrotóxicos (LMRs) permitidos em alimentos para os diversos pesticidas comercializados, e ainda verificam se há presença de pesticidas não permitidos na legislação.

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento de métodos de análise de traços desses agrotóxicos são de grande valia para fiscalizar e garantir a segurança alimentar da população. As técnicas analíticas mais utilizadas são aquelas que têm acopladas espectrômetros de massas (MS), pois possibilitam a confirmação da identidade dos analitos em questão pelo espectro de massas. Nesta linha, as técnicas em maior uso são a cromatografia a gás e a cromatografia a líquido, acopladas a espectrômetros de massas, principalmente em *tandem*. As técnicas cromatográficas tem a vantagem de realizar a separação dos componentes da amostra e quando acopladas aos espectrômetros de massas, cada composto de interesse separado na coluna analítica, tem seu respectivo espectro de massas devidamente caracterizado na espectrometria de massas. Portanto, quando se aliam estas duas poderosas ferramentas bem como seus diferentes modos de análise de dados, é possível identificar e quantificar analitos presentes em amostras, em concentrações em nível de traços e ultra traços ($\mu\text{g kg}^{-1}$, ng kg^{-1} , etc).

O desenvolvimento de metodologias para analitos em nível de traços, além de exigir técnicas sofisticadas e de alta sensibilidade, também exigem que a etapa de extração/pré-concentração seja cuidadosamente definida. A etapa de extração/pré-concentração, é de

fundamental importância, pois problemas de matriz poderão comprometer os dados instrumentais. Com isso, vários sistemas têm sido utilizados e desenvolvidos, dentre os quais podem ser citados: extração por solvente, MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*) e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), dentre tantos.

Neste contexto, neste trabalho serão avaliados diferentes sistemas de preparação de amostras para a erva-mate, com o objetivo de reduzir os interferentes de matriz, para posterior análise quali e quantitativa, utilizando métodos cromatográficos. Foram avaliadas extração e limpeza do extrato por QuEChERS, por extração por solvente (em Shaker), por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e por ultrassom. As amostras assim obtidas foram analisadas por CLAE-UV, para estabelecer qual delas é capaz de produzir extratos mais limpos que permitam melhores resultados na análise quantitativa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito de matriz no processamento de amostras de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) comercial, para análise por cromatografia a líquido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito matriz com diferentes procedimentos de extração/pré-concentração (QuEChERS, extração por solvente, dispersão da matriz em fase sólida e ultrassom) e *clean up* com Florisil utilizando as técnicas de espectroscopia molecular e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV;
- Avaliar a capacidade de lâmpadas de Ultravioleta e Infravermelho, na degradação dos compostos que conferem cor ao extrato (clorofila da erva-mate);
- Avaliar a influência da matriz para o melhor procedimento de extração/pré-concentração frente a um grupo de agrotóxicos;
- Propor a melhor alternativa para a etapa de extração/pré-concentração para a determinação de agrotóxicos em erva-mate.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ERVA-MATE

A erva-mate, por definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis St. Hil.*,

obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê" podendo ser adicionado de açúcar. (ANVISA, 2005).

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a erva-mate possui uma distribuição muito restrita fora da América, é uma árvore que produz matéria-prima para industrialização e consumo como uma infusão estimulante (FAO, 1995).

A composição química da erva-mate é muito complexa, apresentando metilxantinas, saponinas, taninos, vitaminas, componentes minerais, substâncias aromáticas, ácidos graxos, terpenos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, entre outros (JACQUES, 2005).

Chimarrão e tererê são os usos mais comuns dessa infusão de erva-mate (OMAR, 2009), que possui propriedades estimulantes devido ao teor de cafeína em sua composição, que está entre 1 e 2%, de modo que, 60 minutos após o consumo, uma média de 80 a 120 mg deste “pseudoalcaloide” é consumido. Além disso, a erva-mate possui qualidades nutricionais, fornecidas pelo teor de vitaminas A, B e C e a existência de minerais (P, Ca e Fe) (FAO,1995). De acordo com Wendling et al., as indústrias química e farmacêutica têm manifestado interesse no uso de erva-mate para fabricação de medicamentos, tintas, desinfetantes e outros (WENDLING et al., 2007).

Nas últimas décadas, o setor ervateiro passou por muitas transformações, sofrendo variações na produção e consumo. O SINDIMATE (Sindicato da Indústria do Mate no Rio Grande do Sul) mostra dados estatísticos do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) que realizou estudos econômicos envolvendo o cultivo de erva-mate no Brasil, de 1994 a 2010. Este estudo indica, neste período, aumento de 157% de área de erva-mate plantada, 307,7% de área colhida, 91,4% de quantidade produzida e aumento de 33,8% no valor da produção (SINDIMATE, 2012). Atualmente os únicos produtores de erva-mate no mundo são o Paraguai, Argentina, Paraná, Santa Catarina e o Rio Grande do Sul, porém, mais de 30 países consomem produtos industrializados a partir da erva-mate. De acordo com Strapasson (2012) os agricultores estão voltando a apostar na erva-mate e vão se preocupar bastante com a qualidade do produto. A produtividade média dos ervais no Rio Grande do Sul que é de 8 mil quilos por hectare pode chegar até 30 mil quilos por hectare (STRAPASSON, 2012). Strapasson ainda afirma que a erva-mate é um produto que leva entre seis e sete anos para ter uma rentabilidade viável comercialmente, além disso, é colhida somente a cada dois anos. (STRAPASSON, 2012).

Neste contexto, cresce o interesse em manter o cultivo de erva-mate sem presença de pragas. Segundo Iede (IEDE, 1989) para o controle de pragas de erva-mate, os métodos

químicos devem ser evitados ao máximo, tendo em vista que a mesma é consumida praticamente "*in natura*". Além disso, o uso de herbicidas e outros agrotóxicos em ervais não é uma prática aceita, pela inexistência de registros de produtos específicos e apropriados para esta cultura. Porém, esses defensivos agrícolas, possuem praticidade e baixo custo, se comparado ao emprego de mão de obra, por isso, mesmo sendo uma prática ilegal, sem liberação do Ministério da Agricultura, têm sido utilizados pelos produtores (SCHUCHMANN, 2002).

Omar (OMAR, 2009) também salienta a dificuldade na determinação de prazos de carência seguros, já que não existem até o momento, produtos com uso autorizado para a cultura da erva-mate, por parte do Ministério da Agricultura.

Em setembro de 2011, a ANVISA propôs uma consulta pública, cujo Regulamento Técnico inclui aplicação do ingrediente ativo B40 – BEAUVERIA BASSIANA, da classe de inseticida microbiológico, na parte aérea do caule na cultura de erva- mate. Porém com LMR e intervalo de segurança ainda não determinado (ANVISA, 2011).

3.1.1 Efeito de matriz

A análise de resíduos de pesticidas constitui uma das tarefas mais importantes no controle da segurança alimentar e hoje, é geralmente feita utilizando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) (ALDER, 2006). Porém, um dos maiores problemas com o uso desta tecnologia é a ocorrência de efeitos de matriz. Estes são definidos pela IUPAC como "o efeito combinado de todos os componentes da amostra que não o analito na medição das quantidades" (KITTLAUS, S. et. al., 2012). Os principais objetivos e desafios do preparo da amostra é minimizar estes efeitos de matriz, pois durante as análises cromatográficas os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos (PINHO; SILVÉRIO, 2010).

Kittlaus et. al. (2012) ainda afirmam que existem diferentes métodos descritos para a investigação dos efeitos de matriz de um extrato, após a preparação da amostra. O método mais utilizado é o que consiste em adicionar os analitos de interesse com concentração conhecida, em uma amostra de extrato limpo e em um solvente puro, após a extração. A intensidade do sinal desse extrato é comparada com a do solvente. A diferença na resposta entre estes picos mostra o grau de efeitos de matriz para o analito observado. A principal desvantagem desta abordagem é a falta de informação sobre os efeitos da matriz no tempo de retenção que não sejam o tempo de retenção do analito.

O efeito de matriz é dependente das propriedades físico-química dos agrotóxicos e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, etc) (PINHO; SILVÉRIO, 2010).

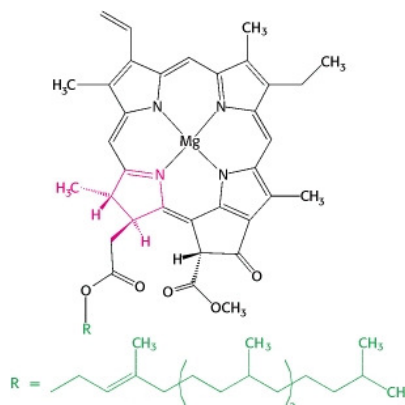
Segundo Oellig e Schwack (2012), uma limpeza eficiente é indispensável para evitar os efeitos da matriz em análise multirresíduo de pesticidas em alimentos por cromatografia em fase gasosa e líquida (LC e GC) acoplada à espectrometria de massa (MS). Além disso, a coextração de clorofila resulta em efeitos de matriz fortes tanto em LC-MS como em CG-MS.

Métodos de limpeza têm sido propostos para eliminar os ácidos graxos, lípidos, fenóis, clorofila e outros coextratos de compostos de matriz frutas e vegetais (OELLIG; SCHWACK, 2011).

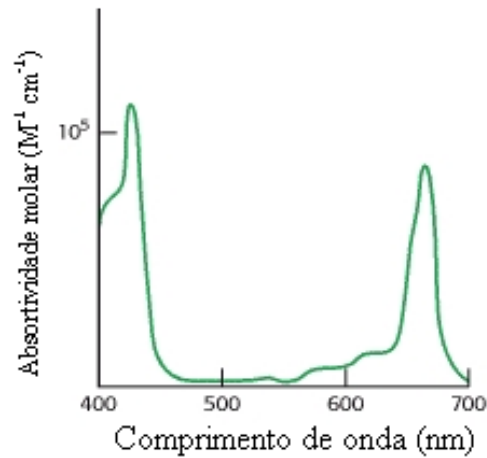
3.1.2 Clorofila

Conforme Berg, Tymoczko e Stryer (2002), a clorofila consiste em um pigmento, produzido pelas plantas através dos cloroplastos, que está presente nas folhas de plantas verdes em duas formas, clorofila *a* e *b*. A clorofila *a* encontra-se sempre presente e é a principal responsável pela coloração verde das plantas e pela realização da fotossíntese. Existem também as clorofilas *c* e *d*, que são encontradas especialmente em algas e cianobactérias. A estrutura da clorofila *a* está representada na Figura 1.

Figura 1- Estrutura da clorofila *a*.



A clorofila *a* apresenta picos máximos de absorção aos 665 e 420 nm, com uma absorvidade molar superior a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, uma das mais altas em compostos orgânicos, conforme apresenta a Figura 2.

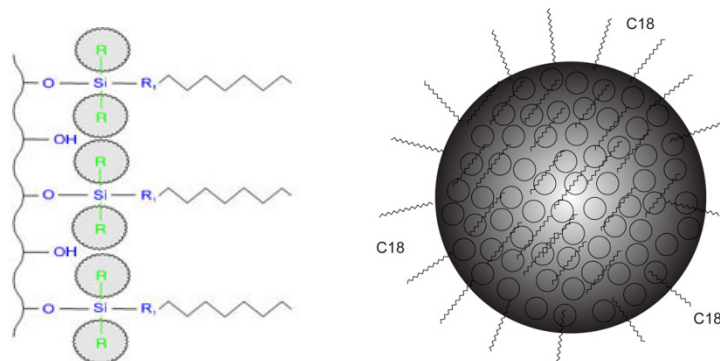
Figura 2 – Espectro eletrônico da clorofila *a*.

Adaptado de (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Sabendo que a clorofila está presente na composição da erva-mate, a análise nessa matriz exige procedimento adequado de limpeza, um dos fatos que justifica esse trabalho. Principalmente pelo fato de que a clorofila fica retida no sistema cromatográfico aumentando a necessidade de troca e manutenções na coluna cromatográfica (PRESTES et al., 2009).

A Figura 3 apresenta dois exemplos de estrutura de fase estacionária, a partir da qual fica evidente a presença diferentes grupos químicos. Ao comparar as Figuras 1 e 3, é possível notar que a estrutura da clorofila contém vários grupos que podem interagir com a fase estacionária da coluna cromatográfica, podendo haver inclusive interações irreversíveis, ou seja, a remoção desse resíduo na coluna se torna impossível. Assim, como consequência dessas interações a coluna fica inutilizada para análises posteriores, uma vez que a fase estacionária teve sua estrutura quimicamente alterada.

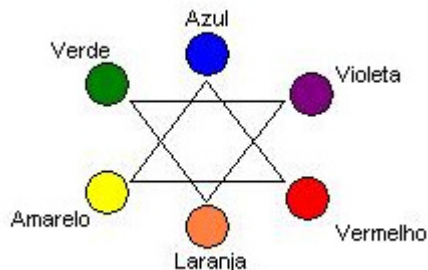
Figura 3 – Exemplos de estruturas da fase estacionária.



Já que pigmentos possuem grupos que absorvem em certos comprimentos de onda, o uso de lâmpadas de infravermelho e ultravioleta, para submeter os extratos de erva-mate a estas radiações de deus para tentar degradar a clorofila presente, reduzindo assim sua interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica.

A Figura 4 apresenta as cores complementares do espectro eletromagnético. Como a clorofila é de coloração verde, conseqüentemente absorve na região do vermelho (por ser sua cor complementar), o que justifica o uso da lâmpada infravermelho. O uso de lâmpada ultravioleta é justificado por que é conhecido que há degradação da clorofila quando exposta a radiação UV. (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Figura 4- Cores complementares do espectro eletromagnético.



3.2 AGROTÓXICOS

De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura), os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais (MAPA, 2012).

O Ministério da Agricultura também afirma que para que possa ser utilizado, o agrotóxico deve ser aprovado e registrado pelo MAPA, pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e pela ANVISA (MAPA, 2012).

Alguns dos principais ingredientes ativos comumente usados na agricultura para hortifrutigranjeiros, autorizados pela no Brasil estão listados na Tabela 1. Esta também apresenta a classe de uso e cultura para a qual se destina.

Tabela 1 – Alguns dos principais ingredientes ativos de hortifrutigranjeiros, seu respectivo grupo químico, classe e culturas autorizadas no Brasil

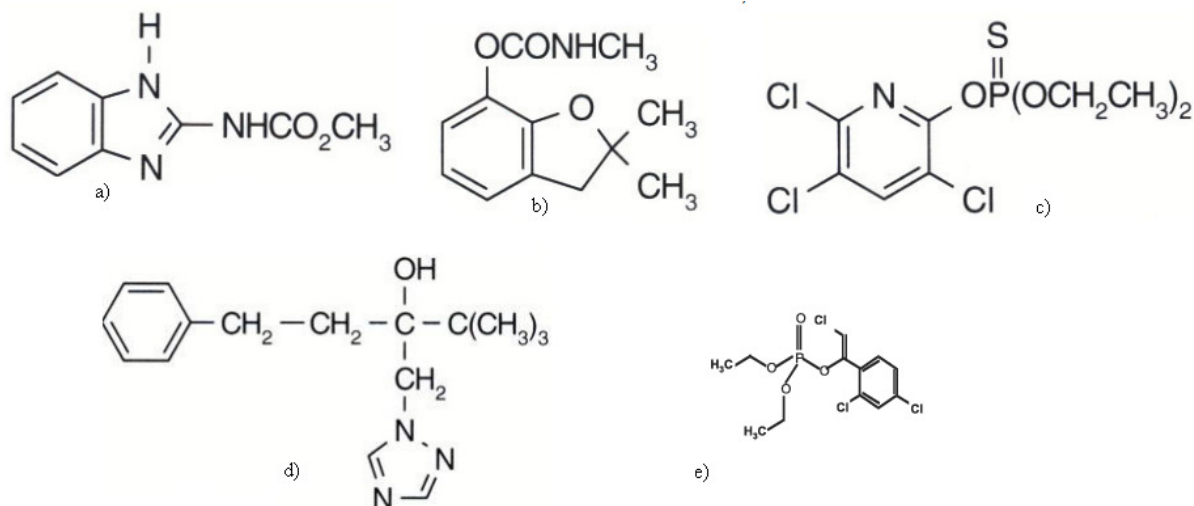
Ingrediente Ativo	Grupo Químico	Classe	Culturas
Acefato (acephate)	Organofosforado	Inseticida e acaricida	Algodão, amendoim, batata, brócolis, citros, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, feijão, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa, soja e tomate
Ametrina (ametryn)	Triazina	Herbicida	Abacaxi, algodão, banana, café, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho e uva
Atrazina (Atrazine)	Triazina	Herbicida	Abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo
Bitertanol	Triazol	Fungicida	Amendoim, feijão, gladiolo, maçã e melão
Bromacila (Bromacil)	Uracila	Herbicida	Abacaxi e citros
Carbendazim	Benzimidazol	Fungicida	Algodão, citros, feijão, maçã, soja e trigo
Carbofurano (Carbofuran)	Metilcarbamato de benzofuranila	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida	Algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo
Clorpirifós (Chlorpyrifos)	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida	Algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate (rasteiro, com fins industriais) e trigo
Diazinona (Diazinon)	Organofosforado	Inseticida e acaricida	Citros e maçã
Difenoconazol (Difenoconazole)	Triazol	Fungicida	Abacate, abobrinha, álamo, alface, algodão, Alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, café, cebola, cenoura, citros, coco, couve-flor, ervilha, feijão, girassol, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, rosa, soja, tomate e uva

Ingrediente Ativo	Grupo Químico	Classe	Culturas
Glifosato (Glyphosate)	Glicina Substituída	Fungicida e Herbicida	Algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva
Malationa (Malathion)	Organofosforado	Inseticida e Acaricida	Alface, algodão, berinjela, brócolis, cacau, café, citros, couve, couve-flor, feijão, maçã, morango, orquídeas, pastagens, pepino, pêra, pêssego, repolho, rosa, soja e tomate
Metamidofós (Methamidophos)	Organofosforado	Inseticida e Acaricida	Algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate (rasteiro, com fins industriais) e trigo
Metamitrona (Metamitron)	Triazinona	Herbicida	Beterraba
Pendimetalina (pendimethalin)	Dinitroanilina	Herbicida	Acácia, algodão, alho, amendoim, arroz, batata, café, cana-de-açúcar, cebola, eucalipto, feijão, fumo, milho, pinus, soja e trigo
Propiconazol (Propiconazole)	Triazol	Fungicida	Algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, café, cevada, feijão, gladiólo, milho, seringueira, soja, tomate e trigo
Tebuconazol (Tebuconazole)	Triazol	Fungicida	Abacaxi, abóbora, álamo, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, berinjela, beterraba, cacau, café, caqui, cebola, cenoura, cevada, citros, cravo, crisântemo, eucalipto, feijão, figo, gladiólo, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssego, pimentão, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva
Tiacloprido (Thiacloprid)	Neocotinóide	Inseticida	Alface, algodão, alho, banana, batata, berinjela, cebola, citros, couve, crisântemo, feijão, gérbera, mamão, melancia, melão, pepino, Pimentão, soja e tomate

A ANVISA também possui uma lista dos ingredientes ativos não autorizados, ou seja, que não podem ser utilizados em nenhuma cultura. Entre eles, estão, por exemplo, **Clorfenvinfós**, Lindano, Aldrin, Azinfós Etilico.

As estruturas dos agrotóxicos usadas neste estudo estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5 – Estruturas dos agrotóxicos usadas neste estudo: a) Carbendazim; b) Carbofurano; c) Clorpirifós; d) Tebuconazol ; e) Clorfenvinfós.



3.2.1 Métodos de Quantificação de Agrotóxicos

Conforme Alder et al., há décadas, a determinação de resíduos de agrotóxicos era feita utilizando a técnica de GC acoplada a sistemas de detecção tais como, detecção por captura de elétrons (*Electron Capture Detection*, ECD), detecção de nitrogênio e fósforo (*Nitrogen and Phosphorus Detection*, NPD) e detecção por fotometria de chama (*Flame Photometric Detection*, FPD). A técnica GC-MS, ou seja, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é utilizada com frequência para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos, se tratando de um dos principais métodos de quantificação aplicado em análise de resíduos de pesticidas, já que permite que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos ocorram de maneira simultânea. (ALDER. et al., 2006).

Outra alternativa de quantificação de agrotóxicos em alimentos é o uso de GC acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS), que de acordo com Martinez-Vidal et. al., proporciona a análise de resíduos de pesticidas ao nível de traços na presença de interferentes provenientes da matriz, já que promove um aumento de seletividade além de redução do ruído, sem perda da capacidade de identificação. Por permitir

a determinação de diferentes analitos coeluentes, esta técnica é recomendada na análise de amostras complexas (MARTINEZ-VIDAL; ARREBOLA; MATEU-SANCHEZ, 2002).

Alder et al. (2006) afirmam que há alguns anos, os métodos de quantificação baseados em cromatografia líquida (LC) eram raramente aplicados na análise de resíduos de pesticidas, já que os detectores utilizados, tais como ultravioleta e arranjo de diodos, geralmente apresentam menor seletividade e sensibilidade se comparados com os métodos de GC. Porém, Frenich et al. (2004) atentam para o fato de que com a tendência do uso de pesticidas mais polares, que não são adequados para análise por GC por apresentarem, em geral, menor persistência e toxicidade do que compostos apolares, foi necessária a adequação dos métodos de análise existentes. Com isso, atualmente, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é um dos métodos mais utilizado na análise de resíduo de pesticidas em frutas e vegetais. Trata-se do método mais indicado para análise de compostos de baixa volatilidade ou labilidade térmica.

Mais recentemente, o acoplamento LC com detecção por espectrometria de massa *tandem* (MS-MS) tem sido fundamental para esse tipo de análise multirresíduos, pois assim como com GC-MS/MS, a LC-MS/MS tem-se um aumento de seletividade e sensibilidade proporcionando o monitoramento de centenas de pesticidas em uma única análise (ALDER et. al., 2006). Considerando que a análise de resíduos de pesticidas é uma das tarefas mais importantes no controle da segurança alimentar e que a maioria dos pesticidas monitorados nos dias de hoje são facilmente detectados por LC-MS/MS, esta se torna uma técnica indispensável em laboratórios que trabalham com análise multirresíduo de pesticidas (KITTLAUS, S. et. al. 2012).

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A análise de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos é normalmente dificultada pela interferência de compostos presentes em matrizes complexas (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007). Hercegová. Dömötöróvá e Matisová (2007) afirmam que a necessidade de etapa prévia de preparo da amostra se dá não só devido à complexidade das matrizes, como também pelo fato de os analitos estarem presente em concentrações muito baixas (em nível de traços) e ainda pelas diferentes propriedades químicas que estes analitos apresentam.

De acordo com Chen et al. (2008)., os métodos de extração/pré-concentração são realmente importantes, pois promovem a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, removendo o máximo possível de interferentes. Sendo essa etapa de preparo

extremamente necessária e crucial em todo o processo analítico, pois perdas durante tal etapa podem comprometer consideravelmente os resultados das análises.

Assim, o desafio é maximizar a recuperação dos analitos e minimizar as interferências, através de procedimentos de extração e *clean-up* adequados. Várias técnicas modernas baseadas tanto em extração de solventes como de membrana de sorção foram testadas nos últimos anos para atingir este objetivo. A etapa de *clean up* consiste em realizar a purificação do extrato, após extração com solvente, a fim de minimizar o efeito-matriz e reduzir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (PICÓ; BLASCO; FONT, 2004).

Entre os procedimentos de preparo/extração de amostras de alimentos para análise de resíduo de agrotóxicos por métodos cromatográficos, Lambropoulou e Albanis (2007) destacam extração por solvente: SE (*Solvent Extraction*) que pode ser seguida por extração em fase sólida: SPE (*Solid-Phase Extraction*), QuEChERS. Entre os métodos instrumentais de extração por solvente são citados extração por fluido supercrítico: SFE (*Supercritical – Fluid Extraction*), extração acelerada por solventes: PLE (*Pressurized-Liquid Extraction*) e extração assistida por micro-ondas: MAE (*Microwave-assisted extraction*). Ainda existem os métodos de extração sortiva, entre os quais estão dispersão da matriz em fase sólida: MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*), extração em fase sólida: SPE (*Solid-Phase Extraction*), microextração em fase sólida: SPME (*Solid-Phase Microextraction*) e extração sortiva em barra magnética: SBSE (*Stir-Bar-Sorptive Extraction*)

De acordo com Prestes et al. (2009), os métodos de extração anteriormente citados, com exceção do QuEChERS, possuem desvantagens consideráveis, tais como maior tempo de análise, número limitado de pesticidas extraídos, ou seja, não são considerados ideais para método multiresíduo.

3.3.1 Extração por Ultrassom

Nos procedimentos de análise química, os sistemas geradores de ondas ultra-sônicas são largamente empregados na etapa de preparo de amostras, seja em processos de extração de espécies químicas ou de dissolução de amostras sólidas (KORN.; ANDRADE, 2003).

Conforme Mitra (2003), a extração por ultrassom, também conhecida como sonicação é um método bem simples, que utiliza a vibração de ultrassons para assegurar um contato íntimo entre a amostra e o solvente. A sonicação é relativamente rápida, mas a extração pode não ser tão eficiente se comparada a outras técnicas. É geralmente realizada com a amostra em solvente e recipiente adequados, submetendo esse recipiente a um banho de ultrassom ou ainda com sonicador ponteira, causador das vibrações. Para amostras de baixa concentração, a

amostra deve ser extraída duas ou mais vezes. Após cada extração, o extrato é filtrado ou centrifugado. Depois disso, os extratos de todas as extrações são unidos e o extrato final passa por algum tipo de limpeza antes da análise.

3.3.2 Extração por Solvente (Shaker)

De acordo com Luthria, Biswas e Natarajan, (2007), na extração por solvente em agitador, é geralmente utilizado um Erlenmeyer com tampa para conter o sólido a ser extraído, e adicionando solvente adequado. A agitação se dá por um tempo de acordo com cada tipo e massa de amostra, podendo ainda ser acidificada.

3.3.3 Extração por MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)

A dispersão da matriz em fase sólida, MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) foi proposta por Barker, Long e Short (1989) auxiliando na resolução de muitos problemas de extração de matrizes sólidas e semi sólidas, quando se utiliza uma fase sólida.

De acordo com Barker (2000), a técnica de MSPD é feita adicionando a amostra diretamente com um adsorvente (dispersante), o que propicia a realização de várias etapas no preparo da amostra simultaneamente. O procedimento da extração por MSPD consiste basicamente em introduzir a amostra em um recipiente contendo um suporte sólido (adsorvente), misturar até homogeneização, geralmente por maceração, transferir essa mistura feita com a matriz e o adsorvente para a coluna e eluir com solvente apropriado. Assim, a coluna MSPD terá a matriz dispersa no adsorvente.

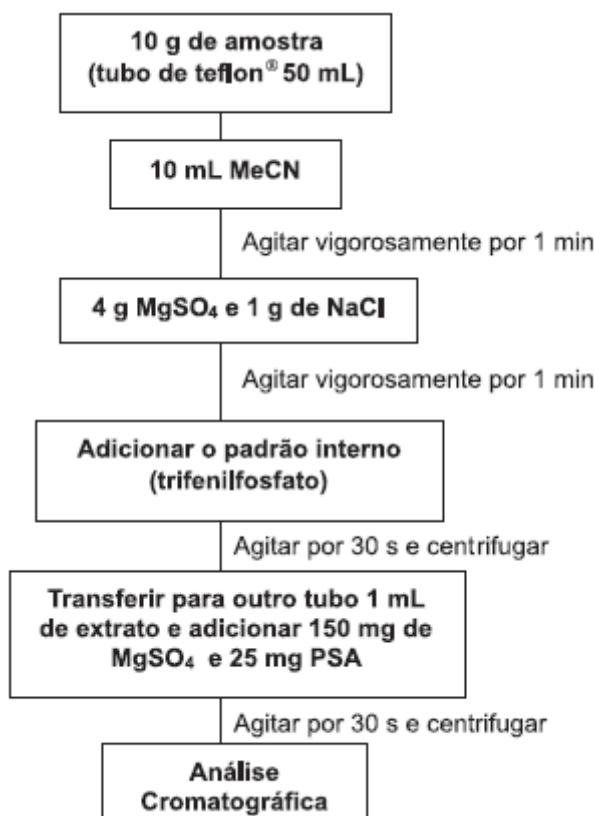
Dórea e Lopes (2004) lembram que o suporte sólido ou dispersante atua como abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra, além de adsorver compostos da matriz, ainda permite que o material misturado seja empacotado na coluna, pressionando o êmbolo ajustado ao cartucho, como uma seringa, até a parte inferior do cartucho. Tal suporte sólido ou dispersante também promove a eluição dos analitos sequencialmente com o solvente, e faz com que a matriz distribuída no suporte produza um único material com a fase sólida da coluna, permitindo um novo grau de fracionamento da amostra.

3.3.4 QuEChERS

O QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) trata-se de um método de preparo de amostras para análise de resíduo de pesticidas, proposto por Anastassiades et.

al.em 2003. Tal método possui como principais vantagens, como o próprio nome sugere, ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Foi criado com a intenção de obter um procedimento dinâmico aplicável a qualquer laboratório. O fluxograma descrito na Figura 6 apresenta o método originalmente proposto (PRESTES et al., 2009).

Figura 6 – Fluxograma do método QuEChERS original proposto por Anastassiades et. al. em 2003.



Adaptado de (PRESTES et al., 2009).

As principais variáveis otimizadas no estudo inicial foram a quantidade de amostra utilizada, a escolha do solvente, as formas de agitação, adição de sais e separação de fases, *clean-up*.

Quanto à quantidade de amostra, para maior eficiência do método, deve ser utilizada a menor quantidade possível, desde que esta garanta representatividade estatística no resultado final. A quantidade otimizada geralmente é 10 g, pois esta se mostra ideal se comparada com as quantidades de 15 g e 100 g necessárias em outros métodos (ARREBOLA et al., 2003).

Na escolha do solvente usado na extração foram avaliadas características importantes como: seletividade, partição e *clean-up*, custo, segurança, além deste solvente ter capacidade de extrair pesticidas de diferentes polaridades. Os solventes mais utilizados na extração

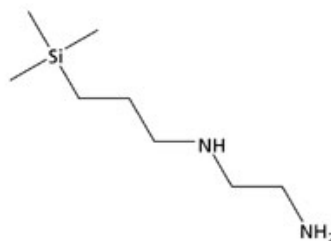
multirresíduo de pesticidas são acetato de etila, acetona e acetonitrila (MeCN). O método QuEChERS faz uso de acetonitrila, que possui como vantagens a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos existentes na amostra (como pigmentos e gorduras), além de extrair muitos pesticidas com diferentes polaridades. Além disso, a acetonitrila é o solvente mais indicado para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do que os outros dois citados (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

No QuEChERS a agitação é feita com auxílio de Vortex, pois esse garante que extração ocorra em frasco fechado, com maior rapidez e sem expor o analista (PRESTES et al., 2009).

Por se tratar de uma etapa rápida, fácil e de baixo custo, a adição de sais é vantajosa, pois não dilui o extrato da amostra e propicia separação das fases orgânica e aquosa. No método QuEChERS originalmente proposto, foi utilizada mistura de NaCl e MgSO₄, por esse último apresentar maior capacidade de remoção da água. A adição de sais secantes melhora a recuperação de pesticidas polares, já que diminui a solubilidade desses analitos na fase aquosa, conseqüentemente reduzindo a quantidade de água e aumentando a solubilidade desses compostos na fase orgânica (KOESUKWIWATA et. al., 2008).

A etapa de *clean-up* é necessária, pois componentes da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insensor, assim como na coluna cromatográfica, o que provoca alteração dos resultados e principalmente aumenta a necessidade de manutenção mais frequente do equipamento utilizado. O método de *clean-up* proposto a ser utilizado no QuEChERS é a adição de um volume de extrato com uma quantidade de sorvente PSA (*Primary Secondary Amine*) que é uma amina primária-secundária e MgSO₄. A extração em fase sólida dispersiva, D-SPE (*Dispersive Solid Phase Extraction*), como é chamado esse método de *clean-up*, possibilita que a “limpeza” e a redução da água residual aconteçam rápida e simultaneamente. O sorvente usado retém interferentes da matriz, pois a estrutura bidentada do PSA, mostrada na Figura 7 (SIGMA ALDRICH, 2012), tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte (SHIMELIS et. al., 2006).

Figura 7 – Estrutura do PSA (amina primária-secundária).



Adaptado de (SIGMA ALDRICH, 2012).

Desde quando foi proposto, o QuEChERS passou por algumas modificações, tais como adição de um ácido juntamente com acetonitrila, que promove melhores recuperações de pesticidas com problemas de estabilidade (PRESTES et al., 2009).

3.4 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

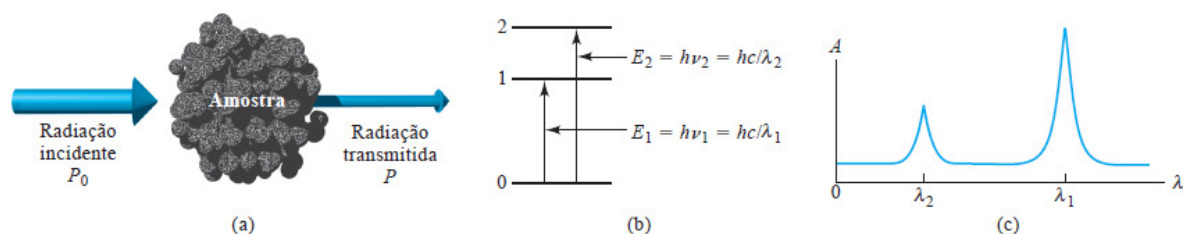
As medições de absorção de radiação ultravioleta e visível, que compreendem a região de comprimento de onda do espectro eletromagnético de 160 nm à 800 nm são de grande aplicação na determinação quantitativa de uma variedade de espécies orgânicas e inorgânicas (HARVEY, 2000).

A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medição da transmitância T ou a absorbância A . O princípio consiste um feixe proveniente da fonte do equipamento que incide na amostra contida dentro de uma cubeta, geralmente de quartzo ou vidro transparente na região onde passa o feixe que percorre o caminho óptico, distância de um lado a outro da cubeta que contém amostra. Parte desse feixe de luz incidente é absorvido pela amostra e o restante que passa pelo caminho óptico sem ser absorvido, considerado feixe transmitido, e este chega até o detector. A resposta do equipamento observada é a diferença entre esses dois feixes (incidente e transmitido) gerando o sinal analítico. O princípio da técnica está baseada na Lei de Beer, representada na equação (1):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Em que A representa absorbância, T transmitância, P_0 o feixe incidente pela fonte, P o feixe transmitido ao detector, ϵ a absorvidade molar (expressa em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), b o caminho óptico percorrido (em cm) e c a concentração do analito. Este esquema está representado na Figura 8.

Figura 8 – (a) A radiação incidente igual a P_0 pode ser absorvida pelo analito, resultando em um feixe de menor potência P transmitido ao detector. (b) De acordo com as diferenças de energia, ocorre a absorção. (c) Espectro de absorção resultante.



Adaptado de (SKOOG et. al., 2006).

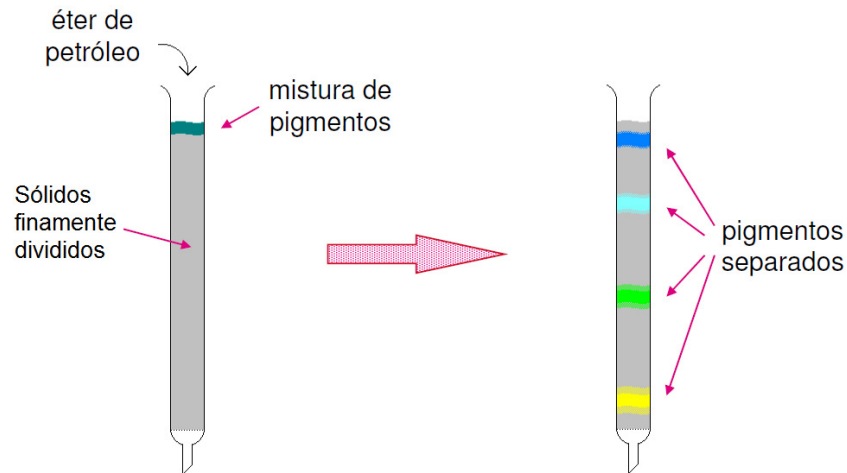
Segundo a Lei de Beer, a absorbância é proporcional à concentração e a ϵ , ou seja quanto maior a concentração do composto na amostra e maior absorvidade molar maior será a absorbância, salvo casos em que a concentração é alta. A ϵ é característica intrínseca de cada composto, por isso compostos com características diferentes possuem respostas diferentes.

Na espectroscopia de absorção molecular, em que a transmitância é uma razão de duas potências radiantes, o instrumento usado é chamado um espectrofotômetro. As fontes comumente usadas são de lâmpada de deutério para comprimentos de onda na região do UV, e lâmpada de tungstênio para medidas na região do visível (SKOOG et. al., 2006).

3.5 CROMATOGRAFIA

O termo cromatografia deriva do grego *chrom* (cor) e *graphie* (escrever) atribuídos a Mikhael Semenivhc TSWETT, devido aos seus trabalhos com separação de componentes dos extratos de folhas, em 1906, conforme Figura 9, os quais usavam colunas de vidro com vários sólidos finamente divididos e adicionados para arrastar o extrato, uma mistura de hidrocarbonetos (COLLINS et. al. 2006).

Figura 9 – Ilustração da experiência de Tswett 1906

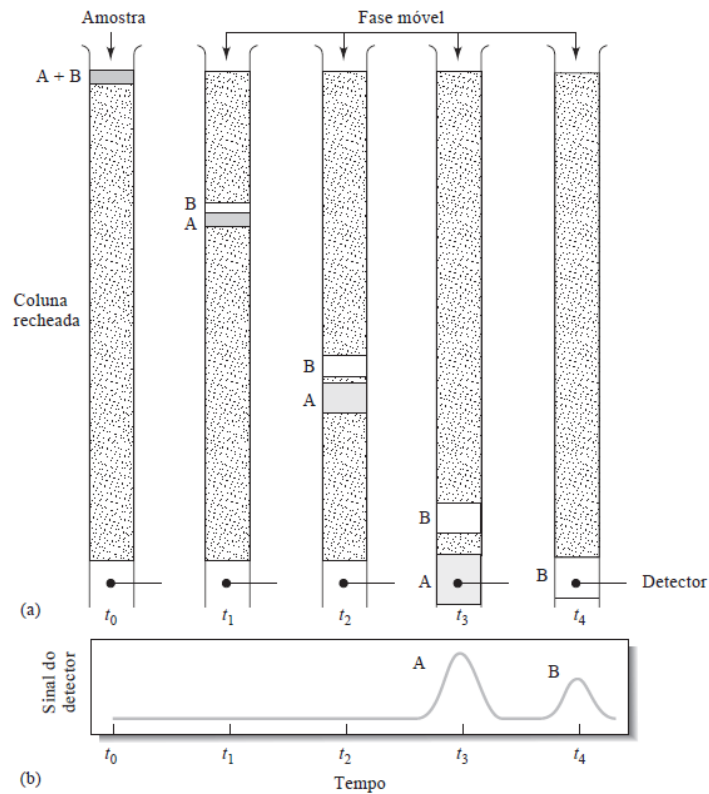


Com base neste princípio foi possível separar pigmentos de inúmeras plantas em pesquisas posteriores à estudada por Tswett, isto inclui entre estes pigmentos a clorofila, descoberta em estudos em cromatografia em papel (COLLINS et. al. 2006).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes contidos em uma mistura (COLLINS et. al.; SKOOG et. al., 2006).

O princípio da técnica consiste na distribuição de componentes em duas fases. A fase estacionária, responsável pela retenção das substâncias devido a diversos tipos de interações, e uma fase móvel, responsável por transportar os componentes da mistura por esta fase estacionária (SKOOG et. al. 2006), conforme ilustra a Figura 10. As interações entre componentes e fase estacionária causam o que Collins et. al. (COLLINS et. al. 2006) chamam de: “migrações diferenciais”.

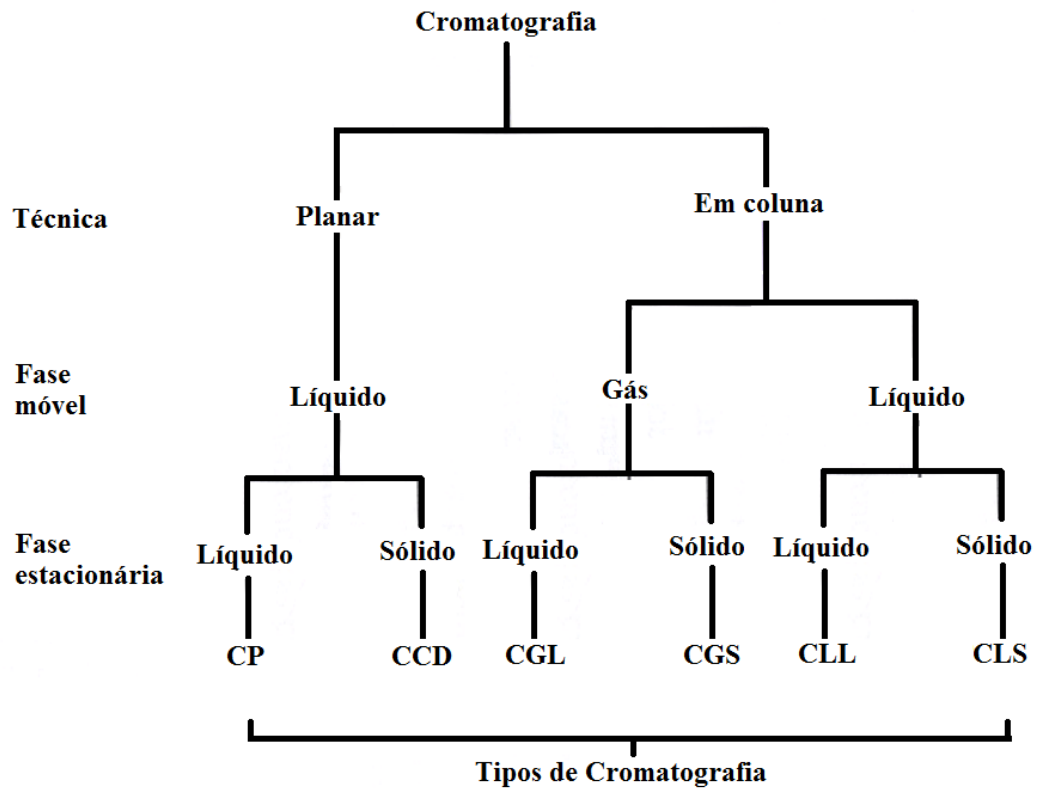
Figura 10 - Diagrama descrevendo (a) a separação de componentes A e B de uma mistura em uma coluna cromatográfica e (b) o cromatograma gerados pelos diferentes os tempos de retenção.



Adaptada de Skoog et al (2006).

A denominação da classe da cromatográfica a ser utilizada depende da técnica a ser explorada (planar ou em coluna) e do estado físico das fases (estacionária e móvel) envolvidas. Um exemplo simplificado segue na Figura 11.

Figura 11 - Tipos de Cromatografia a partir de estados físicos das fases.



CP: Cromatografia em Papel; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; CGL: Cromatografia Gás-Líquido; CGS: Cromatografia Gás-Sólido; CLL: Cromatografia Líquido-Líquido; CLS: Cromatografia Líquido-Sólido.

Adaptada de Collins (2006)

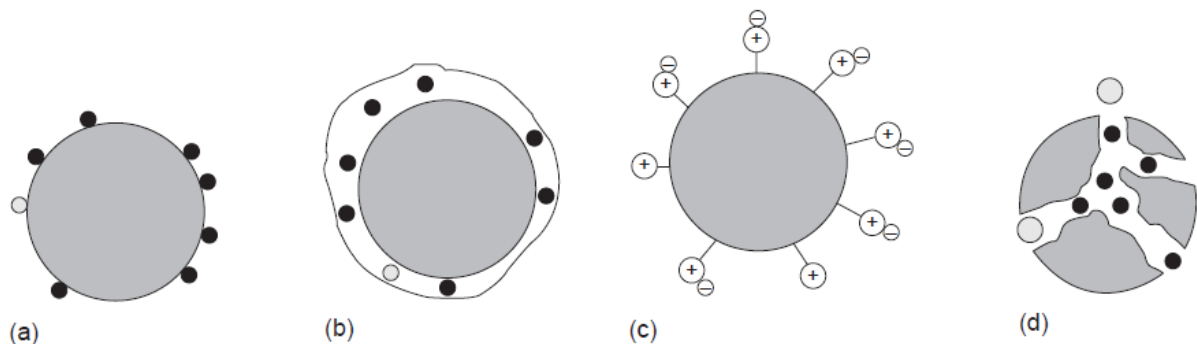
Entre as técnicas de cromatografia em coluna existem diferentes tipos de mecanismos responsáveis pela separação dos compostos na coluna cromatográfica apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 12.

Tabela 2 - Tipo de equilíbrio de acordo com a fase estacionária

Classificação Geral	Método Específico	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia gasosa (CG)	Gás-líquido (CGL)	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre o gás e o líquido
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia líquida (CL)	Líquido-líquido ou partição	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina trocadora de íons	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Partição/penetração
	Afinidade	Líquido específico para determinado grupo ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquido superficial e o líquido móvel

Adaptada de Skoog et. al. (2006)

Figura 12 - Esquema apresentado diferentes tipos de interação: (a) Adsorção, (b) Partição, (c) Troca Iônica e (d) Exclusão



Adaptada de Harvey (2000).

3.5.1 Cromatografia a Gás

A cromatografia gasosa baseia-se na separação de componentes voláteis de uma mistura devido à distribuição destes entre uma fase estacionária, sólida ou líquida, e a fase móvel gasosa. Esta separação ocorre devido ao mecanismo de partição, quando a fase

estacionária é um líquido, ou por adsorção quando a fase estacionária é um sólido (SKOOG et. al. 2006).

A amostra pode ser de natureza líquida (solução) ou gasosa, desde que os componentes da solução, solventes e demais substâncias, sejam voláteis (ponto de ebulição abaixo de 300°C) (COLLINS 2006).

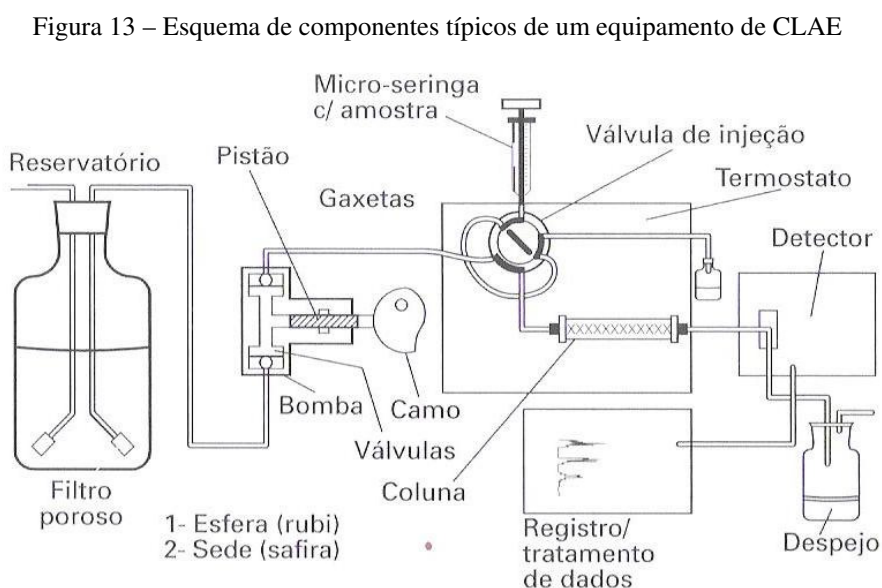
Este trabalho terá seu desenvolvimento focado na preparação de amostras para CLAE, porém a cromatografia gasosa também possui como uma de suas principais aplicações, a análises de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos, devido ao controle ambiental necessário nesses casos.

3.5.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

O princípio da cromatografia líquida de alta eficiência consiste em, segundo Skoog et. al. (2006), “um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida”.

Devido à fase estacionária ser finamente dividida, o que torna a coluna cromatográfica mais resistente, é possível aplicar altas pressões na eluição da fase móvel, reduzindo o tempo de análise, melhorando sua eficiência, o que caracteriza a técnica (COLLINS 2006).

A Figura 13 apresenta componentes típicos de um equipamento de CLAE. Entre estes, o reservatório de fase móvel, o filtro de entrada, as bombas e válvulas de mistura, a válvula de 6 vias para introdução da amostra com looping e micro-seringa, filtros ou pré-colunas, coluna cromatográfica, detectores e registro para tratamento de dados.



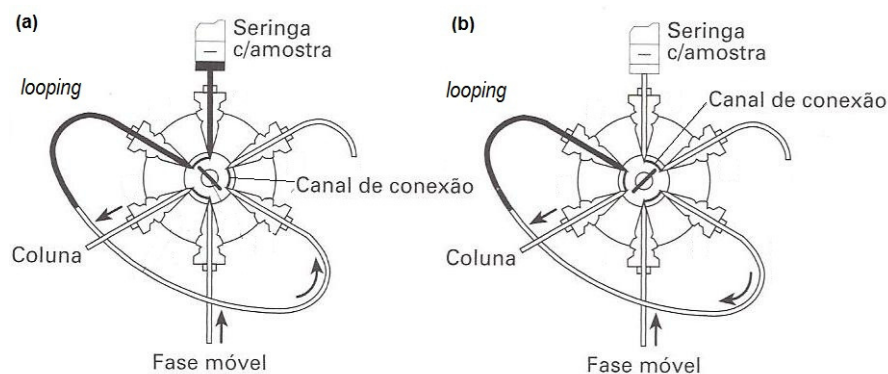
Adaptado de Ciola (1998).

O solvente que se encontra no reservatório é bombeado pela bomba do equipamento e a válvula de mistura controla a proporção quando se utiliza mais de um solvente como fase móvel.

A bomba e a válvula de mistura controlam também o modo de eluição: isocrático ou gradiente. O modo isocrático consiste no uso de um único solvente ou na mesma composição de fase móvel ao longo da análise cromatográfica, enquanto o modo gradiente consiste na variação da composição quando se utiliza dois ou mais solventes (SKOOG et al 2006).

O sistema de introdução de amostra consiste em uma válvula de 6 vias que regula a entrada de amostras e o *looping* aonde é armazenado o volume a ser injetado antes deste ir para coluna (CIOLA, R. 1998).

Figura 14 - Válvula de amostragem de 6 vias



Adaptado de Ciola (1998)

A válvula no modo injeção no *looping* (Figura 14a) regula para introdução da amostra pela micro-seringa no *looping* ou na alça de injeção com o volume desejado. Depois de preencher com alíquota da amostra, a válvula troca para modo de injeção na coluna (Figura 14b). A válvula direciona a fase móvel para o *looping* arrastando para o volume de amostra injetado anteriormente.

A coluna cromatográfica é responsável pela separação dos constituintes da amostra. Para CLAE as colunas são do tipo empacotada, com variações do tamanho de partícula e do filme que recobre estas partículas (COLLINS et. al., 2006).

Ainda é possível o controle de temperatura através de um termostato e um forno em que a coluna fica contida. Após os componentes das amostras serem separados pela coluna, chegam ao detector gerando o sinal analítico (CIOLA, 1998).

3.5.3 Detectores

De acordo com Collins et. al (2006) o detector é o componente do sistema cromatográfico que mede de forma contínua propriedade física ou físico-química da amostra ou da solução a ser analisada, enviando um sinal, gerado logo que o eluente sai da coluna e chega ao detector, que geralmente é proporcional à concentração do analito na amostra (COLLINS et. al., 2006).

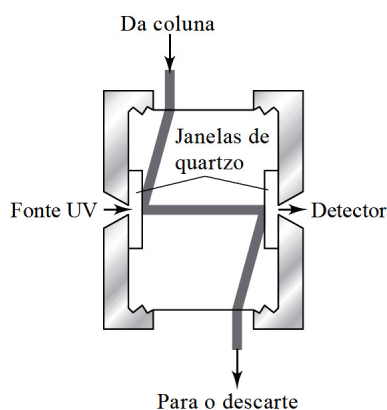
O detector pode ser universal ou seletivo, devido a sua capacidade de trabalhar com todos os tipos de amostras ou com uma classe ou tipo de substância, respectivamente.

3.5.3.1 Detector UV

Os detectores por absorvância no ultravioleta e visível são detectores espectrofotométricos, cujo funcionamento baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através desta qualquer radiação eletromagnética, o que normalmente ocorre desde a região do ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda (COLLINS et. al., 2006). A resposta desse detector é seletiva, uma vez que terá capacidade de detectar somente os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector. Visto que a grande maioria das substâncias absorve a radiação UV, incluindo as que possuem elétrons π e elétrons desemparelhados, ligações duplas conjugadas, compostos contendo bromo, iodo ou enxofre, entre outros, trata-se de um dos detectores mais usados em CLAE.

Na Figura 15 é apresentado um esquema básico de um detector espectrofotômetro de UV-Vis para CLAE. Segundo Ciola (1998), este detector é composto por uma fonte de UV, uma célula de fluxo (por onde passa a fase móvel e as substâncias separadas na coluna) e um detector. A célula de fluxo é colocada no caminho óptico da fonte ao detector e entre as janelas de quartzo que evitam reflexões internas e efeitos de refração.

Figura 15 – Detector UV-Visível para CLAE



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Água deionizada e purificada (com resistividade de 18,2 MΩ cm) em sistema Milli-Q[®] da Millipore foi utilizada nas extrações e na obtenção do branco do espectro eletrônico, assim como a acetonitrila grau HPLC da marca J.T. Baker. O Peróxido de Hidrogênio P.A. utilizado no teste químico para minimização da clorofila presente nas amostras foi da Vetec.

Para a extração por QuEChERS, foram usados Sulfato de Magnésio Seco, da Vetec, Acetato de Sódio anidro P.A. também da marca Vetec, Bondesil - PSA Varian.

Para MSPD foi usado Bondesil Envirelut. Os cartuchos de Florisil usados foram Varian-Bond Elut, Mega Bond Elut[®] FL.

Para análise em CLAE-UV, preparou-se uma solução mista em acetonitrila, a partir dos seguintes padrões de agrotóxicos: carbendazim, carbofuran, chlorfenvinphos, chlorpyrifos e tebuconazole, cada um deles já estavam na concentração de 2 ppm. A solução consistiu em utilizar 1,0 mL de cada.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As análises de extração por ultrassom, Shaker e MSPD foram realizadas em laboratórios do Instituto de Química da UFRGS. A extração pelo método QuEChERS foi realizada na FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde), mais especificamente no Lacen-RS (Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul), foi utilizada a metodologia desse laboratório, que é referência por utilizar esse método de extração na análise de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros, em especial no programa PARA (Programa Análise de Resíduo de Agrotóxicos em Alimentos) gerenciado pela ANVISA.

Os equipamentos usados nos três primeiros métodos de extração testados consistiram em forno de aquecimento da marca Fornos Elétricos Sanchis, para secagem de vidrarias, além do ensaio de teor de umidade, balança analítica DENVER INSTRUMENT, modelo APX-200 também utilizado para teor de umidade, centrífuga IEC Centra MP4R, banho de ultrassom THORTON T14, Vortex Biomixer QL-901, Agitador Shaker da marca De Leo.

Para o QuEChERS, realizado no Lacen-RS, foram utilizados: balança analítica Quimis - Scientech AS 210, centrífuga Thermo Scientific - Heraeus Megafure 16R e *Vortex* Sieger, potência 90W.

Os equipamentos comuns a todos os ensaios foram processador/homogeneizador de amostras Büchi Mixer B-400, da marca Büchi Switzerland, peneira Mesh Series SIEVE – Fischer Scientific, com 10, 20, 40, 60, 80 e 100 Meshes, lâmpada para teste com radiação

infravermelho Philips – Infraphil – 150 W, lâmpada para teste com radiação ultravioleta VLC – 125 W. Para obtenção do espectro eletrônico, foi usado UV-Vis VARIAN 50 Conc UV - Visible Spectrophotometer. A análise por CLAE-UV foi feita em equipamento HPLC Ultimate 3000 da marca DIONEX utilizando Coluna modelo ACCLAIM® RSLC 120 C18 (2,2 µm de diâmetro de partícula x 3,0 mm de diâmetro x 50,0 mm de comprimento), com detector espectrofotométrico na região do UV.

4.3 LIMPEZA DO MATERIAL

A vidraria utilizada foi previamente descontaminada com hexano comercial, acetona comercial, seguida de lavagem com água e detergente e enxague com água destilada. Posteriormente, foi novamente passado acetona e hexano e seca em forno de aquecimento a 300°C durante 2 horas. Vidrarias volumétricas foram submetidas ao mesmo procedimento, porém não foram secas em forno, e sim a temperatura ambiente.

4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de erva-mate utilizadas no processamento foram recebidas no Lacen - RS (Laboratório Central do estado do Rio Grande do Sul), com exceção da erva-mate orgânica, que foi adquirida em comércio local (mercado). Tais amostras foram produzidas no Rio Grande do Sul. A Tabela 3 mostra a relação das amostras processadas.

Tabela 3 - Relação de amostras processadas.

Amostra de Erva- Mate	Processamento
Org – TP	Triturada e Peneirada
Org – P	Peneirada
A – TP	Triturada e Peneirada
A – P	Peneirada
B – TP	Triturada e Peneirada
B – P	Peneirada
C – TP	Triturada e Peneirada
C – P	Peneirada

A forma de processamento ao qual a cada amostra foi submetida foi uma das variáveis estudadas para o teste de teor de umidade. Sendo estas trituradas e peneiradas ou apenas peneiradas.

Cada amostra contendo 1,0 kg foi homogeneizada, 250,0 g foram pesados e triturados em processador Buchi, para que os talos da erva-mate tivessem seu tamanho reduzido. Posteriormente, essa quantidade foi peneirada em peneira de malhas, com capacidade de separar 10, 20, 40, 60, 80, 100 Meshes da marca Mesh Series SIEVE, Fisher Scientific. Neste caso, foi utilizado o conteúdo recolhido ao passar pela peneira de 60 Meshes.

Outros 250,0 g foram igualmente peneirados, porém sem serem submetidos a qualquer processamento.

4.5 TEOR DE UMIDADE

O teste para determinação do teor de umidade foi realizado em todas as amostras previamente processadas conforme já descrito. O método utilizado foi o indicado nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo (LUTZ, 1985).

Em balança analítica, foram pesadas 3 g de cada amostra em pesa-filtro, seguido de aquecimento em a 95°C durante 1 hora em forno de aquecimento. Após esse tempo, as amostras foram deixadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente e pesadas novamente. Esse procedimento de aquecimento, ambientação de temperatura e pesagem foi repetido até cada amostra apresentar peso constante, totalizando 12 repetições.

4.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os quatro métodos de extração utilizados foram: extração por ultrassom, por solvente (Shaker), MSPD e QuEChERS. Uma única amostra escolhida foi submetida a esses quatro métodos, separadamente, sendo esta a amostra A-P, cujo processamento foi feito somente por peneira.

4.6.1 Condições dos experimentos de extração

Para fins de otimização dos resultados, foram avaliadas duas diferentes massas de amostra de erva-mate, com dois diferentes solventes.

Nos quatro métodos avaliados foram utilizadas quantidades de massa de aproximadamente 1,0 g e 5,0 g. Os dois solventes foram água e acetonitrila.

Sendo assim, foram estudadas quatro diferentes situações entre si para os métodos de extração por ultrassom, oito situações para extração por solvente (devido a duas condições de tempo de agitação diferentes), duas para MSPD (a situação de 5 g se tornou inviável) e duas para o método QuEChERS (somente testado com acetonitrila, por seguir o método do LacenRS), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições das extrações realizadas.

Ensaio	Método de Extração	Massa (g)	Solvente	Volume de Solvente (mL)	Tempo de Agitação (min)
US 1	Ultrassom	1,0049	Água	30,0	-
US 2	Ultrassom	5,0038	Água	40,0	-
US 3	Ultrassom	1,0069	Acetonitrila	30,0	-
US 4	Ultrassom	5,0028	Acetonitrila	40,0	-
S 1	Solvente	1,0034	Água	15,0	5
S 2**	Solvente	5,0076	Água	30,0	5
S 3	Solvente	1,0048	Acetonitrila	15,0	5
S 4	Solvente	5,0074	Acetonitrila	20,0	5
S 5**	Solvente	1,0033	Água	15,0	60
S 6**	Solvente	5,0073	Água	30,0	60
S 7	Solvente	1,0022	Acetonitrila	15,0	60
S 8	Solvente	5,0046	Acetonitrila	20,0	60
M 1	MSPD	1,0014	Água	15,0	-
M 3	MSPD	1,0029	Acetonitrila	15,0	-
Q 1	QuEChERS	1,0007	Acetonitrila*	10,0	-
Q 2**	QuEChERS	5,0022	Acetonitrila*	10,0	-

*Acetonitrila contendo 1% de ácido acético

**A filtração com Florisil se tornou inviável

4.6.2 Extração por Ultrassom

Na extração por ultrassom, foram usadas em torno de 1,0 g e 5,0 g de amostra e os solventes foram água e acetonitrila, sendo que as quantidades exatas da massa pesada encontram-se na Tabela 4.

A primeira etapa foi realizada com a amostra previamente pesada colocada em tubo de centrífuga e inicialmente adicionada de 10,0 mL de solvente para as quatro situações. Após 15 minutos submetidas a ultrassom, e posterior correção na massa com adição de solvente aos tubos para equilibrar o peso, os tubos foram colocados em centrífuga com 2000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e preservado.

A segunda etapa foi feita com o sólido restante no tubo, no qual foram adicionados 10,0 mL de solvente nos ensaios que continham aproximadamente 1,0 g de amostra e 15,0 mL nos que continham aproximadamente 5,0 g, novamente sonicados e colocados em centrífuga

nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi novamente retirado. A terceira etapa consistiu na repetição da segunda.

O conteúdo do sobrenadante retirado nas três etapas foi misturado e passado em cartucho de Florisil, com auxílio de filtração a vácuo. O filtrado foi recolhido e o sólido descartado.

4.6.3 Extração por Solvente (Shaker)

A extração por solvente foi feita utilizando as duas quantidades de amostra propostas, de aproximadamente 1,0 g e 5,0 g (valores exatos pesados vide Tabela 4) e com os dois solventes, água e acetonitrila. Após pesada, a amostra foi transferida para Erlenmeyer e foram adicionados solventes nas proporções já mostradas na Tabela 4, para cada situação. O Shaker foi ligado em potência máxima para agitação durante o tempo estabelecido em cada caso, 5 minutos e 60 minutos, também especificados na Tabela 4. O conteúdo de cada erlenmeyer foi passado em cartucho de Florisil, com auxílio de filtração à vácuo. O filtrado foi recolhido em tubo de ensaio e o sólido descartado.

4.6.4 MSPD

A extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) foi feita com aproximadamente 1,0 g de amostra, com água e com acetonitrila. O teste com 5,0 g não foi possível, pois essa quantidade de erva-mate ocuparia volume maior do que a capacidade do cartucho usado na extração. Os valores exatos de massa estão descritos na Tabela 4.

O método consistiu em macerar com auxílio de gral e pistilo a quantidade previamente pesada de amostra juntamente com 2,0 g de Bondesil Envirelut. Em seguida, o sólido misturado foi transferido ao cartucho, com o sistema de filtração já montado. O solvente foi passado em cartucho de Florisil, utilizando filtração à vácuo para acelerar a passagem do solvente. O volume de solvente usado totalizou 15,0 mL, sendo adicionados em três alíquotas de 5,0 mL, filtrado foi recolhido em tubo de ensaio e o sólido foi descartado.

4.6.5 QuEChERS

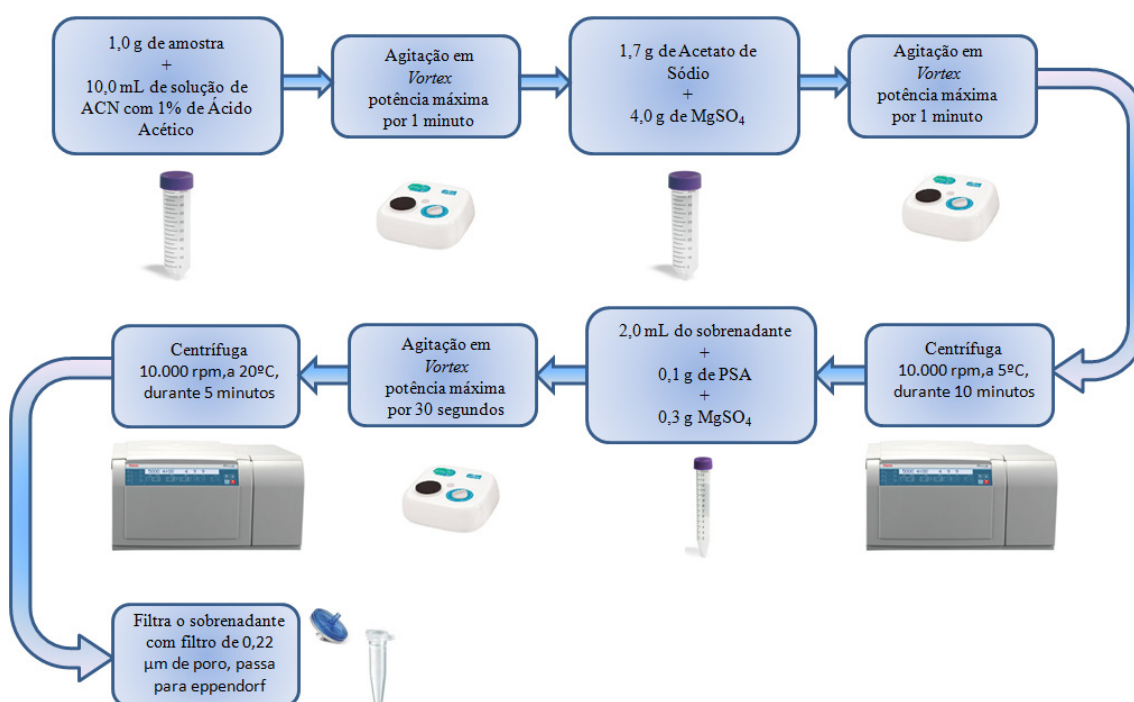
O método QuEChERS seguiu o utilizado nas amostras de hortifrutigranjeiros analisadas no Lacen-RS. A única adaptação foi na quantidade de amostra utilizada, uma vez que o Lacen-RS usa 10,0 g de amostra e as quantidades avaliadas neste estudo foram aproximadamente 1,0 g e 5,0 g. Essa mudança foi feita porque com 10,0 g de erva-mate, os 10,0 mL de solvente utilizados são totalmente adsorvidos pela erva. O uso de 10,0 g seria uma

quantidade exagerada, pois exigiria uma adaptação desnecessária ao método, tendo que se aumentar o volume de solvente consideravelmente.

O método, cujo fluxograma de procedimento está representado na Figura 16 e as quantidades exatas na Tabela 4, consistiu em colocar a massa de amostra pesada em tubo Falcon (com capacidade de 50,0 mL) e adicionar 10,0 mL de solução 1% ácido acético em acetonitrila. Seguido de agitação em *vortex*, potência máxima durante 1 minuto. Depois disso, foram adicionados aproximadamente 4,0 g de sulfato de magnésio seco (atua como adsorvente) e 1,7 g de acetato de sódio (para auxiliar na partição). Novamente foi feita agitação em *vortex* potência máxima durante 1 minuto. Em seguida, a amostra foi colocada na em centrífuga com rotação de 10.000 rpm, a 5°C, durante 10 minutos. Com isso, houve separação das fases, foi retirado o volume de 2,0 mL do sobrenadante e transferido para tubo Falcon (com capacidade de 15,0 mL), no qual já tinham sido previamente pesados aproximadamente 0,3 g de sulfato de magnésio seco e 0,1 g de PSA. Mais uma agitação foi feita na potência máxima do *vortex* por 30 segundos. O sistema foi colocado em centrífuga, com rotação de 10.000 rpm a 20°C por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado para Eppendorf, através de filtro de 0,22 µm de poro.

A intenção de testar esse método foi reproduzir o usado no Lacen-RS, por isso a acetonitrila foi o único solvente nesse caso.

Figura 16 – Fluxograma do procedimento utilizado para o método de extração QuEChERS



4.7 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO QUANTO À MATRIZ

Para a avaliação da remoção da matriz, todos os extratos obtidos a partir dos métodos de extração avaliados, foram analisados em equipamento de absorção molecular, sendo comparados os espectros eletrônicos de cada sistema em estudo.

4.8 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DA MATRIZ

Como a matriz apresenta coloração muito intensa, mesmo utilizando os métodos de extração propostos, foram realizados estudos de degradação, utilizando para isso radiação Infravermelho, Ultravioleta e oxidação com peróxido de hidrogênio.

Os estudos com esses processos de degradação foram realizados a partir de uma solução preparada com 4,0 mL do extrato US 3 (ultrassom, com aproximadamente 1,0 g de amostra pesada e acetonitrila) avolumando com acetonitrila em balão volumétrico de 50,0 mL.

4.8.1 Degradação por Infravermelho e Ultravioleta

A solução preparada com o extrato US 3 foi separada em alíquotas de 3 mL, em tubos de ensaio e submetidas a radiação infravermelho, utilizando para isso uma lâmpada posicionada a 15,0 cm do tubo de ensaio que continha o extrato, de forma que cada tubo permaneceu os tempos diferentes referentes a 30, 60, 90 e 120 minutos sob irradiação. Após as medidas do espectro eletrônico em UV-Vis, foram realizadas antes da submissão a radiação e imediatamente depois de cada tempo definido. O mesmo procedimento foi utilizado para radiação ultravioleta.

O espectro eletrônico de todas as situações analisadas foi feito em UV-Vis, usando comprimento de 800 nm a 200 nm e tendo como branco, o solvente acetonitrila.

4.8.2 Degradação com peróxido de hidrogênio

Foram medidas duas alíquotas de 5,0 mL da solução preparada com o extrato US 3 e adicionadas cada uma de 3 gotas de peróxido de hidrogênio, agitadas e deixadas em repouso, a primeira por 15 minutos e a segunda por 1 semana. Foi medido espectro eletrônico antes e imediatamente depois desses tempos citados.

4.9 ANÁLISE POR CLAE-UV

Para análise em CLAE-UV, preparou-se uma solução mista em acetonitrila, contendo os seguintes padrões de agrotóxicos: carbendazim, carbofuran, chlorfenvinphos, chlorpyrifos e tebuconazole, na concentração de 2 ppm, colocando 1,0 mL de cada um desses padrões em balão volumétrico de 5,0 mL. Em um vial foram colocados 500 μ L de água e 500 μ L da mistura de padrões, agitado em *vortex*, e analisado em CLAE-UV. Os comprimentos de onda avaliados foram 254 nm, 270 nm, 280 nm e 350 nm.

Com a mesma solução do extrato US 3, as quatro situações irradiadas com a lâmpada infravermelho e as quatro com a lâmpada ultravioleta foram analisadas em CLAE-UV, apenas em comprimento de onda igual a 270 nm. Para isso, em um vial, foram colocados 500,0 μ L de solução e 500,0 μ L de água Milli-Q. A temperatura de 25°C, volume de injeção de 20,0 μ L. A fase móvel usada foi acetonitrila e o modo gradiente, está descrito na Tabela 5.

Tabela 5 –Gradiente utilizado na CLAE-UV.

Tempo (min)	Condição
0 – 2	50% água e 50% acetonitrila
2 – 10	Curva (2) 100% acetonitrila
10 – 15	100% acetonitrila
15 – 20	50% água e 50% acetonitrila

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE TEOR DE UMIDADE

Os resultados de teor de umidade obtidos nas amostras estão na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6– Resultados para teor de umidade nas amostras.

Pesa-filtro	Amostra de Erva- Mate	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Teor de Umidade (%)
1	Org - TP	3,0360	2,9133	4,04
2	Org - P	3,0064	2,8866	3,98
3	A – TP	3,0074	2,8564	5,02
4	A – P	3,0154	2,8848	4,33
5	B – TP	3,0160	2,8297	6,18
6	B – P	3,0084	2,8176	6,34
7	C – TP	3,0112	2,9058	3,50
8	C – P	3,0469	2,9379	3,58

Conforme a Resolução RDC nº 303, de 07 de novembro de 2002, o teor de umidade da erva-mate deve ser de no máximo 10% p/p. (ANVISA, 2002). Como já demonstrado na Tabela 6, nenhum dos experimentos para teor de umidade atingiu esse valor, todas as amostras foram consideradas de acordo com a legislação.

5.1.1 Processamento das amostras

Duas formas de processamento foram avaliadas. A primeira consistiu em triturar as amostras em processador Buchi seguida de peneiramento. A segunda forma foi somente peneirar as amostras, sem nenhum outro processamento.

Comparando os dados na Tabela 6, não foi observada diferença significativa entre o teor de umidade nas amostras com as duas formas de processamento da amostra, mas houve uma tendência das amostras submetidas ao triturador apresentarem maior teor de umidade do que as amostras somente peneiradas. A amostra escolhida para dar continuidade às análises foi a A-P, pois foi somente peneirada e apresentou menor teor de umidade, se comparada ao processamento feito triturando e peneirando essa amostra.

5.2 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS

As Figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam o espectro eletrônico para cada condição cujo extrato obtido foi possível de ser filtrado em Florisil. De acordo com estas figuras, é fácil observar que os extratos em acetonitrila, apresentaram bandas no espectro eletrônico mais próximas ao perfil do espectro eletrônico característico da clorofila do que os com água.

Figura 17 – Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 1,0 g e usando água como solvente.

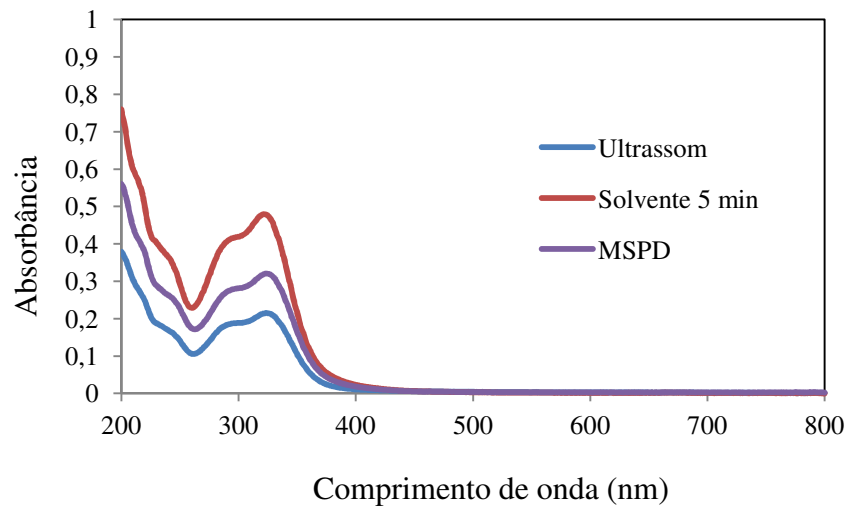


Figura 18 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 5,0 g e usando água como solvente

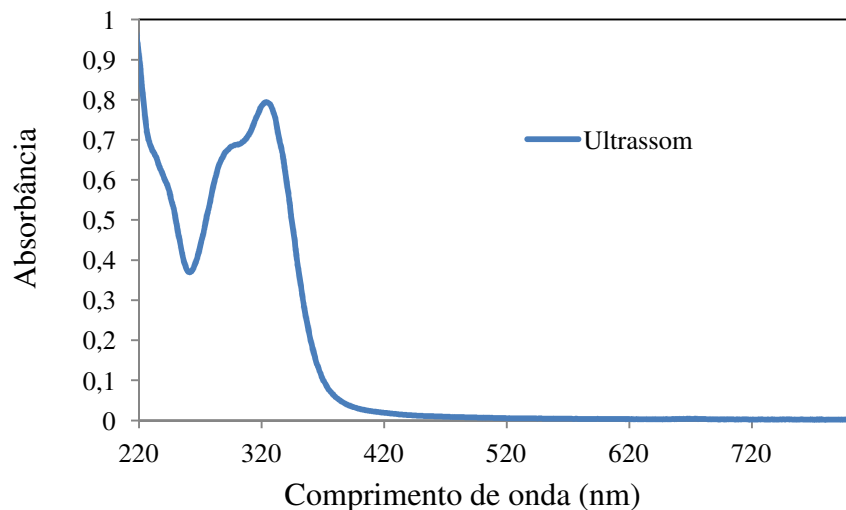


Figura 19 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 1,0 g e usando acetonitrila como solvente

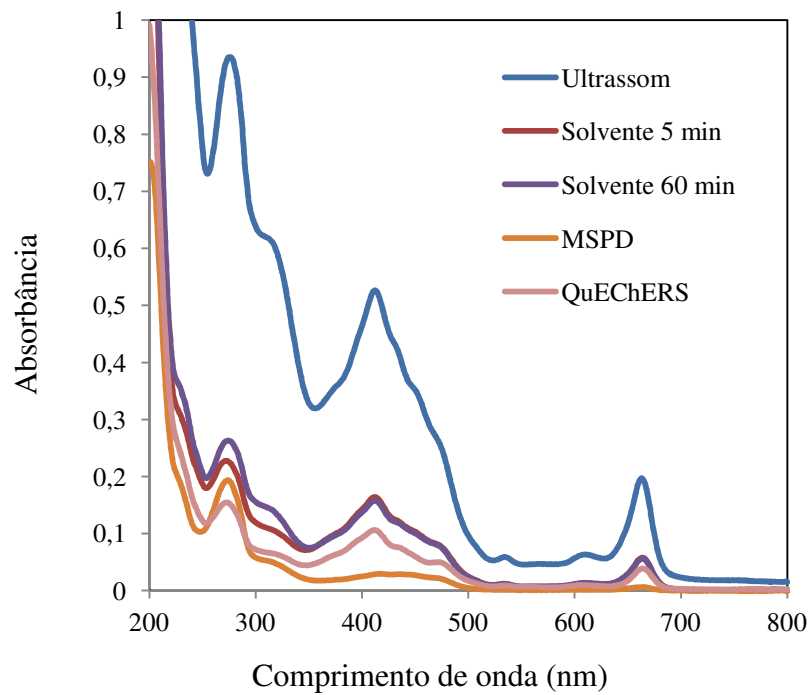
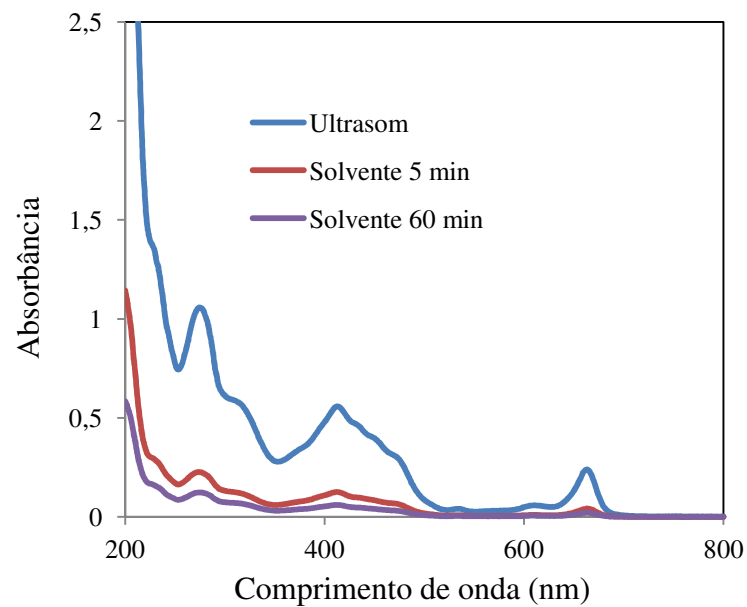


Figura 20 - Espectro eletrônico com massa das amostras de aproximadamente 5,0 g e usando acetonitrila como solvente



5.2.1 Escolha do solvente extrator

Os solventes avaliados foram água e acetonitrila. Com base no fato de o consumo de erva-mate se dar majoritariamente na forma de chá e chimarrão, cujo preparo é feito com água, a intenção de usá-la como solvente foi de tentar aproximar a condição de extração ao uso da erva-mate. O uso de acetonitrila foi feito por se tratar do solvente mais indicado para análise por cromatografia líquida (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Em todos os métodos de extração avaliados, o solvente acetonitrila, frente à água se mostrou mais eficiente, pois proporcionou um extrato mais límpido e o tempo de passagem desse solvente pela amostra foi bem menor. A água dificultou a filtração, assim, não se mostrou um bom eluente. A filtração com esse solvente, para as análises com aproximadamente 5,0 g de amostra de erva-mate, em geral, levaram cerca de 2 horas para passar em torno de 10,0 mL de água pelo cartucho de Florisil.

5.2.2 Massa de amostra e volume do solvente

O ideal seria utilizar maior quantidade de amostra, com menor volume de solvente. Mas em alguns métodos, essa proporção não gera volume suficiente de extrato, além de dificultar a passagem do extrato pelo Florisil.

Entre as quantidades de massa avaliadas, que foram de aproximadamente 1,0 g e 5,0 g, para todos os quatro métodos de extração deste estudo, a massa equivalente à quantidade aproximada de 1,0 g se mostrou mais eficiente, pois apesar de possuir menor presença de analitos, essa quantidade facilitou a passagem do solvente, além de ter possibilitado a diminuição do volume de solvente necessário e reduzido o tempo de análise. O uso de menor volume de solvente ainda contribui na minimização do impacto ambiental gerado pelo resíduo, já que acetonitrila possui toxicidade a ser considerada.

5.2.3 Extrato para estudos de degradação

Em todos os métodos a condição ideal observada foi aquela em que se utilizou acetonitrila como solvente e a massa de amostra de erva-mate foi de cerca de 1,0 g, devido às bandas visualizadas no espectro eletrônico, ao tempo de filtração e a aparência do extrato final (os extratos com acetonitrila se mostraram mais límpidos).

Considerando o espectro eletrônico observado para cada extrato, o do ensaio US 3, cuja massa de erva-mate pesada foi em torno de 1,0 g e em acetonitrila, foi o escolhido para proceder a avaliação da degradação da matriz por radiação infravermelho, ultravioleta e por

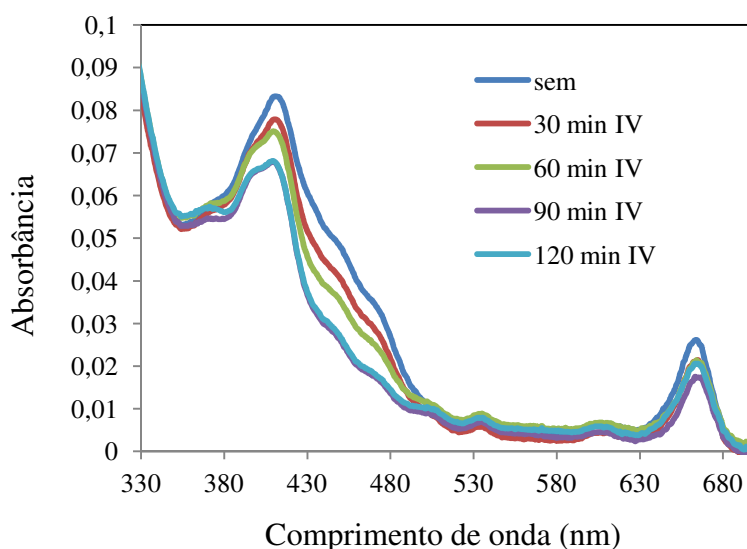
oxidação com água oxigenada. Tal escolha foi feita considerando que ultrassom foi o método de extração que gerou maior volume de extrato final, tornando possível avaliar as formas de degradação partindo de um único extrato. Além disso, foi o extrato que apresentou maior absorvância, quando em acetonitrila, de acordo com cada espectro eletrônico já discutido.

5.2.4 Degradação da clorofila presente na matriz

Os dados de degradação da clorofila presente na matriz utilizando radiação IV e radiação UV, são apresentados nas Figuras 21 e 22, respectivamente. A Figura 23 apresenta a comparação dos espectros eletrônicos para a degradação com IV e UV.

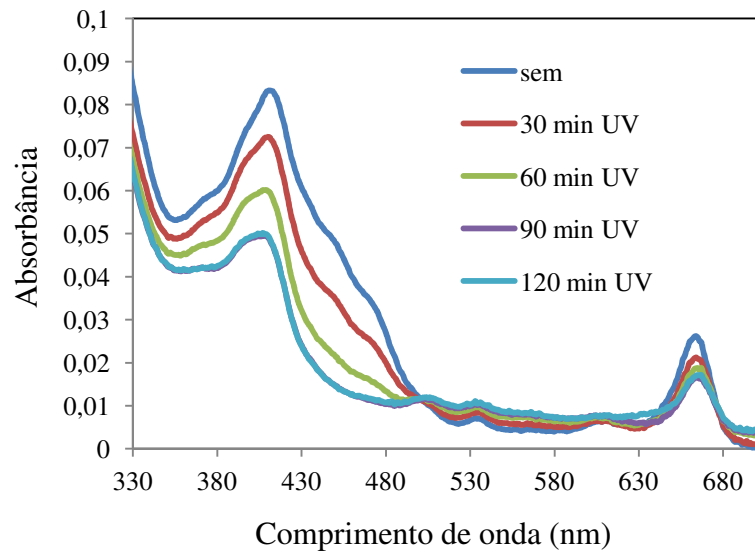
A Figura 21 mostra o espectro eletrônico comparativo do comportamento na análise por UV-Vís com a solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P de erva-mate, sem sofrer radiação, e com diferentes tempos submetido a radiação infravermelho.

Figura 21 - Comparação do espectro eletrônico da solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P, antes e após certos tempos de radiação infravermelho.



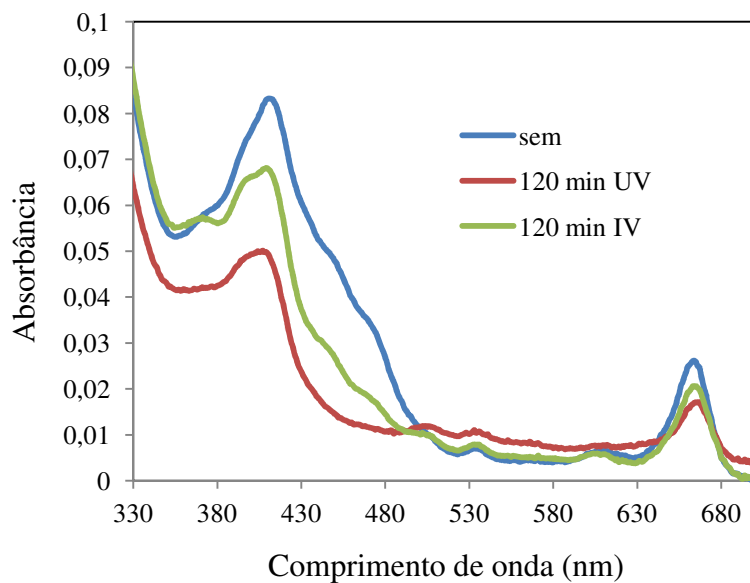
A Figura 22 mostra o espectro eletrônico comparativo do comportamento na análise por UV-Vís com a solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P de erva-mate, sem sofrer radiação, e com diferentes tempos submetido a radiação ultravioleta.

Figura 22 – Comparação do espectro eletrônico da solução preparada com o extrato US 3 da amostra A-P, antes e após certos tempos de radiação ultravioleta.



As Figuras 21 e 22 mostram que as duas principais bandas de absorção, que se encontram em aproximadamente 410 nm e 664 nm tiveram a intensidade reduzida, principalmente com 120 minutos de radiação. Essa mudança foi mais evidenciada no extrato que sofreu radiação ultravioleta, se comparada com infravermelho, conforme mostra a Figura 23.

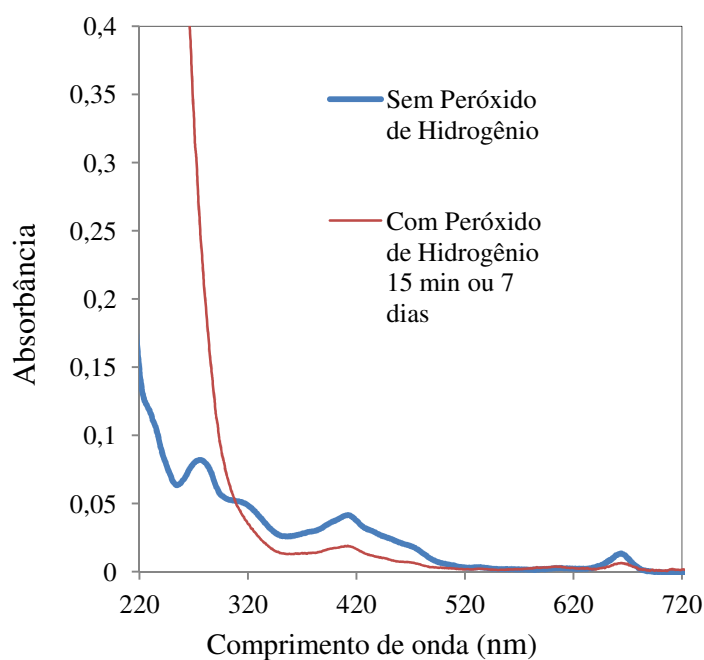
Figura 23 – Comparação entre os extratos obtidos por ultrassom com e sem radiação UV e IV por 120 min.



Além disso, foram dois testes para estudos de degradação com peróxido de hidrogênio, que são apresentados na Figura 24.

A Figura 24 mostra a comparação entre o espectro eletrônico obtido antes e após a adição de peróxido de hidrogênio. De acordo com a qual, é possível observar que com esta adição, apesar de haver uma pequena diminuição das bandas correspondentes ao espectro eletrônico da clorofila, este peróxido provavelmente também oxidou outros compostos, uma vez que apareceram outras bandas no espectro eletrônico, que não são características do sistema sem a presença de peróxido de hidrogênio, ou seja, pode haver outros interferentes com esta adição, o que a torna não eficiente para o propósito deste trabalho.

Figura 24 - Espectro eletrônico do extrato US 3 da amostra A-P, com e sem adição de peróxido de hidrogênio



Entre as três formas de tentar degradar a clorofila presente na erva-mate, que foram avaliadas neste estudo, aquela em que foi utilizada radiação UV se mostrou mais eficiente, mesmo que essa degradação não tenha sido tão significativa. A radiação com IV também, provocou redução na absorvância, mas bem menor se comparada a radiação UV.

5.3 DETERMINAÇÕES POR CROMATOGRAFIA À LÍQUIDO

5.3.1 Condições de análise dos agrotóxicos

Uma solução dos padrões com os cinco agrotóxicos foi analisada por CLAE-UV, em cinco diferentes comprimentos de onda (254 nm, 270 nm, 280 nm e 350 nm), a fim de identificar qual apresentaria a melhor resposta para todos (Figura 25). A Tabela 7 mostra os tempos de retenção de cada padrão. As condições de fase móvel e coluna foram aquelas já estabelecidas para anteriormente.

Figura 25 – Cromatograma dos padrões de agrotóxicos em CLAE-UV. Legenda: 1) Carbendazim, 2) Carbofuran, 3) Tebuconazole, 4) Chlorfenvinphos, 5) Chlorpyrifos - (A) cromatograma mostrando os picos dos cinco analitos; (B) cromatograma com expansão da região entre 4,51 min e 8,42 min.

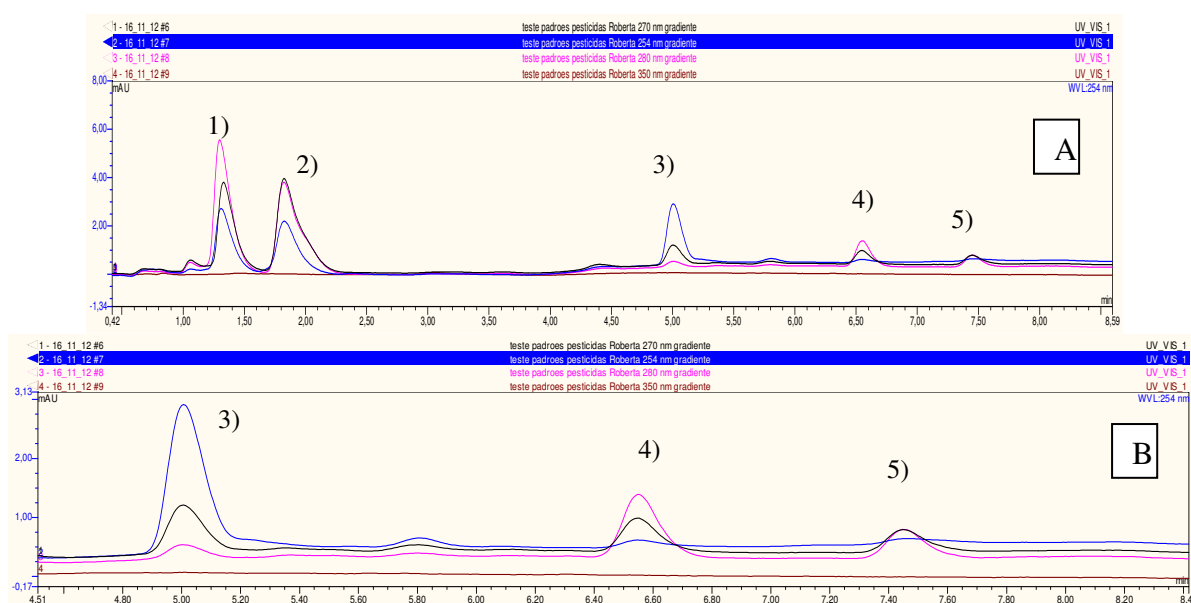


Tabela 7 – Tempos de retenção dos padrões de agrotóxicos usados.

Tempo (min)	Analito
1,33	Carbendazim
1,83	Carbofuran
5,00	Tebuconazole
6,55	Chlorfenvinphos
7,45	Chlorpyrifos

Foi observado que o único comprimento de onda no qual os cinco analitos aparecem no cromatograma foi o equivalente a 270 nm.

5.3.2 Degradação da clorofila presente na matriz

Os extratos depois de submetidos à radiação de lâmpadas Infravermelho e Ultravioleta nos tempos já mencionados foram analisados em CLAE-UV, apenas em 270 nm, pois este foi o comprimento de onda que apareceram os picos referentes aos padrões de agrotóxicos no cromatograma (Figura 25), ou seja a análise dos extratos deve ser feita nas mesmas condições da dos padrões. Os cromatogramas obtidos para cada amostra estão na Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma dos extratos US 3após radiados com UV em CLAE-UV

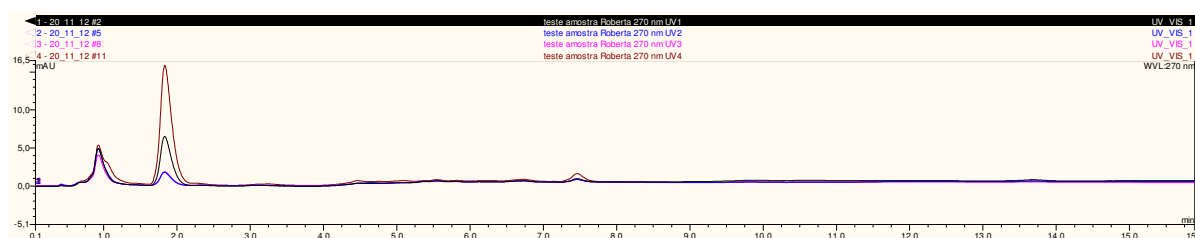
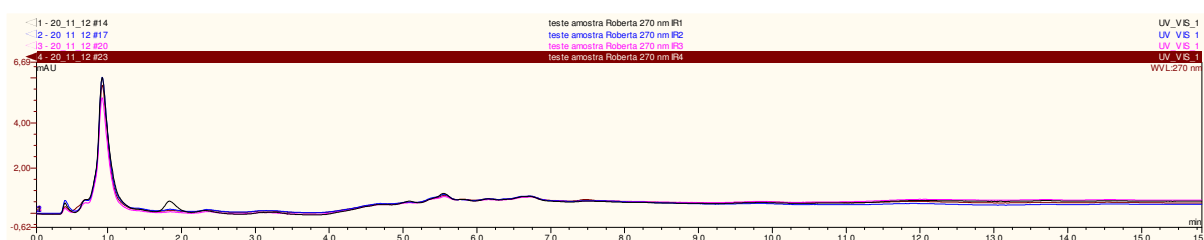


Figura 27 - Cromatograma dos extratos US 3após radiados com IV em CLAE-UV



Comparando as Figuras 26 e 27, observa-se uma possível interferência, tanto nos extratos com radiação UV como os com radiação IV, pois aparecem picos nos tempos de retenção equivalentes a 0,93 e 1,84 minutos.

No cromatograma da Figura 26, a melhor situação observada é aquela em que o extrato permaneceu durante 60 minutos sob radiação UV, visto que possui menor linha de base, se comparada às demais. Já na Figura 27, os tempos em que o extrato permaneceu sob radiação IV não tiveram influência no cromatograma, pois apresentaram o mesmo comportamento. Porém ao comparar as linhas de base dos extratos com radiação IV e com UV, a melhor situação é a com IV, uma vez que são necessários 30 minutos de radiação, enquanto que com UV são necessários 60 minutos para obter picos de mesma intensidade no tempo de retenção equivalente a 0,93 minutos. Além disso, o segundo pico, que aparece em 1,84 minutos no cromatograma com UV (Figura 26), não é observado no cromatograma com IV (Figura 27), isto é, mais uma evidência de que através da CLAE-UV, o melhor método seria com radiação IV, no menor tempo estudado (30 minutos).

Além disso, visto que uma das bandas de absorção da clorofila visualizadas no espectro eletrônico é a de comprimento de onda de aproximadamente 420 nm, os extratos foram analisados por CLAE-UV também neste comprimento de onda.

Figura 28 - Cromatograma do extrato US, após 60 min de radiação UV em CLAE-UV

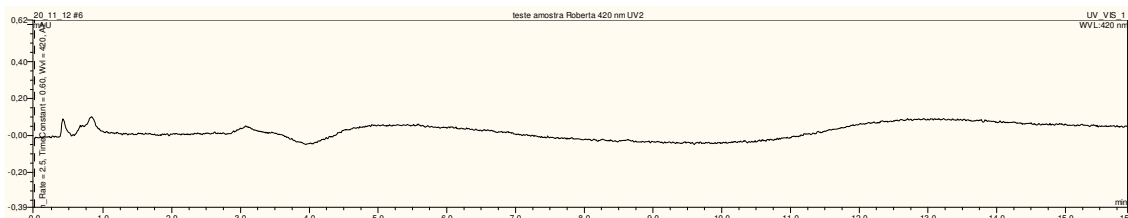
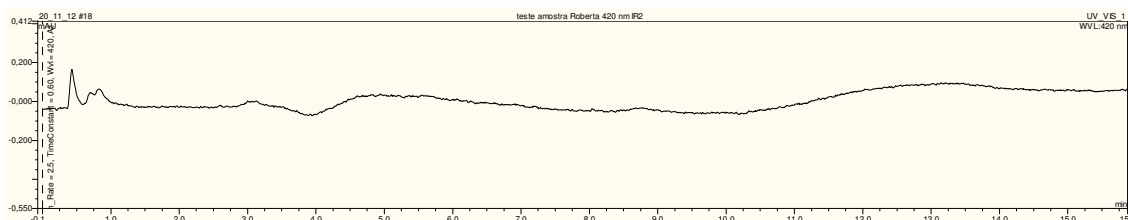


Figura 29 - Cromatograma do extrato US, após 60 min de radiação IV em CLAE-UV



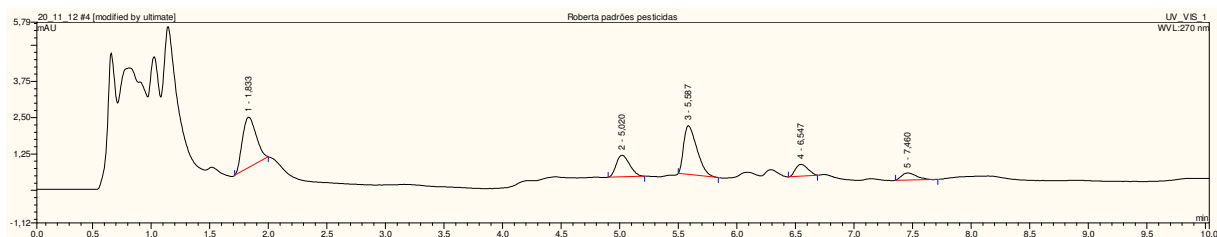
Como observado nas Figuras 28 e 29, não apareceram picos no cromatograma, quando utilizado comprimento de onda de 420 nm, porém este não poderá ser utilizado nas análises, pois os picos referentes aos padrões de agrotóxicos não aparecem em 420 nm.

5.3.3 Efeito de Matriz com relação à resposta dos analitos

A fim de avaliar o efeito de matriz com relação à resposta dos analitos, foi preparada uma solução com padrões de agrotóxicos (A) e outras duas soluções (B e C), preparadas com extratos obtidos fortificados com os padrões.

A solução A foi preparada com 50% água e 50% da mistura de padrões de agrotóxicos em acetonitrila, já referenciada neste trabalho (Carbendazim, Carbofuran, Tebuconazole, Chlorfenvinfos e Chlorpyrifos), cuja concentração de cada analito correspondeu a 0,5 ppm, e filtrada utilizando filtro 0,22 μm . Foi realizada análise por CLAE-UV, cujo resultado está representado na Figura 30.

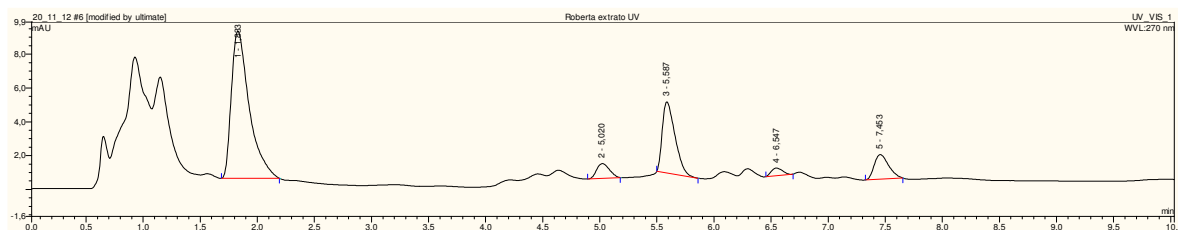
Figura 30 - Cromatograma da solução de padrões de agrotóxicos em 50% acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.



Ao analisar a Figura 30, é possível observar 5 picos representativos, sendo o primeiro deles em 1,83 min. Porém, no cromatograma da Figura 30 acima não é possível obter a área do pico referente ao Carbendazim, que aparece em 1,33 min, pois há uma coeluição na região entre 0,5 min e 1,4 min. O pico referente ao tempo de 5,58 min, havia aparecido anteriormente com intensidade não significativa, porém como o Chlorfenvinphos é um isômero, então aparecem dois picos no cromatograma, que são em 5,58 min e em 6,55 min.

Considerando que de acordo com a análise por CLAE-UV realizada anteriormente, entre os extratos obtidos através de extração por ultrassom submetidos à radiação UV, o que se mostrou mais eficiente, por ter menor interferência da matriz, foi aquele que sofreu radiação ultravioleta durante 60 minutos. A solução B consistiu em 50 % desse extrato fortificado com padrões em acetonitrila e 50% água, com a concentração dos analitos em 0,5 ppm. A Figura 31 representa o cromatograma obtido, após filtrar a solução B em filtro 0,22 μm .

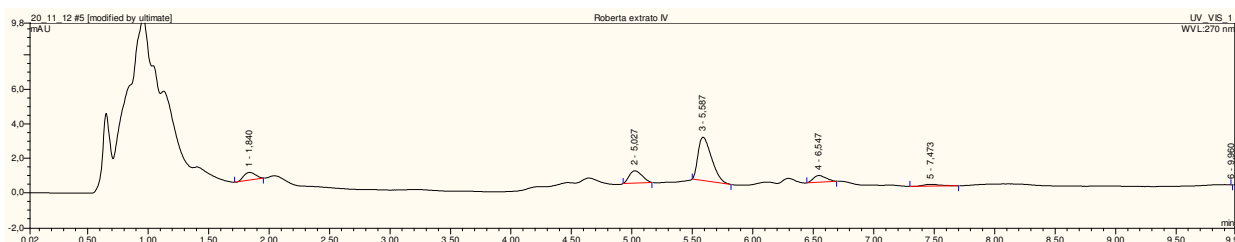
Figura 31 - Cromatograma da solução contendo 50% do extrato US 3 usado radiação UV por 60 minutos fortificado com padrões de agrotóxicos em acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.



Também de acordo com a análise por CLAE-UV realizada anteriormente, entre os extratos obtidos através de extração por ultrassom submetidos à radiação IV, o que se mostrou mais eficiente, por ter menor interferência da matriz, foi aquele que sofreu radiação infravermelho durante 30 minutos. A solução C consistiu em 50 % desse extrato fortificado

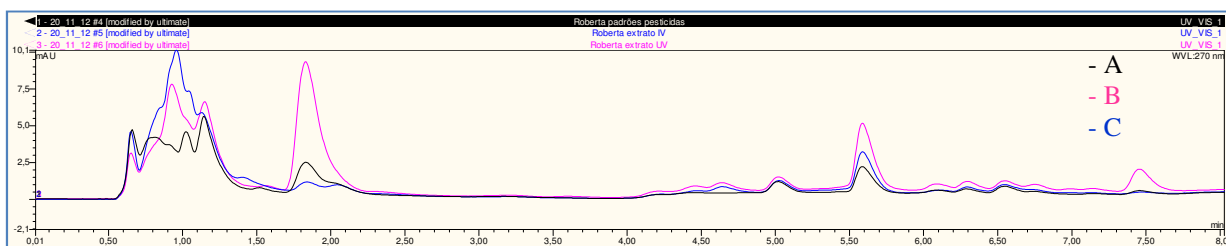
com padrões em acetonitrila e 50% água, com a concentração dos analitos em 0,5 ppm. Essa foi passada em filtro 0,22 μm . A Figura 32 representa o cromatograma obtido.

Figura 32 - Cromatograma da solução contendo 50% do extrato US 3 usado radiação IV por 30 minutos fortificado com padrões de agrotóxicos em acetonitrila e 50% água, cuja concentração de cada analito é de 0,5 ppm, por CLAE-UV.



Os cromatogramas das Figuras 30, 31 e 32, referentes aos obtidos para cada uma das soluções preparadas, A, B e C foram sobrepostos e estão apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Sobreposição dos cromatogramas das soluções A, B e C, por CLAE-UV.



A partir das áreas referentes a cada pico, foram calculados os percentuais de recuperação, cujos resultados encontram-se na Tabela 8 a seguir. Esta recuperação refere-se apenas ao efeito da matriz não tendo sido avaliado a recuperação do procedimento.

Tabela 8- Valores correspondentes às áreas de cada pico e o percentual de recuperação do analito.

Tempo de Retenção (min)	Analito	Padrões (A)	Extrato UV (B)	Extrato IV (C)	% Recuperação	
					Extrato (UV)	Extrato (IV)
1,33	Carbendazim*	-	-	-	-	-
1,83	Carbofuran	0,2373	1,5794	0,0497	666%	21%
5,02	Tebuconazole	0,0988	0,1135	0,088	115%	89%
5,58	Chlorfenvinphos	0,2195	0,5409	0,3232	246%	147%
6,55	Chlorfenvinphos	0,0499	0,0506	0,0471	101%	94%
7,46	Chlorpyrifos	0,0353	0,212	0,0161	601%	46%

* Não pode ser visualizado devido a coeluições

De acordo com a Figura 33, mais uma vez foi evidenciado que o extrato que apresentou o menor efeito de matriz foi o obtido após extração por ultrassom, foi usada radiação IV durante 30 minutos, se comparado ao extrato em que foi utilizada radiação UV durante 60 minutos. Os dados da Tabela 8 corroboram, pois demonstram percentuais de recuperação dos analitos bem maiores para o extrato em que foi usado radiação UV, frente aos percentuais obtidos usando radiação IV. Assim, conforme já esperado, o efeito de matriz foi mais significativo no extrato UV.

Para que o efeito do procedimento proposto sobre os analitos a serem analisados fique melhor estabelecido, em trabalhos futuros deverão ser realizados experimentos em que os analitos são adicionados na amostra antes de iniciar os procedimentos de extração/pré-concentração. No final os dados obtidos serão comparados com soluções padrão a fim de determinar a perda ocorrida.

6 CONCLUSÕES

Para os ensaios de teor de umidade, todas as oito amostras analisadas estavam de acordo com a legislação. Além disso, o processamento não teve influência significativa no teor de umidade de cada amostra de erva-mate.

Entre os parâmetros de massa e solvente utilizados, a melhor situação para todos os métodos de extração realizados, foi a de aproximadamente 1,0 g de amostra e acetonitrila como solvente. Vale salientar o principal fator determinante da massa de amostra foi o

volume da mesma, pois 5,0 g de erva-mate tem um volume muito grande o que inviabilizou a maioria dos experimentos.

De acordo com o espectro eletrônico de cada extrato obtido com extração por ultrassom radiado por IV e UV, é possível afirmar que o submetido por 120 minutos sob radiação de lâmpada UV se mostrou mais eficiente na degradação da clorofila do que os demais. A tentativa de degradação da clorofila utilizando peróxido de hidrogênio não foi eficiente, uma vez que este peróxido provavelmente tenha oxidado outros compostos que podem ser interferentes.

A melhor situação visualizada através da CLAE-UV, foi aquela em o extrato permaneceu por 30 minutos sob radiação IV, pois teve menor interferência da matriz.

Mesmo com as tentativas de degradação, o efeito de matriz visualizado foi muito superior ao esperado, o que torna o método inviável;

Em trabalhos futuros, deve ser realizado experimentos já citados em que os analitos são adicionados na amostra antes de iniciar os procedimentos de extração/pré-concentração, a fim de se ter resultados sobre a recuperação do método.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDER, L. et al. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrom. Rev.** v. 25, p. 838-865, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **RDC nº 303, de 07 de novembro de 2002**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/303_02rdc.htm>. Acesso em 06 outubro 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 48, de 22 de setembro de 2011**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4f38ff004878dfbdbcc0fe419fb83bc3/CP+N%C2%BA+48+GGTOX.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 29 setembro 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em 05 novembro 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc36fe0047457e348a3fde3fbc4c6735/RDC_277_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 27 setembro 2012.

ARREBOLA, F.J. et al. Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 484, p. 167-180, 2003.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissue by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**. v. 475, p.353-361, 1989.

- BARKER, S. A. Review - Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 63–68, 2000.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Light absorption by chlorophyll induces electron transfer. **Biochemistry**. 5 ed. New York: Freeman, 2002. Cap. 19.
- CHEN, Y. et al. Review Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.
- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 1998.
- COLLINS, C.H. et. al. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Ed. UNICAMP, 2006.
- DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados: UFGD, 2009.
- DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por GC-EM. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 892-896, 2004.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Plant Production and Protection Series**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0646e/T0646E0n.htm>>. Acesso em: 27 setembro 2012.
- FRENICH, A.G. et. al. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 199-206, 2004.
- HARVEY, D. **Modern analytical Chemistry**. 1 ed. New York: Mc Graw Hil, 2000. 817p.
- HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.
- IEDE, E.T.; MACHADO, D.C. Pragas da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St Hill.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo: 1989.
- JACQUES, R.A. **Caracterização química da Erva-Mate (Ilex Paraguarienses): Aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. 158f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- KITTLAUS, S. et. al. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8399-8410, 2012.
- KOESUKWIWATA, U. et. al. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 10-20, 2008.
- KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S. Procedimentos Analíticos assistidos por ultra-som. **Revista Analytica**, n.3, p. 34-39, 2003.
- LAMBROPOULOU, D.A., ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Anal. Bioanal. Chem**, p. 1663-1683, 2007.

LUTHRIA, D.L., BISWAS, R., NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 105, p. 325–333, 2007.

LUTZ, A. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. Ed. São Paulo, 1985.

MAPA. Ministério da Agricultura. **Mercado Interno: Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>>. Acesso em 05 novembro 2012.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SANCHEZ, M. Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 16, p. 1106-1115, 2002.

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

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. v. 168. New York: John Wiley & Sons, 2003.

OELLIG, C; SCHWACK, W. Planar solid phase extraction - A new clean-up concept in multi-residue analysis of pesticides by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6540–6547, 2011.

OELLIG, C; SCHWACK, W. Planar solid phase extraction cleanup for pesticide residue analysis in tea by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1260, p. 42–53, 2012.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Mass Spectrom. Rev.** v. 23, p. 1-18, 2004.

PINHO, G.P.; SILVÉRIO, F.O. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

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 espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

SCHUCHMANN, C.E.Z. **Ações para formulação de um protocolo de rastreabilidade de erva-mate**. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SHIMELIS, O. et al. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 18–25, 2007.

SIGMA ALDRICH. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em 20 outubro 2012.

SINDIMATE, Sindicato da indústria do mate no estado do Rio Grande do Sul. **Dados Estatísticos Erva-Mate**. Disponível em: <<http://www.sindimaters.com.br>>. Acesso em 29 de setembro 2012.

SKOOG, D.A. et. al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

STRAPASSON. Produtores de erva-mate comemoram bom momento do setor. **Agência da Notícia**. Passo fundo, 01 dez. 2012. Agronegócio. <http://www.agenciadanoticia.com.br/noticias/agronegocio/1997398/produtores-de-erva-mate-comemoram-bom-momento-do-setor> acesso em 12/12/12.

WENDLING, I. et al. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p.289-292, 2007.