

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELLI CHARÃO MILLIS

**UTILIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA
DE AGROTÓXICOS EM HORTIFRUTIGRANJEIROS**

Porto Alegre, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELLI CHARÃO MILLIS

**UTILIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA
DE AGROTÓXICOS EM HORTIFRUTIGRANJEIROS**

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, 2014.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João da Silva Millis Neto e Sandra Charão Millis, pelo amor, confiança, educação e valores ensinados, sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu namorado Rafael Fraga Raffo, pelo amor, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

A professora, Dr Tânia Mara Pizzolato, pela oportunidade de orientação e confiança prestada para a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Lacen, pela oportunidade de estágio, pela aprendizagem proporcionada e amizades conquistadas. Em especial, agradeço a Fabiane Costa pelos ensinamentos e colaboração na elaboração deste trabalho e a Gabriela Maciel e ao Guilherme Viana, pelo apoio prestado e também por estarem sempre dispostos a me ajudar em todas as horas.

Ao Alex Dallegrave pela ajuda, paciência e todo conhecimento compartilhado.

A minha colega, Cibele Sant' Anna, pela parceria, horas de estudo, conversas, companheirismo e amizade.

A toda a minha família que sempre confiou muito em mim e me ofereceu o suporte necessário para nunca desistir, por mais obstáculos que pudessem surgir ao longo da minha vida. Obrigada!

RESUMO

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um constante desafio, principalmente em razão das pequenas quantidades de analitos presentes e grandes quantidades de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas, afetando adversamente os resultados de uma análise. No entanto, os aspectos de segurança exigem que os agrotóxicos de uma ampla gama de propriedades químicas devem ser monitorados. Com o objetivo de avaliar simultaneamente resíduos de agrotóxicos em diversos tipos de alimentos, o método de extração QuEChERS foi desenvolvido. Neste trabalho, foi realizado o estudo dos métodos QuEChERS original, citrato e modificado, a fim de avaliar o percentual de recuperação, aliado ao efeito matriz (EM), e precisão (RSD%), para os agrotóxicos forato, clorotalonil, fenitrothion, dicofol, aletrina, procimidona, picoxistrobina, oxifluorfem, clorfenapir, etiona, bromuconazol, bromopropilato, bifentrina, lambda-cialotrina e permetrina em amostras de abacate, arroz, beterraba, cebola, repolho e uva. As determinações foram realizadas utilizando cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (GC-MS). Os valores de recuperação dos analitos para a maioria das amostras utilizadas foram superiores a 100%, evidenciando um enriquecimento de sinal característico do efeito matriz positivo. Apenas para o clorotalonil, foi observado um efeito de matriz negativo com valores de recuperação de 8,0 e 6,3% para os métodos QuEChERS original e citrato, respectivamente, e de 21,8% para o modificado. Na amostra de cebola, este analito não foi encontrado. O percentual de recuperação foi utilizado para avaliar a eficiência dos métodos de extração, categorizados em um intervalo de 80-120% como aceitável, e mostrou que o método QuEChERS original apresentou o maior número de agrotóxicos extraídos nesta faixa para as amostras de arroz e beterraba. O método QuEChERS modificado se mostrou mais eficiente para a amostra de uva e, para as demais amostras, este estudo mostrou que os três métodos utilizados podem ser escolhidos pois apresentaram o percentual de recuperação, neste intervalo, para o mesmo número de analitos. Os valores de RSD% apresentaram abaixo de 20% para a maioria dos compostos, com valores superiores apenas para clorotalonil, lambda-cialotrina e bromuconazol.

Palavras-chave: Agrotóxicos. QuEChERS. GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um GC-MS.....	16
Figura 2 - Representação do método QuEChERS Original.	21
Figura 3 - Representação do método QuEChERS citrato e modificado.....	25
Figura 4 - Cromatograma do Íon Total (TIC) para os 15 agrotóxicos estudados na concentração de 1 e 2 mg L ⁻¹	37
Figura 5 - Exemplo para comparação dos métodos QuEChERS e solução padrão para λ-cialotrina em cebola.....	40
Figura 6 - Exemplo para comparação dos métodos QuEChERS e solução padrão para clorotalonil em repolho.....	41
Figura 7 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o abacate.	42
Figura 8 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o arroz.	42
Figura 9 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a beterraba.....	42
Figura 10 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a cebola.	43
Figura 11 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o repolho.	43
Figura 12 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a uva.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre os métodos modernos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em alimentos.	19
Tabela 2 - Descrição das etapas do método QuEChERS original.	22
Tabela 3 - Matrizes representativas para a determinação de agrotóxicos em produtos de origem vegetal.	29
Tabela 4 - Fórmula molecular, toxicidade, grau de pureza, classe e grupo químico dos agrotóxicos selecionados.	32
Tabela 5 - Condições de análise dos agrotóxicos por GC-MS.	34
Tabela 6 - Programação da temperatura do forno cromatográfico, totalizando um tempo de análise de 37,8 min.	35
Tabela 7 - Íons monitorados, massa molar, tempo de retenção e janela de tempo dos agrotóxicos.	36
Tabela 8 - Recuperação percentual dos métodos propostos para determinação de agrotóxicos nas amostras utilizadas, obtidos por comparação com a solução padrão em acetonitrila.	39
Tabela 9 - Precisão em termos de repetitividade dos métodos QuEChERS em cada amostra utilizada.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
Chromatography coupled to Mass Spectrometry

D-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EI – Ionização Eletrônica, do inglês *Electron Ionization*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EU – União Européia

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas*

HAc – Ácido acético

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

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMR – Limite Máximo de Resíduos

m/z – razão massa-carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

MM – Massa Molar

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PSA – Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

PTFE – politetrafluoretileno

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

TIC – Cromatograma Total, do inglês *total ion chromatogram*

λ – Lambda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivos Gerais	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	DESENVOLVIMENTO.....	11
3.1	Características das amostras em estudo	11
3.1.1	<i>Arroz</i>	11
3.1.2	<i>Cebola</i>	12
3.1.3	<i>Beterraba</i>	12
3.1.4	<i>Repolho</i>	12
3.1.5	<i>Abacate</i>	13
3.1.6	<i>Uva</i>	13
3.2	Agrotóxicos.....	13
3.2.1	<i>Definição e classificação</i>	13
3.2.2	<i>Toxicidade</i>	14
3.3	Técnicas cromatográficas	15
3.3.1	<i>Cromatografia à gás</i>	15
3.3.2	<i>Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)</i>	16
3.4	Métodos multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em alimentos.....	17
3.4.1	<i>Método QuEChERS original</i>	20
3.4.2	<i>Método QuEChERS citrato e modificado</i>	23
3.5	Efeito matriz	26
3.6	Parâmetros de validação	27
3.6.1	<i>Precisão</i>	27
3.6.2	<i>Recuperação</i>	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Seleção das amostras representativas.....	28
4.2	Seleção dos agrotóxicos para o estudo.....	29
4.3	Instrumentação	29
4.4	Soluções, reagentes e materiais.....	30
4.5	Processamento das amostras	30
4.6	Preparo das soluções analíticas.....	31

4.7	Avaliação do método QuEChERS	32
4.7.1	<i>Método QuEChERS original</i>	32
4.7.2	<i>Método QuEChERS citrato</i>	33
4.7.3	<i>Método QuEChERS modificado</i>	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas	34
5.2	Utilização dos métodos QuEChERS original, citrato e modificado	37
5.2.1	<i>Recuperação</i>	37
5.2.2	<i>Escolha do procedimento de extração em função da recuperação</i>	41
5.2.3	<i>Precisão</i>	44
6	CONCLUSÃO	46
	Referências	47

1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas para a proteção das mais diferentes culturas permitiu um aumento no volume de produção, porém, a preocupação do aparecimento de resíduos destas substâncias nos alimentos, é atualmente, uma das principais preocupações de saúde pública¹. Visando proteger a saúde dos consumidores, 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, bem como a detecção de pesticidas não autorizados para determinada cultura².

Devido à grande diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura, em geral, os procedimentos analíticos multirresíduos são especialmente recomendáveis quando se trata de identificação e quantificação destes em matrizes vegetais. A necessidade de análise simultânea em diferentes tipos de amostras torna possível a escolha de uma amostra representativa para o procedimento analítico, sendo aplicável para matrizes de um mesmo grupo ou de grupos diferentes de produtos. Em termos de controle de resíduos de agrotóxicos, os alimentos são matrizes complexas, possuem propriedades químicas distintas, o que torna a etapa de preparo de amostra fundamental para a qualidade do dado analítico final³.

A determinação de agrotóxicos em alimentos normalmente faz uso de métodos multirresíduo de fácil aplicação e eficientes, a fim de atingir os limites impostos pela legislação. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a separação, identificação e quantificação desses compostos ganha grande destaque para que os limites de detecção e quantificação desses métodos sejam capazes de atender à legislação⁴.

O método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é o método mais consolidado e seu uso em alimentos tem sido cada vez mais ampliado. Foi desenvolvido para superar limitações práticas dos métodos multirresíduo tradicionais existentes para extração de agrotóxicos em frutas e vegetais. Apresenta principais vantagens como altos valores de recuperações para uma ampla faixa de agrotóxicos, elevado grau de exatidão e precisão, preparo de um grande número de amostras em um curto período de tempo, redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação⁵.

Técnicas analíticas instrumentais precisas e sensíveis a baixas concentrações de resíduos devem ser utilizadas para análise destes agrotóxicos. A técnica de Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente³.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho é estudar diferentes condições de preparo de amostra envolvendo o método QuEChERS e GC-MS para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos em amostras de abacate, arroz, beterraba, cebola, repolho e uva.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar os agrotóxicos disponíveis para análise em GC-MS;
- ✓ Selecionar variações do método QuEChERS adequados para os agrotóxicos e matrizes selecionadas;
- ✓ Determinar o procedimento QuEChERS mais adequado para o sistema em estudo.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Características das amostras em estudo

As amostras, objeto de estudo deste trabalho, fazem parte da dieta alimentar básica do consumidor em geral. O arroz faz parte da cesta básica e é um dos alimentos mais consumidos em todo o Brasil. A cebola é utilizada como principal condimento na culinária nacional e regional. A beterraba e o repolho fazem parte das hortaliças mais consumidas em seu estado natural, na forma de salada. O abacate é considerado um dos melhores alimentos para se controlar as taxas de colesterol e minimizar os riscos cardíacos e, por fim, a uva como fonte de matéria-prima para elaboração de vinhos e sucos.

3.1.1 Arroz

O arroz é um cereal pertencente à espécie *Oryza sativa*, tendo sua origem no sudeste Asiático⁶. É considerado pela FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) como o alimento mais importante para a segurança alimentar do mundo. Além de fornecer um excelente balanceamento nutricional é uma cultura extremamente rústica, o que a faz ser considerada a espécie de maior potencial de aumento de produção para o combate à fome do mundo⁷. O Brasil destaca-se como o maior produtor de fora do continente asiático⁸. Rico em carboidratos complexos, o arroz fornece 20% da energia e 15% das proteínas necessárias ao homem e se destaca pela sua fácil digestão⁷. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cereais são sementes ou grãos comestíveis das gramíneas e não podem apresentar mais de 15% de umidade em sua composição.

3.1.2 Cebola

A cebola é a espécie do gênero *Allium* pode ser encontrada em uma ampla gama de altitudes e latitudes que incluem desde o círculo polar Ártico até o continente europeu, Ásia, América do Norte e África. No entanto, em contraste com a maioria das plantas cultivadas, o centro exato de origem da cebola ainda permanece obscuro⁹. No Brasil, a cebola é plantada desde a região Sul até a região Nordeste, sendo uma atividade praticada principalmente por pequenos produtores. Em função dos baixos teores de proteína, ácidos graxos e carboidratos, não pode ser considerada fonte nutricional, tendo seu valor como condimentar e medicinal⁹. Segundo a ANVISA, a cebola é considerada uma especiaria. Por definição, especiarias são os produtos constituídos de partes como raízes, rizoma, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas.

3.1.3 Beterraba

A beterraba é uma hortaliça pertencente à família das Quenopodiaceas, do gênero *Beta vulgaris*, originária de regiões de clima temperado da Europa e do norte da África, exige temperaturas amenas ou frias para ser produzida¹⁰. Destacada por ser uma das hortaliças mais ricas em ferro, o consumo das raízes como hortaliça é o mais utilizado na alimentação no Brasil. Por apresentar altos teores de açúcar, a beterraba também é utilizada para a produção de açúcar¹⁰. De acordo com a ANVISA, as hortaliças são classificadas como raízes, tubérculos e rizomas, quando são utilizadas as partes subterrâneas, e é consumida como alimento na sua forma natural.

3.1.4 Repolho

O repolho é uma hortaliça folhosa do gênero *Brassica oleracea var. capitata*, pertencente à família das Brassicaceas. Originária da Europa e da Ásia Menor, destacada por ser uma hortaliça de uso mais antigo. É uma das hortaliças mais eficientes na produção de alimentos, em razão de sua alta taxa de crescimento e excelente valor nutritivo, como fonte de vitamina C¹⁰. O cultivo de brássicas é amplamente distribuído em todas as regiões do Brasil, embora se concentre nas regiões de clima mais ameno, condição mais favorável para o seu desenvolvimento. Segundo a ANVISA, o repolho é uma hortaliça classificada como verdura, utilizada como alimento no seu estado natural.

3.1.5 Abacate

O abacate é um fruto climatérico do gênero *Persea americana*, pertencente à família *Lauraceae*, uma árvore de porte arbóreo, originária das regiões altas e baixas do México e América Central, denominada abacateiro. Por apresentar muitas variedades de abacateiros, o abacate é encontrado durante o ano todo no Brasil, sendo desenvolvidos em solos leves, profundos e ligeiramente ácidos. Por ser um fruto rico em ácido oleico (ácido graxo insaturado), vitamina C, fibras e esteróis, é utilizado tanto na prevenção como no tratamento de cardiopatias¹¹.

3.1.6 Uva

A uva é um fruto não climatérico, do gênero *Vitis* e pertencente à família *Vitacea*, uma planta denominada videira. Originária da Ásia, seu cultivo é realizado em clima temperado desde o extremo sul até o nordeste do Brasil¹². O fruto é destacado por sua importância econômica, elevada diversidade morfológica e diferentes finalidades, como uvas de mesa, passas, sucos e vinhos¹³. Apresenta em sua composição basicamente água, altos teores de açúcar, os quais tornam seu valor energético bastante elevado, além de vitaminas e minerais.

3.2 Agrotóxicos

3.2.1 Definição e classificação

A qualidade da produção agrícola sempre foi intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas. Os agrotóxicos são definidos como substâncias que agem direta ou indiretamente em um organismo vivo, podendo matá-lo ou controlá-lo de alguma maneira, interferindo em seu processo reprodutivo. Em geral, a maioria desses compostos tem a propriedade comum de bloquear rápida e eficientemente um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Por isto, são bastante empregados em diversos ramos de atividades e aplicações, em particular, na agricultura¹⁴.

Segundo a legislação brasileira¹⁵, o Decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 e define os agrotóxicos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos

considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

De acordo com o organismo alvo, os agrotóxicos são classificados em acaricidas, bactericidas, inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, raticidas, vermífugos, entre outros, conforme as pragas que controlam. Também podem ser classificados em orgânicos: carbamatos, clorados, fosforados e cloro fosforados; inorgânicos: segundo a composição química, apresentando arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; e botânicos: compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona^{14, 16}.

Com relação à estrutura química, eles podem pertencer à classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, organonitrogenados, triazinas, benziamidazóis, etc¹⁶. Devido à variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais, os agrotóxicos apresentam diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação, sendo que alguns deles podem causar riscos à saúde e ao meio ambiente¹⁷.

3.2.2 Toxicidade

A toxicologia é o estudo dos efeitos nocivos de substâncias sobre os seres vivos. Com relação ao estudo toxicológico dos agrotóxicos, devem ser analisadas as consequências ambientais associadas ao uso desses produtos químicos, com ênfase nas substâncias cuja toxicidade chega a afetar a saúde humana¹⁴. As classes toxicológicas dos agrotóxicos são indicadas por meio das cores dos rótulos, sendo:

- ✓ classe I – faixa vermelha (extremamente tóxico);
- ✓ classe II – faixa amarela (altamente tóxico);
- ✓ classe III – faixa azul (medianamente tóxico);
- ✓ classe IV – faixa verde (pouco ou muito pouco tóxico).

Atualmente, muitos agrotóxicos, principalmente da classe dos organoclorados e organofosforados que são as mais tóxicas existentes, tiveram seu uso proibido devido à possibilidade de suas fórmulas favorecerem a formação de tumores cancerígenos, assim como vários outros problemas à saúde humana. Com isto, o desenvolvimento de técnicas precisas de quantificação de resíduos de diferentes agrotóxicos em águas e alimentos tornou-se de fundamental importância¹⁷.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dispõem sobre o uso de agrotóxicos em diversas culturas, estabelecendo limites máximos de resíduos (LMR) dessas substâncias em diversos alimentos.

3.3 Técnicas cromatográficas

3.3.1 Cromatografia à gás

Na cromatografia a gás (GC), os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa (FM), um gás inerte, e uma fase líquida ou sólida contida em uma coluna, fase estacionária (FE). Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária (FE) é um sólido com grande área superficial e a separação é baseada no mecanismo de adsorção das substâncias nesse sólido. Na cromatografia gás-líquido, a FE é um líquido pouco volátil, espalhado ou imobilizado a um suporte sólido ou às paredes das colunas capilares^{18, 19}. O retorno dos compostos a fase móvel está relacionado com a sua volatilidade.

Para que a análise seja possível em GC, é necessário que os analitos sejam gases ou substâncias voláteis e termicamente estáveis. A injeção da amostra é realizada através de um septo, que pode ser de silicone ou politetrafluoretileno (PTFE), para dentro de um sistema de injeção aquecido em uma temperatura suficientemente elevada para que ocorra a vaporização total da amostra, mas sem que haja sua decomposição. O vapor é arrastado através da coluna por meio do gás de arraste, que pode ser He, N₂ ou H₂, e os analitos separados fluem pelo detector, dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído, cuja resposta é observada em um computador¹⁹. A fase móvel, por ser um gás, torna possível um equilíbrio rápido entre ela e a fase estacionária, tornando a técnica altamente eficiente.

A grande maioria das análises por GC é realizada em colunas capilares estreitas e compridas, as quais oferecem maior resolução, menores tempos de análise e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas¹⁸. O controle de temperatura da coluna é essencial para que se obtenha uma boa separação cromatográfica, a qual é mantida estável e em uma temperatura reproduzível dentro do forno. Para garantir que todos os analitos permaneçam na forma gasosa, o detector é mantido em uma temperatura superior a da coluna. O sinal elétrico gerado pelo detector é proporcional à quantidade eluída de um analito, em que o registro do sinal em função do tempo é o cromatograma. As substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, possibilitando a análise quantitativa.

Existem diferentes modos de injeção que podem ser utilizados. Em colunas capilares, podem ser encontrados injetores tipo com divisor/sem divisor da amostra (S/SL do inglês, *split/splitless*), onde a divisão da amostra é realizada de acordo com a taxa *split* escolhida; e injetores *on column*, onde a amostra é injetada diretamente na coluna, com modos de injeção à frio (*cold-on column*) e vaporização com programação de temperatura (OCI/PTV, do inglês *On Column Injector/ Programmed Temperature Volatilisation*)²⁰.

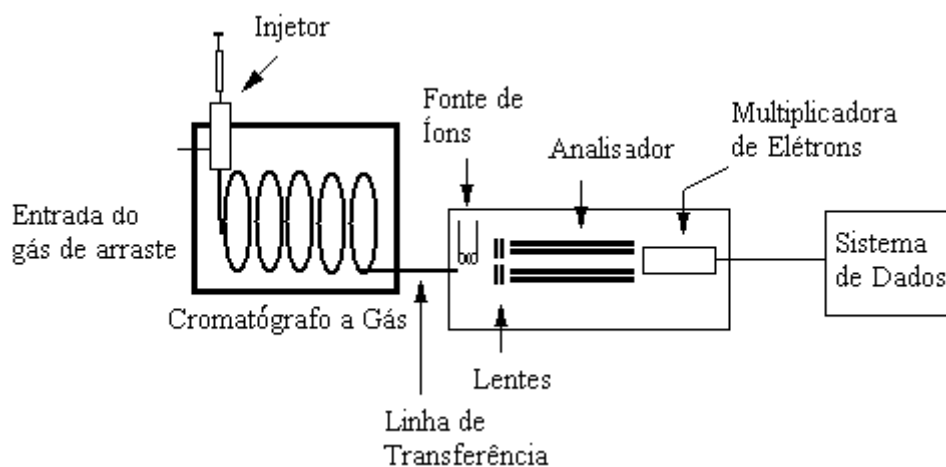
Os detectores mais utilizados em cromatografia gasosa são: detector por ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), detector por condutividade térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detection*), detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*), detector termoiônico (TID, do inglês *Thermionic Ionization Detector*), detector fotométrico de chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detector*) e sistema acoplado ao espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectroscopy*).

3.3.2 Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

A GC-MS é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente³.

Na Figura 1, está representado o esquema de um cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas.

Figura 1- Representação esquemática de um GC-MS.



A formação de íons é uma etapa fundamental na MS. Várias técnicas de ionização são utilizadas na GC-MS. As fontes de ionização mais comuns para determinação de agrotóxicos são: Ionização por Impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), positiva ou negativa. A ionização por EI é a mais utilizada, gera íons moleculares (M^+) e íons fragmentos, oriundos da fragmentação do M^+ . Na EI, um fluxo de elétrons com energia tipicamente de 70 eV, produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido, bombardeiam os analitos em fase gasosa. Primeiramente, ocorre a formação de íons moleculares, muitos destes, apresentando um excesso de energia, que é dissipada com a quebra de ligações, resultando na fragmentação dos M^+ . Estes fragmentos podem ser cátions, ânions, radicais livres e neutros. Porém, apenas os

íons positivos são direcionados para o analisador de massas²¹. Os analisadores de massas podem ser quadropolo, *ion trap*, setor magnético ou ToF, sendo o quadropolar mais utilizado por ser compacto, de menor custo e de fácil operação. É considerado um filtro de massas, constituído por quatro hastes hiperbólicas dispostas paralelamente, em que a combinação entre a corrente elétrica do tipo contínua e radio frequência gera um campo eletrostático oscilante entre as hastes e permite que apenas íons com determinada razão m/z atravessem este campo e atinjam o detector. A alta reprodutibilidade dos espectros de massas é uma característica importante da EI. Assim, bibliotecas podem ser utilizadas para identificação dos analitos²¹.

Os modos de operação são as maneiras como o MS pode ser programado de acordo com a seletividade e sensibilidade do método, para a aquisição dos dados. No modo *scan*, o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z . No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*), após a ionização, o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector²².

3.4 Métodos multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em alimentos

Geralmente, os alimentos são matrizes complexas com propriedades químicas distintas e com baixa concentração de analitos, e por isso, requerem uma etapa fundamental de preparo de amostras. Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises e o sistema cromatográfico³. Em razão disso, a etapa importante no preparo da amostra é a purificação dos extratos. Constituintes da matriz podem ser co-extraídos e posteriormente co-eluídos com os compostos que serão analisados e, conseqüentemente, interferir na avaliação da análise. A limpeza do extrato minimiza problemas, permite resultados mais exatos e precisos, além de possibilitar o aumento da vida útil das colunas capilares²³.

Assim, para a determinação de agrotóxicos, faz-se necessário o emprego de métodos multirresíduo de fácil aplicação e de eficiência adequada para superar os limites impostos pela legislação. O método selecionado para uma análise multirresíduo deve analisar um grande número de compostos, altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança, utilizando pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade²⁴.

Mills et al., em 1963, nos laboratórios de U.S. Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, desenvolveram o primeiro método multirresíduo para a extração de agrotóxicos²⁵. O método é utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não-gordurosas empregando acetonitrila como solvente extrator. A adição de água no extrato, seguida de uma etapa de partição, é promovida através da adição de solventes apolares, como éter de petróleo ou hexano. Além de água, açúcares e sais também são removidos do extrato nesta etapa.

O desenvolvimento e a aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como por exemplo, organofosforados e organonitrogenados, demandaram novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos²⁴. Em 1975, Luke et al., desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração utilizando acetona, seguida de uma partição líquido-líquido, empregando solventes apolares, como o éter de petróleo e diclorometano²⁶. Para se obter maiores percentuais de analitos polares, foi feita a adição de cloreto de sódio na fase aquosa, a fim de favorecer a transferência destes compostos para a fase orgânica.

O *Food and Consumer Product Safety Authority* da Holanda, em 1980, desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio^{24, 27}. A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Como um método de extração alternativo, foi então desenvolvida uma modificação do método de extração mini-Luke, em 1990, no qual foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares³.

Os avanços da química analítica em concordância com o conceito de sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de várias técnicas de extração. A Tabela 1 apresenta algumas das técnicas de preparo de amostra modernas utilizadas para determinação de agrotóxicos em matrizes alimentares.

Tabela 1- Comparação entre os métodos modernos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em alimentos.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Extração assistida por microondas (MAE- do inglês <i>Microwave-Assisted Extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fácil realização; ✓ Extração simultânea de várias amostras; ✓ Pequenas quantidades de solventes; ✓ Tempo curto de extração. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extração de insuficiente seletividade; ✓ Etapa de limpeza necessária; ✓ Compostos termolábeis não pode ser usada; ✓ Tempo de espera para resfriamento.
Extração por solvente acelerado (ASE- do inglês <i>Accelerated solvent Extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extrações podem ser automatizadas, diminuindo erros pelas etapas do processo por serem de forma idêntica; ✓ Tempo curto de extração; ✓ Consumo moderado de solventes; ✓ Simplicidade de preparo de amostra antes da análise. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Elevados custos de manutenção e aquisição do instrumento; ✓ Baixa seletividade de extração; ✓ Limpeza de extrato e de equipamento após cada uso.
Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD- do inglês <i>Matrix solid-phase Dispersion</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Custo relativamente baixo por análise; ✓ Equipamento simples; ✓ Realização simultânea de várias análises; ✓ Pode ser utilizada <i>in situ</i>; ✓ Pouca quantidade de solventes. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Geralmente obtém-se LODs não muito baixos; ✓ Algumas vezes baixa recuperação dos analitos; ✓ Não se torna muito ideal para amostras secas ou ricas em lipídios.
Micro extração em fase sólida (SPME- do inglês <i>Solid-phase Microextraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Utilização de solventes pode ser eliminada; ✓ Capacidade de adsorvente limitada; ✓ Possibilidade de re-executar repetidamente a análise de uma amostra; ✓ Possibilidade de utilizar uma fibra muitas vezes sem perda de adsorbado; ✓ Cromatógrafos com injetores comuns podem ser usados sem grandes mudanças na concepção . 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Não garante uma gama suficientemente ampla de análise em um único procedimento; ✓ Problemas com a reprodutibilidade; ✓ Problemas frequentes com a otimização de método; ✓ Recuperações de analitos relativamente baixas.
Extração por fluido super crítico (SFE- do inglês <i>Supercritical fluid extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Redução no consumo de solvente; ✓ Extração de compostos termolábeis; ✓ Não resulta na degradação dos compostos analisados; ✓ Realização de extração fracionada; ✓ Tempo curto de extração; ✓ Dispositivo que permite a extração no modo semi-automático. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Custo elevado para aquisição e manutenção; ✓ Baixa seletividade de extração; ✓ Elevado tempo de limpeza do equipamento após cada uso; ✓ Relativamente complicado quando comparado à outras técnicas de extração.

Fonte: adaptado de WILKOWSKA e BIZIUK, 2011²⁸.

Com o objetivo de melhorar a análise quantitativa, estudos foram realizados no desenvolvimento de novos métodos de extração e limpeza do extrato. Várias técnicas de

purificação são aplicadas para eliminar interferências co-extraídas dos extratos de amostras de frutas e vegetais, incluindo Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), Extração Dispersiva em Fase Sólida (D-SPE, do inglês *Extraction Dispersive Solid-Phase*) e Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*)^{23, 29}.

Para superar limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos foi introduzido no ano de 2003, por Anastassiades et al., sendo denominado QuEChERS⁵.

O método QuEChERS, em conjunto com a D-SPE, tem se destacado dentre os métodos de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos em diversos tipos de alimentos. Este método simplifica as etapas de preparo, bem como a quantidade de solventes e de vidraria utilizada, proporcionando a extração dos analitos e a limpeza dos extratos³⁰.

3.4.1 Método QuEChERS original

O método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro; do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), foi desenvolvido em 2003 para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, por Anastassiades e colaboradores⁵.

O método baseia-se nas seguintes etapas: extração, partição e limpeza. Um novo método de limpeza D-SPE foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na Figura 2, estão representadas as principais etapas do método QuEChERS original e a Tabela 2 apresenta a descrição das etapas do método.

Entre as principais vantagens deste método com relação aos métodos tradicionais estão: altos valores de recuperações para uma ampla faixa de agrotóxicos; elevado grau de exatidão e precisão; preparo de um grande número de amostras em um curto período de tempo; redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação³¹. Além disso, o método QuEChERS foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas (GC-MS e LC-MS)⁵.

Figura 2 - Representação do método QuEChERS Original.

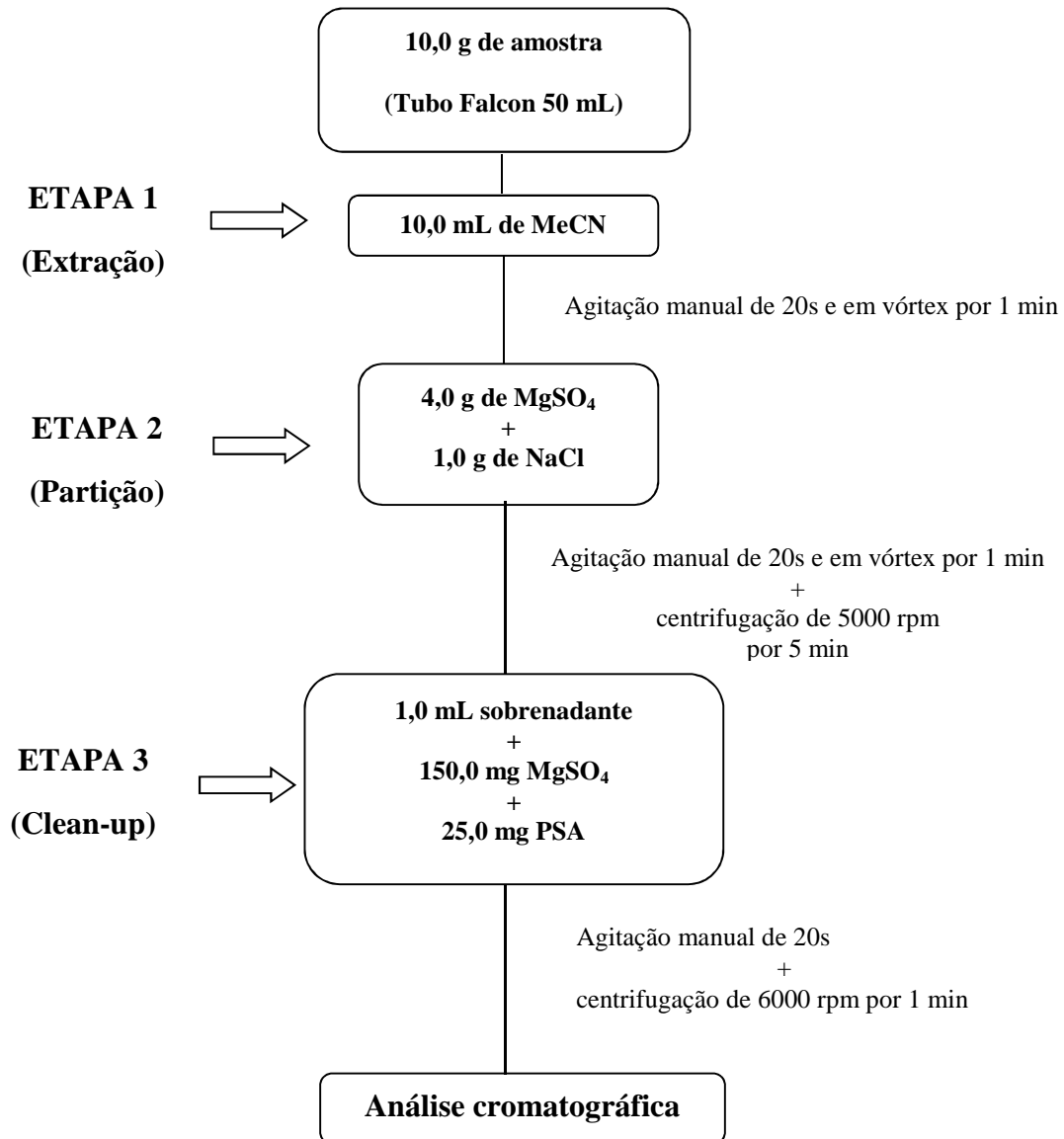


Tabela 2 - Descrição das etapas do método QuEChERS original.

ETAPA	DESCRIÇÃO DA ETAPA
Massa de amostra	A escolha da massa de amostra deve garantir representatividade estatística ao resultado final. Para o método QuEChERS, a quantidade de amostra escolhida no desenvolvimento foi de 10 g, sendo esta considerada ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo ^{5,3} .
Formas de agitação da amostra	A agitação manual ou com auxílio do Vórtex possui várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista; rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador no intervalo entre as extrações ³ .
Extração	A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos ⁵ . A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS. Assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS ^{5,31} .
Particionamento entre as fases	A adição de sais para promover o efeito “salting out” é utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa ^{32,33,34} . A utilização de sais secantes como sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares ³⁵ . A escolha do MgSO ₄ no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares ⁵ . Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa ^{36,37} .
Limpeza (clean-up)	A etapa de limpeza é realizada para remover co-extrativos que posteriormente possam afetar a confiabilidade dos resultados. Componentes não voláteis da matriz podem aderir ao sistema de injeção e também à coluna cromatográfica, aumentando a frequência de manutenção, além de alterar a resposta do sistema ^{3,38} . A etapa de limpeza ocorre simultaneamente com a remoção de água residual na D-SPE. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares.

O sorvente tem a função de reter as interferências da matriz que, após agitação manual e centrifugação, torna o extrato apto para ser injetado no sistema cromatográfico⁵. Os sorventes mais utilizados nos tubos usados na D-SPE são PSA (*Primary Secondary Amine*), C18 e CGB (carbono grafitizado - *Graphitised Carbon Black*). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante sob os pigmentos polares e açúcares, 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. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insersores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz^{39, 40}.

GCB é eficiente para remoção de pigmentos como clorofila e esteróis e, além destes, também retém os agrotóxicos de estrutura planar. E o C18 é usado para remoção de compostos apolares, assim como lipídios²⁸.

Desde seu desenvolvimento, o método QuEChERS tem sofrido diferentes modificações para ser empregado na determinação de diferentes analitos em diferentes matrizes. Como um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em alimentos, empregando métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, uma ampla aplicabilidade vem sendo observada em inúmeras publicações da área²⁸.

3.4.2 Método QuEChERS citrato e modificado

Apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados em diferentes tipos de amostras^{41, 42, 43} algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz^{41, 44}. Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH, independente da matriz utilizada^{44, 45}.

Em geral, os agrotóxicos são estáveis em pH ácido. Porém, alguns compostos apresentam baixos percentuais de recuperação quando em pH ácido, devido ao fato de estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição. O pH é importante tanto para compostos sensíveis em meio ácido como aqueles sensíveis à degradação em meio alcalino. Dessa forma, recomenda-se uma faixa de pH entre 4 e 5 uma vez que, a mesma proporciona boas recuperações para agrotóxicos sensíveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles sensíveis em meio alcalino⁴⁵.

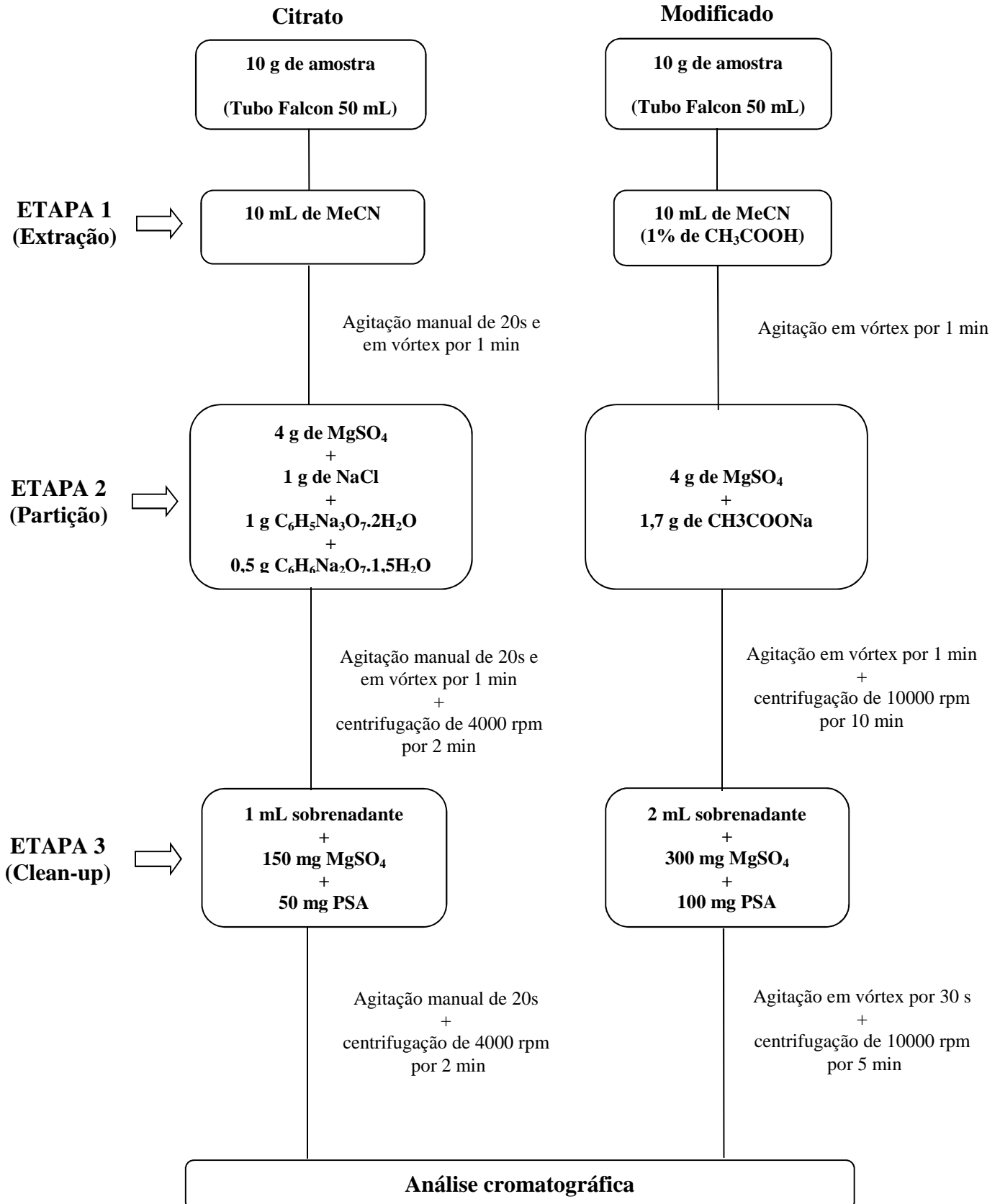
As frutas e os vegetais apresentam um pH natural que varia entre 2,5 e 6,5. Portanto, o ajuste do pH também está relacionado à presença de co-extrativos na fase orgânica, uma vez

que se observa uma maior presença de gordura e ácidos graxos quando a extração é efetuada em meio ácido³.

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%)⁵. Lehotay et al. (2005)⁴⁵, propuseram o método “QuEChERS modificado”, em que a extração é realizada com acetonitrila contendo 1% v/v de ácido acético (HAc), e o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio (CH₃COONa). Anastassiades et al. (2007)⁴⁴, propuseram o método “QuEChERS-citrato” que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e citrato dissódico hidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o *European Committee for Standardisation*, oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na *União Européia* (UE).

Na Figura 3 estão representados os procedimentos dos métodos citrato e modificado, respectivamente.

Figura 3 - Representação do método QuEChERS citrato e modificado.



3.5 Efeito matriz

A complexidade das matrizes utilizadas em análises de agrotóxicos e o número de compostos que co-eluem com elas acabam gerando um problema durante a análise, denominado efeito matriz (EM). Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz⁴⁶. O efeito matriz pode gerar sérios problemas analíticos devido a possível superestimação da concentração dos analitos ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra, quando comparado ao mesmo analito em solvente orgânico⁴⁷. Assim, o EM também é utilizado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100% e a baixa precisão de resultados.

Em GC, o efeito de matriz pode ocorrer em partes do próprio sistema cromatográfico, no injetor. No injetor, o *liner*/insensor (tubo de vidro) é o principal responsável pelo efeito de matriz, pois os sítios ativos deste material podem adsorver ou induzir a degradação térmica de alguns analitos, promovendo assim o enriquecimento ou a diminuição do sinal⁴⁸. Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do *liner*, os quais podem surgir a partir de co-extrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises⁴⁹.

Várias precauções podem ser usadas para eliminar ou reduzir este efeito: uma delas é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector e, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de *clean-up* devem ser desenvolvidos. Além disso, pode-se citar: (a) uso de padrões preparados em brancos da matriz, (b) uso do método de adição padrão, (c) extensiva limpeza para reduzir componentes da matriz, (d) uso de padrões internos, com tempos de retenção próximos ou idênticos aos do analito, afetados similarmente aos analitos pelos componentes da matriz, (e) uso de *on-column* ou outras formas de injeção em GC para evitar o efeito de sítios ativos, (f) colocar componentes da matriz com a tentativa de preencher os sítios ativos e (g) utilização do GC acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS), que possibilita a análise de resíduos de agrotóxicos ao nível de traços na presença de interferentes provenientes da matriz.

Métodos como de adição padrão tem a desvantagem de ser necessária uma curva analítica para cada amostra⁴⁹. O uso de padrões preparados em extratos dos brancos é a opção mais utilizada para resolver o problema de efeito matriz.

3.6 Parâmetros de validação

Neste trabalho não será realizada a validação da metodologia, no entanto, alguns parâmetros utilizados nos processos de validação serão utilizados para avaliar as eficiências dos processos que estão sendo propostos. Estes parâmetros são a precisão e a recuperação.

3.6.1 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas⁵⁰. A forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD%) (Equação 1), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$\text{RSD\%} \quad \text{ou} \quad \text{CV\%} = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (1)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto

X_m = média de uma série de medidas (replicatas)

A repetitividade e reprodutibilidade são as formas mais comuns de expressar a precisão através do desvio padrão relativo. Na análise de traços, valores até 20 % são aceitos⁵¹.

Repetitividade refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições (procedimento, analista, equipamento, local, em um curto espaço de tempo). Este termo é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, INMETRO⁵⁰. A ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

Já a reprodutibilidade é o grau de concordância de um mensurando, sob diferentes condições de análise. É obtida na comparação interlaboratorial dos resultados⁵⁰.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas, equipamentos ou a combinação destes. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório⁵¹.

3.6.2 Recuperação

A recuperação (R) é utilizada para avaliar o desempenho global de um método de análise, pois inclui tanto perdas de analitos durante o procedimento de extração como efeito matriz (EM)⁵². A recuperação é calculada conforme a Equação 2:

$$R(\%) = \frac{C}{A} \times 100 \quad (2)$$

onde:

C = Área absoluta dos picos cromatográficos dos analitos extraídos da matriz pré-fortificada;

A = Área absoluta dos picos cromatográficos dos analitos no solvente (solução padrão);

Valores de R próximos a 100%, geralmente indicam que as recuperações do método estão próximas a 100% e o efeito matriz é baixo. Diferenças entre R% e EM indicam que deve ser utilizada a curva construída no extrato da matriz para a determinação das recuperações, pois o efeito matriz é alto⁵³.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras representativas

A escolha de uma amostra representativa para cada grupo de alimentos foi realizada com base na seleção de matrizes representativas para validação de procedimentos de determinação de agrotóxicos, estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Tabela 3 apresenta os produtos de origem vegetal, de acordo com suas propriedades comuns e espécies representativas, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 3 - Matrizes representativas para a determinação de agrotóxicos em produtos de origem vegetal.

Grupos de produtos	Propriedades comuns	Espécies representativas
I	Alto teor de água e clorofila	Repolho
II	Alto teor de água e ausência ou baixo teor de clorofila	Uva
III	Alta acidez	Cebola
IV	Alto teor de açúcar	Beterraba
V	Alto teor de óleos/gorduras	Abacate
VI	Ausência ou baixo teor de água	Arroz

Fonte: Adaptado de MAPA, 2011.

4.2 Seleção dos agrotóxicos para o estudo

Inicialmente, os agrotóxicos alvos deste estudo foram definidos por meio de cada cultura a ser avaliada (arroz, abacate, beterraba, cebola, repolho e uva), a partir de uma consulta nas páginas eletrônicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e com base no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Além disso, para selecionar os analitos, foi considerada a disponibilidade de padrões destes compostos no laboratório e a possibilidade de determinação por cromatografia à gas.

4.3 Instrumentação

- ✓ Agitador Vórtex modelo SIEGER AV (Sieger);
- ✓ Balança Analítica de precisão com quatro casas decimais modelo M2143Ai (Bel Engineering);
- ✓ Centrífuga de tubos modelo Megafure 16R (Thermo Scientific);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (50 – 1000 µL);
- ✓ Liquidificador industrial, modelo LQI-04 (Vitalex);
- ✓ Moinho de rotor modelo MA- 09CFT (Marconi);
- ✓ Sistema de Purificação de água Milli-Q Integral 5 (Millipore);
- ✓ Cromatógrafo a gás, GC-MS QP-2010 SE Shimadzu, equipado com injetor split/splitless, fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) e filtro de massa quadrupolo;

✓ Coluna capilar de sílica fundida: Rtx-5MS (Restek) com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme. Aquisição de dados pelo software GC Solution Shimadzu.

4.4 Soluções, reagentes e materiais

- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T Baker);
- ✓ Ácido acético glacial p.a.(Dinâmica);
- ✓ Água Ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Integral 5, Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- ✓ Citrato de sódio diidratado p.a. (Sigma-Aldrich);
- ✓ Citrato dissódico hidrogenado p.a. (Vetec);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL (Waters);
- ✓ Padrões analíticos (Dr.Ehrenstorfer): aletrina 99,0%; bifentrina 99,5%; bromuconazol 98,0%; bromopropilato 99,0%; clorfenapir 99,0%; clorotalonil 98,5%; dicofol 99,0%; etiona 99,0%; fenitrotona 98,0%; forato 99,0%; lambda-cialotrina 98,5%, oxifluorfem 98,0%, permetrina 99,0%, picoxistrobina 99,0% e procimidona 98,0%.
- ✓ Sorvente amina primária secundária (PSA) Bondesil (Sigma-Aldrich);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (Sigma-Aldrich);
- ✓ Tubos Falcon, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL;
- ✓ Vidrarias em geral (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béqueres, etc).

4.5 Processamento das amostras

As amostras “branco” (isentas de agrotóxicos) avaliadas neste estudo foram adquiridas em feiras ecológicas de Porto Alegre e processadas conforme descrito abaixo:

- a) Abacate, beterraba, cebola, repolho e uva: porções de 500 g foram processadas até completa homogeneização, com auxílio do liquidificador industrial Vitalex, e a seguir foram acondicionadas em freezer com temperatura abaixo de - 4 °C, até sua utilização.
- b) Arroz: porção de 70 g foi processada com o auxílio do moinho de rotor e adicionada a mesma massa de água ultrapura para realização do *slurry*. A seguir, foi acondicionada em freezer com temperatura abaixo de - 4 °C, até sua utilização.

4.6 Preparo das soluções analíticas

A Tabela 4 apresenta o nome, fórmula molecular, toxicidade, classe, grau de pureza e grupo químico dos padrões analíticos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Para o preparo das soluções analíticas estoques, efetuou-se o cálculo para determinar o volume de cada padrão líquido, a fim de se obter soluções individuais dos compostos, na concentração de 100 mg L^{-1} . Estas soluções individuais foram preparadas pela diluição dos padrões líquidos em acetonitrila, considerando o grau de pureza e foram injetadas no sistema GC-MS para determinação do tempo de retenção e espectro de massas de cada composto.

Para a realização da separação cromatográfica e de análise do espectro de massas, foi preparada uma solução contendo a mistura de todos os compostos, na concentração de 1 mg L^{-1} para os analitos: forato, fenitrotona, dicofol, bifentrina, aletrina, procimidona, picoxistrobina, clorfenapir e de 2 mg L^{-1} para clorotalonil, oxifluorfem, etiona, bromuconazol, bromopropilato, lambda-cialotrina e permetrina.

Para avaliar os três procedimentos do método QuEChERS, foi preparada uma solução de 50 mL da mistura em acetonitrila, na concentração de 20 vezes a solução de 1 mg L^{-1} e 2 mg L^{-1} . Essa mistura intermediária foi utilizada para os ensaios de fortificação na matriz e no solvente, a fim de avaliar o percentual de recuperação de cada processo e precisão dos métodos. A solução foi então armazenada em frasco âmbar e estocada a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ protegida da luz.

Tabela 4 - Fórmula molecular, toxicidade, grau de pureza, classe e grupo químico dos agrotóxicos selecionados.

Agrotóxico	Fórmula molecular	Toxicidade ^(a)	Pureza(%)	Classe	Grupo químico
Aletrina	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	III	99,0	Inseticida	Piretróide
Bifentrina	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	II	99,5	Inseticida Formicida Acaricida	Piretróide
Bromuconazol	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O ₂	III	98,0	Fungicida	Triazol
Bromopropilato	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	III	99,0	Acaricida	Benzilato
Clorfenapir	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	II	99,0	Inseticida Acaricida	Análogo de pirazol
Clorotalonil	C ₈ Cl ₁₄ N ₂	III	98,5	Fungicida	Isoftalonitrila
Dicofol	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	II	99,0	Acaricida	Organoclorado
Etiona	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	II	99,0	Inseticida Acaricida	Organofosforado
Fenitrotona	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	II	98,0	Inseticida Formicida	Organofosforado
Forato	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	I	99,0	Acaricida Nematicida Inseticida	Organofosforado
λ-cialotrina	C ₂₉ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	III	98,5	Inseticida	Piretróide
Oxifluorfem	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	III	98,0	Herbicida	Éter difenílico
Permetrina	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	III	99,0	Inseticida Formicida	Piretróide
Picoxistrobina	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	II	99,0	Fungicida	Estrobilurina
Procimidona	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	IV	98,0	Fungicida	Dicarboximida

Fonte: ANVISA, 2011. λ = lambda.

^(a) I – extremamente tóxico; II – altamente tóxico; III – moderadamente tóxico; IV – pouco tóxico.

4.7 Avaliação do método QuEChERS

As amostras utilizadas neste estudo foram fortificadas adicionando 500 µL da mistura de padrões. Para cada matriz, foram também preparadas soluções padrão da mistura dos analitos, diluindo-se 50 µL da mistura em 950 µL de acetonitrila, para cálculos de percentual de recuperação dos agrotóxicos em estudo e precisão dos métodos. Os procedimentos foram realizados em triplicata e injetados no cromatógrafo à gás.

4.7.1 Método QuEChERS original

Para o método QuEChERS original, desenvolveu-se a análise de acordo com a Figura 2. Pesou-se 10,0 g de amostra diretamente em um tubo Falcon (com capacidade de 50,0 mL); realizou-se a fortificação da amostra utilizando 500 µL da mistura de padrões, deixando o sistema interagir durante 10 min. Após, adicionou-se 10,0 mL de MeCN para a extração;

agitou-se manualmente por 20 s e em Vórtex por 1 min; adicionou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e 1,0 g de NaCl; repetiu-se a etapa de agitação manual de 20 s e em Vórtex durante 1 min e, por fim, centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 min. Para a etapa de limpeza, transferiu-se 1,0 mL do sobrenadante para outro tubo Falcon (capacidade de 15,0 mL), contendo 150,0 mg de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e 25,0 mg de amina primária secundária (PSA) e, em seguida, agitou-se novamente por 20 s manualmente e centrifugou-se a 6000 rpm durante 1 min. Após, o retirou-se o sobrenadante, colocou-se em uma seringa de vidro com filtro de 0,22 μm acoplado, para garantir que nenhuma partícula em suspensão entrasse no sistema cromatográfico, colocou-se em *vial* com capacidade de, aproximadamente, 2 mL e injetou-se no GC-MS para análise dos dados. Da mesma maneira, realizou-se a extração da amostra “branco”, sem a etapa de fortificação, para verificar a ausência destes agrotóxicos na matriz.

4.7.2 Método QuEChERS citrato

Para o método QuEChERS citrato, desenvolveu-se a análise de acordo com a Figura 3. Pesou-se 10,0 g de amostra diretamente em um tubo Falcon (com capacidade de 50,0 mL); realizou-se a fortificação da amostra utilizando 500 μL da mistura de padrões, deixando o sistema interagir durante 10 min. Após, adicionou-se 10,0 mL de MeCN para a extração; agitou-se manualmente por 20 s e em Vórtex por 1 min; adicionou-se 4,0 g de MgSO_4 , 1,0 g de sal NaCl, 1,0 g de citrato de sódio diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de citrato dissódico hidrogenado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$); repetiu-se a etapa de agitação manual por 20 s e em Vórtex durante 1 min e, por fim, centrifugou-se a 4000 rpm durante 2 min. Para a etapa de limpeza, transferiu-se 1,0 mL do sobrenadante para outro tubo Falcon (capacidade de 15,0 mL), contendo 150,0 mg de MgSO_4 e 25,0 mg de PSA, em seguida agitou-se novamente por 20 s manualmente e centrifugou-se a 4000 rpm durante 2 min. Após, retirou-se o sobrenadante, colocou-se em uma seringa de vidro com filtro de 0,22 μm acoplado, para garantir que nenhuma partícula em suspensão entrasse no sistema cromatográfico, colocou-se em *vial* com capacidade de, aproximadamente, 2 mL e injeto-se no GC-MS para análise dos dados. Da mesma maneira, realizou-se a extração da amostra “branco”, sem a etapa de fortificação, para verificar a ausência destes agrotóxicos na matriz.

4.7.3 Método QuEChERS modificado

Para o método QuEChERS modificado, desenvolveu-se a análise de acordo com a Figura 3. Pesou-se 10,0 g de amostra diretamente em um tubo de Falcon (com capacidade de 50,0

mL); realizou-se a fortificação da amostra utilizando 500 μL da mistura de padrões, deixando o sistema interagir durante 10 min; adicionou-se 10,0 mL de MeCN acidificada com 1% de ácido acético (v/v) para a extração; agitou-se em Vórtex por 1 min; adicionou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e 1,7 g de acetato de sódio anidro (CH_3COONa); repetiu-se a etapa de agitação em vórtex durante 1 min e por fim, centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min. Para a etapa de limpeza, empregando a técnica Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE), transferiram-se 2,0 mL do sobrenadante para outro tubo Falcon (capacidade de 15,0 mL), contendo 300,0 mg de MgSO_4 e 100,0 mg de PSA, seguido de agitação em Vórtex por 30 s e centrifugou-se a 10000 rpm durante 5 min. Após, o retirou-se sobrenadante, colocou-se em uma seringa de vidro com filtro de 0,22 μm acoplado, para garantir que nenhuma partícula em suspensão entrasse no sistema cromatográfico, colocou-se em *vial* com capacidade de, aproximadamente, 2 mL e injetou-se no GC-MS para análise dos dados. Da mesma maneira, realizou-se a extração da amostra “branco”, sem a etapa de fortificação, para verificar a ausência destes agrotóxicos na matriz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas

Em cromatografia à gás, parâmetros como a coluna a ser usada, rampa de aquecimento, temperatura do injetor, entre outros, são necessários para a utilização da técnica. Nas Tabelas 5 e 6, estão descritas as condições de análise do GC-MS.

Tabela 5 - Condições de análise dos agrotóxicos por GC-MS.

GC	
Coluna capilar	RTX 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm)
Volume de injeção	1 μL
Temperatura do injetor	280 $^{\circ}\text{C}$
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo de gás Hélio	1 mL min^{-1}
MS	
Temperatura da fonte EI	250 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura da interface	310 $^{\circ}\text{C}$
Modo de monitoramento	SCAN e SIM
Fonte de ionização	EI (70 eV)

Tabela 6 - Programação da temperatura do forno cromatográfico, totalizando um tempo de análise de 37,8 min.

Taxa ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de espera (min)
--	100,0	0,0
25,0	150,0	0,0
5,0	200,0	0,0
1,5	230,0	1,0
25,0	300,0	2,0

As condições de separação cromatográfica para cada analito foram realizadas, primeiramente, no modo *scan* a fim de se obter o tempo de retenção e o espectro de massas correspondente a cada um. Após, a análise da mistura de concentração 1 mg L^{-1} e 2 mg L^{-1} desses compostos foi realizada. A partir dos espectros de massa de cada composto, determinaram-se os íons (razão *m/z* mais intensos) a serem monitorados no modo SIM. Este modo é mais sensível, pois permite atingir limites de detecção e quantificação na ordem de ultratraço (ng L^{-1}). Na Tabela 7 estão apresentados os íons selecionados, a partir dos espectros de massas dos agrotóxicos em estudo.

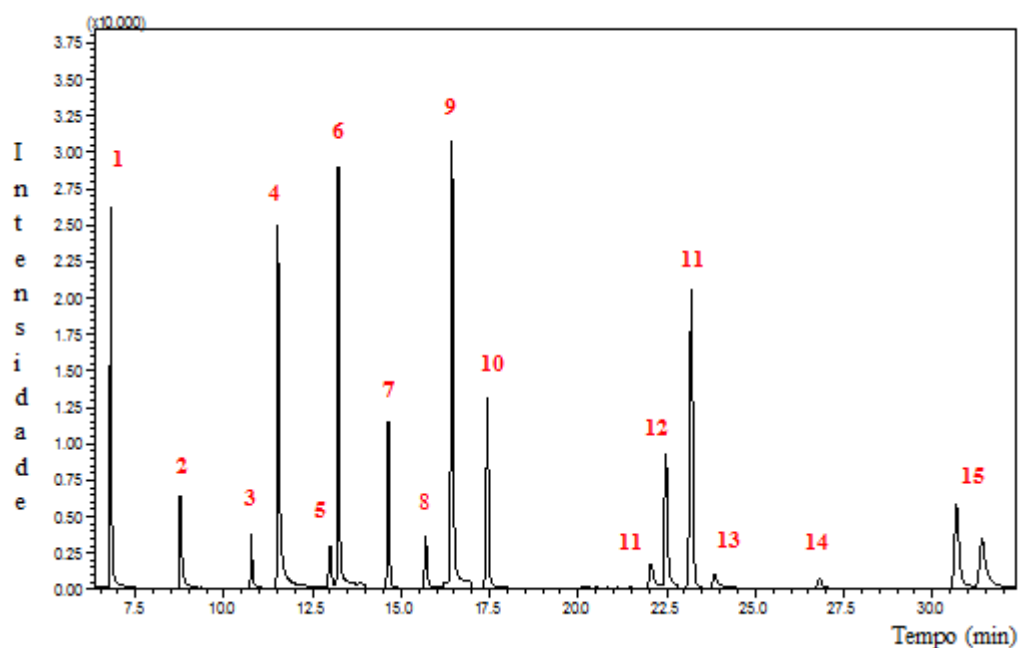
Tabela 7 - Íons monitorados, massa molar, tempo de retenção e janela de tempo dos agrotóxicos.

Agrotóxicos	Massa molar (g/mol)	Tempo de retenção (min)	Íons monitorados (m/z)	Janela de tempo para monitoramento (min)
Forato	260,4	6,80	75 /, 121	5,00 - 7,50
Clorotalonil	265,9	8,77	264 /, 265	8,00 – 9,50
Fenitrothiona	277,2	10,78	109 /, 125	10,50 – 11,20
Dicofol	370,5	11,52	111 /, 139	11,20 – 12,60
Aletrina	302,4	13,00	79 /, 123	12,60 – 13,16
Procimidona	284,1	13,21	96 /, 283	13,16 – 14,00
Picoxistrobina	367,3	14,64	145 /, 335	14,00 – 15,00
Oxifluorfem	361,7	15,70	252 /, 302	15,00 – 16,20
Clorfenapir	407,6	16,43	59 /, 247	16,20 – 17,00
Etiona	384,5	17,42	97 /, 231	17,00 – 18,00
Bromuconazol (isômeros)	377,1	22,05	173 /, 295	20,00 – 22,40
		23,85		23,50 – 26,00
Bromopropilato	428,1	22,47	183 /, 341	22,40 – 22,80
Bifentrina	422,9	23,19	166 /, 181	22,90 – 23,50
λ-cialotrina	449,9	26,80	181 /, 197	26,50 – 29,00
Permetrina (isômeros)	391,3	30,70	163 /, 183	30,00 – 33,00
		31,42		

Íons em negrito representam os íons de maior intensidade

Com base nestas condições, foi obtido o cromatograma da mistura de padrões apresentado na Figura 4. Os agrotóxicos estão representados por números em ordem de eluição conforme estão identificados na Tabela 6. Nesta figura é possível visualizar claramente a separação cromatográfica dos analitos.

Figura 4 - Cromatograma do Íon Total (TIC) para os 15 agrotóxicos estudados na concentração de 1 e 2 mg L⁻¹.



1: Forato; 2: Clorotalonil; 3: Fenitrotiona; 4: Dicofol; 5: Aletrina; 6: Procimidona; 7: Picoxistrobina; 8: Oxifluorfem; 9: Clorfenapir; 10: Etiona; 11: Bromuconazol (isômeros); 12: Bromopropilato; 13: Bifentrina; 14: λ -cialotrina; 15: Permetrina (isômeros).

5.2 Utilização dos métodos QuEChERS original, citrato e modificado

Para a escolha do método mais eficiente de extração dos agrotóxicos estudados em amostras de abacate, arroz, beterraba, cebola, uva e repolho foram avaliados os métodos QuEChERS original, citrato e modificado em termos de recuperação e precisão. A recuperação foi usada para facilitar na escolha entre os procedimentos de extração e verificar a ocorrência de efeito matriz e a precisão foi avaliada na forma de repetitividade.

5.2.1 Recuperação

A recuperação do método envolve tanto perdas durante o procedimento de extração como o efeito matriz (EM). Para avaliar quantitativamente o efeito matriz, deve-se construir uma curva de calibração interna e correlacionar entre a concentração do analito dissolvido em um solvente puro e a razão área do pico cromatográfico correspondente ao analito pela área do pico do composto denominado padrão interno. Neste estudo, as amostras foram fortificadas na matriz em apenas um nível de concentração, e realizadas comparações das áreas dos analitos na matriz pré-fortificada com as áreas dos analitos na solução padrão, na

mesma concentração. Dessa maneira, foi possível analisar a presença significativa deste efeito, porém não quantificá-lo.

Como pode ser observado na Tabela 8, o percentual de recuperação foi alto para a maioria dos analitos, resultado do enriquecimento do sinal em razão da complexidade das matrizes analisadas. Pode-se notar que os maiores efeitos encontrados em cada amostra foram para os agrotóxicos: Fenitrotiona, Aletrina, Oxifluorfem, Clorfenapir, Etiona, Bromuconazol, Bromopropilato, Bifentrina, λ -cialotrina e Permetrina.

Compostos do grupo dos piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol^{-1}) para λ -cialotrina, bifentrina e bromopropilato e para permetrina ($391,3 \text{ g mol}^{-1}$), dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas⁵⁴. Estudos revelam que compostos contendo grupamentos -P=S (organofosforados), como é caso da fenitrotiona e etiona, e -N= (imidazoles e benzimidazoles), no caso do clorfenapir e bromuconazol são bastante suscetíveis ao efeito matriz⁴⁷. Assim como, compostos mais polares, nesse caso o oxifluorfem e bromopropilato.

Efeito matriz positivo em GC-MS, é frequentemente associado aos componentes da matriz que evitam que certos analitos sejam adsorvidos ao *liner*/insensor⁴⁹. Quando a solução padrão é preparada em solvente puro, os sítios ativos do *liner* estão disponíveis para a retenção dos analitos e quantidades menores destes analitos são transferidas para a coluna e o detector. Quando a análise é realizada em um extrato fortificado, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do *liner*, resultando numa maior resposta do detector para os analitos provenientes do extrato da matriz.

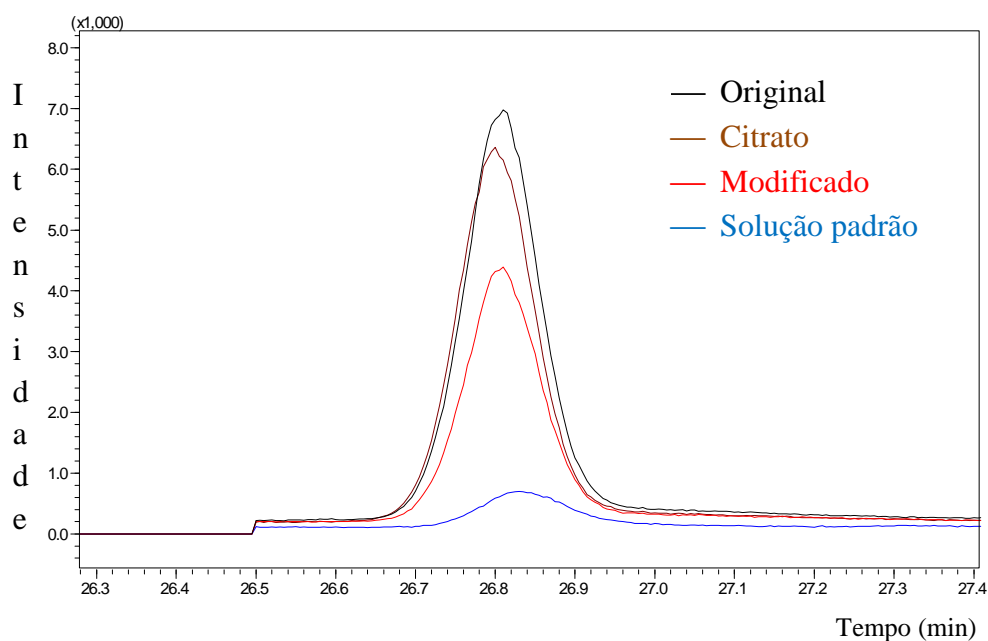
Tabela 8 - Recuperação percentual dos métodos propostos para determinação de agrotóxicos nas amostras utilizadas, obtidos por comparação com a solução padrão em acetonitrila.

Agrotóxicos	R(%)																		
	Abacate			Arroz			Beterraba			Cebola			Repolho			Uva			
	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	
Forato	149,6	157,5	114,7	106,6	111,2	104,3	98,9	102,0	99,6	99,7	100,8	96,9	97,0	97,9	96,1	125,3	132,2	110,7	
Clorotalonil	45,2	55,0	42,0	106,9	284,8	362,2	112,3	40,2	439,9	-	-	-	8,0	6,3	21,8	173,9	155,6	289,7	
Fenitrotona	265,8	280,1	206,0	180,8	217,1	221,4	97,6	100,8	118,5	216,0	214,7	221,3	157,1	157,3	147,3	259,7	275,3	235,2	
Dicofol	75,6	74,9	75,2	94,4	95,4	99,5	99,4	105,5	99,6	100,5	97,0	100,3	101,1	103,7	94,2	124,0	126,9	106,7	
Aletrina	222,1	245,0	192,0	270,2	340,3	412,6	96,1	105,5	127,2	380,0	400,0	414,8	129,2	131,2	126,7	260,8	281,0	256,0	
Procimidona	84,3	81,0	123,3	99,5	98,2	104,4	112,1	121,6	112,1	100,6	98,1	105,7	98,6	99,2	97,5	96,7	103,6	93,4	
Picoxistrobina	140,6	149,5	150,1	103,7	107,2	111,7	98,5	105,3	104,2	101,8	101,8	103,5	108,0	109,3	104,9	131,5	133,8	116,0	
Oxifluorfem	291,6	336,2	208,5	160,0	189,5	213,1	88,0	88,4	123,1	157,3	180,5	174,2	155,0	155,7	151,0	146,3	168,5	160,4	
Clorfenapir	84,9	88,2	88,5	129,3	133,6	135,6	104,9	111,7	106,2	105,3	104,4	110,5	106,7	109,2	101,2	135,9	142,2	123,8	
Etiona	164,3	174,1	143,8	252,1	275,8	281,7	105,5	101,7	112,3	165,3	161,2	167,9	121,8	122,3	115,5	191,4	203,1	176,4	
Bromuconazol	B1	225,8	235,4	223,5	600,8	818,4	701,9	108,8	116,2	125,7	205,4	206,5	240,2	164,6	163,8	157,2	312,8	341,8	276,9
	B2	269,3	286,7	269,2	861,5	1350,9	1180,5	131,6	148,6	166,9	324,0	316,5	399,3	308,5	287,3	280,3	481,5	582,5	478,9
Bromopropilato	126,8	129,5	113,1	137,0	138,9	184,5	115,7	116,6	109,9	304,6	288,6	313,9	105,5	95,5	105,7	127,2	155,3	162,7	
Bifentrina	96,3	102,8	78,0	130,7	131,0	131,9	108,5	116,6	107,1	116,9	119,6	117,8	110,1	113,3	103,7	142,7	148,5	127,1	
λ -cialotrina	804,6	671,5	750,0	1102,3	2341,5	1993,2	171,2	158,7	89,2	3348,1	3085,6	2188,2	271,5	289,7	199,6	1702,0	2030,3	942,5	
Permetrina	P1	268,3	256,1	253,6	164,4	167,5	167,9	123,4	133,1	127,8	180,9	180,3	184,0	129,3	134,8	120,7	196,3	208,6	167,7
	P2	232,4	247,3	187,9	201,0	206,5	207,9	122,3	130,6	128,6	205,1	207,3	208,5	129,7	134,6	121,7	210,5	225,2	183,9

B1, B2 = isômeros do Bromuconazol; P1, P2 = isômeros da Permetrina; O = QuEChERS original; C = QuEChERS citrato; M = QuEChERS modificado.

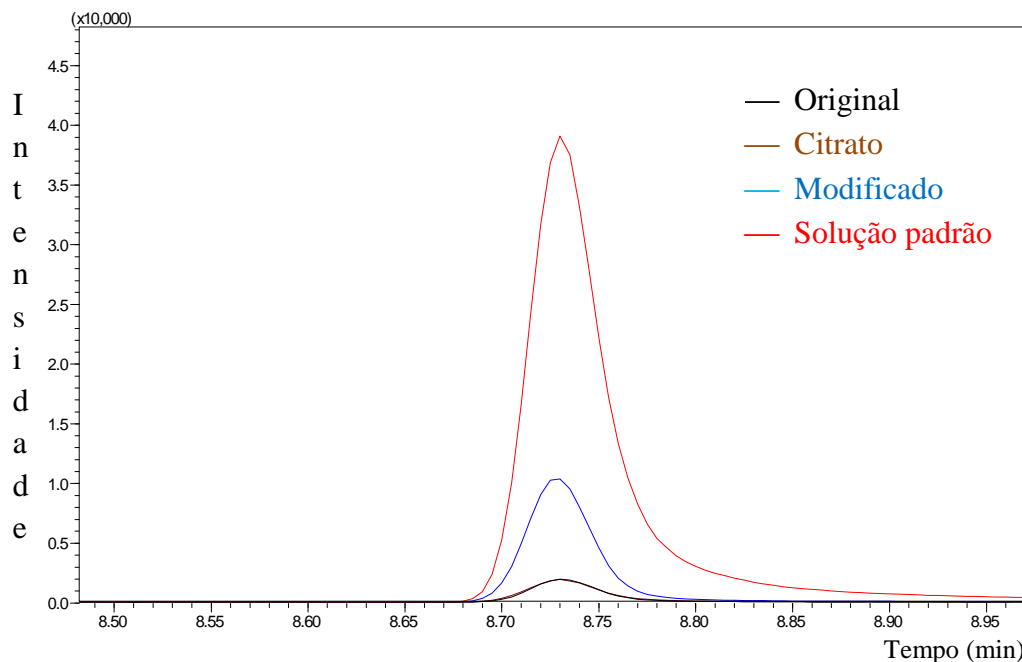
Dentre os agrotóxicos analisados, λ -cialotrina apresentou o maior efeito de matriz na amostra de cebola. O cromatograma da figura 5 foi utilizado para exemplificar o EM positivo para os métodos QuEChERS original, citrato e modificado. Os demais compostos também apresentaram perfil similar, porém menos pronunciado.

Figura 5 - Exemplo de cromatograma para comparação dos métodos QuEChERS e solução padrão para λ -cialotrina em cebola.



De acordo com a Tabela 8, também foi possível observar também uma diminuição do sinal para o clorotalonil no abacate e repolho, sendo este último um percentual de recuperação muito abaixo de 100%. Uma possível explicação para este comportamento pode estar relacionada com os componentes da matriz, que de alguma forma se degradam ou reagem com o analito, gerando um efeito de matriz negativo. O cromatograma da figura 6 para o clorotalonil, exemplifica o EM negativo para os métodos QuEChERS original, citrato e modificado, na amostra de repolho.

Figura 6 - Exemplo de cromatograma para comparação dos métodos QuEChERS e solução padrão para clorotalonil em repolho.



Ainda para o mesmo analito, observa-se que não foi encontrado na cebola. O fato de o clorotalonil ser um analito sensível ao pH e requerer condições analíticas adequadas para evitar sua perda³, pode ter ocasionado sua degradação, tendo em vista o alto teor de acidez existente nesta amostra. Embora os agrotóxicos sejam, em sua maioria, estáveis em pH ácidos, baixos percentuais de recuperação também podem ser explicados por estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição.

5.2.2 Escolha do procedimento de extração em função da recuperação

Para selecionar o método mais eficiente na extração dos agrotóxicos em amostras de abacate, arroz, beterraba, cebola, repolho e uva, avaliou-se a recuperação. Este ensaio foi utilizado, pois envolvem as etapas desde a fortificação da amostra, com concentração conhecida de padrão, extração, partição e limpeza, bem como a análise cromatográfica.

Neste trabalho, objetivou-se escolher o método que responda de forma eficiente para a extração do maior número de agrotóxicos e com menor efeito matriz para todas as matrizes analisadas. Para realizar a avaliação da recuperação, os analitos foram categorizados dentro de três grupos (menor que 80%, entre 80 e 120% e maiores que 120%), considerando uma faixa

de $\pm 20\%$ ⁵⁵. As Figuras de 8 a 13 mostram os três métodos QuEChERS utilizados em cada amostra.

Figura 7 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o abacate.

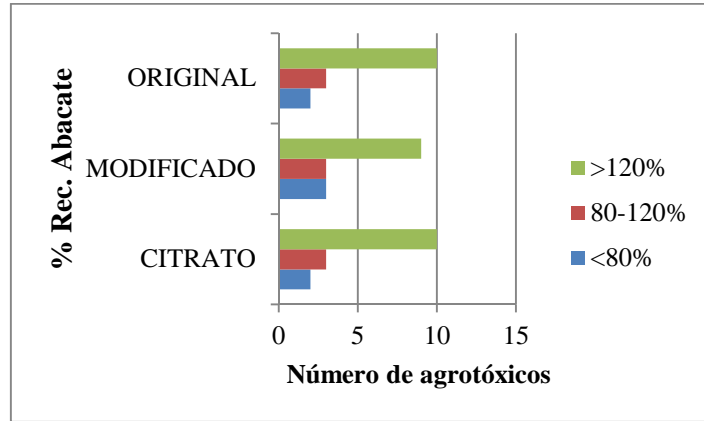


Figura 8 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o arroz.

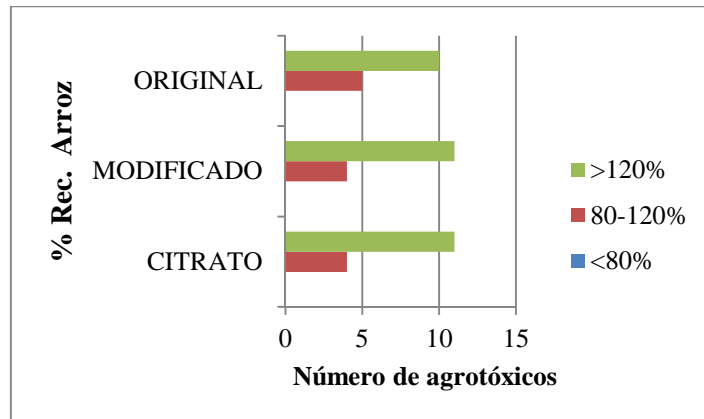


Figura 9 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a beterraba.

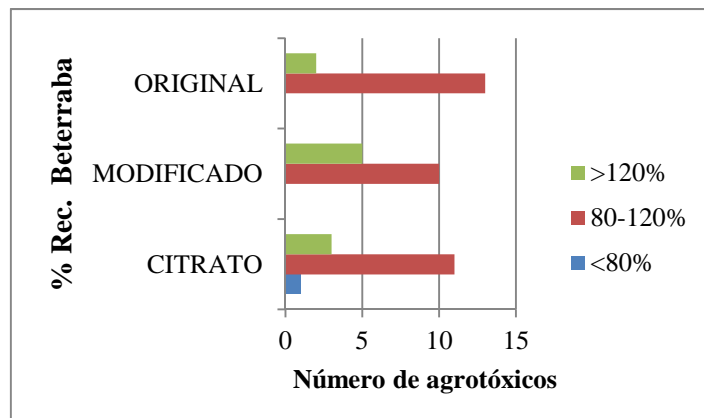


Figura 10 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a cebola.

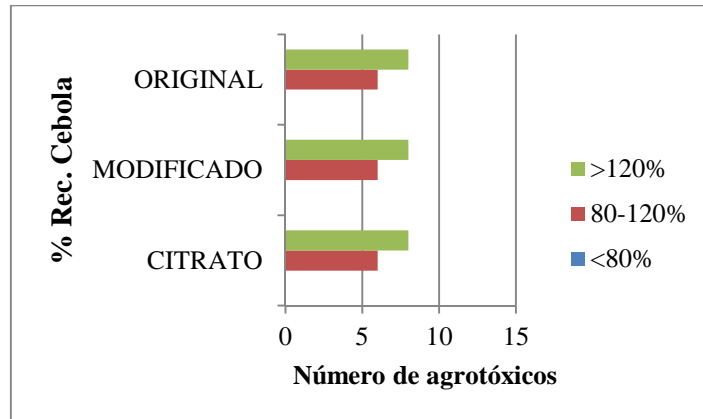


Figura 11 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para o repolho.

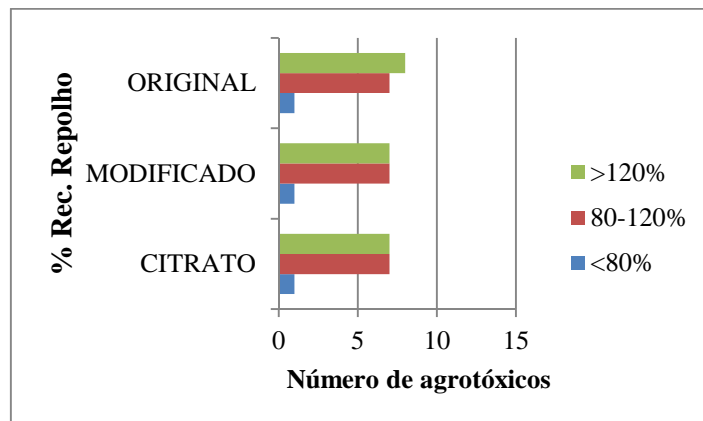
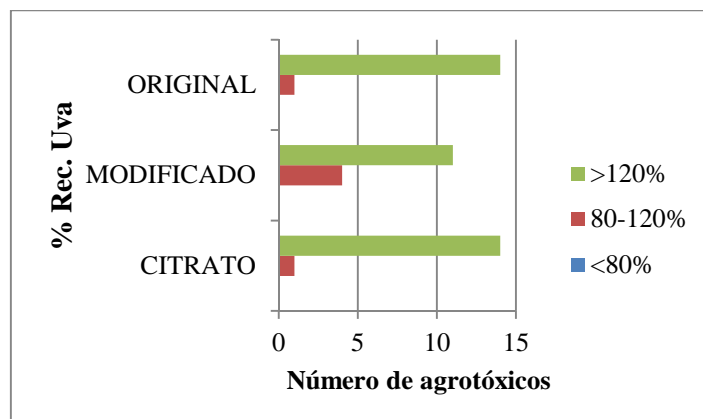


Figura 12 - Recuperação para os métodos original, citrato e modificado para a uva.



Para as amostras de arroz e beterraba, observou-se que o método QuEChERS original apresentou um processo mais eficiente na extração dos agrotóxicos pois apresentou o maior número de agrotóxicos dentro da faixa de 80-120% considerada. Este método tem como

vantagem a utilização de menores quantidades de sais, comparado ao citrato e modificado, sendo o mais adequado para a extração de matrizes com alto teor de açúcares e baixo teor de umidade. O método QuEChERS modificado se mostrou mais eficiente para a amostra de uva, visto que a utilização de acetonitrila acidificada possibilitou a extração de um maior número de analitos e, apesar de ser uma matriz representativa para amostras com elevado teor de água e baixo teor de clorofila, as quantidades de sais empregada para a remoção de água residual e para a limpeza do extrato, foram adequadas. Porém, para as amostras de abacate, cebola e repolho, o número de analitos extraídos foi o mesmo, indicando que a escolha dos três métodos para este estudo seria possível.

5.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em função de repetitividade, a qual é definida como a proximidade da concordância entre os resultados em sucessivas determinações do mesmo mensurando realizadas sob as mesmas condições de trabalho. A repetitividade foi avaliada pela análise das soluções padrão em amostras “branco”, realizadas em triplicada (n=3) e injetadas no GC-MS em simplicata. Os resultados foram avaliados através do desvio padrão relativo (RSD) e estão apresentados na Tabela 9.

Para os métodos de análises de traços, são aceitos valores de desvio padrão relativo de até 20 %⁵¹. Pode-se observar que apenas os agrotóxicos clorotalonil, λ -cialotrina e bromuconazol apresentaram valores fora do limite estabelecido e, para estes, a repetitividade dos métodos propostos não deve ser considerada.

Tabela 9 - Precisão em termos de repetitividade dos métodos QuEChERS em cada amostra utilizada.

Agrotóxicos	Repetitividade – RSD (%)																		
	Abacate			Arroz			Beterraba			Cebola			Repolho			Uva			
	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	O	C	M	
Forato	2,1	2,6	17,9	0,7	2,2	3,8	4,1	3,4	1,0	1,6	1,9	3,8	2,0	7,3	1,5	2,9	1,0	1,7	
Clorotalonil	16,5	5,4	16,8	45,9	25,5	15,7	22,3	30,3	3,0	-	-	-	94,7	25,4	2,8	15,4	24,7	11,0	
Fenitrotiona	7,3	4,8	17,1	9,4	5,2	5,8	3,5	2,7	3,5	7,7	1,3	7,8	5,4	8,9	3,6	1,3	6,3	7,9	
Dicofol	3,4	2,2	10,0	5,4	4,7	1,3	4,6	6,5	1,1	3,9	2,4	1,2	4,7	3,9	0,7	4,1	5,3	3,5	
Aletrina	3,0	2,4	10,0	18,5	6,9	2,3	4,9	5,1	2,6	9,0	3,0	4,2	4,3	7,2	0,7	4,3	5,7	5,3	
Procimidona	6,0	0,2	13,8	3,6	4,9	2,0	5,2	4,9	1,6	3,6	1,0	0,7	4,3	5,4	2,4	6,1	5,8	1,5	
Picoxistrobina	4,6	1,7	3,7	4,3	3,3	2,4	1,2	4,6	2,6	2,9	1,1	0,8	4,6	4,6	0,7	1,9	2,5	4,5	
Oxifluorfem	2,4	4,0	25,9	12,1	7,3	3,9	1,8	3,6	2,7	10,1	3,6	6,6	5,1	7,6	2,9	7,6	12,0	9,6	
Clorfenapir	2,3	2,4	7,2	5,6	3,0	2,3	2,9	4,4	1,8	3,3	0,8	1,0	4,3	4,9	0,2	2,0	3,3	4,9	
Etiona	1,2	3,6	11,8	7,7	3,9	2,7	2,3	2,3	2,1	4,2	1,7	3,8	6,3	7,1	0,8	2,4	2,9	6,6	
Bromuconazol	B1	3,7	3,8	4,9	21,7	8,2	3,0	3,5	8,3	2,7	6,7	0,4	0,6	5,5	5,8	1,2	3,5	6,6	8,7
	B2	8,8	5,7	8,8	30,9	9,1	4,1	13,1	12,5	0,9	14,2	5,4	4,8	16,2	14,2	19,2	6,6	13,2	5,4
Bromopropilato	3,0	1,4	12,5	4,4	14,8	2,6	3,9	2,9	6,0	3,9	4,3	3,8	7,3	8,3	1,3	12,6	1,1	3,8	
Bifentrina	0,4	3,4	14,5	3,3	4,2	2,4	2,8	6,6	1,4	4,0	1,1	3,3	4,1	4,5	2,7	4,1	4,1	6,1	
Lambda-cialotrina	21,7	8,9	22,5	41,7	11,7	10,8	27,4	13,3	14,2	17,1	9,5	4,9	18,4	7,7	2,0	16,2	21,3	8,7	
Permetrina	P1	5,0	5,2	10,7	4,7	4,6	2,8	4,9	5,7	1,1	2,8	0,7	1,1	4,9	4,9	1,0	3,6	3,2	7,5
	P2	0,6	3,1	15,6	6,5	4,9	3,6	3,7	5,5	1,1	2,8	0,3	2,1	5,1	5,7	2,5	3,8	3,6	6,8

B1, B2 = isômeros do Bromuconazol; P1, P2 = isômeros da Permetrina; O = QuEChERS original; C = QuEChERS citrato; M = QuEChERS modificado

6 CONCLUSÃO

A avaliação da metodologia QuEChERS apresentou melhor eficiência para a extração de agrotóxicos em amostra de uva utilizando o método modificado. Para as amostras de arroz e beterraba, o método original se mostrou mais eficiente e, para as amostras de abacate, cebola e repolho, este estudo revelou que a escolha dos três procedimentos de extração pode ser realizada.

Os métodos QuEChERS utilizados apresentaram recuperações entre 80 e 120% e RSD menor que 20%, este para a maioria dos analitos. No entanto, observou-se efeito de matriz positivo para a maioria dos compostos e efeito de matriz negativo apenas para o clorotalonil, evidenciando a necessidade de correção do efeito de matriz através da construção da curva no extrato e utilização de padrão interno.

A determinação dos agrotóxicos em estudo por GC-MS foi adequada, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, utilizando o modo de aquisição *scan* e SIM. As condições cromatográficas utilizadas permitiram a identificação de todas as substâncias, em um tempo de análise de 37,8 minutos.

REFERÊNCIAS

- 1) PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Arroz Polido utilizando Método Quechers Modificado, Clean-Up Dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- 2) QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M.A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QhEChERS e UPLC–MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.
- 3) 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.
- 4) SILVA, J. M., et al. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em sedimentos por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector de captura de elétrons. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 591-597, 2010.
- 5) ANASTASSIADES, M., et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- 6) PEREIRA, J. A.; **A Cultura do Arroz no Brasil: subsídios para sua história**, Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2002, p. 10.
- 7) FAO – **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 13 set. 2014.
- 8) EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. Versão Eletrônica, Nov./2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 13 de setembro de 2014.
- 9) EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Cultivo de cebola no Nordeste**. Versão Eletrônica, Nov./2007 Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 13 set. 2014.
- 10) SOUZA, J. L. **Manual de horticultura orgânica**. 2.ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2006. 843 p.
- 11) CREDIDIO, E.V.; **Abacate: efeitos funcionais na nutrição e saúde**. 1.ed. São Paulo: Ottoni, 2008. 237p.
- 12) GIOVANNINI, E. **Manual de viticultura**. Porto Alegre: Bookman, 2014. 253p.
- 13) EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), **Cultivo Da videira**. Versão Eletrônica, Ago/2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 15 de outubro de 2014.

- 14) JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.
- 15) BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em: 20 ago. 2014.
- 16) RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L.C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS environment**, v.8, p. 53-71, 2008.
- 17) GALLI, A., et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 105-112, 2006.
- 18) COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006. Cap. 7, p. 203-270.
- 19) HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8.ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2012. Cap. 23, p. 605-628.
- 20) MENDHAM, J; DENNEY, R. C.; BARNES, L. D.; THOMAS, M. J. K. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2002. Cap. 9, p.144-159.
- 21) SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry- based environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p.125-151, 2003.
- 22) VEKÉY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227-236, 2001.
- 23) LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal Chromatography A**, v.1218, p. 1021-1036, 2011.
- 24) PRESTES, O. D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. 130 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- 25) MILLS, P.A; ONLEY, J.H.; GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non-fatty foods. **Journal of AOAC**, v. 50, p. 430, 1963.
- 26) LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H.T. Extraction and *clean-up* of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC**, v. 58, p. 1020, 1975.

- 27) HIEMSTRA, M.; KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.
- 28) WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803–812, 2011.
- 29) KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.
- 30) RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v.34, n. 5, p. 780-786, 2011.
- 31) MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J; Determination of photoirradiated high polar benzylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 20140, n. 2, p. 259-265, 2004.
- 32) GIHP (General Inspectorate for Health Protection). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, General Inspectorate for Health Protection, 6th ed., The Hage, 1996.
- 33) STAN, H.J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 2, p. 347-377, 2000.
- 34) PIZZUTTI, I. R., et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v.1142, n. 2, p. 123-136, 2007.
- 35) ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 339, p.365-367, 1991.
- 36) KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 1 p.10-20, 2008.
- 37) SCHENCK, F. J., et al. A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 2, p. 422-438, 2008.

- 38) LEHOTAY, S., Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.
- 39) MARTINEZ-VIDAL, J. L., *et al.* Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 3, p. 365-375, 2006.
- 40) 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 Chromatography A**, v.1165, p. 18, 2007.
- 41) LEHOTAY, S.J., HIEMSTRA, M., BODEGRAVEN, P., KOK, A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 595, 2005.
- 42) CVUA (CHEMISCHES UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSÄMTER STUTTGART). Disponível em <http://www.quechers.com>. Acesso em: 24 ago. 2014.
- 43) PAYÁ P., *et al.* Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697, 2007.
- 44) ANASTASSIADES, M., *et al.* Crop Protection, Public Health. **Environmental Safety**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 2007, 439.
- 45) LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K; LIGHTFIELD, A.R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.
- 46) PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean up dispersivo e GC-MS**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- 47) HAJŠLOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.
- 48) SHENCK, F. J., LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51 – 61, 2000.
- 49) PINHO, *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

- 50) INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- 51) RIBANI, M., et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- 52) VARGA, R., et al. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction – liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, p.1447–1454, 2011.
- 53) KRUVE, A., et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.
- 54) SANCHEZ-BRUNETE, C., et al. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**. v. 21, p. 1291-1296, 2005.
- 55) ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Monografia de agrotóxicos**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 ago. 2014.