



FERNANDA RIBEIRO BEGNINI KONATU

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
CULTURA DE ALFACE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA
À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FERNANDA RIBEIRO BEGNINI KONATU

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
CULTURA DE ALFACE, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA
À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ISABEL CRISTINA SALES FONTES
JARDIM**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO
DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR FERNANDA
RIBEIRO BEGNINI KONATU, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ISABEL CRISTINA SALES
FONTES JARDIM.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

K836d Konatu, Fernanda Ribeiro Begnini, 1987-
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de alface, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial / Fernanda Ribeiro Begnini Konatu. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Alface. 2. Agrotóxicos. 3. QuEChERS. 4. Cromatografia líquida. 5. Espectrometria de massas sequencial. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation of analytical methods for multi-residue determination of pesticides in lettuce by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Lettuce

Pesticides

QuEChERS

Liquid chromatography

Tandem mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim [Orientador]

Ednei Gilberto Primel

Martha Bohrer Adaime

Fabio Augusto

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Data de defesa: 19-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Sílvia e José Carlos, que muito contribuíram para meu sucesso e me forneceram a base indispensável para uma vida maravilhosa. Também dedico este trabalho aos meus irmãos Gui, Fábio, Nita e Mar, e ao meu marido Alexandre, pela incomparável compreensão, paciência, apoio, carinho e amor. Por fim, dedico a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

“Sempre faço o que não consigo fazer, para aprender o que não sei!” (Pablo Picasso)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À vida, por me fornecer desafios engrandecedores.

À Profa. Dra. Isabel Jardim, pela oportunidade, apoio, dedicação, confiança e exemplos de orientação e profissionalismo.

À todos os amigos do LabCrom e da UNICAMP, Cristiane, Cláudio, Liane, Renata M., Renata N., Carla, Elias, Karen, Daniele, Elisa, Luana, Lucília e Priscila, pela grande amizade, companheirismo e auxílio nos trabalhos.

À toda minha família, em especial, meus pais, irmãos e avós, pelo amor, apoio e compreensão incomparáveis, principalmente nos momentos em que estive ausente.

À todos meus amigos, pelo carinho, companhia e lealdade. Em especial, ao Harry, Raquel, Renata, Glauco, Simone, Priscila, Nozômi, Michelin, Vareta, Felipe, Thaís, Mariana, Michele, Janaina, Sâmara e Aline V., pela imensa amizade, até mesmo à distância.

Ao Alexandre, meu grande amor, pela compreensão, amizade e imenso apoio em todos os momentos de minha vida.

À toda comunidade do Instituto de Química da UNICAMP, professores, funcionários e alunos, pelos indispensáveis ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Em especial, à Profa. Carol H. Collins e à Profa. Márcia C. Breitreitz, pelas contribuições ao trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida no período de 08/2011 a 05/2012.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida no período de 06/2012 a 04/2014 (Processo Nº 2011/23127-0) e confiança no trabalho.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

MESTRADO EM QUÍMICA (QUÍMICA ANALÍTICA) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Instituto de Química, Campinas-SP, Brasil. Título da Dissertação: “Preparação e caracterização de fase estacionária reversa fenil-propil-metil-siloxano, imobilizada por micro-ondas, para cromatografia líquida de alta eficiência”. Orientação: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Período: 03/2009 a 08/2011.

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (BACHARELADO) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química, Araraquara-SP, Brasil. Período: 03/2005 a 12/2008.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA: Título da Monografia: “Caracterização de fármacos policristalinos pelo Método de Rietveld com dados de difração de raios X: Análise quantitativa de fases dos polimorfos da carbamazepina”. Orientação: Prof. Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Período: 10/2006 a 12/2008.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

MONITORA DA DISCIPLINA “QUÍMICA FUNDAMENTAL” – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 03/2006 a 07/2006.

MONITORA DOS MINI-CURSOS “CRISTALOGRAFIA BÁSICA” E “MÉTODO DE RIETVELD” - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 02/2008.

MEMBRO DA EMPRODEQUI JR – Empresa de Projetos e Consultoria em Química (Empresa Júnior do IQ/UNESP) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 03/2005 a 06/2008.

PRÊMIO

PRÊMIO LAVOISIER, por Honra ao Mérito, concedido pelo Conselho Regional de Química da IV Região (CRQ-IV), por ser classificada como melhor aluna do curso de Bacharelado em Química da Turma de 2008 do Instituto de Química da UNESP Campus Araraquara.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP) - Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, Campinas-SP, Brasil.

Função: Profissional de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. Período: 05/2014 a 09/2014.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (IPT) –

Laboratório de Análises Químicas do Centro de Metrologia em Química, São Paulo-SP, Brasil.

Função: Assistente de Pesquisa Trainee. Período: 06/2009 a 07/2010.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS: 15

ARTIGOS CIENTÍFICOS

MORAIS, E. H. C.; **BEGNINI, F. R.**; JARDIM, I. C. S. F. Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. *Scientia Chromatographica*, v.5, n. 2, p.146 - 162, 2013.

BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Preparation and characterization of a new microwave immobilized poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane stationary phase for reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1297, p.113-122, 2013.

ANTONIO, S. G.; **BENINI, F. R.**; FERREIRA, F. F.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. O. P. Quantitative phase analyses through the Rietveld method with X-ray powder diffraction data of heat-treated carbamazepine form III. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 7, p. 2658-2664, 2011. (DOI 10.1002/jps.22482).

ANTONIO, S. G.; **BENINI, F. R.**; FERREIRA, F. F.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. O. P. Synchrotron X-ray powder diffraction data of atorvastatin. *Powder Diffraction*, v. 23, n. 4, p. 350-355, 2008. (DOI 10.1154/1.2996511).

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO
DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CULTURA DE ALFACE, POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

RESUMO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nos últimos anos, a alface tem apresentado irregularidades no Brasil, em relação à presença de agrotóxicos permitidos em limites acima do recomendável e/ou substâncias não autorizadas para o produto, tornando-se necessário o desenvolvimento de métodos para a determinação multirresíduos de agrotóxicos nesta cultura. A separação, confirmação e quantificação de 16 agrotóxicos em alface foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e de ultra eficiência acopladas à espectrometria de massas sequencial, com analisador triplo quadrupolo, operando no modo de monitoramento de reações múltiplas e ionização positiva por *eletrospray*. Para a extração dos agrotóxicos, foi utilizado o método QuEChERS otimizado, empregando-se acetonitrila como solvente extrator, tampão citrato na etapa de particionamento, agitação por vórtex, centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm e uso de uma mistura de PSA, MgSO₄ e carbono grafitizado para realização da limpeza da amostra. Os métodos desenvolvidos foram validados, de acordo com o Documento SANCO N° 12571/2013, mostrando-se seletivos, exatos e precisos, com recuperações na faixa de 70-120% e coeficientes de variação inferiores a 20%. A linearidade foi avaliada em 5 níveis de fortificação, empregando curvas analíticas por padronização externa com superposição de matriz, obtendo-se coeficientes de determinação acima de 0,990, resíduos menores que 20% e limites de quantificação acima de 3 µg/kg. Os métodos foram aplicados para diferentes variedades de alface (crespa, lisa, americana, mimosa e roxa) e para o espinafre (hortaliça de composição similar), obtendo-se bons resultados. Amostras adquiridas no comércio da região de Campinas-SP foram analisadas e agrotóxicos foram detectados em 43% das amostras, em limites não autorizados pela ANVISA, comprovando a necessidade do monitoramento contínuo da cultura de alface no Brasil.

Palavras-chave: alface; agrotóxicos; QuEChERS; cromatografia líquida; espectrometria de massas sequencial.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR MULTI-RESIDUE
DETERMINATION OF PESTICIDES IN LETTUCE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY

ABSTRACT

According to the Brazilian Health Surveillance Agency, in recent years, lettuce has shown irregularities in Brazil, due to the presence of pesticides at levels above the permissible maximum residue level. Therefore, the development of a multi-residue method for determination of pesticides in lettuce becomes necessary. For this, the separation, confirmation and quantification of 16 pesticides in lettuce was realized using high- and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with a triple quadrupole mass analyzer, operating in a multiple reaction monitoring mode with positive electrospray ionization. The pesticide extraction was performed using an optimized QuEChERS method, employing acetonitrile as extraction solvent, citrate buffer as partitioning salt, vortex agitation, centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes and clean-up with PSA, MgSO₄ and graphitized carbon black. The methods developed were validated according to Document SANCO N° 12571/2013, and proved to be selective, accurate and precise, presenting recoveries from 70 to 120% and a relative standard deviation $\leq 20\%$ for all pesticides. Linearity was evaluated at 5 levels of fortification, employing matrix-matched standard solutions, providing coefficients of determination higher than 0.990, residuals $\leq 20\%$ and limits of quantification from 3 $\mu\text{g/kg}$. The methods were applied to several varieties of lettuce (green-leaf, looseleaf, iceberg, green-bowl and red-leaf) and to spinach (vegetable of similar composition), showing good results. Samples of several varieties of lettuce were purchased from commercial markets in Campinas, SP, and pesticides were detected in 43% of the samples at concentrations above the levels authorized by ANVISA, indicating the need to continue to monitor lettuce.

Keywords: lettuce; pesticides; QuEChERS; liquid chromatography; tandem mass spectrometry.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A importância e o controle do uso de agrotóxicos	1
1.2 A cultura da alface no Brasil	2
1.2.1 Principais doenças da alface e agrotóxicos empregados em seu controle.....	5
1.2.1.1 Tombamento.....	6
1.2.1.2 Podridão-de-esclerotínea	7
1.2.1.3 Míldio	7
1.2.1.4 Septoriose	7
1.3 Métodos para determinação multirresíduos de agrotóxicos.....	8
1.3.1 Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos em alimentos.....	8
1.3.1.1 O método de extração QuEChERS.....	10
1.3.1.1.1 O solvente extrator	12
1.3.1.1.2 Os sais extratores.....	13
1.3.1.1.3 Extração em fase sólida dispersiva (EFS-D).....	13
1.3.1.1.4 Modificações no método QuEChERS	14
1.3.2 Técnicas analíticas para determinação multirresíduos de agrotóxicos.....	16
1.3.2.1 Cromatografia líquida.....	17
1.3.2.2 Espectrometria de massas.....	20
1.3.2.3 O uso da CL-EM/EM na determinação de agrotóxicos em alface	23
1.3.3 Efeito matriz em espectrometria de massas	25
1.4 Validação de métodos analíticos	26
1.4.1 Seletividade	27
1.4.2 Limites de detecção e de quantificação	28
1.4.3 Linearidade e curva analítica	29
1.4.4 Precisão	30
1.4.5 Exatidão	30
1.4.6 Robustez	31
2 OBJETIVOS	31
2.1 Metas específicas	31
3 EXPERIMENTAL	33
3.1 Reagentes.....	33
3.2 Equipamentos	34
3.3 Colunas cromatográficas comerciais.....	34
3.4 Amostras de alface.....	35
3.5 Seleção dos agrotóxicos estudados	35

3.6	Preparo das soluções analíticas dos agrotóxicos	39
3.7	Definição das condições instrumentais de análise	39
3.7.1	Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação	40
3.7.2	Separação cromatográfica dos agrotóxicos	40
3.7.3	Avaliação dos parâmetros do espectrômetro de massas	41
3.7.4	Determinação das concentrações iniciais de trabalho	42
3.8	Otimização do método de preparo de amostra QuEChERS	42
3.8.1	Preparação de um sorvente do tipo fenil para avaliação na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS.....	46
3.8.2	Emprego de ponteiras descartáveis na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS.....	47
3.8.3	Estudo da radiação micro-ondas para a extração dos agrotóxicos	48
3.9	Validação do método.....	49
3.9.1	Limites de detecção e de quantificação	50
3.9.2	Linearidade e curva analítica	50
3.9.3	Seletividade	51
3.9.4	Precisão	52
3.9.5	Exatidão	52
3.9.6	Robustez	53
3.10	Aplicação do método otimizado e validado por CLAE-EM/EM.....	54
3.10.1	Estudo de diferentes variedades de alface	54
3.10.2	Determinação de agrotóxicos em amostras comerciais de alface	54
3.10.3	Aplicação do método para a análise de espinafre	55
3.11	Transferência do método desenvolvido para a CLUE-EM/EM	56
3.11.1	Definição das condições instrumentais de análise por CLUE-EM/EM.....	56
3.11.1.1	Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação por CLUE-EM/EM	57
3.11.1.2	Separação cromatográfica dos agrotóxicos por CLUE-EM/EM	57
3.11.1.3	Determinação das concentrações iniciais de trabalho por CLUE-EM/EM	58
3.11.2	Estudos de recuperação e efeito matriz da alface crespa por CLUE-EM/EM	58
3.11.3	Estudo do efeito matriz nas diferentes variedades de alface e espinafre por CLUE-EM/EM.....	58
3.11.4	Validação do método por CLUE-EM/EM	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Definição das condições de análise por CLAE-EM/EM	60
4.1.1	Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação	60
4.1.2	Otimização da separação cromatográfica	61
4.1.3	Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	62
4.1.4	Determinação das concentrações iniciais de trabalho	63
4.2	Otimização do método de preparo de amostra QuEChERS	64
4.2.1	Otimização do tempo e velocidade de centrifugação	65
4.2.2	Tempo de interação dos agrotóxicos nas amostras fortificadas	66
4.2.3	Definição do tipo de sal.....	66
4.2.4	Definição do solvente extrator.....	70
4.2.5	Definição dos sais de limpeza da amostra	73
4.2.5.1	Avaliação do sorvente Si(PFPMS)	77
4.2.5.2	Emprego de ponteiras descartáveis na etapa de limpeza	81

4.2.5.3	Estudo do ultrassom como forma de agitação	83
4.2.6	Estudo da radiação micro-ondas para a extração dos agrotóxicos	85
4.3	Quantificação dos agrotóxicos em alface pelo método QuEChERS	87
4.4	Validação do método por CLAE-EM/EM.....	88
4.4.1	Limites de detecção e de quantificação por CLAE-EM/EM	88
4.4.2	Linearidade e curva analítica por CLAE-EM/EM	89
4.4.3	Seletividade por CLAE-EM/EM	92
4.4.4	Precisão e exatidão por CLAE-EM/EM	93
4.4.5	Robustez por CLAE-EM/EM	94
4.5	Aplicação do método otimizado e validado por CLAE-EM/EM.....	96
4.5.1	Estudo de diferentes variedades de alface	96
4.5.2	Determinação de agrotóxicos em amostras de alface disponíveis no comércio.	99
4.5.3	Aplicação do método para a análise de espinafre.....	102
4.6	Transferência do método desenvolvido para a CLUE-EM/EM.....	108
4.6.1	Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação por CLUE-EM/EM	108
4.6.2	Separação cromatográfica dos agrotóxicos por CLUE-EM/EM	109
4.6.3	Determinação das concentrações iniciais de trabalho por CLUE-EM/EM	112
4.6.4	Estudos de recuperação e efeito matriz da alface crespa por CLUE-EM/EM... ..	113
4.6.5	Estudo do efeito matriz nas diferentes variedades de alface e espinafre por CLUE-EM/EM.....	114
4.6.6	Validação do método por CLUE-EM/EM.....	117
4.6.6.1	Limites de detecção e de quantificação por CLUE-EM/EM	117
4.6.6.2	Linearidade e curva analítica por CLUE-EM/EM	118
4.6.6.3	Seletividade por CLUE-EM/EM	123
4.6.6.4	Precisão e exatidão por CLUE-EM/EM	124
5	CONCLUSÕES.....	125
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE	135

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABCSEM: Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ANOVA: Análise de Variância (do inglês, *Analysis of Variance*).

Área_{amostra} fortificada após a extração: área do pico do analito obtida pela injeção da amostra “branco” fortificada após o processo de extração.

Área_{solução} de fortificação em solvente: área do pico do analito obtida pela injeção da solução de fortificação, em solvente.

C₀: concentração inicial de trabalho.

CG: Cromatografia Gasosa.

CL: Cromatografia Líquida.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CLAE-EM/EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial.

CL-EM/EM: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial.

CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.

CLUE-EM/EM: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial.

CV: Coeficiente de Variação.

d_c: diâmetro interno da coluna cromatográfica.

DIC: Dissociação Induzida por Colisão.

EFS-D: Extração em Fase Sólida Dispersiva.

EM/EM: Espectrometria de Massas sequencial.

EM: Espectrometria de Massas.

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FE: Fase Estacionária.

FM: Fase Móvel.

GCB: Carbono Grafitizado (do inglês, *Graphitized Carbon Black*).

IBAMA: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente.

ICH: do inglês, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

L: comprimento da coluna cromatográfica.

LabCrom: Laboratório de pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp.

LD: Limite de Detecção.

LMR: Limite Máximo de Resíduo.

LQ: Limite de Quantificação.

LQi: Limite de Quantificação do instrumento.

m/z: relação massa/carga de um composto químico.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento.

MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

ONUAA: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação.

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

PFPMS: copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano.

Si(PFPMS): sorvente à base de sílica e do copolímero PFPMS.

PNCRC/Vegetal: Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal.

PSA: amina primária secundária (do inglês, *Primary Secondary Amine*).

PTFE: politetrafluoretileno.

PVDF: fluoreto de polivinilideno, do inglês *polyvinylidene fluoride*.

QuEChERS: do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*.

r^2 : coeficiente de determinação de uma curva analítica.

s: estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear, quando se emprega uma curva analítica.

S: a inclinação ou coeficiente angular de uma curva analítica.

TFM: copolímero de tetrafluoretileno e perflúor(propil vinil éter).

TIC: Cromatograma de Íons Totais, do inglês *Total Ion Chromatogram*.

V_{inj} : volume de injeção de um método cromatográfico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição nutricional das diferentes variedades de alface cultivadas no Brasil: crespa, lisa, americana, mimosa e roxa.	3
Tabela 2: Produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de doenças da alface e de insetos-vetores de vírus.	6
Tabela 3: Variações comuns do método QuEChERS, abrangendo o tipo de solvente extrator, os tipos de sais da etapa de particionamento e os sorventes utilizados na limpeza da amostra.	12
Tabela 4: Levantamento bibliográfico de métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em alface por CL-EM/EM, nos últimos anos.	24
Tabela 5: Agrotóxicos selecionados, assim como suas fórmulas químicas, grupos químicos, classes agrônômicas, massas monoisotópicas e os valores de pKa e log P.	37
Tabela 6: Limites máximos de resíduos dos 16 agrotóxicos estudados, quando aplicados em alface, estabelecidos por diferentes legislações, assim como a modalidade de aplicação de cada agrotóxico.	38
Tabela 7: Variações para cada tipo de modificação realizada no método QuEChERS para aplicação em amostras de alface.	44
Tabela 8: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, para avaliação da linearidade do método.	51
Tabela 9: Variações de alguns parâmetros do método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em alface, para avaliação da robustez.	54
Tabela 10: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, para avaliação da linearidade do método por CLUE-EM/EM.	59
Tabela 11: Apresentação das transições de massa definidas para cada agrotóxico estudado, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone otimizadas para cada transição.	60
Tabela 12: Tempo de retenção de cada agrotóxico estudado, no modo gradiente otimizado da separação cromatográfica por CLAE, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água de cada analito.	61
Tabela 13: Parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas avaliados e otimizados para o aumento da detectabilidade dos agrotóxicos estudados.	62
Tabela 14: Compostos monitorados em cada intervalo de tempo da análise cromatográfica, assim como o <i>dwell time</i> definido para cada janela.	63

Tabela 15: Concentrações iniciais de trabalho (C_0) para os agrotóxicos estudados e a razão entre os íons de quantificação e confirmação, obtida experimentalmente, assim como seus desvios teóricos aceitos, de acordo com o SANCO.	64
Tabela 16: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se extração por QuEChERS com sais de diferentes naturezas na segunda etapa de extração.	69
Tabela 17: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com diferentes solventes extratores.	72
Tabela 18: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se QuEChERS com diferentes sais de limpeza da amostra.	76
Tabela 19: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o sorvente Si(PFPMS) como um dos sais de limpeza da amostra.	79
Tabela 20: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o uso de ponteiras descartáveis na etapa de limpeza da amostra. ...	81
Tabela 21: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com uso de ultrassom em substituição ao vórtex.	84
Tabela 22: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com uso de micro-ondas com e sem a etapa de limpeza da amostra.	86
Tabela 23: Dados das curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico, empregadas na determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento.	88
Tabela 24: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, assim como os intervalos de concentração compreendidos pela curva, o limite de quantificação do método e os dados das curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz.	89
Tabela 25: Precisão, curva analítica e exatidão obtidas na análise de 5 amostras fortificadas em dois níveis de concentração.	94
Tabela 26: Coeficientes de variação calculados comparando-se as áreas dos analitos obtidas no método original e após alterações em alguns parâmetros do método.	95
Tabela 27: Coeficientes de variação calculados comparando-se as porcentagens de recuperação dos analitos obtidas no método original e após alterações em alguns parâmetros.	95

Tabela 28: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, para as diferentes variedades de alface, empregando o método analítico otimizado e validado.....	97
Tabela 29: Resultados de regressão linear obtidos para as diferentes variedades de alface. ...	99
Tabela 30: Agrotóxicos detectados e suas respectivas concentrações, nas diferentes porções e variedades de amostras de alface analisadas.....	100
Tabela 31: Porcentagens de recuperação, coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS para a análise de espinafre.	103
Tabela 32: Resultados de regressão linear obtidos pelas curvas analíticas elaboradas para a matriz espinafre em solvente e pelo método de superposição de matriz (fortificação de uma matriz “branco” extraída).....	104
Tabela 33: Agrotóxicos detectados e suas respectivas concentrações, assim como a procedência das amostras de espinafre adquiridas no comércio de Campinas-SP.	107
Tabela 34: Apresentação das transições de massa definidas para cada agrotóxico estudado, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone otimizadas para cada transição, empregando-se CLUE-EM/EM.	109
Tabela 35: Tempo de retenção de cada agrotóxico estudado, no modo gradiente otimizado para a separação cromatográfica por CLUE, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água de cada analito.	110
Tabela 36: Compostos monitorados em cada intervalo de tempo da análise cromatográfica por CLUE-EM/EM, assim como o <i>dwell time</i> definido para cada janela.	111
Tabela 37: Comparação dos resultados obtidos para a separação cromatográfica dos agrotóxicos, empregando os sistemas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.	112
Tabela 38: Concentrações iniciais de trabalho (C_0) para os agrotóxicos estudados empregando-se a CLAE-EM/EM e a CLUE-EM/EM e a razão entre os íons de quantificação e confirmação, obtida por CLUE-EM/EM, assim como seus desvios aceitos, de acordo com o SANCO.	113
Tabela 39: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o uso da CLUE-EM/EM.	114
Tabela 40: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, para as alfaces lisa, americana, mimosa e roxa e para o espinafre, empregando-se CLUE-EM/EM.	115
Tabela 41: Dados das curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico, empregadas na determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento por CLUE-EM/EM.	117

Tabela 42: Intervalos de concentração das curvas analíticas obtidas por CLUE-EM/EM, o limite de quantificação do método e os dados de regressão das curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz.....	119
Tabela 43: Precisão, curva analítica e exatidão obtidas na análise de 5 amostras fortificadas por CLUE-EM/EM, em dois níveis de concentração.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Total de sementes comercializadas no Brasil, no período de 2007 a 2009, compreendendo sementes nuas e peletizadas, de acordo com a ABCSEM ¹²	4
Figura 2: Representações de mudas de alface atingidas pela doença do tombamento ¹⁶	6
Figura 3: Representações de alfaces atingidas pela doença da podridão-de-esclerotínea ¹⁶	7
Figura 4: Representações de alfaces atingidas pela doença do míldio ^{16,17}	7
Figura 5: Representações das folhas de alface atingidas pela doença da septoriose ¹⁶	8
Figura 6: Representação esquemática do funcionamento das ponteiros descartáveis contendo sorventes sólidos, para emprego na etapa de limpeza do método QuEChERS ⁴³	15
Figura 7: Representação esquemática da ionização por <i>eletrospray</i> , operando no modo positivo ⁶¹	22
Figura 8: Representação esquemática do analisador triplo quadrupolo, operando no modo MRM (monitoramento de reações múltiplas), sendo Q1 e Q3 quadrupolos de transmissão e Q2 um quadrupolo que atua como cela de colisão ⁶⁴	23
Figura 9: Representação da estrutura química dos agrotóxicos estudados.	36
Figura 10: Representação da estrutura do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMS). As letras <i>m</i> e <i>n</i> representam o comprimento da cadeia polimérica.	46
Figura 11: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido na separação cromatográfica dos 16 agrotóxicos estudados, utilizando-se coluna analítica XTerra® MS C18 (100 x 3,0 mm, 3,5 µm) e coluna de guarda XTerra® C18 (20 x 3,0 mm, 3,5 µm). Condições cromatográficas: volume de injeção: 7 µL; fase móvel MeOH:H ₂ O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) variando linearmente: 0 min – 15:85, 4 min – 15:85, 7 min - 40:60, 10 min – 60:40, 15 min – 70:30, 20 min – 70:30, 25 min – 85:15, 28 min – 85:15, 30 min – 15:85 e 40 min – 15:85; vazão de 0,3 mL/min e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) carbendazim, (4) metomil, (5) tiametoxam, (6) imidacloprido, (7) clotianidina, (8) tiacloprido, (9) carbaril, (10) azoxistrobina, (11) fenamidona, (12) malationa, (13) iprodiona, (14) procloraz, (15) tebuconazol e (16) difenoconazol.....	62
Figura 12: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação.....	65
Figura 13: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o tempo de interação entre os agrotóxicos adicionados às amostras, antes da realização da extração.	66

Figura 14: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se a natureza dos sais utilizados na segunda etapa de extração.	67
Figura 15: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS com o tampão salino acetato, variando-se a quantidade de PSA utilizada na etapa de limpeza da amostra.....	68
Figura 16: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de sal empregado no método QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 ; (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.	69
Figura 17: Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o solvente extrator utilizado na primeira etapa de extração.	71
Figura 18: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de solvente extrator empregado em QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 , (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.	73
Figura 19: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se os sais de limpeza da amostra.	74
Figura 20: Ilustração das colorações dos extratos obtidos após extração por QuEChERS e limpeza da amostra com PSA, $MgSO_4$ e diferentes quantidades de carbono grafitizado.	75
Figura 21: (A) Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de sal de limpeza empregado em QuEChERS, avaliado em dois níveis de fortificação (C_0 e $3xC_0$) e (B) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.	76
Figura 22: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS com o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza da amostra.	78
Figura 23: Distribuição numérica do efeito matriz, empregando o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza do método QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 , (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.	80
Figura 24: Representação ilustrativa das ponteiras descartáveis utilizadas na etapa de limpeza do método QuEChERS: (A) Ponteiras descartáveis, contendo a mistura de 37,5 mg PSA, 225 mg $MgSO_4$ e 7,5 mg de GCB. (B) Coloração dos extratos de amostra de alface antes e após a etapa de limpeza da amostra, empregando as ponteiras.....	83
Figura 25: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados.	90
Figura 26: Resíduos da regressão linear obtida para cada um dos analitos estudados.	91

Figura 27: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos através da análise de: (A) uma amostra de alface crespa “branco” após a extração e (B) uma amostra de alface crespa fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.....	93
Figura 28: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método analítico otimizado e validado para diferentes variedades de alface.	96
Figura 29: Distribuição numérica do efeito matriz em diferentes variedades de alface, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 , (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.	97
Figura 30: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos através da análise de: (A) uma amostra de espinafre “branco” após a extração e (B) uma amostra de espinafre fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.	102
Figura 31: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados, na matriz espinafre.	105
Figura 32: Resíduos da regressão linear obtida para os agrotóxicos estudados, em espinafre.	106
Figura 33: (A) Cromatograma de íons totais obtido na separação cromatográfica dos 16 agrotóxicos estudados por CLUE, utilizando-se coluna analítica Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m) e coluna de guarda Van Guard® BEH C18 (5 x 2,1 mm, 1,7 μ m). Condições cromatográficas: volume de injeção: 1,7 μ L; fase móvel MeOH:H ₂ O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) variando linearmente: 0 min – 15:85; 2,82 min – 15:85; 4,32 min - 40:60; 5,82 min – 60:40; 8,32 min – 70:30; 10,82 min – 70:30; 13,32 min – 85:15; 14,82 min – 85:15; 15,82 min – 15:85; 20 min – 15:85; vazão de 0,147 mL/min e temperatura de 25 °C. (B) Comparativo entre os cromatogramas de íons totais obtidos na separação cromatográfica dos agrotóxicos pelas técnicas de CLAE e CLUE. As condições cromatográficas de análise por CLAE estão descritas na Figura 11. Identificação dos picos: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) carbendazim, (4) metomil, (5) tiametoxam, (6) imidacloprido, (7) clotianidina, (8) tiacloprido, (9) carbaril, (10) azoxistrobina, (11) fenamidona, (12) malationa, (13) iprodiona, (14) procloraz, (15) tebuconazol e (16) difenoconazol.	110
Figura 34: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de matriz estudada, avaliado por CLUE-EM/EM nos níveis de fortificação: (A) C_0 e (B) $3xC_0$	115
Figura 35: Comparativo entre os limites de detecção do instrumento, obtidos para a análise de 16 agrotóxicos em alface, empregando-se as técnicas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.	118
Figura 36: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados, empregando-se a CLUE-EM/EM.	120

Figura 37: Resíduos da regressão linear obtida para os analitos analisados por CLUE-EM/EM.	121
Figura 38: Comparativo dos limites de quantificação do método, obtidos através das técnicas analíticas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM para a análise de: (A) agrotóxicos não autorizados para uso em alface; e (B) agrotóxicos autorizados.	122
Figura 39: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos por CLUE-EM/EM através da análise de: (A) uma amostra de alface crespa “branco” após a extração e (B) uma amostra de alface crespa fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância e o controle do uso de agrotóxicos

A qualidade da produção agrícola é intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, como insetos e ervas daninhas, que causam cerca de 42% de danos à produção vegetal, de acordo com dados divulgados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (ONUAA ou do inglês FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) em 2013¹. Desta forma, torna-se necessária a utilização de agrotóxicos de diversas classes químicas, como herbicidas, inseticidas e fungicidas, cujas funções básicas na agricultura incluem, principalmente, o aumento da produtividade, evitando perdas significativas na produção^{2,3}.

Os agrotóxicos são definidos como produtos de processos químicos ou biológicos, naturais ou sintéticos, destinados ao uso nos setores de produção; no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas; nas pastagens; e na proteção de florestas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, que possuem a finalidade de alterar a composição da flora ou fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos nocivos, de acordo com a Lei Federal número 7802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto número 98816⁴.

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, divulgados em 2012, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto que o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos, enquanto que os Estados Unidos foram responsáveis por 17% do mercado mundial, fazendo do Brasil o país líder no mercado mundial de agrotóxicos⁵.

No entanto, se por um lado a utilização de agrotóxicos em larga escala é benéfica ao desenvolvimento da agricultura, por outro lado o uso indiscriminado e pouco criterioso de agrotóxicos traz problemas associados à contaminação do meio ambiente, como a contaminação de solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, além da contaminação dos alimentos, trazendo riscos à saúde humana e animal⁶.

Apesar dos agrotóxicos sintéticos terem sido introduzidos no mercado mundial na década de 40⁷, somente em anos mais recentes o conhecimento científico e as novas

tecnologias da área laboratorial vêm permitindo a avaliação da qualidade dos alimentos, que chegam ao consumo da população. No Brasil, a regulamentação dos agrotóxicos é realizada oficialmente pelos seguintes órgãos federais: o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente e a ANVISA, do Ministério da Saúde.

Assim, de modo a controlar o uso dos agrotóxicos nas culturas brasileiras e assegurar a segurança do consumidor, a ANVISA criou, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* consumidos pelos brasileiros, atendendo a segurança alimentar e evitando agravos à saúde da população. O PARA monitora a qualidade dos alimentos comercializados em 25 estados brasileiros, em diferentes culturas, quanto ao uso indevido de agrotóxicos não autorizados para as culturas monitoradas, bem como os agrotóxicos permitidos, porém com resíduos acima do limite máximo de resíduo permitido (LMR).

De acordo com a ANVISA, o limite máximo de resíduo (LMR) é a quantidade máxima de agrotóxico legalmente aceita no alimento, expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg/kg), em decorrência da aplicação adequada de agrotóxicos, desde a sua produção até o seu consumo. Os LMR são baseados nas Boas Práticas Agrícolas, que são iniciativas economicamente viáveis e seguras que garantem uma produção de qualidade e também preservam o meio ambiente, fazendo com que produtos que apresentem agrotóxicos dentro dos LMR sejam considerados toxicologicamente aceitáveis.

1.2 A cultura da alface no Brasil

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil⁸, sendo produzida em mais de 66 mil estabelecimentos agropecuários e abrange uma produção superior a 525 mil toneladas ao ano, de acordo com o último censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), divulgado em 2006. A maior produção de alface está centrada nas regiões sudeste e sul, abrangendo 61% do total dos estabelecimentos produtores. Também de acordo com o IBGE, cerca de 70% dos

produtores utilizam agrotóxicos na cultura da alface, sendo de natureza química ou orgânica⁹.

Recentemente, a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM) divulgou resultados da produção de alface no Brasil, entre outras hortaliças, referentes ao ano de 2012¹⁰, sendo que 1,6 bilhões de toneladas de alface foram produzidas em todo o país, movimentando mais de 57 milhões de reais em agrotóxicos. De acordo com esses dados, pode-se observar um aumento significativo da produção de alface no Brasil, com a utilização de agrotóxicos nessa cultura.

A alface tem grande importância na alimentação e na saúde humana, destacando-se, principalmente, como fonte de fibras, vitaminas (vitaminas A, B e C; folatos; entre outras) e sais minerais, como potássio, cálcio e fósforo. Esta importância não só se deve à sua qualidade nutritiva, mas também à facilidade de aquisição, produção durante todo o ano e baixo custo¹¹. Dentre os tipos de alface mais cultivados no Brasil, destacam-se a alface crespa, a lisa, a americana, a mimosa e a roxa, que apresentam composições nutricionais semelhantes, conforme informações obtidas da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, denominada de *USDA Nutrient Database for Standard Reference*, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição nutricional das diferentes variedades de alface cultivadas no Brasil: crespa, lisa, americana, mimosa e roxa.

Alface	Teor (%)					
	Água	Carboidratos	Fibras	Proteínas	Açúcares totais	Gorduras totais
Crespa	95,0	2,9	1,3	1,4	0,8	0,2
Lisa	95,6	2,2	1,1	1,4	0,9	0,2
Americana	95,6	3,0	1,2	0,9	2,0	0,1
Mimosa ^a	-	1,5	1,3	0,5	-	-
Roxa	95,6	2,3	0,9	1,3	0,5	0,2

^aInformações provenientes dos produtores de alface no Brasil, uma vez que este tipo de alface não se encontra na base de dados americana.

Segundo a ABCSEM, que também realiza pesquisas de mercado nacional em relação ao total de sementes de hortaliças comercializadas, tem-se que, nos últimos anos, a variedade de alface mais produzida no Brasil foi a do tipo crespa, seguida pela americana e, posteriormente, a alface lisa. A Figura 1 apresenta os últimos dados divulgados pela ABCSEM, referentes à comercialização de sementes de diferentes

variedades de alface no Brasil, nos anos de 2007 a 2009, compreendendo as sementes nuas e peletizadas (sementes tratadas e revestidas)¹². De acordo com a Figura 1, verifica-se que a venda de sementes desta hortaliça tem aumentado nos últimos anos.

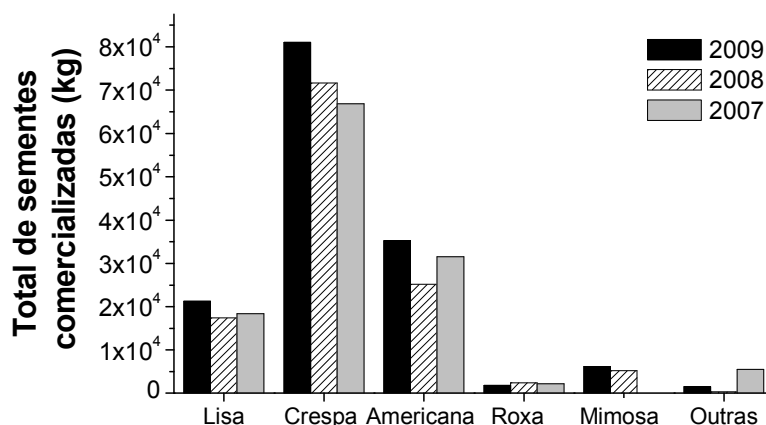


Figura 1: Total de sementes comercializadas no Brasil, no período de 2007 a 2009, compreendendo sementes nuas e peletizadas, de acordo com a ABCSEM¹².

Em relação às modalidades de produção de alface no Brasil, destaca-se o plantio convencional em campo aberto (solo) e os sistemas de hidroponia¹³. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o cultivo em solo é o mais comum no país, em termos de área cultivada e de quantidade de produção, sendo a hortaliça plantada diretamente no solo. O cultivo hidropônico¹⁴, por sua vez, consiste no plantio de sementes no interior de estufas fechadas, utilizando-se calhas ou tubos plásticos, que contêm soluções nutritivas que irrigam as raízes das plantas e fornecem os nutrientes essenciais para o desenvolvimento das hortaliças. Nesse tipo de cultivo, a alface não é afetada pelos fatores adversos do meio ambiente, como ocorre no solo, ficando protegida de geadas, chuvas intensas, ventos fortes, entre outros, havendo ganhos na qualidade do produto¹⁵. Além disso, o cultivo por hidroponia apresenta outras vantagens em relação ao plantio em solo, como o emprego de menores volumes de água e o uso de menor área para o plantio. No entanto, é uma modalidade de cultivo de maior custo, quando comparada à produção em solo.

Em relação ao uso de agrotóxicos, através do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, realizado pelo PARA, da ANVISA, em 2009 a alface apresentou irregularidade em 38,4% das 138 amostras analisadas em diferentes

estados brasileiros, enquanto que no ano de 2010 houve um aumento no percentual de irregularidades para 54,2% das 131 amostras analisadas, sendo a alface, dentre as outras 18 culturas avaliadas, a quarta a apresentar maior porcentagem de irregularidades, com a presença de agrotóxicos permitidos em limites acima do recomendável e/ou substâncias não autorizadas para o produto. Em 2011, de acordo com os dados do PARA, a alface continuou a apresentar irregularidades em relação à presença de agrotóxicos, porém se observou um decréscimo na porcentagem de amostras insatisfatórias, havendo redução de 54,2% para 43%, no período de 2010 a 2011.

No relatório do PARA 2009, em 37,7% das amostras analisadas observou-se a presença de ingredientes ativos não autorizados para a cultura, enquanto que em apenas uma amostra se detectou a presença de agrotóxicos acima do LMR estabelecido pela ANVISA. Já no PARA 2010, observou-se a presença de ingredientes ativos não autorizados em 51,9% das amostras analisadas, e outras 3 amostras estavam contaminadas com agrotóxicos permitidos acima do LMR. Esse mesmo comportamento foi observado nas amostras analisadas pelo PARA em 2011, nas quais 41% das amostras continham ingredientes ativos não autorizados, enquanto que em três amostras, das 134 analisadas, foram detectados agrotóxicos acima dos limites estabelecidos.

Assim, se torna importante o desenvolvimento de um método analítico para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em alface, para melhor controle da qualidade de sua produção, não afetando o meio ambiente e a saúde humana e animal.

1.2.1 Principais doenças da alface e agrotóxicos empregados em seu controle

As alfaces de qualidade comercial superiores têm como principais atributos a boa formação das plantas e a ausência de danos, sejam eles físicos ou provocados por insetos-pragas e fitopatógenos. Por isso, com a finalidade de preservar a aparência das folhas por ocasião da colheita e garantir o valor comercial, o produtor agrícola aplica agrotóxicos para controlar patógenos e insetos, prevenindo-as contra os danos que estes podem gerar¹⁶.

De acordo com a Embrapa, foram relatadas mais de 75 doenças da alface no mundo, sendo causadas por micro-organismos parasitas, tais como bactérias, fungos, nematóides e vírus. As principais doenças da alface, cujo controle é realizado por agrotóxicos, estão descritas a seguir¹⁷.

A Tabela 2 apresenta os produtos fitossanitários registrados no MAPA e autorizados para serem empregados no controle de doenças da alface e de insetos-vetores de vírus¹⁶.

Tabela 2: Produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de doenças da alface e de insetos-vetores de vírus.

Doença	Patógeno	Princípios Ativos
Tombamento	<i>Rhizoctonia solani</i>	Penciclurom
Mildio	<i>Bremia lactucae</i>	Fenamidona e mandipropamida
Septoríose	<i>Septoria lactucae</i>	Azoxistrobina e difenoconazol
Podridão-de-esclerotínia	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Procimidona e iprodiona
Insetos-vetores	Nome Científico	Princípios Ativos
Pulgão-verde	<i>Myzus persicae</i>	Imidacloprido, tiacloprido, clotianidina, tiametoxam e azadiractina
Tripos	<i>Frankliniella schulzei</i>	Imidacloprido
Lagarta-rosca	<i>Agrotis ipsilon</i>	Beta-ciflutrina
Mosca-branca	<i>Bemisia tabaci</i> raça B	Imidacloprido
Pulgão-da-alface	<i>Dactynotus sonchi</i>	Imidacloprido
Tripos do fumo	<i>Thrips tabaci</i>	Imidacloprido e tiacloprido

1.2.1.1 Tombamento

É uma doença causada por fungos, atingindo a raiz e o caule da alface, uma vez que está associada com o solo encharcado por irrigação excessiva ou chuvas frequentes ou solo argiloso e mal preparado. Seu principal sintoma é a destruição do tecido da planta, podendo haver seu apodrecimento antes mesmo de sua emergência do solo, comprometendo a produção de mudas. É uma doença de ocorrência bastante provável em alfaces produzidas em solos, sendo rara em alfaces hidropônicas. A Figura 2 mostra o aspecto desta hortaliça quando atingida por esta doença¹⁶.



Figura 2: Representações de mudas de alface atingidas pela doença do tombamento¹⁶.

1.2.1.2 Podridão-de-esclerotínea

É uma doença de raiz e caule, muito comum em cultivos conduzidos em ambientes frios e úmidos, sendo que o patógeno se estabelece no campo. Os sintomas aparecem em plantas adultas, sendo que as folhas mais velhas, em contato com o solo, são afetadas, murchando e apresentando podridão mole, transmitindo a doença para toda a planta. A Figura 3 mostra o aspecto da alface quando atingida por esta doença¹⁶.



Figura 3: Representações de alfaces atingidas pela doença da podridão-de-esclerotínea¹⁶.

1.2.1.3 Míldio

É uma das principais doenças da alface, sendo frequente tanto no solo como em cultivo hidropônico. É uma doença causada por fungos e atinge a parte aérea da alface, provocando manchas amareladas nas folhagens. Esta doença é predominante em localidades de baixa temperatura e com elevado teor de umidade. A Figura 4 mostra o aspecto da alface quando atingida por esta doença^{16,17}.



Figura 4: Representações de alfaces atingidas pela doença do míldio^{16,17}.

1.2.1.4 Septoriose

É uma doença causada por fungos, que atinge a parte aérea da planta, de ocorrência comum em épocas chuvosas, sendo rara em regiões de temperatura elevada, como Norte e Nordeste do Brasil. A doença normalmente se inicia com a semente infectada ou com o inóculo vindo de cultivos antigos, sendo que os primeiros sintomas são observados nas folhas mais velhas. A Figura 5 mostra o aspecto desta hortaliça quando atingida por esta doença¹⁶.



Figura 5: Representações das folhas de alface atingidas pela doença da septoriose¹⁶.

1.3 Métodos para determinação multirresíduos de agrotóxicos

Diferentes métodos analíticos são utilizados para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, sendo cada metodologia definida de acordo com a natureza dos agrotóxicos a serem analisados e com a matriz de análise. Idealmente, busca-se desenvolver métodos que sejam rápidos, sensíveis e seletivos, a fim de se determinar com maior exatidão e rapidez os agrotóxicos, conferindo maior segurança alimentar à população, amenizando os impactos ambientais decorrentes de sua utilização e favorecendo, também, a exportação mundial dos produtos agrícolas¹⁸.

Tipicamente, os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos consistem em uma etapa de preparo da amostra, na qual se realiza a homogeneização da amostra, a extração dos analitos da matriz, a limpeza do extrato (para remoção dos interferentes) e a concentração dos analitos (quando necessário); seguida da etapa de determinação qualitativa e quantitativa dos analitos, empregando uma técnica instrumental de análise^{19,20}.

1.3.1 Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos em alimentos

Para a determinação de agrotóxicos em alimentos, primeiramente é necessário realizar um tratamento das amostras antes de submetê-las à análise instrumental, a fim de remover possíveis interferentes da matriz, que podem afetar a identificação e quantificação do analito, e de concentrar os analitos, uma vez que os compostos de interesse geralmente se encontram em baixas concentrações na matriz²¹.

A primeira técnica de preparo de amostra empregada na extração multirresíduo de agrotóxicos foi desenvolvida na década de 60, por Mills *et al.*²², com o objetivo de extrair compostos organoclorados apolares de amostras de alimentos não gordurosos.

A técnica baseia-se em uma extração com acetonitrila, seguida da adição de água ao extrato orgânico e, posteriormente, a realização de uma etapa de partição, promovida através da adição de solventes apolares (éter de petróleo ou hexano), a fim de remover os componentes polares da matriz, como água, açúcares e sais, caracterizando uma etapa de limpeza da amostra^{23,24}.

No entanto, o desenvolvimento e aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como por exemplo, organofosforados e organonitrogenados, demandou novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos²³. Em 1975, Luke *et al.*²⁵ desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração de 100 g de amostra com acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano, 100 mL cada) e adição de cloreto de sódio na fase aquosa, a fim de favorecer a transferência dos analitos para a fase orgânica, aumentando-se a porcentagem de recuperação para os compostos polares. Além disso, para a remoção de água residual presente na fase orgânica, foi adicionado sulfato de sódio anidro²⁴.

Nas décadas de 80 e 90, o Ministério da Saúde da Holanda 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. O método consiste na extração de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando-se acetona (30 mL) seguida de agitação em homogeneizador por 30 segundos, sendo posteriormente adicionados éter de petróleo (30 mL) e diclorometano (30 mL), agitando-se novamente por cerca de 30 segundos. Para a remoção de água da fase orgânica e aumento da recuperação dos analitos polares, sulfato de sódio anidro é adicionado, promovendo o efeito *salting-out*²³. A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados, obtendo-se valores de recuperação elevados.

Por sua vez, na década de 90, ocorreu um grande desenvolvimento de métodos alternativos de extração baseados na redução do volume de solvente utilizado na etapa de extração, devido à emergência do conceito de Química Verde. Entre esses novos métodos, as técnicas mais comumente utilizadas para a extração de agrotóxicos em

frutas e verduras são a extração em fase sólida²⁶, a microextração em fase sólida^{27,28,29}, a dispersão da matriz em fase sólida^{30,31} e a extração por micro-ondas^{20,32}.

Mais recentemente, entre os anos de 2000 e 2002, Anastassiades *et al.*³³ desenvolveram um novo procedimento de preparo de amostra, para a extração multirresíduos de agrotóxicos, denominado QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*), empregando-se misturas de frutas e vegetais em seu estudo. Publicado pela primeira vez em 2003³³, esse método permite a realização das etapas de extração e limpeza do extrato, tendo como vantagens o fato de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Também, é um método que utiliza pouca quantidade de solventes e reagentes, sendo atualmente empregado por órgãos oficiais internacionais, como a *Association of Official Analytical Chemists* e o *European Committee for Standardization*, para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos³⁴.

1.3.1.1 O método de extração QuEChERS

O método QuEChERS original, publicado por Anastassiades *et al.*^{33,35}, constitui-se por uma etapa inicial de extração da amostra com acetonitrila, empregando 10 g de amostra e 10 mL de solvente (proporção 1:1 v/v), seguida de uma segunda etapa de extração realizada após a adição de uma mistura de sais, consistindo de 4 gramas de sulfato de magnésio anidro e 1 grama de cloreto de sódio, com o intuito de induzir o particionamento entre a acetonitrila e a água, proveniente da amostra, ocorrendo o efeito *salting-out*, ou seja, a diminuição da solubilidade do analito na fase aquosa, e a remoção de água do meio. A agitação em vórtex por 1 minuto é empregada após cada etapa de extração, seguida por centrifugação após a etapa de particionamento.

Posteriormente, uma alíquota do extrato bruto é submetida à etapa de limpeza (*clean-up*) por extração em fase sólida dispersiva (EFS-D), empregando-se uma mistura de amina primária-secundária (PSA, do inglês, *Primary Secondary Amine*, 25 mg por mililitros de extrato) e sulfato de magnésio (150 mg por mililitros de extrato), cujo objetivo é remover os componentes polares da matriz, como ácidos orgânicos, pigmentos e açúcares^{34,35}. Após agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação das amostras, o extrato final é então submetido à análise instrumental.

O método QuEChERS possui inúmeras vantagens em comparação com outras técnicas empregadas na análise de resíduos de agrotóxicos (por exemplo, método de Luke, mini-Luke, extração em fase sólida), como: obtenção de maiores porcentagens de recuperação (maior que 85%) para agrotóxicos de diferentes polaridades e volatilidades; resultados mais precisos e exatos; utilização de menores quantidades de solvente e geração de menos resíduos; e a utilização de equipamentos simples e de baixo custo, como o vórtex, a centrífuga e a balança analítica, além de ser um método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, como seu próprio nome sugere³⁶.

A principal desvantagem da extração por QuEChERS, em comparação com as técnicas de preparo de amostra mais tradicionais, é a baixa relação entre a quantidade de amostra e a de solvente utilizadas. No caso, essa relação, obtida por QuEChERS é de 1 g/mL, enquanto que nas demais técnicas, obtém-se de 2-5 g/mL^{36,37}. No entanto, esta desvantagem pode ser contornada através da inserção de etapas de concentração durante o procedimento de extração.

A versão original do método QuEChERS apresenta excelentes resultados para diferentes tipos de amostras, porém, algumas aplicações mostram que certos compostos possuem problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz. Dessa forma, inúmeras modificações deste método têm sido estudadas mundialmente por diferentes pesquisadores, utilizando tampões de pH (faixa de 4 a 6) e realizando outros ajustes na metodologia originalmente proposta, a fim de promover recuperações satisfatórias para todos os compostos, principalmente aqueles dependentes do pH.

A realização de modificações no preparo de amostras por QuEChERS é totalmente viável, pois este método possui grande escopo analítico, permitindo a análise de agrotóxicos de diferentes classes químicas simultaneamente (altamente polares, básicos e ácidos), em matrizes de diferentes naturezas, como matrizes ricas em gorduras, com baixo ou alto teor de água, entre outras, sendo necessários apenas alguns ajustes no método original.

O método QuEChERS original pode ser modificado através da alteração de alguns fatores, como o solvente extrator (acetonitrila, acetona, acetato de etila), os tipos de sais utilizados na etapa de particionamento ($MgSO_4$ e NaCl, tampão acetato, citrato,

entre outros) e suas quantidades, o modo e o tempo de agitação, a massa de amostra utilizada e o tipo de sorvente empregado na EFS-D havendo adição ou não de C18 (usado para remoção de lipídeos e similares) e/ou de carbono grafitizado (GCB, do inglês *Graphitized Carbon Black*, utilizado para remoção de clorofila e carotenóides), dependendo-se da natureza da matriz, com o objetivo de otimizar a etapa de preparo da amostra e remover a maior quantidade de interferentes da matriz analisada.

A Tabela 3 apresenta algumas variações do método QuEChERS original, que são as mais empregadas na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Geralmente, a quantidade de amostra analisada por este método é de 10 a 15 gramas de amostra.

Tabela 3: Variações comuns do método QuEChERS, abrangendo o tipo de solvente extrator, os tipos de sais da etapa de particionamento e os sorventes utilizados na limpeza da amostra.

Tipo de Método	Solvente Extrator	Tipo de sal da etapa de particionamento	Limpeza da amostra (EFS-D)
Original ³³	Acetonitrila	- MgSO ₄ anidro (0,4 g/mL amostra) - NaCl anidro (0,1 g/mL amostra)	- PSA (25 mg/mL extrato) - MgSO ₄ anidro (150 mg/mL extrato)
Tampão acetato ^{38,39}	Acetonitrila com 1% de ácido acético glacial	- MgSO ₄ anidro (0,4 g/mL amostra) - Acetato de sódio anidro (0,1 g/mL amostra)	- PSA (50 mg/mL extrato) - MgSO ₄ anidro (150 mg/mL extrato) - C18* (50 mg/mL extrato) - Carbono grafitizado* (7,5 mg/mL extrato)
Tampão citrato ^{40,41}	Acetonitrila	- MgSO ₄ anidro (0,4 g/mL amostra) - NaCl anidro (0,1 g/mL amostra) - Citrato trissódico diidratado (0,1 g/mL amostra) - Hidrogenocitrato dissódico sesquiidratado (0,05 g/mL amostra)	- PSA (25 mg/mL extrato) - MgSO ₄ anidro (150 mg/mL extrato) - C18 (uso opcional)* (25 mg/mL extrato) - Carbono grafitizado (uso opcional)*

*a utilização ou não deste sorvente depende da matriz em análise.

1.3.1.1.1 O solvente extrator

A seleção do solvente extrator é uma importante etapa no desenvolvimento de um método de extração multirresíduos²⁰. O solvente utilizado deve ser capaz de extrair agrotóxicos de diferentes polaridades, ser seletivo, compatível com as técnicas cromatográficas e apresentar baixo custo e toxicidade.

Os solventes mais utilizados para extração de agrotóxicos através do método QuEChERS são o acetato de etila, a acetona e a acetonitrila.

O acetato de etila é um solvente parcialmente miscível em água e possui a capacidade de extrair agrotóxicos de diferentes polaridades, porém não fornece elevadas porcentagens de recuperação para analitos com caráter básico ($pK_a > 4$), devido aos problemas de degradação.

A acetona e a acetonitrila, por sua vez, são miscíveis em água e promovem a extração em fase única quando em contato com a matriz (a adição de sais ao extrato faz com que ocorra a separação entre as fases). O uso da acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos, e proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades²³, além de ser altamente compatível com a cromatografia líquida, diferentemente do acetato de etila e da acetona.

1.3.1.1.2 Os sais extratores

A adição de sais para promover o efeito *salting-out* é empregada em diferentes métodos multirresíduos de agrotóxicos, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica.

A utilização de sais secantes, como o sulfato de magnésio, faz com que haja remoção de água da fase orgânica, além de haver o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C, pelo fato de sua hidratação ser uma reação exotérmica, favorecendo a extração dos compostos, principalmente os menos polares²⁴.

O emprego de tampões salinos também pode ser realizado como, por exemplo, o uso de tampões acetato e citrato, evitando a degradação de compostos sensíveis a mudanças de pH e proporcionando um aumento na porcentagem de recuperação desses analitos²⁰.

1.3.1.1.3 Extração em fase sólida dispersiva (EFS-D)

A EFS-D é uma técnica empregada na limpeza de extratos de amostras, proposta por Anastassiades *et al.*³³, juntamente com o método QuEChERS.

O princípio básico dessa técnica é a agitação do extrato da amostra com o sorvente (sal) de limpeza, geralmente na proporção de 25 mg para 1 mL de extrato, com

o objetivo de distribuir uniformemente o sorvente, facilitando o processo de limpeza. O sorvente é então separado por centrifugação e o extrato orgânico é submetido à análise cromatográfica. Desta forma, o sal de limpeza atua como um filtro químico, retendo alguns componentes da matriz, que podem interferir na análise cromatográfica⁴².

Uma grande vantagem dessa técnica é a possibilidade de utilizar diferentes misturas de sorventes, dependendo da natureza dos analitos e do tipo de matriz estudada. Simultaneamente à limpeza da amostra, pode-se realizar a remoção de água residual do extrato, adicionando-se, por exemplo, sulfato de magnésio, juntamente com os sorventes de limpeza. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares.

Os sorventes mais utilizados na EFS-D são o etilenodiamino-N-propil, que é uma amina primária e secundária (PSA); o octadecilsilano (C18) e o carbono grafitizado.

O PSA atua como um trocador aniônico, podendo interagir com alguns componentes da matriz através de ligações de hidrogênio e/ou dipolo-dipolo. A retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito intensa, mas não é eficiente para a remoção de gorduras⁴².

O sorvente octadecilsilano (C18) promove uma limpeza mais efetiva de matrizes que possuem elevado teor de gorduras (acima de 2%), pois remove eficientemente interferentes apolares, como as substâncias graxas e lipídios⁶.

O carbono grafitizado (GCB) é bastante utilizado para a redução do teor de pigmentos (por exemplo, clorofila e carotenóides) e de esteróis em extratos provenientes de amostras vegetais. O GCB possui elevada área superficial e contém grupos altamente polares em sua superfície, com elevado potencial para a formação de ligações de hidrogênio. Em virtude disso, ocorre forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura, resultando em baixas recuperações para esses compostos⁴².

1.3.1.1.4 Modificações no método QuEChERS

Em virtude de algumas desvantagens operacionais do método QuEChERS, como a presença de algumas etapas manuais, como o uso de vórtex, que não permite a extração simultânea de várias amostras, e a transferência de alíquotas dos extratos

para diferentes tubos, além da grande quantidade de vidrarias utilizadas, algumas modificações podem ser realizadas no procedimento QuEChERS para seu aprimoramento e a redução ainda maior do número das etapas de extração e do tempo total da etapa de preparo de amostra.

A fim de reduzir algumas etapas de agitação por vórtex e centrifugação, ponteiras do tipo descartáveis (internacionalmente conhecidas como DPX – *Disposable Pipette Extraction*) podem ser empregadas na etapa de limpeza da amostra.

Esses dispositivos consistem em ponteiras para pipetas volumétricas automáticas, contendo um sorvente disperso em seu interior, apenas retido por filtros nas duas extremidades da ponteira. O seu emprego é vantajoso, pois há um rápido equilíbrio entre a fase sorvente e a amostra a ser purificada e a extração ou limpeza da amostra pode ser realizada rapidamente, através de ciclos de aspirar e dispensar a amostra. Com o uso dessas pipetas na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS, há redução de etapas de agitação e centrifugação, sendo que a limpeza ocorre diretamente na ponteira e o extrato final obtido pode ser injetado diretamente no sistema cromatográfico. A Figura 6⁴³ esquematiza o princípio de funcionamento desses dispositivos.

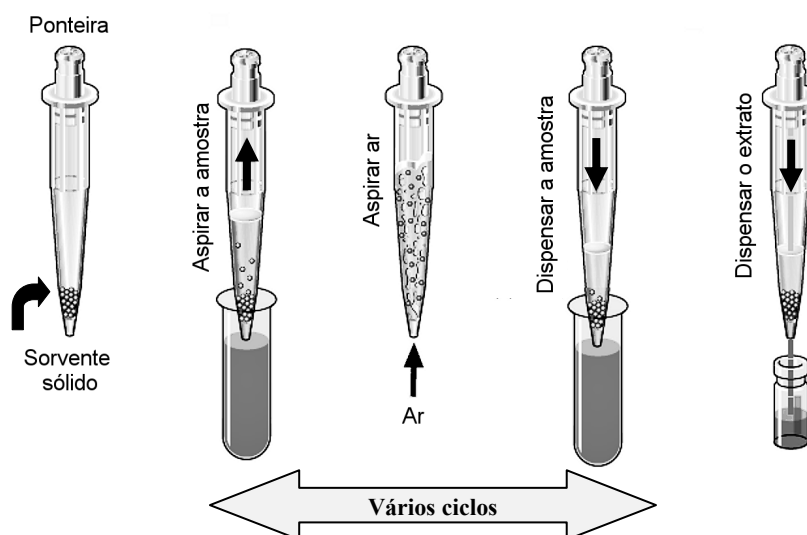


Figura 6: Representação esquemática do funcionamento das ponteiras descartáveis contendo sorventes sólidos, para emprego na etapa de limpeza do método QuEChERS⁴³.

Outra modificação possível para o método QuEChERS é o emprego da radiação micro-ondas para realização simultânea das etapas de extração em solvente e

particionamento com sais, havendo uma redução no número de etapas de extração, reduzindo o tempo total do preparo de amostra.

A técnica de extração assistida por micro-ondas vem sendo estudada como uma alternativa na extração de amostras sólidas para a determinação de agrotóxicos, uma vez que o tempo de análise é curto, há baixo consumo de solventes e é possível extrair várias amostras simultaneamente, além de possibilitar alta eficiência de extração²⁰.

Basicamente, a extração por micro-ondas utiliza a radiação eletromagnética para a dessorção dos analitos de suas matrizes, transferindo-os para um solvente polar. A radiação não ionizante causa o aquecimento da amostra através da migração dos íons e da rotação das moléculas com momentos de dipolo. Dessa forma, a temperatura, o tempo de extração e o tipo de solvente extrator são parâmetros importantes que influenciam na eficiência da extração por micro-ondas⁴⁴.

Embora a radiação micro-ondas não modifique a estrutura molecular dos compostos, facilmente pode ocorrer aquecimento localizado, principalmente quando se trabalha com temperaturas elevadas e longos tempos de extração, provocando a degradação dos analitos e gerando baixas porcentagens de recuperação.

Outra desvantagem do uso das micro-ondas é a ocorrência da extração de componentes da matriz, juntamente com os analitos, sendo necessário submeter as amostras a uma etapa adicional de limpeza, antes de conduzi-las à análise instrumental⁴⁵. Além disso, para compostos apolares, geralmente obtém-se baixa eficiência de extração, devido à ausência de dipolos nas moléculas.

Em virtude de seus atrativos, torna-se interessante realizar estudos da aplicação das micro-ondas para otimização da etapa de preparo de amostra, para a determinação de agrotóxicos em alimentos.

1.3.2 Técnicas analíticas para determinação multirresíduos de agrotóxicos

As determinações de resíduos de agrotóxicos em alimentos são difíceis de serem realizadas, uma vez que os analitos, na maioria das vezes, pertencem a diferentes grupos químicos e se encontram em concentrações menores que os compostos interferentes da matriz. Mesmo diante dessas dificuldades, muitas análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são realizadas mundialmente, com o objetivo de garantir

que o alimento produzido atenda às exigências da legislação, assegurando a qualidade de vida dos seres humanos e animais.

Nesse contexto, torna-se necessário o emprego de técnicas analíticas que permitam a identificação, confirmação e quantificação dos resíduos em baixos níveis de concentração e de forma seletiva. Atualmente, as principais técnicas analíticas utilizadas na determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos são as técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa - CG e a cromatografia líquida - CL), que são empregadas dependendo da natureza da amostra a ser analisada e da polaridade, volatilidade e estabilidade química dos analitos⁴⁶. Essas técnicas se destacam em função de sua eficiência em efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra, além de fornecer resultados seletivos e sensíveis, dependendo-se do detector utilizado e da técnica de preparo de amostra.

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem se mostrado uma ferramenta poderosa na determinação de resíduos de agrotóxicos, principalmente os mais polares, termicamente lábeis e não voláteis⁴⁷ (não detectáveis por cromatografia gasosa, sem a etapa de derivatização), uma vez que possui excelente detectabilidade e seletividade; é capaz de discriminar o analito do sinal da matriz mais eficientemente que a CG; e torna possível a determinação de compostos de diferentes classes químicas simultaneamente. Além disso, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) é uma técnica recente e apropriada para a análise de resíduos de agrotóxicos, uma vez que a CL é efetiva na separação dos analitos, enquanto que a espectrometria de massas permite a confirmação e quantificação dos analitos, em concentrações da ordem de µg/L ou até ng/L, mesmo na presença de interferentes da matriz^{48,49}.

1.3.2.1 Cromatografia líquida

A cromatografia líquida (CL) é uma técnica físico-química de separação amplamente utilizada para fins qualitativos e quantitativos, na qual os componentes de uma mistura são separados, através de suas distribuições entre duas fases: uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel líquida (FM) que flui através da FE, com o auxílio de bombas de alta pressão^{50,51}.

Dentre as técnicas de separação baseadas na cromatografia líquida, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que se fundamentam nos mesmos princípios, mas se diferem em termos de instrumentação e tecnologia.

A CLAE tem sido empregada em diferentes áreas de pesquisa, como química ambiental, alimentos, fármacos, entre outras, destacando-se pelo fato de possibilitar a separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis, fornecendo resultados em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade⁵⁰. Para a realização das separações, a CLAE emprega colunas cromatográficas recheadas com partículas porosas de diferentes naturezas, com comprimentos de 10-30 cm e diâmetro interno na faixa de 2-6 mm^{50,52}. Nos últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica, como o desenvolvimento de novas fases estacionárias e avanços na instrumentação, permitindo que análises mais rápidas e seletivas sejam realizadas⁵³.

A CLUE desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de fase estacionária porosas de tamanho inferior a 2 µm, a fim de se alcançar análises mais rápidas e eficientes que as obtidas através do emprego da CLAE, que utiliza fases estacionárias com tamanhos de partícula na faixa de 3 a 10 µm. Além disso, as colunas empregadas em CLUE são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), fazendo com que maiores velocidades lineares de fase móvel possam ser alcançadas, aumentando-se a resolução e a detectabilidade dos analitos e, conseqüentemente, diminuindo o tempo e custo das análises. No entanto, para se alcançar esse desempenho cromatográfico, equipamentos mais adequados são necessários, capazes de operar a pressões mais elevadas (aproximadamente 6000-15000 psi) que a CLAE, que opera em torno de 1400-5000 psi^{53,54}.

Diante das inovações da CLUE, muitas indústrias e centros de pesquisas se interessaram pela técnica, mas encontraram obstáculos para a sua implementação, uma vez que os métodos de CLAE já estavam consolidados e protocolados. Nesse contexto, Veuthey *et al.*^{55,56} estudaram a transferência de métodos de CLAE para CLUE, sendo passível de ser realizada empregando-se relações matemáticas que consideram os seguintes parâmetros cromatográficos: volume de injeção, vazão da fase móvel, o tempo total da análise e os tempos das etapas isocrática e/ou gradiente da

separação cromatográfica. Além disso, para a transferência do método ser eficiente, a fase estacionária empregada deve ser similar à do método já existente. As Equações 1 e 2 mostram, respectivamente, como são calculados o volume de injeção e a vazão da fase móvel, na transferência de um método de CLAE para CLUE^{55,56}.

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (1)$$

sendo:

V_{inj2} : volume de injeção a ser determinado; V_{inj1} : volume de injeção do método desenvolvido; d_{c2} : diâmetro interno da coluna a ser empregada; d_{c1} : diâmetro interno da coluna empregada no método desenvolvido; L_2 : comprimento da coluna a ser empregada e L_1 : comprimento da coluna empregada no método desenvolvido.

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \quad (2)$$

sendo:

F_2 : vazão da fase móvel a ser determinada e F_1 : vazão da fase móvel do método desenvolvido.

Na transferência de um método de separação no qual foi empregada eluição por gradiente, o principal fator a ser considerado é o tempo de residência da fase móvel no sistema cromatográfico. O tempo de residência da fase móvel é expresso em termos de volumes de coluna, que deve ser o mesmo nos dois sistemas cromatográficos (CLAE e CLUE), a fim de que o perfil dos picos cromatográficos sejam os mesmos nos dois sistemas. A Equação 3 apresenta o modo como o volume de coluna é calculado.

$$\text{Volumes de coluna} = \frac{\text{Vazão fase móvel} \cdot \text{tempo do gradiente}}{\text{Volume da coluna cromatográfica}} \quad (3)$$

Por sua vez, o volume da coluna cromatográfica é calculado pela Equação 4.

$$\text{Volume da coluna cromatográfica} = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (4)$$

sendo:

r: raio interno da coluna cromatográfica e L: comprimento da coluna cromatográfica.

Mantendo-se o volume de coluna constante para transferência do método de CLAE para CLUE, o tempo de cada etapa do gradiente é determinado através da Equação 5.

$$t_2 = t_1 \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (5)$$

sendo:

t₁: tempo da etapa do gradiente do método desenvolvido e t₂: tempo da etapa do gradiente do método a ser determinado.

Atualmente, existem softwares disponíveis no mercado que realizam a transferência de métodos desenvolvidos por CLAE para CLUE, e vice-versa, destacando-se o *ACQUITY UPLC Columns Calculator*, software comercializado pela empresa Waters[®], que considera todos os parâmetros da coluna cromatográfica e da fase móvel para realizar a conversão de um método analítico.

Superado o obstáculo de transferência de métodos, a técnica de CLUE tem se tornado uma tendência mundial, uma vez que há um aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos e redução de custos e tempo de análise. Por sua vez, a combinação da CLUE com a espectrometria de massas fornece vantagens ainda mais significativas, em relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise⁵⁷.

1.3.2.2 Espectrometria de massas

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)^{58,59}, a espectrometria de massas (EM) é definida como o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização pela massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas, empregando espectrômetros de massas que, por sua vez, são instrumentos que medem as relações massa/carga (*m/z*) e a abundância dos íons na fase gasosa.

Devido ao elevado grau informativo das análises, a EM pode ser utilizada qualitativamente, para a identificação de composição elementar e elucidação estrutural, e para análises quantitativas, na qual se objetiva determinar analitos em matrizes complexas, geralmente presentes em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g/mL}$ a ng/mL .

Basicamente, o espectrômetro de massas é constituído por um sistema de introdução de amostras, por exemplo cromatógrafos; uma fonte de ionização, onde são produzidos íons na fase gasosa; um analisador de massas, que identifica as espécies químicas de acordo com suas relações massa/carga (m/z); e um detector, geralmente constituído por um multiplicador de elétrons. Atualmente, existem diferentes configurações de espectrômetros de massas disponíveis no mercado, constituídos por diferentes fontes de ionização e analisadores, a fim de englobar diferentes áreas de aplicação, como as ciências químicas, biológicas e médicas. A escolha de uma configuração frente à outra depende da natureza da amostra a ser analisada e da polaridade, volatilidade e estabilidade química dos analitos⁴⁶.

A espectrometria de massas também pode ser acoplada à EM, caracterizando a técnica de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma relação massa/carga, utiliza dois estágios de espectrometria de massas, em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é empregado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida.

Atualmente, para a análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, a configuração mais empregada é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM), com ionização por *eletrospray* e analisador triplo quadrupolo, uma vez que é seletivo, possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência de compostos presentes na matriz⁶⁰.

Na ionização por *eletrospray*, representada esquematicamente na Figura 7⁶¹, a solução na qual o analito de interesse se encontra dissolvido (por exemplo, a fase móvel) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar, são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que

são dessolvatadas devido à ação de um gás nebulizador (geralmente nitrogênio). À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre o processo de “explosão coulômbica”, gerando gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização⁶².

Durante a ionização por *eletrospray*, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares (M^+ ou M^-), moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) e moléculas cationizadas ou anionizadas (por exemplo, $[M+Na]^+$ ou $[M+Cl]^-$), sendo M a massa monoisotópica do analito de interesse⁶³. O modo de operação positivo ou negativo é estabelecido pelos modificadores adicionados à FM, como por exemplo, um ácido orgânico (modo positivo), geralmente ácido fórmico, ou uma base orgânica (modo negativo). Uma das grandes vantagens do *eletrospray* é o fato da ionização ocorrer em solução, de forma branda, possibilitando que compostos sensíveis à temperatura possam ser ionizados sem ocorrer degradação.

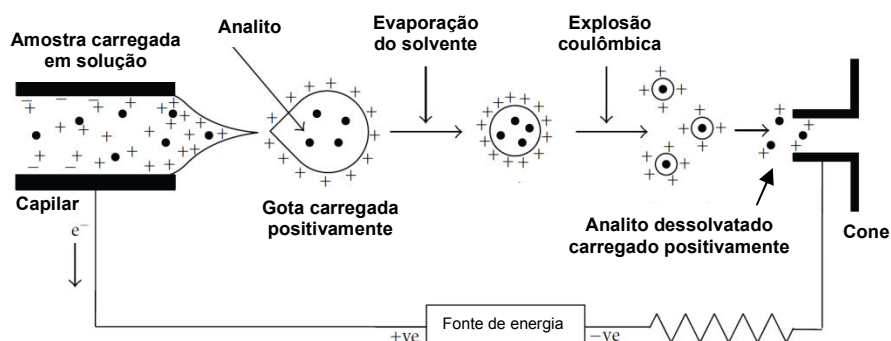


Figura 7: Representação esquemática da ionização por *eletrospray*, operando no modo positivo⁶¹.

Por sua vez, o analisador triplo quadrupolo, empregado em EM/EM e representado esquematicamente na Figura 8, é constituído por três quadrupolos em série, sendo dois quadrupolos de transmissão (utilizados para separar íons de mesma relação massa/carga) interligados por um quadrupolo que atua como cela de colisão, no

qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC), e é também empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

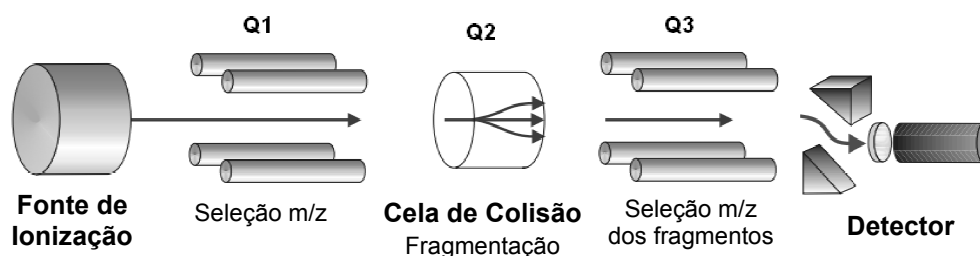


Figura 8: Representação esquemática do analisador triplo quadrupolo, operando no modo MRM (monitoramento de reações múltiplas), sendo Q1 e Q3 quadrupolos de transmissão e Q2 um quadrupolo que atua como cela de colisão⁶⁴.

Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente argônio ou hélio), induzindo um aumento na energia potencial do íon até ocasionar sua fragmentação, com consequente formação de íons produtos.

Na EM/EM podem ser realizadas várias técnicas de varredura, dentre as quais se destaca o monitoramento de reações múltiplas (MRM), modo no qual é possível obter elevada detectabilidade, favorecendo sua aplicação na análise de agrotóxicos em alimentos. No analisador, o íon de interesse é pré-selecionado, fragmentando na câmara de colisão por um potencial elétrico, e, por fim, os fragmentos são analisados no terceiro quadrupolo⁶⁰. O fragmento de maior intensidade é empregado na quantificação do analito, enquanto o segundo fragmento de maior intensidade é utilizado para confirmação da identidade do analito.

1.3.2.3 O uso da CL-EM/EM na determinação de agrotóxicos em alface

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial tem sido bastante empregada na determinação de agrotóxicos em alface, conforme alguns trabalhos relatados na literatura, descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Levantamento bibliográfico de métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em alface por CL-EM/EM, nos últimos anos.

Agrotóxicos	Técnica de preparo de amostra	Técnica analítica	LQ ^a (µg/kg)	Recup. ^b (%)	CV ^c (%)	Ano ^d
Multirresíduos (80 agrotóxicos)	QuEChERS acetato	CLAE-EM/EM	3-360	70-120	< 20	2014 ⁴⁹
Tiofanato metílico e três metabólitos	QuEChERS original	CLAE-EM/EM	2-10	68-113	1-9	2013 ⁶⁵
Metalaxil e fluazifop-P-butil	QuEChERS original	CLAE-EM/EM	2-10	94-112	1-9	2013 ⁶⁶
6 piretrinas	Extração com solventes (acetona/água)	CLAE-EM/EM	0,3-5,3	72-97	1-9	2013 ⁶⁷
5 pirazoles	QuEChERS original	CLUE-EM/EM	0,3-1,8	71-101	2-17	2012 ⁶⁸
1 carbamato	Extração com MgSO ₄ , EDTA ^e e acetonitrila a baixas temperatura	CLAE-EM/EM	0,6	97-106	3-5	2012 ⁶⁹
Multirresíduos (29 agrotóxicos)	QuEChERS citrato	CLUE-EM/EM	5	76-109	1-19	2012 ⁵⁷

^aLQ: limite de quantificação do método. ^bRecup.: porcentagem de recuperação. ^cCV: coeficiente de variação. ^dAno: ano referente à publicação e referência do artigo. ^eEDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

Como se pode observar na Tabela 4, o método QuEChERS original tem se destacado como técnica de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos em alface. No entanto, os métodos descritos não foram otimizados apenas para a extração de agrotóxicos em alface, uma vez que outras matrizes foram estudadas simultaneamente, em todos os trabalhos descritos. Diante disso, torna-se clara a necessidade do estudo de modificações desse método de preparo de amostra para a matriz alface, tanto na etapa de extração quanto na de limpeza da amostra, a fim de se obterem extratos límpidos e isentos de interferentes, minimizando a injeção de contaminantes no sistema cromatográfico, que podem afetar a detecção dos analitos.

Também, de acordo com a Tabela 4, observa-se que os métodos descritos forneceram elevadas porcentagens de recuperação, resultados precisos e baixos limites de quantificação. No entanto, a maioria dos métodos foram desenvolvidos para a análise de apenas um grupo químico desses compostos, existindo ainda poucos relatos na literatura de métodos multirresíduos de agrotóxicos, evidenciando a necessidade de maiores estudos nessa área, desenvolvendo métodos que identifiquem e quantifiquem simultaneamente compostos de diferentes classes químicas.

Em relação à determinação analítica, há poucos relatos na literatura sobre a aplicação da CLUE-EM/EM na análise de resíduos de agrotóxicos em alface, assim

como estudos comparativos dessa técnica com a CLAE-EM/EM, principalmente devido ao fato da instrumentação ter sido disponibilizada comercialmente apenas em 2004.

Diante disso, tem-se que não há relatos na literatura de métodos desenvolvidos especificamente para a determinação simultânea de agrotóxicos de diferentes classes e grupos químicos em alface, empregando-se as técnicas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.

1.3.3 Efeito matriz em espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica de elevada seletividade e detectabilidade para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos. No entanto, esta técnica é bastante suscetível ao efeito matriz, principalmente quando se emprega a ionização por *eletrospray*^{70,71}.

O efeito matriz em espectrometria de massas foi primeiramente discutido por Kebarle e Tang⁷², em 1993, e é caracterizado por alterações na eficiência de ionização dos analitos, quando submetidos à análise na presença de outros compostos, como os componentes da matriz de análise, que podem coeluir com os analitos, resultando em alteração do sinal analítico, podendo ocorrer a supressão ou o ganho de sinal.

Embora os mecanismos de supressão ou ganho de sinal ainda não estejam claramente estabelecidos, o efeito matriz é altamente dependente da natureza do analito e da matriz de análise. Comumente, observa-se que a eficiência de ionização de compostos polares é mais pronunciadamente influenciada por componentes da matriz coeluídos do que quando se trabalha com compostos menos polares⁷³.

Diante disso, torna-se indispensável a avaliação do efeito matriz durante o desenvolvimento de um método analítico, uma vez que este pode afetar significativamente a exatidão e a precisão da metodologia.

Um dos modos mais comuns para avaliação do efeito matriz foi proposto em 2003 por Matuszewski *et al.*⁷⁴, consistindo na comparação entre o sinal obtido para o analito, que foi adicionado na matriz, após esta ter passado pelo procedimento de extração, e o sinal do analito em solvente. Através da razão entre os sinais analíticos (áreas dos picos), é possível avaliar quantitativamente o efeito matriz para cada analito estudado, conforme a Equação 6⁷⁵.

$$\% \text{ Efeito Matriz} = \left(\frac{\text{Área amostra fortificada após a extração}}{\text{Área solução de fortificação em solvente}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (6)$$

sendo:

Área_{amostra} fortificada após a extração: área do pico do analito obtida pela injeção da amostra “branco” fortificada após o processo de extração.

Área_{solução} de fortificação em solvente: área do pico do analito obtida pela injeção da solução de fortificação, em solvente.

Através da Equação 6, a obtenção de resultados negativos sugere a ocorrência de supressão do sinal analítico, enquanto que resultados positivos sugerem ganho no sinal, decorrentes da interação do analito com a matriz da amostra em análise.

Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar o efeito matriz é reduzir a quantidade de componentes da matriz que coeluem com os analitos no detector e isto pode ser controlado pelo método de extração utilizado, sendo que métodos mais seletivos e com etapas de limpeza mais eficientes devem ser empregados.

De acordo com a literatura⁷⁶, tem-se que valores de efeito matriz acima de 20% (em módulo) são considerados significativos, influenciando na quantificação dos analitos, enquanto que valores de efeito matriz na faixa de $\pm 20\%$ são considerados desprezíveis.

1.4 Validação de métodos analíticos

Diferentes métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos têm sido desenvolvidos, a fim de assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais e nas Boas Práticas Agrícolas. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizados e cumpram requisitos que garantam resultados confiáveis. Assim, com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos através de um método analítico, são delineados procedimentos de validação, como garantia da qualidade das medidas químicas, através da sua comparação, rastreabilidade e confiabilidade⁷⁷.

Internacionalmente, os guias mais utilizados para a validação de métodos que envolvem a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos são o *Codex Alimentarius* e o Documento SANCO^{78,79}.

O *Codex Alimentarius*⁸⁰ é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (ONUAA) e da Organização Mundial de

Saúde (OMS) que tem como finalidade proteger a saúde da população, abordando assuntos como resíduos de agrotóxicos, métodos de análise e amostragem de alimentos e medicamentos, entre outros, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos⁷⁷.

O Documento N° SANCO/12571/2013, elaborado pela comunidade europeia, descreve os requisitos para controle de qualidade dos métodos analíticos desenvolvidos para a análise de alimentos, com o objetivo de assegurar a saúde dos consumidores. Além de ser um guia de validação atual, também estabelece parâmetros para a utilização da espectrometria de massas para a análise dos agrotóxicos.

Os parâmetros analíticos de validação, também denominados de figuras de mérito, mais usados para avaliar métodos analíticos são: seletividade, limites de detecção e de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez⁸¹.

1.4.1 Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa⁸¹. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito e/ou com a matriz em análise, podendo ser produtos de degradação, impurezas, entre outros⁷⁷.

Para os métodos cromatográficos, a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (em um determinado tempo de retenção) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão são seriamente comprometidas⁸¹.

Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do composto de interesse, injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Nesse caso, a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito deve ser observada, garantindo que os componentes da matriz não interferirão na detecção dos analitos⁸².

1.4.2 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) correspondem à menor quantidade de um analito que pode ser detectada e quantificada, respectivamente, utilizando-se uma determinada metodologia^{81,82}. Na prática, esses limites podem ser calculado de três maneiras diferentes: o método visual, o método da relação sinal/ruído e o método baseado nos parâmetros da curva analítica.

O método visual é utilizado para determinar os limites, utilizando-se a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável e/ou quantificável).

Através do método da relação sinal/ruído, compara-se a intensidade dos sinais gerados a partir da matriz fortificada com baixas concentrações do analito com os sinais gerados da matriz “branco” (matriz isenta do composto de interesse). Comumente, aceita-se como uma estimativa do LD e do LQ a concentração do analito que gera um sinal 3 e 10 vezes maior, respectivamente, que o ruído do sistema.

Através do método baseado em parâmetros da curva analítica, os limites de detecção e de quantificação podem ser expressos através das Equações 7 e 8, respectivamente.

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (8)$$

sendo:

s: a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S: a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para o cálculo das variáveis s e S, uma curva analítica deverá ser elaborada utilizando a matriz contendo o analito na faixa de concentração próxima ao LD.

Para as técnicas cromatográficas, o melhor método para a determinação dos limites de detecção e quantificação é o baseado nos parâmetros da curva analítica, pois este é estatisticamente mais confiável que os demais, uma vez que os valores destes limites podem variar dependendo-se do tipo e tempo de uso da coluna cromatográfica, das condições de análise e até mesmo da sensibilidade dos analitos⁸¹.

1.4.3 Linearidade e curva analítica

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação⁸¹.

A linearidade do método pode ser definida a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, denominada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medidas experimentais, utilizando-se o método matemático da regressão linear. Além destes, é importante avaliar estatisticamente os resíduos (através do gráfico de resíduos) e a regressão obtida, através do coeficiente de determinação (r^2), que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais⁸¹.

Os resíduos, também utilizados para avaliar a qualidade da curva analítica de um método, representam a diferença entre a concentração nominal (teórica) e a concentração média obtida experimentalmente, em porcentagem. Para cada curva analítica elaborada é necessário construir um gráfico dos resíduos em função da concentração teórica dos analitos e, a linearidade é confirmada através da obtenção de uma distribuição aleatória dos valores residuais (positivos ou negativos).

Em relação às curvas analíticas, estas podem ser construídas utilizando-se diferentes métodos, entre os quais se destacam a padronização externa e a por superposição de matriz, quando não há necessidade do emprego de padrões internos nas análises e se tem disponível matrizes isentas das substâncias de interesse⁸¹.

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas em solvente, a partir de um padrão.

O método da padronização externa com superposição de matriz consiste na adição do analito em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância de interesse e, a curva analítica é elaborada relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões.

A interferência da matriz também pode ser determinada sobrepondo-se as curvas obtidas pela padronização externa com e sem superposição da matriz. A obtenção de retas paralelas indica que a matriz não interfere no sinal do analito, mas se as retas se cruzarem, a matriz está interferindo nas determinações e torna-se necessário realizar a quantificação usando o método da superposição da matriz.

1.4.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é frequentemente avaliada pelo coeficiente de variação (CV), determinado através da Equação 9.

$$CV (\%) = \frac{\text{estimativa do desvio padrão das determinações}}{\text{média das determinações}} \cdot 100 \quad (9)$$

Para a validação de métodos analíticos no laboratório, a precisão é avaliada em termos de repetitividade, descrevendo a concordância entre os resultados de medidas sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições; e em relação à precisão intermediária, indicando o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias e/ou diferentes analistas.

1.4.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medida perfeita e este valor é indeterminado por natureza⁸¹.

Para a determinação da exatidão de um método analítico, valores de recuperação são obtidos através da Equação 10, que expressa a quantidade medida da substância

após submissão da matriz ao processo de extração, em relação à quantidade adicionada inicialmente na matriz.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração do analito obtida experimentalmente após extração}}{\text{Concentração do analito adicionado à amostra antes da extração}} \cdot 100\% \quad (10)$$

1.4.6 Robustez

A robustez de um método é a medida de sua capacidade em resistir a variações dos parâmetros analíticos, decorrentes de seu uso rotineiro, refletindo as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Um método diz-se robusto quando as mudanças realizadas estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis⁸³.

A robustez é normalmente avaliada durante a etapa de desenvolvimento do método analítico através da variação de parâmetros como a composição e vazão da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, pH da fase móvel e programação da temperatura. Pequenas modificações também podem ser realizadas na etapa de preparo das amostras, como alterando-se o tempo de extração e agitação, marcas de solventes, entre outros.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa de multirresíduos de agrotóxicos em alface, utilizando-se as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acopladas à espectrometria de massas sequencial, uma vez que não há relatos na literatura de trabalhos empregando essas técnicas para a determinação simultânea de agrotóxicos de diferentes classes químicas exclusivamente na matriz alface e em suas diferentes variedades.

2.1 Metas específicas

Para atingir os objetivos delineados, as seguintes metas específicas foram realizadas:

Na primeira etapa do trabalho, foram selecionados os agrotóxicos estudados e foi empregada a CLAE-EM/EM para a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, a otimização da separação cromatográfica e a otimização da etapa de preparo de amostra, empregando-se a alface do tipo crespa, que é o cultivar mais comercializado e consumido no Brasil.

O preparo da amostra foi realizado através do emprego do método QuEChERS, estudando-se diferentes variações em relação ao tempo e velocidade de centrifugação, tempo de interação dos agrotóxicos com a matriz, tipo de solvente extrator, tipos de sais empregados na etapa de particionamento, modo de agitação (vórtex ou ultrassom), modo de extração (por agitação ou através do emprego da extração assistida por micro-ondas) e tipos de sais empregados na etapa de limpeza da amostra. Nessa última etapa, diferentes combinações dos sais PSA, MgSO₄, GCB e C18 foram estudadas, incluindo o emprego do sorvente constituído por sílica e o copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMS), preparado no laboratório, além de ser estudado o uso de ponteiros descartáveis contendo os sais de limpeza. Para cada modificação realizada no método QuEChERS, foram feitos estudos de recuperação e efeito matriz, a fim de selecionar as melhores condições de extração.

Posteriormente à otimização da etapa de preparo de amostra, o método desenvolvido por CLAE-EM/EM foi validado, em termos de seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez, seguindo as recomendações do guia de validação Documento N° SANCO/12571/2013⁷⁹. Após a validação, o método foi aplicado em diferentes variedades de alface, incluindo as alfaces lisa, americana, mimosa e roxa e na matriz espinafre, pertencente à mesma categoria da alface, de acordo com o SANCO⁷⁹ (vegetal folhoso com elevado teor de água), realizando-se estudos de recuperação, efeito matriz, linearidade e análises de amostras disponíveis no comércio da região de Campinas-SP.

Na segunda etapa do trabalho, foi realizada a transferência do método desenvolvido por CLAE para a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, a fim de comparar as duas técnicas instrumentais, em termos de detectabilidade, efeito matriz, geração de resíduos, tempo de análise e custos.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

- Acefato 97,2%, Sigma Aldrich, lote 9320X.
- Acetato de etila 99,9%, Tedia, lote 710371R.
- Acetato de sódio 99,5%, Dyne Produtos Químicos, lote 6908.
- Acetona 99,5%, Synth, lote 147712.
- Acetonitrila 99,98%, J. T. Baker, lote K08C81.
- Ácido acético glacial 99,7%, Mallinckrodt ChromAR HPLC, lote V155KTVT.
- Ácido fórmico 85%, Synth, lote 108843.
- Água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore).
- Amina primária secundária (PSA), Bondesil, 40 µm, Varian, lotes 1207208 e 1215708.
- Azoxistrobina 99,9%, Sigma Aldrich, lote SZE8163X.
- C18, Supelco, 45 µm, lote 2903601.
- Carbaril 99,5%, Chem Service, lote 361-23B.
- Carbendazim 98,5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, lote 90310.
- Carbono grafitizado, sorvente SampliQ SPE, Agilent Technologies, lote 9334611.
- Citrato trissódico diidratado 99%, Sigma, lote 047K0097.
- Cloreto de sódio 99,5%, Ecibra Reagentes Analíticos, lote 18692.
- Clotianidina 99,9%, Sigma Aldrich, lote SZBA203XV.
- Copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMS), Gelest, lote 8C-12390.
- Difenconazol 97%, Sigma Aldrich, lote SZB9287XV.
- Fenamidona 99,9%, Sigma Aldrich, lote SZBA090XV.
- Hidrogenocitrato dissódico sesquiidratado 99%, Aldrich, lote S43364-317.
- Imidacloprido 99,9%, Sigma Aldrich, lote 6054X.
- Iprodiona 99,3%, Sigma Aldrich, lote SZE6222X.
- Malationa 98,1%, Chem Service, lote 353-34B.
- Metamidofós 98,5%, Sigma Aldrich, lote SZE9285X.
- Metanol grau HPLC, Tedia.
- Metomil 99,9%, Sigma Aldrich, lote SZB8197XV.
- Procloraz 99,1%, Sigma Aldrich, lote SZE6220X.
- Sílica gel, tamanho de partícula 35-70 µm, 6 nm, Acros Organics, lote A0229122.

- Sulfato de magnésio seco 98%, Vetec Química Fina, lote 0903899.
- Tebuconazol 99,6%, Sigma Aldrich, lote 5116X.
- Tiacloprido 99,9%, Sigma Aldrich, lote SZBA020XV.
- Tiametoxam 99,7%, Sigma Aldrich, lote SZB9098XV.

3.2 Equipamentos

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg, marca Fisher Scientific, modelo A-250.
- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, marca Sartorius, modelo CP225D.
- Banho de ultrassom, marca Thornton, modelos T14 e T50.
- Bomba a vácuo 60 Hz e 3,5 mA, marca Millipore, modelo WP6111560.
- Centrífuga de alimentos *Juicer* Mondial, modelo CF-02, 250 W de potência.
- Centrífuga Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, número de série 13107.
- Cromatógrafo a líquido Waters Alliance 2695 acoplado ao espectrômetro de massas Waters Micromass Quattro MicroTM API, com analisador triplo quadrupolo, conectado a um microcomputador e controlado pelo software Mass Lynx v. 4.1.
- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Waters Acquity acoplado ao espectrômetro de massas Waters Micromass Quattro MicroTM API, com analisador triplo quadrupolo, conectado a um microcomputador e controlado pelo software Mass Lynx v. 4.1.
- Sistema de digestão de amostras por micro-ondas, marca Milestone, modelo STARTE.
- Pipetas automáticas Eppendorf Research Plus: 0,5-10 µL (lote 4994445); 10-100 µL (lote 4742079); 100-1000 µL (lote 121159Z) e 500-5000 µL (lote 124251A).
- Sistema de deionização de água, Milli-Q Plus, marca Millipore.
- Unidade Filtrante Millex, com membrana PTFE 0,2 µm de poro, marca Millipore.
- Vórtex Phoenix Luferco AP56, número de série 15054.

3.3 Colunas cromatográficas comerciais

- Coluna comercial XTerra[®] MS C18, capeada, fabricada pela Waters, tamanho de partícula de 3,5 µm, comprimento de 100 mm, diâmetro interno de 3,0 mm, PN: 186000418, lote 0223310481.

- Coluna de guarda XTerra® MS C18, fabricada pela Waters, tamanho de partícula de 3,5 µm, comprimento de 20 mm, diâmetro interno de 3,0 mm, PN: 186000640, lote 0223303131.
- Coluna comercial Acquity UPLC® BEH C18, fabricada pela Waters, tamanho de partícula de 1,7 µm, comprimento de 50 mm, diâmetro interno de 2,1 mm, PN: 186002350, lote 019731258257.
- Coluna de guarda Van Guard® BEH C18, fabricada pela Waters, tamanho de partícula de 1,7 µm, comprimento de 5 mm, diâmetro interno de 2,1 mm, PN: 186003975, lote 0179310102.

3.4 Amostras de alface

As amostras de alface de diferentes variedades (crespa, lisa, americana, mimosa e roxa), rotuladas como orgânicas, foram adquiridas na cidade de Campinas-SP, para a avaliação como branco das amostras e para realização dos estudos de recuperação e de efeito matriz. Para a aplicação do método, adquiriram-se amostras de diferentes variedades de alface de estabelecimentos comerciais da mesma região.

As amostras *in natura*, com ou sem lavagem (dependendo do estudo realizado), foram processadas em centrífuga de alimentos tipo *juicer*, até ficarem homogêneas e, a seguir, foram colocadas em frascos de vidro e armazenadas em *freezer*, para manter sua originalidade.

3.5 Seleção dos agrotóxicos estudados

Os agrotóxicos estudados foram selecionados baseados nos resultados divulgados pelo Programa PARA, da ANVISA, e diante da possibilidade de determinação empregando a espectrometria de massas. Os agrotóxicos permitidos para aplicação em alface e que foram selecionados para estudo são: azoxistrobina, clotianidina, difenoconazol, fenamidona, imidacloprido, iprodiona, malationa, tiacloprido e tiametoxam. Dentre estes, no relatório PARA, nos anos 2009 e 2010, o difenoconazol foi detectado em um total de 3 amostras e a iprodiona foi detectada em uma amostra em 2010, ambos em quantidades acima dos LMR permitidos para a cultura da alface. Dentre os agrotóxicos não autorizados para este cultivo, mas que foram encontrados irregularmente nas amostras analisadas pelo PARA, foram selecionados para estudo:

carbendazim (15 amostras em 2009, 26 em 2010 e 27 em 2011), acefato (3 amostras em 2009 e em 2011 e 2 em 2010), carbaril (2 amostras em 2009 e em 2011), tebuconazol (1 amostra em 2009, 6 em 2010 e 4 em 2011), metamidofós (12 amostras em 2009, 14 em 2010 e 2 em 2011), metomil (3 amostras em 2009 e 4 em 2010 e 2011) e procloraz (1 amostra em 2009).

A Figura 9 apresenta as estruturas químicas dos 16 agrotóxicos estudados.

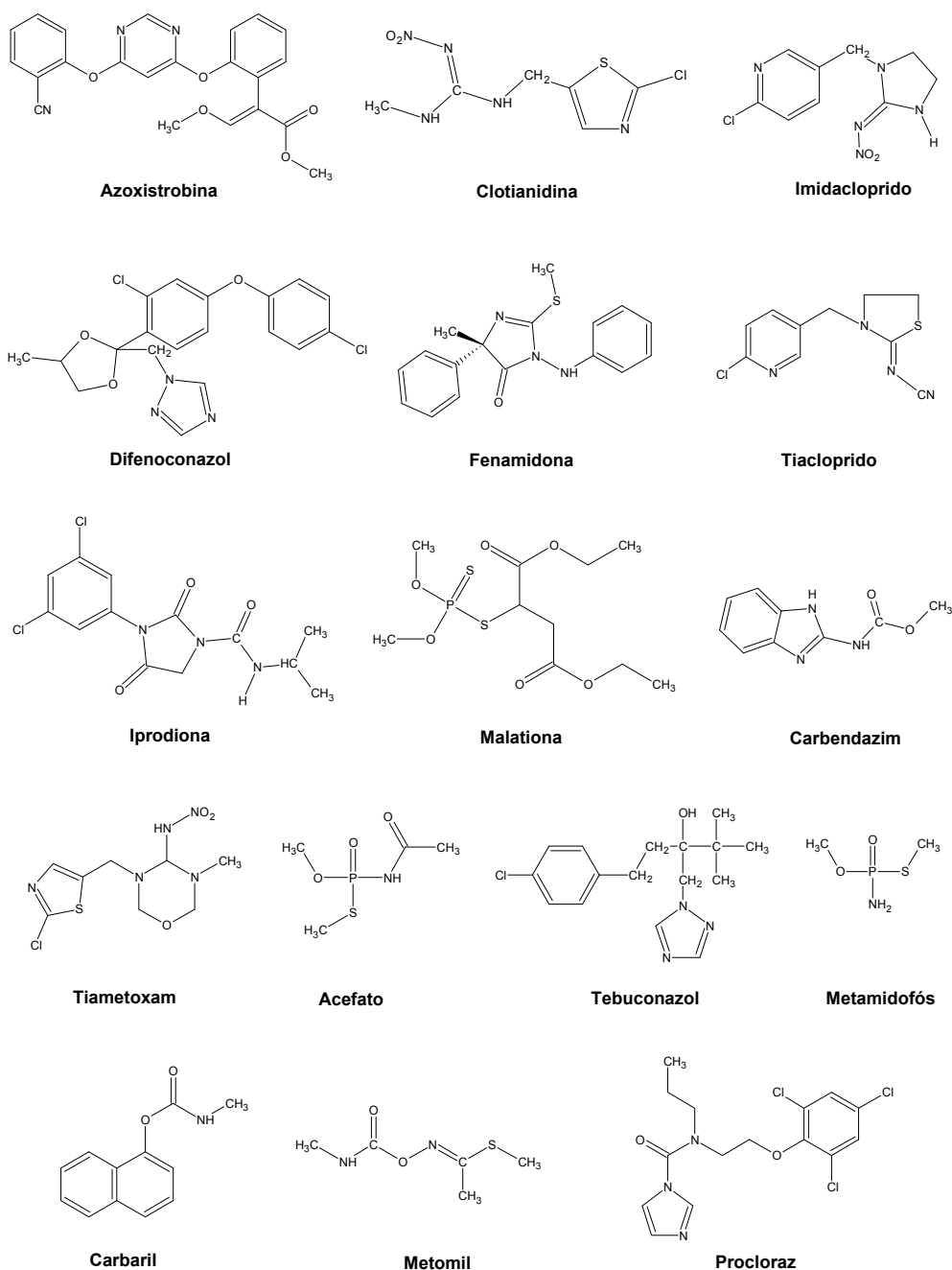


Figura 9: Representação da estrutura química dos agrotóxicos estudados.

A Tabela 5 apresenta as fórmulas químicas, os grupos químicos e as classes agrônômicas aos quais os 16 agrotóxicos de trabalho pertencem, assim como as massas monoisotópicas, os logaritmos dos coeficientes de partição octanol/água (log P) e os valores de pKa, de acordo com a IUPAC⁸⁴, para cada analito.

Tabela 5: Agrotóxicos selecionados, assim como suas fórmulas químicas, grupos químicos, classes agrônômicas, massas monoisotópicas e os valores de pKa e log P.

Agrotóxico	Fórmula Química	Grupo Químico	Classe Agrônômica	M ^a (Da)	pKa (25 °C)	log P ^c
Metamidofós	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	organofosforado	Acaricida / Inseticida	141,00	-	-0,79
Acefato	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	organofosforado	Acaricida / Inseticida	183,01	8,35	-0,85
Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	benzimidazol	Fungicida	191,07	4,2	1,48
Metomil	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	metilcarbamato de oxima	Acaricida / Inseticida	162,05	ND ^b	0,09
Tiametoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	neonicotinóide	Inseticida	291,02	ND ^b	-0,13
Imidacloprido	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	neonicotinóide	Inseticida	255,05	ND ^b	0,57
Clotianidina	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	neonicotinóide	Inseticida	249,01	11,1	0,91
Tiacloprido	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	neonicotinóide	Inseticida	252,02	ND ^b	1,26
Carbaril	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	metilcarbamato de naftila	Inseticida / Regulador de Crescimento	201,08	10,4	2,36
Azoxistrobina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	estrobilurina	Fungicida	403,12	ND ^b	2,50
Fenamidona	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	imidazolinona	Fungicida	311,11	ND ^b	2,80
Malationa	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	organofosforado	Acaricida / Inseticida	330,04	ND ^b	2,75
Iprodiona	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	dicarboximida	Fungicida	329,03	ND ^b	3,10
Procloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	imidazolidilcarboxamida	Fungicida	375,03	3,8	3,50
Tebuconazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	triazol	Fungicida	307,14	-	3,70
Difenoconazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	triazol	Fungicida	405,06	1,07	4,36

^aM (massa monoisotópica): massa calculada a partir da massa do isótopo de ocorrência natural mais abundante de cada elemento. ^bND: não dissociável. ^cLogaritmo do coeficiente de partição octanol/água, em pH 7 e 20 °C, de acordo com a IUPAC⁸⁴.

Além do PARA, o MAPA, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, criou o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), para monitorar a presença de resíduos de agrotóxicos em diferentes culturas agrícolas, incluindo a alface. De acordo com os dados publicados no Diário Oficial da União, referentes ao ano-safra 2010/2011, a alface apresentou índice de conformidade de apenas 54%, do total de 35 amostras analisadas, sendo que as amostras analisadas no estado de São Paulo (30 amostras) apresentaram índice de 50% de conformidade. Em amostras provenientes de Pernambuco (3 amostras), houve a detecção dos agrotóxicos carbendazim (não autorizado) e imidacloprido (acima dos LMR permitido); enquanto que nas amostras provenientes de São Paulo, foram encontrados os agrotóxicos carbendazim, metomil e tebuconazol (não autorizados para

serem aplicados) e imidacloprido, fora da faixa aceita pela legislação, entre outros agrotóxicos. As amostras provenientes de Minas Gerais (2 amostras) não apresentaram irregularidades. Em relação aos dados divulgados pelo PNCRC/Vegetal, referente ao ano safra de 2011/2012, todas as 7 amostras de alface analisadas apresentaram conformidades, quanto à presença de agrotóxicos.

Através destas informações, é possível verificar que os agrotóxicos estudados abrangem aqueles mais empregados na cultura da alface, seja regular ou irregularmente.

A Tabela 6 apresenta os limites máximos de resíduos dos 16 agrotóxicos estudados, em alface, estabelecidos por diferentes legislações. A Tabela 6 também apresenta a modalidade de aplicação de cada agrotóxico na alface.

Tabela 6: Limites máximos de resíduos dos 16 agrotóxicos estudados, quando aplicados em alface, estabelecidos por diferentes legislações, assim como a modalidade de aplicação de cada agrotóxico.

Agrotóxico	Modalidade de Aplicação ^a	LMR (mg/kg) para a alface (folhas e caule)			
		ANVISA	CODEX ^c	EPA ^d	UE ^e
Metamidofós	Foliar	NA ^b	NA ^b	1	0,01*
Acefato	Foliar e Sementes	NA ^b	NA ^b	0,02	0,01*
Carbendazim	Foliar e Sementes	NA ^b	5	NA ^b	0,1*
Metomil	Foliar	NA ^b	0,2	5	0,02*
Tiametoxam	Foliar e Solo	0,05	3	4	5
Imidacloprido	Foliar	0,5	2	3,5	2
Clotianidina	Foliar	0,1	2	3	2
Tiacloprido	Foliar	0,2	NA ^b	NA ^b	2
Carbaril	Foliar	NA ^b	NA ^b	10	0,01*
Azoxistrobina	Foliar	1	3	30	15
Fenamidona	Foliar	2	NA ^b	60	2
Malationa	Foliar	8	NA ^b	8	0,02*
Iprodiona	Foliar	1	10	25	10
Procloraz	Foliar e pós-colheita	NA ^b	NA ^b	NA ^b	5
Tebuconazol	Foliar e Sementes	NA ^b	5	NA ^b	0,5
Difenoconazol	Foliar	0,5	2	NA ^b	0,05*

^aModalidade de aplicação dos agrotóxicos na alface, durante sua produção, transporte ou armazenamento. Para os agrotóxicos não autorizados para uso nessa cultura, considerou-se a forma de aplicação em culturas semelhantes.

^bNA: agrotóxico não autorizado para a alface. ^cCODEX: *Codex Alimentarius*. ^dEPA: *United States Environmental Protection Agency* (dados obtidos da *United States Department of Agriculture*, disponível em <http://www.mrlatabase.com/>). ^eUnião Européia: *EU Pesticides Database* (disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/). * limite da determinação analítica.

De acordo com a Tabela 6, observa-se que a legislação brasileira é mais restritiva para a maioria dos agrotóxicos estudados, exceto para o difenoconazol, a fenamidona, a malationa e o tiacloprido, que são agrotóxicos não autorizados para emprego em alface, de acordo com algumas legislações. Para o desenvolvimento do trabalho, foram

considerados os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira, uma vez que as amostras analisadas foram adquiridas no comércio da região de Campinas-SP, devendo estar de acordo com as normas do país, em relação à presença de agrotóxicos.

Além disso, na Tabela 6 observa-se que a maioria dos agrotóxicos estudados são aplicados sobre a superfície foliar das hortaliças, durante sua produção, transporte ou armazenamento.

3.6 Preparo das soluções analíticas dos agrotóxicos

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg/L de cada agrotóxico, foram preparadas através da dissolução do padrão sólido em metanol. Considerando-se o grau de pureza dos agrotóxicos de trabalho, foram pesados cerca de 10,0 mg de cada analito em balança de alta precisão, com o auxílio de navículas, e a massa pesada foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, utilizando-se metanol.

Para o carbendazim, que é um analito pouco solúvel em metanol (359-480 mg/L a 24 °C), sua solução estoque foi preparada na concentração de 200 mg/L (5 mg de analito em 25 mL de solvente).

As soluções estoque foram armazenadas em *freezer*, em frascos de vidro com tampas de teflon, envoltos por papel alumínio, durante um período máximo de 6 meses⁸⁵. Para o carbendazim, sua solução foi armazenada por até 2 meses.

A partir das soluções estoque foram feitas diluições em concentrações adequadas para preparar as soluções de trabalho empregadas nos diferentes estudos realizados. As soluções mais diluídas também foram armazenadas em *freezer*, porém utilizadas por um período menor de tempo, de até 7 dias.

3.7 Definição das condições instrumentais de análise

As análises cromatográficas, na primeira etapa do trabalho, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), com analisador triplo quadrupolo. Os parâmetros do EM foram ajustados para operar no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e ionização por *eletrospray* no modo positivo.

3.7.1 Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação

A definição dos íons de cada analito a serem monitorados foi realizada através da infusão direta, no espectrômetro de massas, de soluções de 1,0 mg/L dos analitos, em metanol, utilizando-se a fase móvel metanol:H₂O 0,1% de ácido fórmico (50:50 v/v) e vazão de 0,1 mL/min.

Para cada agrotóxico estudado, foram monitorados o íon molecular e dois fragmentos, dos quais o de maior intensidade foi utilizado para a quantificação do analito, enquanto que o segundo fragmento de maior intensidade foi utilizado para a confirmação da natureza do analito. Também, através da infusão direta, foram otimizadas a voltagem do cone e a energia de colisão, que são parâmetros instrumentais definidos para cada transição de massa monitorada.

3.7.2 Separação cromatográfica dos agrotóxicos

A separação dos agrotóxicos por CLAE-EM/EM foi realizada utilizando-se a coluna cromatográfica XTerra[®] MS C18 (100 x 3,0 mm, 3,5 µm), a coluna de guarda XTerra[®] C18 (20 x 3,0 mm, 3,5 µm) e a fase móvel composta por metanol e água (modificada com 0,1% de ácido fórmico). O ácido fórmico foi utilizado como modificador orgânico da fase móvel, com o intuito de favorecer o processo de ionização dos analitos.

Os solventes empregados na fase móvel foram filtrados à vácuo, através de membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno, do inglês *polyvinylidene fluoride*) com tamanho de poro de 0,45 µm, e desgaseificados em ultrassom por 20 minutos, à temperatura ambiente (25 °C).

A separação cromatográfica foi avaliada no modo isocrático e por gradiente, sendo que as proporções dos solventes na fase móvel foram variadas com o intuito de conseguir uma separação mais completa dos analitos, em menor tempo de análise.

Os cromatogramas foram obtidos por íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*), ou seja, quando há o monitoramento simultâneo das transições de massa de todos os agrotóxicos estudados, durante todo o intervalo de tempo no qual o cromatograma é adquirido.

Empregando a detecção por espectrometria de massas, a separação cromatográfica completa dos analitos pode não ser necessária, uma vez que o detector é capaz de monitorar diferentes analitos no mesmo tempo de retenção, através de suas transições de massa. No entanto, quanto melhor a separação entre os analitos, maior será a detectabilidade do método, sendo que quanto menos transições de massa são monitoradas simultaneamente a cada tempo de retenção ou intervalo de tempo (janela de retenção), atinge-se maior detectabilidade. Por isso, é necessário desenvolver um método cromatográfico em que haja a separação mais completa possível dos analitos.

Para avaliar a separação cromatográfica, foi utilizada uma solução contendo todos os padrões dos agrotóxicos em metanol, na concentração de 0,5 mg/L.

3.7.3 Avaliação dos parâmetros do espectrômetro de massas

A otimização dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas (temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação, voltagem do capilar e do cone extrator, vazão do gás do cone e RF Lens) foi realizada para todos os agrotóxicos simultaneamente, com o objetivo de selecionar as melhores condições de fragmentação dos íons, que conferem maior detectabilidade. Dessa forma, a detectabilidade dos analitos foi avaliada através da área do pico referente à transição de quantificação, injetando-se uma solução de concentração de 0,5 mg/L contendo a mistura de todos os analitos em metanol.

Após a definição dos parâmetros instrumentais otimizados, o cromatograma de íons totais obtido a partir da separação cromatográfica otimizada foi subdividido em janelas de tempo (intervalos de tempo), possibilitando monitorar apenas as transições de massa dos analitos que eluem em cada intervalo de tempo definido. Este procedimento, assim como o ajuste no *dwell time* de cada janela, foram realizados a fim de conferir elevada detectabilidade, sem a perda de definição dos picos cromatográficos.

O *dwell time* especifica o intervalo de tempo, em segundos, no qual as transições de massa selecionadas serão monitoradas. Quanto maior seu valor (escala de 0,1 a 0,9 segundos), maior será a detectabilidade do analito monitorado, porém quanto mais transições forem monitoradas simultaneamente, perde-se a resolução dos picos.

De acordo com a literatura⁸⁶, para que haja repetitividade na quantificação dos analitos e integração adequada, o pico de cada composto deve possuir um mínimo de 10 a 15 pontos de aquisição, sendo que o número de pontos por pico pode ser modificado através de alterações no *dwell time*.

3.7.4 Determinação das concentrações iniciais de trabalho

Para a determinação das concentrações iniciais de trabalho (C_0) de cada analito, foram preparadas soluções de diferentes concentrações contendo todos os agrotóxicos (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/L}$), em metanol e injetadas no cromatógrafo a líquido, em triplicata.

A C_0 foi definida visualmente, observando-se a menor concentração detectável na qual é possível distinguir claramente entre o sinal analítico e o ruído, e também considerando a repetitividade das áreas dos picos obtidas nas três diferentes injeções de cada concentração. A C_0 foi empregada na otimização do preparo de amostra, empregando o método QuEChERS, nos estudos de efeito matriz e na validação do método desenvolvido, para a determinação dos limites de detecção e de quantificação do instrumento.

3.8 Otimização do método de preparo de amostra QuEChERS

Para a definição do método de extração otimizado a ser aplicado em amostras de alface, foram avaliadas as porcentagens de recuperação dos analitos e seus coeficientes de variação, o efeito matriz⁷³ em dois níveis de fortificação e a análise gravimétrica do resíduo sólido³³, em diferentes versões do método QuEChERS. Para isso, foram utilizadas amostras de alface orgânica, do tipo crespa, uma vez que este cultivar é o mais comercializado e consumido no Brasil.

O procedimento de extração por QuEChERS foi realizado da seguinte maneira:

1) Pesar ($10,0 \pm 0,1$) g de amostra homogeneizada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL.

2) Fortificar as amostras com solução de padrões de agrotóxicos de concentração conhecida (quando aplicável).

3) Agitar os tubos em vórtex por 1 minuto e, aguardar, no mínimo, 30 minutos para os agrotóxicos interagirem com a amostra.

4) Adicionar 10 mL do solvente extrator e agitar em vórtex por 1 minuto.

5) Adicionar os sais extratores ao tubo, agitar em vórtex por 1 minuto e centrifugar.

6) Retirar 7 mL do sobrenadante e transferir para outro tubo de centrifuga, contendo a mistura salina para limpeza da amostra (EFS-D).

7) Agitar o tubo com os sais de limpeza por 30 segundos e centrifugar.

8) Retirar 5 mL do sobrenadante e colocá-lo em um frasco de vidro, juntamente com 50 μ L de uma solução 5% de ácido fórmico em acetonitrila (para estabilização do extrato).

9) Secar a solução sob fluxo de nitrogênio.

10) Ressuspender o extrato seco em 1 mL de metanol ou com solução de fortificação de agrotóxicos, em se tratando da amostra “branco” fortificada. Nessa etapa, tem-se que a amostra é concentrada 5 vezes, uma vez que há a secagem de 5 mL do extrato e o resíduo sólido é ressuspensionado em 1 mL. A possibilidade de concentração do extrato nessa etapa do método QuEChERS é vantajosa, fazendo com que o método seja capaz de detectar concentrações dos analitos dentro dos LMR estabelecidos pelos órgãos governamentais.

11) Agitar a solução em vórtex por 1 minuto e sonicar por 10 segundos.

12) Filtrar a solução em filtro de seringa com membrana PTFE (politetrafluoretileno) de 0,2 μ m de poro e injetá-la no cromatógrafo a líquido.

As modificações realizadas experimentalmente no método QuEChERS original foram em relação ao solvente extrator, tipo de sal da etapa de particionamento, sorventes de limpeza da amostra, tempo e velocidade de centrifugação, tempo de interação dos agrotóxicos com a amostra e forma de agitação dos extratos. As variações avaliadas para cada tipo de modificação estão descritas na Tabela 7.

Para o estudo de cada modificação do método QuEChERS, a fim de definir as melhores condições aplicáveis para as amostras de alface, foram analisadas 5 amostras, sendo 3 amostras fortificadas com soluções padrões dos analitos; 1 amostra “branco” (sem a fortificação) e uma amostra “branco” fortificada após a realização da extração. A otimização da etapa de preparo de amostra foi realizada de forma

univariada, sendo que um parâmetro foi otimizado de cada vez e a melhor condição foi fixada para o estudo do próximo tipo de modificação. As amostras foram fortificadas com 3 vezes a concentração de trabalho ($3 \times C_0$), definida para cada analito e, após a definição das condições otimizadas, o método foi aplicado para a concentração C_0 .

Tabela 7: Variações para cada tipo de modificação realizada no método QuEChERS para aplicação em amostras de alface.

Tipo de Modificação	Variações
Tempo e velocidade de centrifugação	- 5 min a 4000 rpm - 5 min a 5000 rpm - 10 min a 5000 rpm - 5 min a 5500 rpm
Tempo de interação dos agrotóxicos ⁸⁷	- 30 minutos - 1 hora
Tipo de Sal	- $MgSO_4$ e NaCl (Original) - $MgSO_4$ (Original sem NaCl) - Tampão citrato - Tampão acetato - Tampão citrato sem NaCl
Solvente Extrator	- Acetato de etila - Acetonitrila - Acetona - Acetonitrila e acetona (1:1 v/v)
Sorventes de limpeza da amostra	- 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ - 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ + 175 mg C18 - 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ + 17,5 mg GCB^a - 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ + 35 mg GCB^a - 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ + 70 mg GCB^a - 175 mg PSA + 35 mg GCB^a - 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ + 35 mg GCB^a + 175 mg C18 - 175 mg Si(PFPMS)^b + 1,050 g $MgSO_4$ - 175 mg Si(PFPMS)^b + 1,050 g $MgSO_4$ + 35 mg GCB - 175 mg Si(PFPMS)^b + 175 mg PSA + 1,050 g $MgSO_4$ - 37,5 mg PSA + 225 mg $MgSO_4$ + 7,5 mg GCB^a em ponteiros descartáveis
Modo de agitação	- Vórtex - Ultrassom

^aGCB (*Graphitized Carbon Black*): carbono grafitizado. ^bSi(PFPMS): sorvente preparado no laboratório, conforme descrito no item 3.8.1, à base de sílica e do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano.

Para cada modificação estudada, a porcentagem de recuperação de cada analito foi determinada, através da Equação 11⁷³.

$$R (\%) = \frac{\text{Área do analito (fortificação no branco da matriz)}}{\text{Área do analito (fortificação no extrato final)}} \cdot 100\% \quad (11)$$

De acordo com o Documento N° SANCO/12571/2013⁷⁹, a porcentagem de recuperação dos analitos deve estar entre 70 e 120%, com coeficientes de variação inferiores ou iguais a 20%.

Com os resultados de porcentagem de recuperação obtidos nas análises das 3 amostras fortificadas antes do processo de extração, também foram realizados testes de significância, através da análise de variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*)^{88,89}, a fim de se avaliar, estatisticamente, se as alterações realizadas no método QuEChERS foram significativas ou não. Para a realização destes testes, foi utilizado o programa Design-Expert®, considerando-se o nível de 95% de confiança. Quando os resultados da ANOVA levam à rejeição da hipótese nula, que representa a afirmação de que os resultados das diferentes variações são iguais, têm-se evidências de que os valores obtidos diferem significativamente. Através dos testes ANOVA, são fornecidos valores de P (nível descritivo, que considera a diferença média e a variância dos dados analisados) que, quando inferiores a 0,05 (ou seja, 5% de significância), sugerem que os valores analisados possuem diferenças significativas entre si⁹⁰.

Também, durante o processo de otimização da extração, foi feita a determinação gravimétrica do resíduo sólido obtido após a extração da amostra branco e secagem do extrato sob fluxo de nitrogênio, a fim de avaliar a quantidade de componentes da matriz extraídos em cada modificação do QuEChERS, que podem interferir na separação, detecção e quantificação do analito. A análise gravimétrica foi feita pesando-se um frasco de vidro de 10 mL vazio. A seguir, adicionaram-se 5 mL do extrato obtido após o procedimento de extração da amostra “branco” e o extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio. A diferença de massa entre o frasco contendo o resíduo seco do extrato e o frasco vazio forneceu a quantidade de componentes da matriz extraídos³³.

A determinação gravimétrica foi obtida em quadruplicata (4 amostras diferentes), para cada modificação do método QuEChERS avaliada. Teoricamente, o método de extração mais apropriado é aquele capaz de extrair os analitos eficientemente, coextraíndo a menor quantidade possível dos componentes da matriz, a fim de que haja menor influência do efeito matriz. Nesse contexto, a fim de se avaliar os componentes da matriz extraídos, os extratos “branco” das diferentes variações do método QuEChERS estudadas também foram injetados no cromatógrafo a líquido, sendo

detectados pelo EM operando no modo de varredura, abrangendo faixa de massas no intervalo de 30-1000 m/z . Através da contagem do número de picos detectados, pode-se avaliar, quantitativamente, o número de componentes da matriz extraídos nas diferentes variações estudadas³³.

O efeito matriz também foi estudado para as diferentes variações da extração por QuEChERS, utilizando-se uma amostra “branco” fortificada no C_0 e uma amostra “branco” fortificada em $3xC_0$, cujas áreas dos analitos nessas amostras foram comparadas com a área dos compostos em soluções da mesma concentração. Os resultados foram obtidos através da Equação 6.

3.8.1 Preparação de um sorvente do tipo fenil para avaliação na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS

Um sorvente do tipo fenil foi preparado no laboratório, para emprego na etapa de limpeza da amostra do método de extração QuEChERS, a fim de avaliar seu uso como possível substituinte ou complemento ao PSA, que é um reagente de custo elevado.

O sorvente, constituído por sílica e o copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMs), cuja estrutura está representada na Figura 10, foi primeiramente desenvolvido e estudado para ser utilizado como fase estacionária reversa, para cromatografia líquida de alta eficiência^{91,92}. De acordo com os estudos realizados, a fase desenvolvida apresentou caráter mais polar que as fases convencionais do tipo C18, sugerindo que este material possa ser empregado como sorvente de limpeza, podendo interagir com os interferentes polares da matriz.

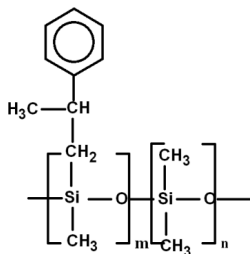


Figura 10: Representação da estrutura do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMs). As letras m e n representam o comprimento da cadeia polimérica.

O sorvente do tipo fenil pode interagir com os analitos e/ou interferentes da matriz através das interações hidrofóbicas e do tipo π - π que ocorrem entre grupos funcionais insaturados.

O sorvente foi preparado de acordo com as seguintes etapas^{91,92}:

1) Ativação da sílica (35-70 μm de tamanho de partícula) em estufa à vácuo a 140 °C por 16 horas.

2) Preparação de uma suspensão 10% (m/v) de sílica em diclorometano e outra solução 10% (m/v) do PFPMS também em diclorometano. Agitação das misturas por 10 minutos em agitador magnético e sonicação também por 10 minutos.

3) Adição da solução de PFPMS à suspensão de sílica e agitação da mistura por 10 minutos, sonicação por 10 minutos e agitação por mais 3 horas.

4) Repouso da solução, na capela, por 6 dias, a fim de sorver o copolímero nos poros e na superfície da sílica e evaporar o solvente.

5) Imobilização do sorvente por radiação micro-ondas, a 540 W por 80 minutos (2 ciclos de aquecimento de 40 minutos, com etapa intermediária de resfriamento de 15 minutos).

6) Repouso do sorvente por 8 dias, na capela.

7) Submissão do sorvente à extração com clorofórmio por 3 horas a uma vazão de 1,0 mL/min, seguido da extração com metanol por 2 horas, também a uma vazão de 1,0 mL/min, a fim de eliminar o copolímero não imobilizado na superfície da sílica.

8) Secagem do sorvente sob fluxo do gás nitrogênio, para uso na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS.

3.8.2 Emprego de ponteiros descartáveis na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS

Para a avaliação do emprego de ponteiros descartáveis na etapa de limpeza da amostra, primeiramente realizou-se o procedimento de extração QuEChERS, conforme descrito no item 3.8, sendo feitas as etapas experimentais de 1 a 5, seguidas pela transferência do extrato para um frasco de vidro, para a realização do procedimento de limpeza com as ponteiros.

Foram empregadas ponteiros plásticas descartáveis de 5 mL, concedidas pela empresa americana DPX Labs, que foram montadas no laboratório, adicionando-se a mistura de sais de limpeza do método QuEChERS, previamente otimizada. As ponteiros foram conectadas à seringas descartáveis de 10 mL, para realização dos procedimentos de aspirar e dispensar a amostra.

Para a realização da etapa de limpeza da amostra empregando essas ponteiras, utilizaram-se apenas 1,5 mL de amostra, uma vez que a capacidade das ponteiras é inferior à dos tubos de centrifuga, empregados no método QuEChERS original. Foram realizados 5 ciclos de aspirar e dispensar a amostra, dentro de um frasco de vidro e o extrato obtido após a limpeza foi transferido para outro frasco, sem a necessidade de filtração em filtros de seringa, uma vez que os filtros das ponteiras já retiveram as partículas do extrato. As amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspendidas em metanol, ou com solução de fortificação de agrotóxicos, para serem injetadas no cromatógrafo a líquido.

Comparando-se o experimento realizado com o procedimento de limpeza da amostra do método QuEChERS original, não foram necessárias etapas de agitação em vórtex, centrifugação e filtração da amostra, havendo diminuição no tempo total de preparo de amostra.

Para a avaliação da eficiência de limpeza da amostra com o uso dessas ponteiras, as recuperações dos analitos, o efeito matriz e a determinação gravimétrica do resíduo sólido foram determinados, conforme descrito na seção 3.8.

3.8.3 Estudo da radiação micro-ondas para a extração dos agrotóxicos

Uma modificação do método QuEChERS, empregando a radiação micro-ondas para a extração dos agrotóxicos da matriz foi realizada baseando-se no estudo feito por Paíga *et al.*⁹³, no qual se empregou a extração assistida por micro-ondas para extrair sete agrotóxicos, pertencentes aos grupos químicos dos carbamatos e uréias, em amostras de vegetais frescos, como a alface.

O procedimento de extração foi realizado da seguinte maneira, empregando-se as condições otimizadas do método QuEChERS (solvente extrator, tempo e velocidade de centrifugação e tipos de sais de limpeza de amostra):

- 1) Pesar ($1,0 \pm 0,1$) g de amostra homogeneizada em um tubo de copolímero de tetrafluoretileno e perflúor(propil vinil éter)⁹⁴, quimicamente inerte, adequado para uso em sistemas de micro-ondas.

- 2) Fortificar a amostra com solução de padrões de agrotóxicos de concentração conhecida (quando aplicável).

- 3) Adicionar 20 mL de acetonitrila.
- 4) Adicionar 9,0 g de sulfato de magnésio anidro.
- 5) Colocar acetonitrila em outro tubo de tetrafluoretileno e perflúor(propil vinil éter), para controle da temperatura da extração.
- 6) Realizar a extração dos agrotóxicos a 60 °C (300 W), por 10 minutos, sob agitação, com etapa de aquecimento da amostra em 5 minutos.
- 7) Após extração, transferir o conteúdo do frasco para um tubo de centrifuga. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm.
- 8) Retirar 1 mL do sobrenadante, transferi-lo para um frasco de vidro e secar o extrato sob fluxo de nitrogênio. Ressuspender o extrato seco em 1 mL de metanol ou com solução de fortificação de agrotóxicos, em se tratando da amostra “branco” fortificada.
- 9) Retirar outros 7 mL do sobrenadante e transferi-los para outro tubo de centrifuga, contendo a mistura salina para limpeza da amostra (EFS-D) otimizada. Agitar o tubo por 30 segundos em vórtex e centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm. Coletar 1 mL do sobrenadante, secar sob fluxo de nitrogênio e ressuspender em metanol ou com solução de fortificação de agrotóxicos.
- 10) Agitar as soluções em vórtex por 1 minuto e sonicar por 10 segundos.
- 11) Filtrar os extratos obtidos em filtro de seringa com membrana PTFE (politetrafluoretileno) de 0,2 µm de poro e injetá-los no cromatógrafo a líquido.

Para a avaliação do emprego da radiação micro-ondas na extração dos agrotóxicos em alface, as recuperações dos analitos, o efeito matriz e a determinação gravimétrica do resíduo sólido foram determinados, conforme descrito na seção 3.8, para amostras preparadas com e sem a etapa de limpeza.

3.9 Validação do método

O método desenvolvido foi validado, avaliando-se os limites de detecção e de quantificação do método, linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Para avaliação dos parâmetros, foram seguidas, principalmente, as recomendações do Documento N° SANCO/12571/2013⁷⁹, que aborda o emprego da espectrometria de massas na quantificação de agrotóxicos em alimentos.

3.9.1 Limites de detecção e de quantificação

Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação do instrumento, LDi e LQi, respectivamente, foi utilizado o método baseado nos parâmetros da curva analítica, elaborando-se uma curva com a matriz “branco” fortificada com os analitos de interesse, na faixa de concentração próxima à concentração de trabalho C_0 , determinada em solvente pelo método visual.

Para a elaboração da curva, soluções contendo todos os agrotóxicos foram preparadas nas concentrações de $0,7 \times C_0$, $1 \times C_0$, $2 \times C_0$, $3 \times C_0$, $4 \times C_0$ e $5 \times C_0$. A partir dos resultados obtidos, os limites de detecção e de quantificação do instrumento foram determinados através das Equações 7 e 8, para cada analito.

Definiram-se como LDi e LQi as quantidades mínimas do analito que podem ser detectadas e quantificadas pelo instrumento, respectivamente, na presença dos componentes da matriz alface extraídos pelo método QuEChERS otimizado.

3.9.2 Linearidade e curva analítica

As curvas analíticas foram elaboradas com 5 diferentes níveis de concentração, baseados nos limites de quantificação do instrumento e/ou nos LMR de cada agrotóxico para a alface, e a partir de dois modos: a padronização externa (curva em solvente) e a padronização externa com superposição de matriz (matriz “branco” fortificada com os analitos). Para cada nível de fortificação, as soluções foram injetadas em triplicata no cromatógrafo a líquido.

A princípio, objetivou-se elaborar uma curva analítica incluindo o LQi do analito e seu LMR (quando aplicável). No entanto, para os agrotóxicos com LMR elevado, observou-se perda da linearidade (resíduos superiores a $\pm 20\%$), em virtude da ampla faixa de concentração estabelecida. Em virtude disso, para esses compostos (azoxistrobina, fenamidona, malationa e difenoconazol), uma nova curva analítica foi elaborada, em função do LMR, uma vez que, de acordo com o *Codex Alimentarius*, para analitos que possuem um LMR estabelecido, o primeiro ponto da curva analítica, ou seja, o LQ do método, pode ser especificado como uma fração deste valor.

A Tabela 8 apresenta os pontos definidos para a elaboração da curva analítica.

Tabela 8: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, para avaliação da linearidade do método.

Agrotóxico	Níveis da curva analítica				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Metamidofós	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Acefato	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Carbendazim	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Metomil	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Tiametoxam	1xLQi	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Imidacloprido	1xLQi	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Clotianidina	1xLQi	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Tiacloprido	1xLQi	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Carbaril	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Azoxistrobina	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Fenamidona	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Malationa	0,4xLMR	0,5xLMR	0,75xLMR	1xLMR	1,05xLMR
Iprodiona ^a	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Procloraz	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Tebuconazol	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Difenoconazol	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR

^aA iprodiona possui LMR igual a 1 mg/kg, porém, em estudos prévios, injetando-se no cromatógrafo a líquido soluções de concentração próximas a 1 mg/L, observou-se que este analito não apresentou linearidade nesse intervalo de concentração. Portanto, este foi o único composto permitido para ser aplicado em alface no qual não foi possível abranger o LMR na curva analítica, sendo esta elaborada em função apenas do LQi.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais, e através dos resíduos, que representam a diferença entre a concentração teórica e a concentração obtida experimentalmente, em porcentagem.

3.9.3 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se os sinais analíticos obtidos para amostras “branco” submetidas ao processo de extração e para amostras “branco” fortificadas após a extração (picos referentes às transições de quantificação de cada analito), no limite de quantificação do método (LQ), definido como sendo o primeiro ponto da curva analítica que descreve a linearidade do método (Tabela 8).

De acordo com os guias de validação *Codex Alimentarius* e SANCO, os picos porventura presentes nas amostras “branco” devem ser reportados e, em matrizes que possuem compostos interferentes no tempo de retenção do analito, a resposta dos picos interferentes deve ser inferior a 30% da resposta no limite de quantificação.

3.9.4 Precisão

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em termos de repetitividade (precisão intraensaio) e precisão intermediária (precisão interensaio, em dois diferentes dias), em dois níveis de fortificação: no limite de quantificação do método (LQ) e no LMR (ou 3xLQ, para analitos não autorizados para uso em alface), conforme sugerido pelo guia SANCO.

Para determinação da repetitividade, 5 diferentes amostras de alface isentas do analito de interesse (“branco”) foram fortificadas e submetidas ao processo de extração pelo método QuEChERS. Os extratos finais obtidos foram submetidos à análise instrumental e injetados em triplicata no cromatógrafo a líquido. O coeficiente de variação de cada analito foi determinado através da razão entre a média e a estimativa do desvio padrão das 5 amostras diferentes analisadas, considerando, para cada amostra, as áreas médias das três injeções. De acordo com o SANCO, o coeficiente de variação máximo aceitável é de 20%. O mesmo procedimento foi realizado, porém em um dia diferente, a fim de avaliar a precisão intermediária do método.

3.9.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, em dois níveis de fortificação: no limite de quantificação do método (LQ) e no LMR (ou 3xLQ, para analitos não autorizados para uso em alface) e com 5 replicatas em cada nível, conforme sugerido pelo guia de validação SANCO.

Amostras de alface isentas dos analitos de interesse foram fortificadas nos diferentes níveis e submetidas ao processo de extração. A exatidão do método, para cada analito, foi calculada através da Equação 10, que expressa a razão entre a concentração do analito obtida experimentalmente e a concentração teórica adicionada na amostra antes da extração. A concentração do analito experimental foi calculada através da equação da reta obtida por regressão linear de amostras “branco” de alface fortificadas no final da etapa de extração.

Para avaliação da exatidão, foi preparada uma nova curva analítica por superposição de matriz, submetendo as amostras de alface “branco” ao processo de extração, e posteriormente fortificando-as com diferentes níveis de concentração.

A curva analítica elaborada para a determinação da exatidão do método difere-se da curva analítica apresentada para a avaliação da linearidade, uma vez que é necessária a adição de mais um nível de concentração, no caso o correspondente ao 0,7xLQ (ou 0,2xLMR, para o analitos azoxistrobina, fenamidona, malationa e difenoconazol).

A adição deste nível inferior ao limite de quantificação do método à curva analítica é necessária, a fim de assegurar a quantificação das amostras de alface que serão fortificadas no início e submetidas ao processo de extração. Uma vez que a porcentagem de recuperação dos analitos pode ser inferior a 100%, ao fortificar uma amostra no início com o LQ, após a extração, o extrato final poderá fornecer uma concentração inferior ao LQ e, para determinação da exatidão do método, esse valor deve ser quantificado.

Para a avaliação da exatidão, utilizaram-se os mesmo resultados obtidos para as amostras usadas na determinação da precisão do método, uma vez que as amostras foram fortificadas antes da etapa de extração, nos níveis LQ e LMR (ou 3LQ).

3.9.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada variando-se em 5% os seguintes parâmetros: temperatura da coluna cromatográfica, composição da fase móvel (teor de ácido fórmico na água deionizada) e alteração da marca do solvente orgânico extrator utilizado na etapa de preparo das amostras (acetonitrila).

A robustez foi avaliada através dos coeficientes de variação determinados pela comparação das áreas dos analitos e das porcentagens de recuperação, obtidas nas diferentes condições experimentais de análise e em dois diferentes níveis de fortificação (LQ e LMR ou 3xLQ).

A Tabela 9 apresenta todas as variações estudadas, para avaliação da robustez do método. Para cada variação, foram preparadas 4 amostras, sendo 2 fortificadas no início da extração (uma no LQ e outra no LMR ou 3xLQ) e 2 amostras fortificadas no extrato, nos mesmos níveis.

Tabela 9: Variações de alguns parâmetros do método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em alface, para avaliação da robustez.

Denominação da condição	Marca acetonitrila (solvente extrator)	Temperatura da coluna cromatográfica (°C)	Teor de ácido fórmico na água (%)
1 (método original)	J.T.Baker	25,0	0,100
2	J.T.Baker	25,0	0,105
3	J.T.Baker	26,3	0,100
4	J.T.Baker	26,3	0,105
5	Tedia	25,0	0,100
6	Tedia	25,0	0,105
7	Tedia	26,3	0,100
8	Tedia	26,3	0,105

3.10 Aplicação do método otimizado e validado por CLAE-EM/EM

3.10.1 Estudo de diferentes variedades de alface

A fim de avaliar a aplicabilidade do método analítico otimizado e validado para a determinação de agrotóxicos em alface crespa, empregando o método de extração QuEChERS e determinação analítica por CLAE-EM/EM, foram estudadas diferentes variedades de alface, incluindo as alfaces lisa, americana, mimosa e roxa.

Para essas matrizes, foram realizados estudos de porcentagem de recuperação, efeito matriz e determinação gravimétrica do teor de resíduo sólido, feitos da mesma forma que para a alface crespa. Também, curvas analíticas foram elaboradas para cada matriz, nos mesmos níveis das curvas elaboradas para a alface crespa, e a qualidade da linearidade foi avaliada.

O preparo das amostras foi realizado utilizando-se o método QuEChERS otimizado, empregando-se fator de concentração de 5 vezes. Para a determinação das porcentagens de recuperação, as amostras foram fortificadas com a concentração de $3 \times C_0$, definida para cada analito.

3.10.2 Determinação de agrotóxicos em amostras comerciais de alface

Após o desenvolvimento e validação do método analítico, amostras de diferentes variedades de alface, cultivadas em solo ou em hidroponia, foram adquiridas no comércio de Campinas-SP, a fim de serem analisadas em relação à presença ou não de agrotóxicos.

As amostras adquiridas foram subdivididas em diferentes porções, compreendendo as folhas e o caule, quando possível. As folhas foram analisadas sem lavagem e após lavagem com água de torneira e/ou lavagem com solução de aproximadamente 1,5% de hipoclorito de sódio (folhas mantidas por 30 min em uma mistura de 1 L de água e 15 mL de água sanitária comercial e, posteriormente, lavadas com água de torneira), que são procedimentos comumente empregados pelos consumidores, a fim de se avaliar se ocorre uma redução da quantidade de agrotóxicos, quando as hortaliças são submetidas à diferentes tipos de lavagem. O caule isolado somente foi analisado para algumas amostras de alface crespa.

Para a quantificação das amostras de alface, foram elaboradas curvas analíticas por padronização externa com superposição de matriz (matriz “branco” fortificada com os analitos), para cada matriz, nos mesmos níveis das curvas elaboradas para a alface crespa e a qualidade da linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear e dos resíduos.

3.10.3 Aplicação do método para a análise de espinafre

De acordo com o guia de validação SANCO/12571/2013⁷⁹, se um método analítico for desenvolvido e validado para uma categoria de alimentos, ele pode ser estendido para a análise de outras matrizes pertencentes ao mesmo grupo, desde que os critérios de recuperação (70-120%) e desvios aceitáveis ($\leq 20\%$) sejam mantidos. No mesmo grupo da alface, ou seja, grupo de vegetais folhosos, com elevado teor de água, destaca-se o espinafre.

O espinafre é uma hortaliça folhosa cultivada durante todo o ano no Brasil, constituído basicamente por 91,4% de água, 2,9% de proteínas, 3,6% de carboidratos, 2,2% de fibras, 0,4% de açúcares e lipídios e possui quantidades significativas de vitaminas e sais minerais, como por exemplo, potássio, cálcio, vitaminas A, C e folatos. Embora muito consumido no Brasil, ainda há poucos estudos sobre essa hortaliça, principalmente em relação à análise de agrotóxicos. A ANVISA, por exemplo, não monitora essa cultura no programa PARA.

Diante disso, estudos de recuperação e efeito matriz foram realizados em espinafre, empregando o método desenvolvido e validado, a fim de ampliar o escopo

analítico e avaliar esta hortaliça em relação à presença ou não de agrotóxicos. Amostras de espinafre também foram adquiridas no comércio de Campinas-SP, a fim de identificar e quantificar agrotóxicos. No Brasil, de acordo com a ANVISA, os 16 agrotóxicos estudados não são autorizados para uso em espinafre.

Para a quantificação de agrotóxicos nas amostras de espinafre, foram elaboradas curvas analíticas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz (matriz “branco” fortificada com os analitos), nos mesmos níveis de fortificação que os empregados para a alface.

3.11 Transferência do método desenvolvido para a CLUE-EM/EM

O método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em alface foi inicialmente otimizado e validado com o uso da técnica de CLAE-EM/EM. No entanto, em virtude das grandes vantagens apresentadas pela cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM), em relação ao menor tempo de análise, melhores resolução e detectabilidade, e redução de custos, o método desenvolvido foi transferido para a CLUE-EM/EM com o objetivo de se comparar estas duas técnicas instrumentais, quanto ao tempo de análise, detectabilidade, efeito matriz e custos.

3.11.1 Definição das condições instrumentais de análise por CLUE-EM/EM

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Waters Acquity, acoplado ao espectrômetro de massas Quattro MicroTM API, com analisador triplo quadrupolo e ionização por *eletrospray* no modo íon positivo. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados para operar no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Uma vez que se objetiva a transferência do método desenvolvido e validado em CLAE-EM/EM para a CLUE-EM/EM e comparação dos resultados obtidos por ambas as técnicas, os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas foram mantidos constantes, sendo: temperatura da fonte: 140 °C; temperatura do gás de dessolvatação: 500 °C; voltagem do capilar: 4,0 kV; voltagem do cone extrator: 3 V; vazão do gás do cone: 60 L/h; vazão do gás de dessolvatação: 800 L/h e RF Lens: 0,2V.

3.11.1.1 Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação por CLUE-EM/EM

Uma vez que será realizada a transferência do método desenvolvido para outro equipamento, torna-se necessário realizar novamente a infusão dos agrotóxicos no espectrômetro de massas, pois alterações sutis podem ocorrer na fragmentação dos analitos, principalmente em relação ao centro de massa e nos valores de voltagens do cone e energia de colisão.

Diante disso, a definição dos íons a serem monitorados, assim como a voltagem do cone e a energia de colisão, foi realizada através da infusão direta no espectrômetro de massas de soluções de 1,0 mg/L dos analitos, em metanol, utilizando-se a fase móvel metanol:H₂O 0,1% de ácido fórmico (50:50 v/v) e vazão de 0,1 mL/min.

3.11.1.2 Separação cromatográfica dos agrotóxicos por CLUE-EM/EM

A transferência de um método de separação cromatográfica desenvolvido por CLAE para um sistema CLUE pode ser realizada facilmente, empregando *softwares* comerciais, desde que a natureza da fase estacionária das colunas empregadas em ambas as técnicas seja similar.

Neste trabalho, foi empregado o *software Acquity UPLC Columns Calculator* versão 1.1.1, comercializado pela Waters, através do qual foram inseridas as dimensões da coluna cromatográfica utilizada em CLAE, assim como as condições de separação otimizadas no modo gradiente (tempo e composição da fase móvel), vazão de análise e volume de injeção. Através desses dados, o *software* ajusta essas informações para serem aplicadas em colunas de CLUE, que possuem menores dimensões e tamanho de partícula.

Após a definição das condições de separação empregando CLUE-EM/EM, o cromatograma de íons totais obtido foi subdividido em janelas de tempo (intervalos de tempo), possibilitando monitorar apenas as transições de massa dos analitos que eluem em cada intervalo de tempo definido. Este procedimento, assim como o ajuste no *dwell time* de cada janela, foi realizado a fim de conferir elevada detectabilidade, sem a perda de definição dos picos cromatográficos.

3.11.1.3 Determinação das concentrações iniciais de trabalho por CLUE-EM/EM

Para a determinação das concentrações iniciais de trabalho (C_0) de cada analito, foram preparadas soluções de diferentes concentrações de todos os agrotóxicos (0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/L}$), em metanol e injetadas no cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, em triplicata.

A C_0 foi definida visualmente, da mesma maneira como descrito na seção 3.7.4, para a CLAE-EM/EM. Em CLUE-EM/EM, a C_0 foi empregada nos estudos de recuperação, efeito matriz e na validação do método desenvolvido, para a determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento.

3.11.2 Estudos de recuperação e efeito matriz da alface crespa por CLUE-EM/EM

Para a realização dos estudos de recuperação, empregando a CLUE-EM/EM, amostras de alface crespa foram fortificadas com concentrações de $3 \times C_0$ e as amostras foram submetidas à extração, empregando-se o método QuEChERS otimizado, com a etapa de concentração do extrato (5 vezes), conforme foi realizado por CLAE-EM/EM. A porcentagem de recuperação de cada analito foi determinada através da Equação 11.

Em relação ao efeito matriz, este foi determinado utilizando-se amostras “branco” fortificadas nas concentrações C_0 e $3 \times C_0$, cujas áreas obtidas dos analitos foram comparadas com a área dos compostos em soluções da mesma concentração, empregando-se a alface crespa. Os resultados foram obtidos através da Equação 6.

3.11.3 Estudo do efeito matriz nas diferentes variedades de alface e espinafre por CLUE-EM/EM

O efeito matriz realizado através do método da comparação do sinal analítico, determinado pela Equação 6, foi estudado para as diferentes variedades de alface (crespa, lisa, americana, mimosa e roxa) e para o espinafre, empregando-se a técnica CLUE-EM/EM, nas concentrações de C_0 e $3 \times C_0$. O estudo da determinação gravimétrica, que influencia no efeito matriz, não foi realizado, uma vez que está relacionado com a etapa de preparo de amostra e não com a determinação analítica. Os resultados de efeito matriz foram comparados com os obtidos por CLAE-EM/EM.

3.11.4 Validação do método por CLUE-EM/EM

O método desenvolvido por CLUE-EM/EM foi validado, avaliando-se os limites de detecção e quantificação, linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação), seguindo as recomendações do Documento N° SANCO/12571/2013⁷⁹. Os parâmetros foram determinados de modo análogo à validação por CLAE-EM/EM, conforme descrito no item 3.9.

Apenas para o estudo da linearidade, algumas alterações foram realizadas, em relação aos pontos da curva analítica, sendo que alguns analitos não apresentaram comportamento linear elaborando-se a curva analítica conforme os pontos apresentados na Tabela 8. Sendo assim, novos estudos de linearidade foram realizados, injetando-se diferentes concentrações dos analitos no cromatógrafo a líquido e estabeleceram-se novos intervalos de concentração, mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, para avaliação da linearidade do método por CLUE-EM/EM.

Agrotóxico	Níveis da curva analítica por CLUE-EM/EM				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Metamidofós	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Acefato	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Carbendazim	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Metomil	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Tiametoxam	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Imidacloprido	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Clotianidina	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Tiacloprido	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Carbaril	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Azoxistrobina	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Fenamidona	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Malationa	0,4xLMR	0,5xLMR	0,75xLMR	1xLMR	1,05xLMR
Iprodiona	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR
Procloraz	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Tebuconazol	1xLQi	2xLQi	3xLQi	4xLQi	5xLQi
Difenoconazol	0,5xLMR	0,7xLMR	1xLMR	1,2xLMR	1,4xLMR

De acordo com a Tabela 10, as concentrações em negrito representam as alterações feitas, comparando-se com a curva analítica elaborada em CLAE-EM/EM. As principais modificações foram realizadas para os analitos tiametoxam, imidacloprido, clotianidina e tiacloprido, na qual a curva analítica foi elaborada apenas em função do LMR, e para o analito iprodiona, no qual foi possível elaborar uma curva analítica em função do LMR, o que não ocorreu em CLAE-EM/EM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição das condições de análise por CLAE-EM/EM

4.1.1 Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação

Através da infusão direta no espectrômetro de massas, os analitos em estudo, na presença de ácido fórmico (modificador da fase móvel) e na fonte de *eletrospray*, foram ionizados na forma $[M+H]^+$, formando íons precursores, sendo M a massa monoisotópica de cada analito. No analisador, o íon precursor foi selecionado no primeiro quadrupolo e fragmentado na câmara de colisão, gerando fragmentos de diferentes intensidades que foram analisados no terceiro quadrupolo.

Dessa forma, foi possível definir o íon precursor e seus fragmentos, estabelecendo as transições de massa para a quantificação de cada analito (íon precursor > fragmento de maior intensidade) e para a confirmação de cada agrotóxico (íon precursor > fragmento com a segunda maior intensidade), assim como a voltagem do cone e a energia de colisão, parâmetros otimizados para cada transição de massa.

A Tabela 11 apresenta as transições de massas dos agrotóxicos utilizados, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone de cada analito.

Tabela 11: Apresentação das transições de massa definidas para cada agrotóxico estudado, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone otimizadas para cada transição.

Analito	Transição de Quantificação	Transição de Confirmação	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Metamidofós	141,87>93,3	141,87>124,5	14 (Q ^a) 14 (C ^b)	20
Acefato	184,06>142,7	184,06>124,5	10 (Q ^a) 22 (C ^b)	10
Carbendazim	192,13>159,8	192,13>131,7	16 (Q ^a) 28 (C ^b)	25
Metomil	163,00>87,2	163,00>105,4	12 (Q ^a) 10 (C ^b)	10
Tiametoxam	292,13>210,9	292,13>180,9	12 (Q ^a) 22 (C ^b)	15
Imidacloprido	256,13>174,9	256,13>209,1	18 (Q ^a) 12 (C ^b)	15
Clotianidina	250,13>168,8	250,13>131,5	12 (Q ^a) 14 (C ^b)	15
Tiacloprido	253,13>125,5	253,13>89,4	20 (Q ^a) 42 (C ^b)	25
Carbaril	202,19>144,7	202,19>126,7	12 (Q ^a) 28 (C ^b)	10
Azoxistrobina	404,25>372,0	404,25>344,1	12 (Q ^a) 24 (C ^b)	20
Fenamidona	312,19>91,3	312,19>236,0	24 (Q ^a) 14 (C ^b)	20
Malationa	331,19>126,6	331,19>98,3	12 (Q ^a) 22 (C ^b)	10
Iprodiona	330,06>244,9	330,06>287,9	16 (Q ^a) 10 (C ^b)	25
Procloraz	376,13>308,0	376,13>266,0	12 (Q ^a) 16 (C ^b)	15
Tebuconazol	308,25>69,1	308,25>124,6	20 (Q ^a) 32 (C ^b)	25
Difenoconazol	406,13>251,0	406,13>337,0	24 (Q ^a) 16 (C ^b)	30

^aTransição de quantificação. ^bTransição de confirmação.

4.1.2 Otimização da separação cromatográfica

A separação cromatográfica foi avaliada inicialmente através da eluição no modo isocrático, empregando-se a fase móvel MeOH:H₂O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) nas diferentes proporções: 20:80 (% v/v), 30:70 (% v/v), 40:60 (% v/v), 50:50 (% v/v), 60:40 (% v/v), 70:30 (% v/v) e 80:20 (% v/v). Através desses resultados, foi possível avaliar o tempo de eluição de cada agrotóxico e estudar o emprego da separação no modo gradiente, empregando-se variação na composição da fase móvel durante a separação cromatográfica, a fim de que os analitos eluam em menor tempo e com a mínima sobreposição de picos, evitando perdas na detectabilidade de cada analito.

A separação cromatográfica que conferiu melhor separação dos compostos em menor tempo de análise, para os 16 agrotóxicos estudados, foi a realizada no modo gradiente linear, variando-se a composição da fase móvel MeOH:H₂O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) da seguinte maneira: 0 min – 15:85; 4 min – 15:85; 7 min - 40:60; 10 min – 60:40; 15 min – 70:30; 20 min – 70:30; 25 min – 85:15; 28 min – 85:15; 30 min – 15:85; 40 min – 15:85, empregando-se vazão de 0,3 mL/min, temperatura de 25 °C e volume de injeção de 7 µL.

O cromatograma de íons totais (TIC: *Total Ion Chromatogram*) obtido, ou seja, quando há o monitoramento simultâneo das 32 transições de massa, durante os 40 minutos da análise cromatográfica, está representado na Figura 11. A Tabela 12 apresenta o tempo de retenção de cada analito, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, de acordo com a IUPAC⁸⁴.

Tabela 12: Tempo de retenção de cada agrotóxico estudado, no modo gradiente otimizado da separação cromatográfica por CLAE, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água de cada analito.

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	logP ^a	Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	logP ^a
Metamidofós	3,25	-0,79	Carbaril	16,21	2,36
Acefato	3,84	-0,85	Azoxistrobina	18,79	2,50
Carbendazim	6,47	1,48	Fenamidona	19,14	2,80
Metomil	9,72	0,09	Malationa	20,11	2,75
Tiametoxam	10,68	-0,13	Iprodiona	22,44	3,10
Imidacloprido	12,29	0,57	Procloraz	22,77	3,50
Clotianidina	12,51	0,91	Tebuconazol	24,09	3,70
Tiacloprido	13,86	1,26	Difenoconazol	27,21	4,36

^alogaritmo do coeficiente de partição octanol/água em pH 7 e 20 °C, de acordo com a IUPAC⁸⁴.

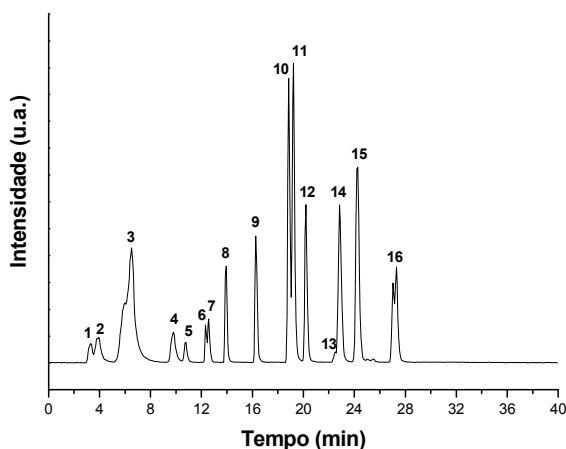


Figura 11: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido na separação cromatográfica dos 16 agrotóxicos estudados, utilizando-se coluna analítica XTerra® MS C18 (100 x 3,0 mm, 3,5 µm) e coluna de guarda XTerra® C18 (20 x 3,0 mm, 3,5 µm). Condições cromatográficas: volume de injeção: 7 µL; fase móvel MeOH:H₂O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) variando linearmente: 0 min – 15:85, 4 min – 15:85, 7 min – 40:60, 10 min – 60:40, 15 min – 70:30, 20 min – 70:30, 25 min – 85:15, 28 min – 85:15, 30 min – 15:85 e 40 min – 15:85; vazão de 0,3 mL/min e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) carbendazim, (4) metomil, (5) tiametoxam, (6) imidacloprido, (7) clotianidina, (8) tiacloprido, (9) carbaril, (10) azoxistrobina, (11) fenamidona, (12) malationa, (13) iprodiona, (14) procloraz, (15) tebuconazol e (16) difenoconazol.

4.1.3 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

A Tabela 13 apresenta os parâmetros do espectrômetro de massas avaliados. A definição das condições otimizadas foi baseada no comportamento do analito menos sensível, no caso, a iprodiona, sendo que os parâmetros selecionados conferiram maior detectabilidade a este composto, não prejudicando significativamente a ionização dos demais analitos.

Tabela 13: Parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas avaliados e otimizados para o aumento da detectabilidade dos agrotóxicos estudados.

Parâmetros	Níveis avaliados	Condição otimizada
Temperatura da Fonte (°C)	80; 100; 120; 140; 150	140
Temperatura do gás de dessolvatação (°C)	150; 250; 350; 400; 450; 500	500
Voltagem do capilar (kV)	2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5	4,0
Voltagem do cone extrator (V)	0; 1; 2; 3; 4; 5	3
Vazão do gás do cone (L/h)	50; 60; 70; 80; 90; 100	60
Vazão do gás de dessolvatação (L/h)	200; 400; 500; 600; 800; 900	800
RF Lens (V)	0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5	0,2

Após a definição dos parâmetros instrumentais, o cromatograma de íons totais obtido foi dividido em janelas, a fim de aumentar a detectabilidade dos analitos (modo MRM). Posteriormente, definiu-se o *dwell time* de cada janela, de modo que os picos cromatográficos fossem adquiridos com, no mínimo, 15 pontos.

A Tabela 14 apresenta a subdivisão do cromatograma otimizado em janelas, assim como o *dwell time* definido para cada intervalo de tempo.

Tabela 14: Compostos monitorados em cada intervalo de tempo da análise cromatográfica, assim como o *dwell time* definido para cada janela.

Número da Janela	Intervalo de Tempo (min)	Compostos Monitorados	Dwell Time (s)
1	0,00 – 11,85	Metamidofós, Acefato, Carbendazim, Metomil e Tiametoxam	0,2
2	11,30 – 13,30	Imidacloprido e Clotianidina	0,3
3	12,50 – 15,50	Tiacloprido	0,9
4	15,00 – 17,75	Carbaril	0,9
5	17,75 – 21,75	Azoxistrobina, Fenamidona e Malationa	0,3
6	20,75 – 26,25	Iprodiona, Procloraz e Tebuconazol	0,4
7	25,00 – 40,00	Difenoconazol	0,9

4.1.4 Determinação das concentrações iniciais de trabalho

Após a definição das condições cromatográficas de análise, foram injetadas no cromatógrafo a líquido soluções de diferentes concentrações dos analitos (1 a 150 µg/L), em metanol, a fim de definir as concentrações de trabalho (C_0) para cada analito. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

As C_0 foram definidas para cada analito como sendo a concentração que forneceu área de aproximadamente 1000 unidades para os analitos, sendo concentrações nas quais se pode facilmente distinguir o sinal analítico e o ruído do equipamento. Além disso, nessas concentrações, também foi possível garantir a repetibilidade da área em diferentes injeções. Para a iprodiona, que é o analito menos sensível, a C_0 foi definida como a concentração na qual se obteve área de 700 unidades, havendo distinção entre o sinal analítico e o ruído e baixo desvio entre as injeções.

As C_0 definidas também se encontram abaixo do LMR permitido para cada agrotóxico, em alface.

A partir dos dados obtidos para a determinação das concentrações de trabalho, também foi possível determinar a razão entre a intensidade dos íons de quantificação e

de confirmação, gerados por *eletrospray* no modo íon positivo. Esta razão é constante, sendo independente da concentração dos analitos e é importante para garantir a qualidade dos resultados obtidos, confirmando a identidade dos agrotóxicos analisados. As razões foram determinadas experimentalmente, através dos dados obtidos na análise da mistura de 50 µg/L, e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Concentrações iniciais de trabalho (C_0) para os agrotóxicos estudados e a razão entre os íons de quantificação e confirmação, obtida experimentalmente, assim como seus desvios teóricos aceitos, de acordo com o SANCO.

Agrotóxico	C_0 (µg/L)	$3 \times C_0$ (µg/L)	Razão entre os íons de quantificação e confirmação	Tolerância de desvio da razão entre os íons (SANCO) ^a
Metamidofós	20	60	2,3:1 (44%)	25%
Acefato	15	45	19,2:1 (5%)	50%
Carbendazim	5	15	8,3:1 (12%)	30%
Metomil	25	75	1,0:1 (99%)	20%
Tiametoxam	35	105	2,1:1 (47%)	25%
Imidacloprido	45	135	1,4:1 (70%)	20%
Clotianidina	30	90	1,5:1 (65%)	20%
Tiacloprido	15	45	5,6:1 (18%)	30%
Carbaril	10	30	5,4:1 (18%)	30%
Azoxistrobina	5	15	4,8:1 (21%)	25%
Fenamidona	5	15	1,7:1 (59%)	20%
Malationa	15	45	1,7:1 (58%)	20%
Iprodiona	45	135	5,6:1 (18%)	30%
Procloraz	10	30	8,9:1 (11%)	30%
Tebuconazol	5	15	13,9:1 (7%)	50%
Difenoconazol	10	30	3,0:1 (33%)	25%

^aAs tolerâncias aceitáveis de desvio da razão entre os íons expressas na tabela e utilizadas no trabalho estão descritas no Documento N° SANCO/12495/2011. No entanto, em revisões mais recentes deste guia (SANCO/12571/2013), as tolerâncias foram alteradas para 30%, independente do valor da razão entre os íons. Valores de tolerância maiores que 30% foram empregadas apenas para os analitos acefato e tebuconazol, porém não comprometeram a qualidade dos resultados obtidos.

A razão entre a intensidade dos íons é obtida normalizando a intensidade do íon de quantificação para 100%. Por exemplo, para o agrotóxico metamidofós, a intensidade do íon de quantificação é 2,3 vezes maior que a do íon de confirmação, sendo este 44% da altura do íon mais intenso.

4.2 Otimização do método de preparo de amostra QuEChERS

Para a definição do melhor procedimento de extração a ser aplicado em alface, as amostras submetidas aos diferentes procedimentos de extração QuEChERS (apresentados na Tabela 7) foram fortificadas com soluções padrão de cada agrotóxico nas concentrações de $3 \times C_0$, apresentadas na Tabela 15.

A escolha das condições de extração mais apropriadas para as amostras de alface foi feita com base nas porcentagens de recuperação de cada analito e nos coeficientes de variação (CV) obtidos na análise de três amostras. Para as modificações envolvendo a natureza do solvente extrator, modo de agitação, tipo de sal e sais de limpeza, também foram avaliados o efeito matriz e o teor de resíduo sólido.

4.2.1 Otimização do tempo e velocidade de centrifugação

A Figura 12 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos em estudo, variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação, empregando-se a acetonitrila como solvente, tampão salino citrato e limpeza da amostra com PSA e sulfato de magnésio.

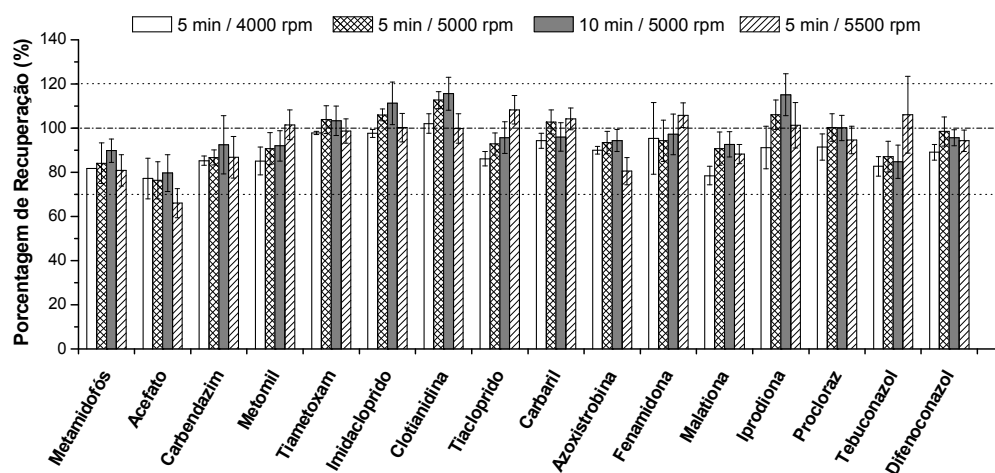


Figura 12: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação.

Analisando-se a Figura 12, observa-se que todos os tempos e rotações empregados forneceram resultados aceitáveis de recuperação (70-120%), de acordo com o SANCO, exceto para o composto acefato, ao utilizar-se rotação de 5 min a 5500 rpm. Os coeficientes de variação foram menores que 20%, em todos os ensaios, variando-se na faixa de 0,8 a 17%.

Em relação aos resultados da ANOVA (Tabela A.1 e Figura A.1 do Apêndice), 69% dos analitos apresentaram variação significativa ao empregar diferentes tempos e velocidades de centrifugação, além de maiores recuperações terem sido obtidas, para a maior parte dos analitos, ao empregar-se a rotação de 5000 rpm por 5 minutos. Portanto, essa condição foi selecionada para ser empregada no método QuEChERS.

4.2.2 Tempo de interação dos agrotóxicos nas amostras fortificadas

A Figura 13 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos em estudo, variando-se o tempo de interação da mistura de agrotóxicos adicionada nas amostras fortificadas antes da extração, empregando-se a acetonitrila como solvente extrator, tampão salino citrato, limpeza da amostra com PSA e sulfato de magnésio e centrifugação de 5 min a 5000 rpm.

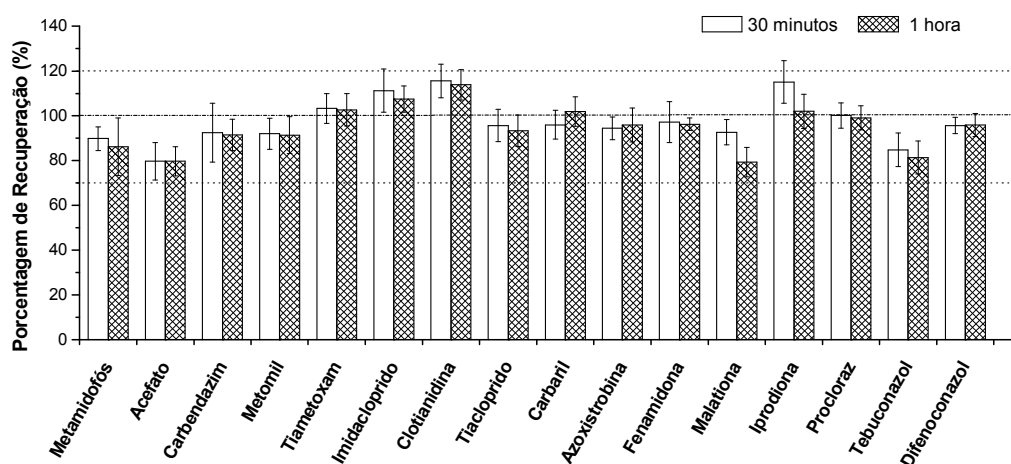


Figura 13: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o tempo de interação entre os agrotóxicos adicionados às amostras, antes da realização da extração.

De acordo com os resultados, obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa de 70-120%, com coeficientes de variação menores que 20% (na faixa de 3 a 13%), para ambas as condições avaliadas. Em relação à ANOVA (Tabela A.2 e Figura A.2 do Apêndice), todos os analitos, exceto a malationa, apresentaram variação não significativa ao empregar-se 30 minutos ou 1 hora. Diante disso, o tempo de interação de 30 minutos foi selecionado para ser empregado no método, por ser o menor tempo e ser suficiente para possibilitar a interação dos agrotóxicos com a matriz^{33,87}.

4.2.3 Definição do tipo de sal

A Figura 14 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos em estudo, variando-se a natureza dos sais utilizados na segunda etapa de extração do QuEChERS, empregando-se a acetonitrila como solvente, limpeza da amostra com PSA e sulfato de magnésio e centrifugação de 5 minutos a 5000 rpm.

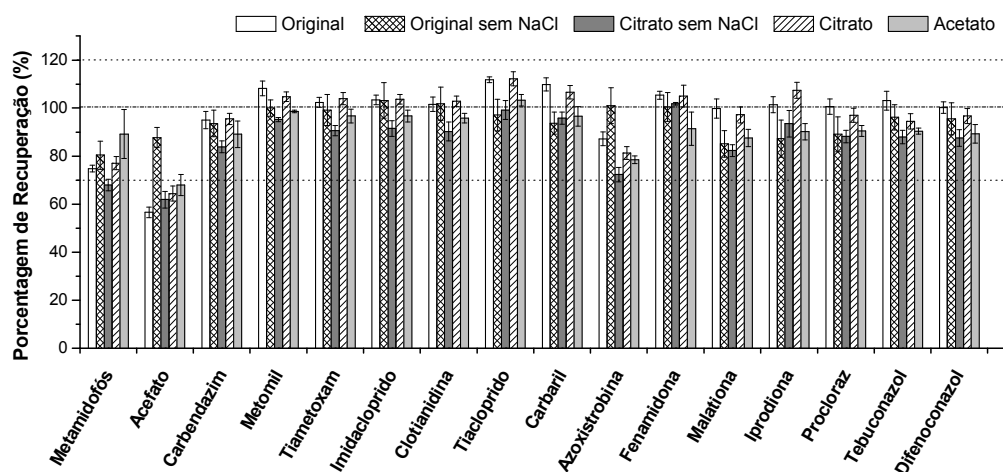


Figura 14: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se a natureza dos sais utilizados na segunda etapa de extração.

De acordo com a Figura 14, obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa aceita pela literatura (70-120%), exceto para o analito acefato, que apresentou recuperações menores que 70%, para todos os tipos de sais testados, com exceção do sal sulfato de magnésio, utilizado no método original sem cloreto de sódio. Esse comportamento do acefato pode ser justificado pelo fato deste analito ser o mais polar entre todos os agrotóxicos estudados, conforme se pode observar pelos valores do coeficiente de partição octanol/água apresentados nas Tabelas 5 e 12, tendo maior afinidade pelo meio aquoso, não sendo extraído facilmente pela acetonitrila.

A utilização do método original e do tampão citrato sem a presença do cloreto de sódio foi avaliada com o intuito de aumentar as porcentagens de recuperação dos analitos mais polares (metamidofós e acefato, principalmente), uma vez que a literatura⁴¹ relata que menores quantidades deste sal, ou sua ausência, fornece maiores porcentagens de recuperação. No entanto, experimentalmente, apenas se observou um aumento significativo na porcentagem de recuperação destes analitos com o emprego do método original sem NaCl, ou seja, somente com a adição de sulfato de magnésio. No entanto, com o emprego desse sal, para os demais analitos (mais apolares), obtiveram-se menores recuperações, sendo seu uso mais desfavorável que o emprego de outras misturas de sais.

As melhores porcentagens de recuperação foram obtidas empregando-se o método original e o método que emprega o tampão citrato. Os coeficientes de recuperação obtidos foram menores que 10%, para todas as modificações avaliadas.

Através dos resultados da ANOVA (Tabela A.3 e Figura A.3 do Apêndice), o emprego de sais de diferentes naturezas forneceu variações significativas nos valores de porcentagens de recuperação para todos os analitos estudados, além de ser comprovada, estatisticamente, a obtenção de maiores porcentagens de recuperação para o uso dos sais dos métodos original e citrato.

Empregando-se o tampão acetato, duas possibilidades de limpeza da amostra foram avaliadas, a primeira com 175 mg de PSA e 1,050 g de MgSO_4 , como os demais ensaios e, a segunda, usando o dobro da quantidade de PSA, como sugerem artigos na literatura^{23,26}. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15.

De acordo com os resultados obtidos e através da ANOVA (Tabela A.4 e Figura A.4 do Apêndice), pode-se verificar que a utilização de maior quantidade de PSA na etapa de limpeza da amostra, juntamente com o tampão acetato, não foi significativamente diferente para a maioria dos compostos estudados, com exceção da fenamidona. No entanto, mesmo empregando-se menor quantidade de PSA, o tampão acetato apresentou recuperações menores que as obtidas nos métodos que utilizaram os sais original e tampão citrato, para a maioria dos analitos (exceto para o metamidofós e o acefato), conforme observado na Figura 14.

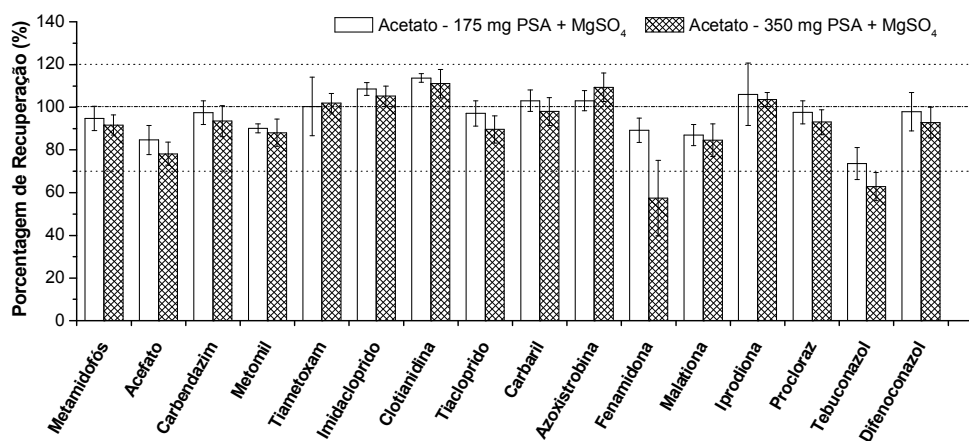


Figura 15: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS com o tampão salino acetato, variando-se a quantidade de PSA utilizada na etapa de limpeza da amostra.

A Tabela 16 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C_0 e $3 \times C_0$), determinados através da Equação 6, empregando-se o procedimento de extração QuEChERS com diferentes tipos de sais.

Tabela 16: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se extração por QuEChERS com sais de diferentes naturezas na segunda etapa de extração.

Agrotóxico	Efeito Matriz (%)									
	Tipo de sal e nível de fortificação									
	Original		Acetato		Citrato		Citrato sem NaCl		Original sem NaCl	
	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$
Metamidofós	46	38	-11	-14	89	78	25	133	-47	-59
Acefato	1	-7	-4	-13	13	4	17	66	-21	-36
Carbendazim	15	-2	9	-3	15	0	11	1	-16	-33
Metomil	6	-3	6	-4	5	-5	8	-1	-8	-25
Tiametoxam	0	-10	-5	-12	1	-12	-2	-11	-31	-50
Imidacloprido	-5	-16	-20	-21	-7	-15	-18	-20	-39	-52
Clotianidina	-12	-24	-26	-29	-12	-21	-26	-30	-47	-60
Tiacloprido	-14	-18	-25	-24	-13	-17	-20	-19	-28	-45
Carbaril	-23	-30	-30	-32	-27	-28	-27	-26	-33	-42
Azoxistrobina	4	4	-16	-10	-1	0	-7	4	-13	-27
Fenamidona	9	-2	60	12	5	-3	21	3	78	-4
Malationa	3	-4	-5	-7	-2	-4	1	-2	-8	-22
Iprodiona	-14	35	-20	15	-16	35	-15	27	-5	12
Procloraz	5	-3	-5	-1	8	-4	-3	0	-1	-18
Tebuconazol	6	-1	4	-2	9	-1	11	5	2	-17
Difenoconazol	-1	-8	-10	-9	-5	-7	-1	-5	-7	-21

A Figura 16 (Figuras 16A e 16B) apresenta o número de analitos que possuem efeito matriz negligenciáveis ou significativos, em dois níveis de fortificação (C_0 e $3xC_0$), baseados nos dados da Tabela 16. A Figura 16C apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método gravimétrico, expressando a quantidade média de matriz extraída, utilizando-se diferentes tipos de sais no método QuEChERS.

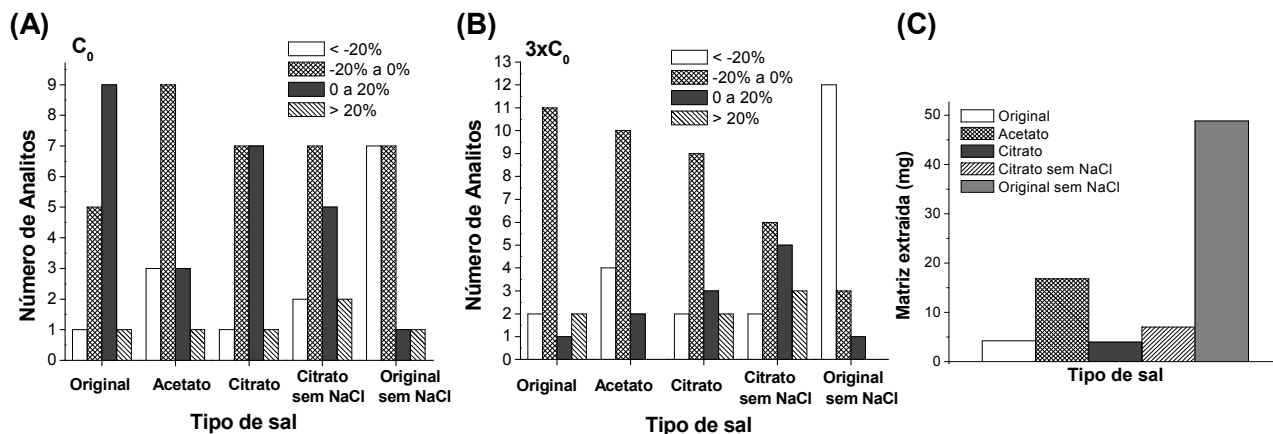


Figura 16: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de sal empregado no método QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 ; (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.

Analisando-se a Tabela 16 e as Figuras 16A e 16B, observa-se que nos dois níveis de fortificação, os métodos original e com tampão citrato apresentaram apenas 12,5% e 25% dos analitos, respectivamente, nos níveis C_0 e $3xC_0$, com efeito matriz significativo (superior/inferior a 20%/-20%), sendo estes os sais que apresentaram maior número de analitos com efeito matriz na faixa de $0 \pm 20\%$ (efeito matriz desprezível). Em relação aos demais sais estudados, empregando-se o método com o sal sulfato de magnésio (original sem NaCl) observa-se que mais de 50% dos analitos apresentam efeito matriz significativo, enquanto que os métodos com uso dos sais citrato sem NaCl e acetato apresentam mais de 25% dos compostos com efeito matriz significativo, nos dois níveis de fortificação avaliados. Esse efeito matriz pronunciado não é favorável, uma vez que pode interferir na análise dos agrotóxicos.

Colaborando com estes resultados, na Figura 16C pode-se observar que os sais empregados nos métodos original e com tampão citrato forneceram as menores quantidades de matriz extraída, além de menor número de picos (aproximadamente 57) terem sido observados nos cromatogramas desses extratos, obtido no modo varredura, em comparação com os resultados obtidos pela análise dos demais extratos estudados (mais de 70 picos), indicando que menos componentes da matriz estão sendo extraídos juntamente com os analitos, o que é desejável a fim de minimizar a interferência da matriz na quantificação dos analitos e preservar o sistema cromatográfico.

Diante desses resultados, dentre os sais do método original e o tampão citrato, o uso do tampão foi preferido para ser empregado no método em desenvolvimento, pelo fato de fornecer a menor quantidade de matriz extraída, e por fornecer as maiores porcentagens de recuperação para os analitos, principalmente os polares, em virtude da adição de maior quantidade de sal, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica.

4.2.4 Definição do solvente extrator

A Figura 17 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos, variando-se o solvente utilizado na extração do método QuEChERS, empregando-se tampão citrato, limpeza com PSA e $MgSO_4$ e centrifugação de 5 min a 5000 rpm.

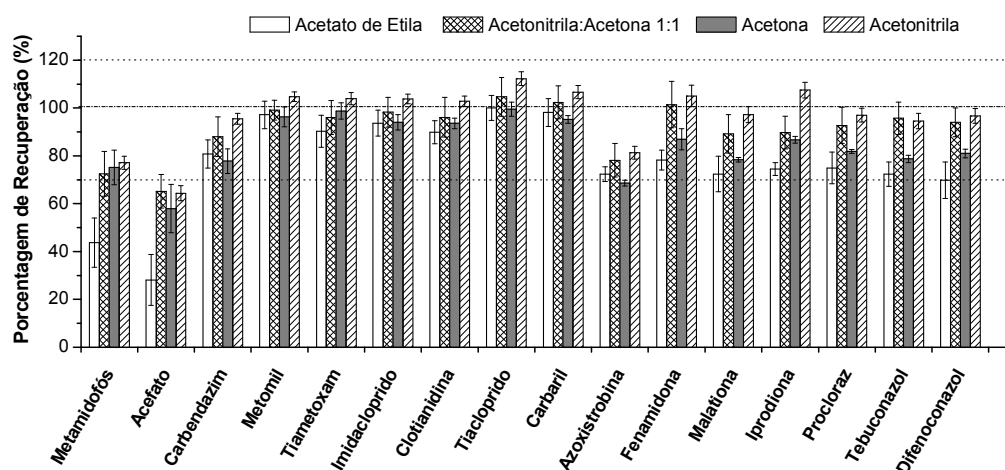


Figura 17: Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se o solvente extrator utilizado na primeira etapa de extração.

Analisando-se a Figura 17, o uso da acetonitrila forneceu as maiores porcentagens de recuperação, estando na faixa aceita pela literatura (70-120%), exceto para o analito acefato, que apresentou porcentagem de recuperação abaixo de 70%. Além disso, os coeficientes de variação foram menores que 11%. Através dos resultados da análise de variância (Tabela A.5 e Figura A.5 do Apêndice), o emprego de diferentes solventes extratores forneceu variações significativas nos valores de porcentagens de recuperação para todos os analitos estudados, além de ter sido comprovado, estatisticamente, a obtenção de maiores porcentagens de recuperação para 75% dos analitos, com o uso da acetonitrila.

O uso da acetona forneceu porcentagens de recuperação mais baixas, possivelmente devido ao fato de ser miscível em água, não havendo uma boa separação entre as fases orgânica e aquosa, mesmo após a adição dos sais na etapa de partição do método QuEChERS, ficando os analitos, em sua maioria, na fase aquosa. Com o uso da acetonitrila, embora também seja miscível em água, a adição de sais ao extrato faz com que ocorra a separação entre as fases, garantindo elevadas recuperações para analitos de diferentes polaridades.

Em relação aos demais solventes, o emprego da mistura acetonitrila e acetona (1:1) apresentou porcentagens de recuperação menores do que as obtidas apenas com o uso da acetonitrila, para a maioria dos analitos. O acetato de etila, por sua vez, forneceu as recuperações mais baixas para a maioria dos agrotóxicos estudados (63%),

principalmente para os analitos mais polares (metamidofós e acefato), possivelmente pelo fato desse solvente possuir caráter mais apolar que a água e os demais solventes estudados.

A Tabela 17 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C_0 e $3xC_0$), determinado através da Equação 6, empregando-se o procedimento de extração QuEChERS com diferentes solventes.

Tabela 17: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com diferentes solventes extratores.

Agrotóxico	Efeito Matriz (%)							
	Tipo de solvente extrator e nível de fortificação							
	Acetato de Etila		Acetonitrila:acetona 1:1		Acetona		Acetonitrila	
	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$	C_0	$3xC_0$
Metamidofós	369	288	-16	-41	-70	-75	89	78
Acefato	91	111	-12	-38	-48	-52	13	4
Carbendazim	9	-4	2	-14	-13	-29	15	0
Metomil	3	-8	0	-18	-21	-29	5	-5
Tiametoxam	1	-10	-24	-39	-50	-54	0	-12
Imidacloprido	0	-9	-28	-40	-50	-57	-7	-15
Clotianidina	-5	-13	-35	-49	-58	-62	-12	-21
Tiacloprido	-3	-14	-16	-34	-32	-41	-13	-17
Carbaril	-8	-16	-30	-42	-44	-47	-27	-28
Azoxistrobina	-5	-13	-1	-16	-18	-20	-1	0
Fenamidona	-3	-11	86	5	92	13	5	-3
Malationa	1	-7	3	-12	-8	-12	-2	-4
Iprodiona	-10	28	-5	19	-18	34	-16	35
Procloraz	-1	-8	5	-8	-1	-4	8	-4
Tebuconazol	1	-7	20	-8	3	-3	9	-1
Difenoconazol	-1	-8	-7	-15	-9	-9	-5	-7

A Figura 18 (Figuras 18A e 18B) apresenta o número de analitos que possuem efeito matriz negligenciáveis ou significativos, baseados nos dados da Tabela 17. A Figura 18C apresenta os resultados obtidos pelo método gravimétrico, utilizando-se diferentes tipos de solvente no método QuEChERS.

Analisando-se a Tabela 17 e as Figuras 18A e 18B, observa-se que nos níveis de fortificação C_0 e $3xC_0$, os solventes acetato de etila e acetonitrila apresentaram menor número de analitos com efeito matriz significativo (menos de 25% dos analitos). Com o emprego da mistura de acetonitrila:acetona (1:1) e com o uso de apenas acetona, respectivamente, mais de 31% e 56% dos compostos apresentam efeito matriz

significativo. Em relação à quantidade de matriz extraída, de acordo com a Figura 18C, a acetonitrila forneceu os melhores resultados, sendo o solvente que extraiu a menor quantidade de componentes da matriz, o que também foi possível observar através dos cromatogramas obtidos no modo varredura, havendo a presença de menor número de picos nos extratos obtidos com o uso da acetonitrila, em comparação com os demais solventes (para a acetona, por exemplo, obteve-se o cromatograma com maior número de picos). Esse comportamento pode ser justificado possivelmente pelo fato da acetonitrila remover uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos²⁰.

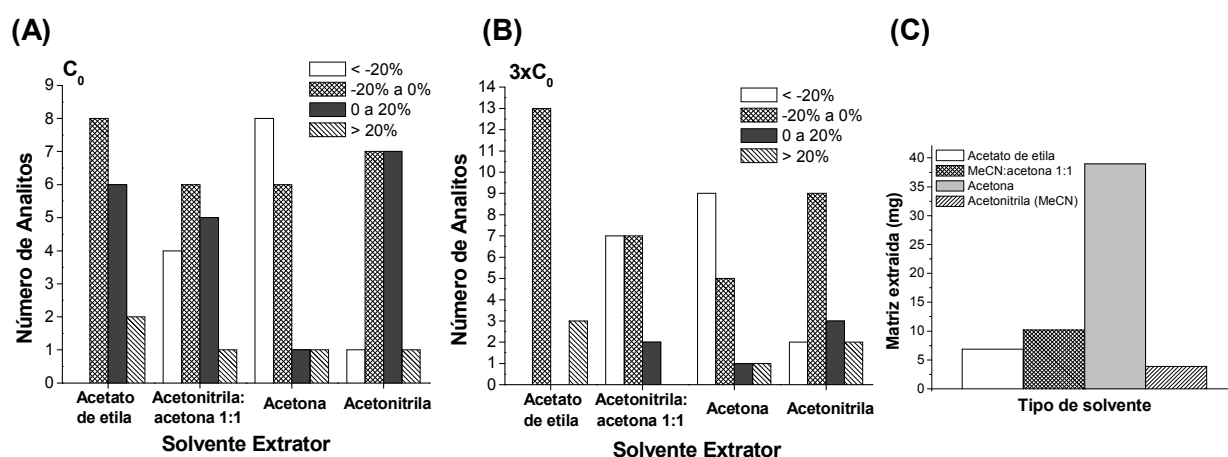


Figura 18: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de solvente extrator empregado em QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 , (B) $3xC_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.

Portanto, analisando-se as porcentagens de recuperação e o efeito matriz de cada tipo de solvente empregado, pode-se concluir que a acetonitrila é o solvente mais adequado para ser empregado como solvente extrator no procedimento de extração por QuEChERS.

4.2.5 Definição dos sais de limpeza da amostra

A Figura 19 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos, variando-se os sais de limpeza da amostra. Cada experimento foi realizado utilizando-se acetonitrila, tampão citrato e centrifugação de 5 min a 5000 rpm.

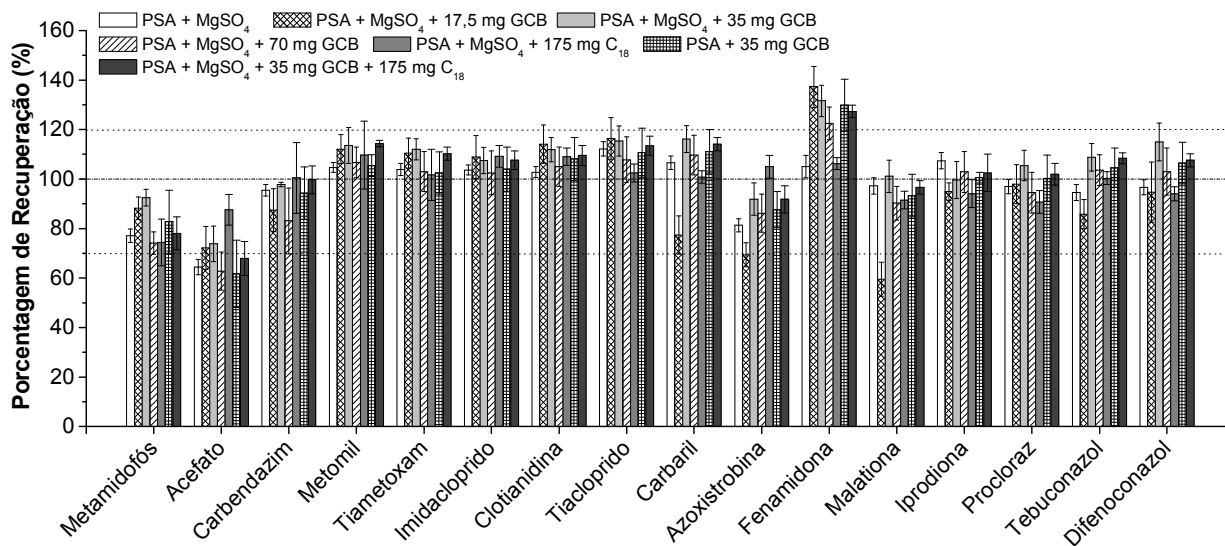


Figura 19: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS, variando-se os sais de limpeza da amostra.

Inicialmente, estudou-se a quantidade de carbono grafitizado (GCB) a ser empregada (0, 17,5, 35 e 70 mg), juntamente com os sais PSA e MgSO_4 , uma vez que este sorvente tem demonstrado ser eficiente na remoção de clorofila, presente em grande quantidade na alface.

Analisando-se a Figura 19, observa-se que as maiores porcentagens de recuperação, para a maioria dos analitos, foram obtidas utilizando-se a mistura de PSA e MgSO_4 , juntamente com 35 mg de GCB. Para todos os analitos, exceto a iprodiona, o emprego de 70 mg de GCB não foi favorável, havendo diminuição da porcentagem de recuperação, comparando-se com os resultados obtidos com a adição de 35 mg de GCB, possivelmente devido à absorção dos analitos no excesso de GCB. A utilização de 17,5 mg de GCB também não foi favorável, havendo baixas porcentagens de recuperação, principalmente para os analitos azoxistrobina e malationa (recuperação abaixo de 70%). Em relação à análise de variância (Tabela A.6 e Figura A.6 do Apêndice), para 63% dos analitos estudados a quantidade de GCB presente na mistura de sais de limpeza afeta significativamente a porcentagem de recuperação dos analitos.

Com o emprego da mistura de sais PSA, MgSO_4 e 35 mg GCB todos os analitos, inclusive o acefato, apresentaram recuperações acima de 70%. O composto

fenamidona, por sua vez, apresentou recuperação acima de 120%, devido ao efeito matriz. Para todas as combinações de sais estudadas, os coeficientes de variação obtidos foram menores que 15%.

Além das boas recuperações obtidas com o uso de 35 mg de GCB, visualmente, observa-se que os extratos obtidos são mais límpidos e com coloração menos intensa, comparado ao extrato obtido sem o uso do GCB, fazendo com que menos interferentes possam ser injetados no cromatógrafo a líquido. As colorações dos extratos obtidos estão apresentadas na Figura 20.

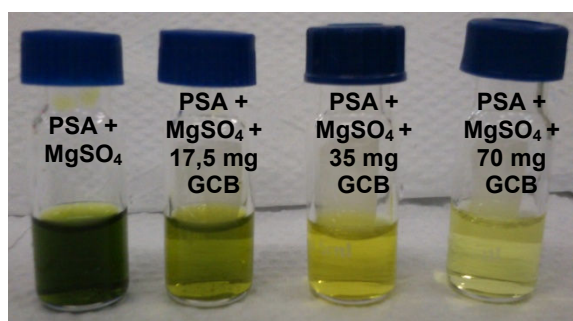


Figura 20: Ilustração das colorações dos extratos obtidos após extração por QuEChERS e limpeza da amostra com PSA, MgSO_4 e diferentes quantidades de carbono grafítico.

Após a definição da quantidade de GCB a ser utilizada no método de extração, realizaram-se outros ensaios, empregando-se C18 e outras combinações de sais, também apresentados na Figura 19, com intuito de otimizar a etapa de limpeza da amostra.

Analisando-se os resultados obtidos (Figura 19), tem-se que o uso das misturas PSA/GCB e PSA/ MgSO_4 /GCB/C18 não foi favorável para o analito acefato, obtendo-se porcentagens de recuperação abaixo de 70%. Para a mistura de sais PSA/ MgSO_4 /C18, obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa de 70-120%, para todos os agrotóxicos estudados. Portanto, em termos de recuperação, as misturas de sais que conferiram melhores resultados foram: PSA/ MgSO_4 /C18 e PSA/ MgSO_4 /35 mg GCB.

A Tabela 18 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C_0 e $3 \times C_0$), empregando-se diferentes sais na etapa de limpeza da amostra.

Tabela 18: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se QuEChERS com diferentes sais de limpeza da amostra.

Agrotóxico	Efeito Matriz (%)													
	Sais de limpeza ^a e nível de fortificação													
	1		2		3		4		5		6		7	
	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀
Metamidofós	89	78	96	31	28	27	85	30	47	44	-2	-7	149	185
Acefato	13	4	50	19	20	13	42	11	20	21	0	-6	64	131
Carbendazim	15	0	18	-2	13	-5	13	-4	13	1	3	-8	11	0
Metomil	5	-5	0	-7	-1	-7	3	-6	-6	-1	-12	-12	-4	-2
Tiametoxam	0	-12	-12	-17	-14	-18	-12	-16	-11	-10	-31	-29	-7	-11
Imidacloprido	-7	-15	-15	-23	-14	-22	-14	-21	-17	-17	-30	-30	-16	-17
Clotianidina	-12	-21	-26	-32	-26	-31	-25	-30	-28	-25	-41	-38	-28	-27
Tiacloprido	-13	-17	-16	-23	-16	-23	-15	-21	-18	-18	-24	-25	-17	-19
Carbaril	-27	-28	-31	-35	-31	-35	-28	-33	-30	-31	-32	-30	-33	-32
Azoxistrobina	-1	0	3	4	9	-8	14	1	15	7	-10	-8	6	3
Fenamidona	5	-3	33	2	33	2	27	5	17	4	69	16	18	6
Malationa	-2	-4	7	-3	8	-1	9	0	5	1	-1	-3	3	0
Iprodiona	-16	35	-2	51	5	56	6	52	-2	52	-6	59	-4	67
Procloraz	8	-4	8	0	5	1	5	3	4	2	3	2	4	2
Tebuconazol	9	-1	7	-1	16	-1	7	1	5	2	3	3	3	2
Difenoconazol	-5	-7	25	-10	1	-5	-1	-5	1	0	2	-3	2	-4

^aSais de limpeza da amostra: 1) 175 mg PSA e 1,050 g MgSO₄; 2) 175 mg PSA, 1,050 g MgSO₄ e 17,5 mg GCB; 3) 175 mg PSA, 1,050 g MgSO₄ e 35 mg GCB; 4) 175 mg PSA, 1,050 g MgSO₄ e 70 mg GCB; 5) 175 mg PSA, 1,050 g MgSO₄ e 175 mg C₁₈; 6) 175 mg PSA e 35 mg GCB e 7) 175 mg PSA, 1,050g MgSO₄, 35 mg GCB e 175 mg C₁₈.

A Figura 21 apresenta os estudos de efeito matriz, empregando o método da comparação do sinal analítico (Figura 21A) e o método gravimétrico (Figura 21B).

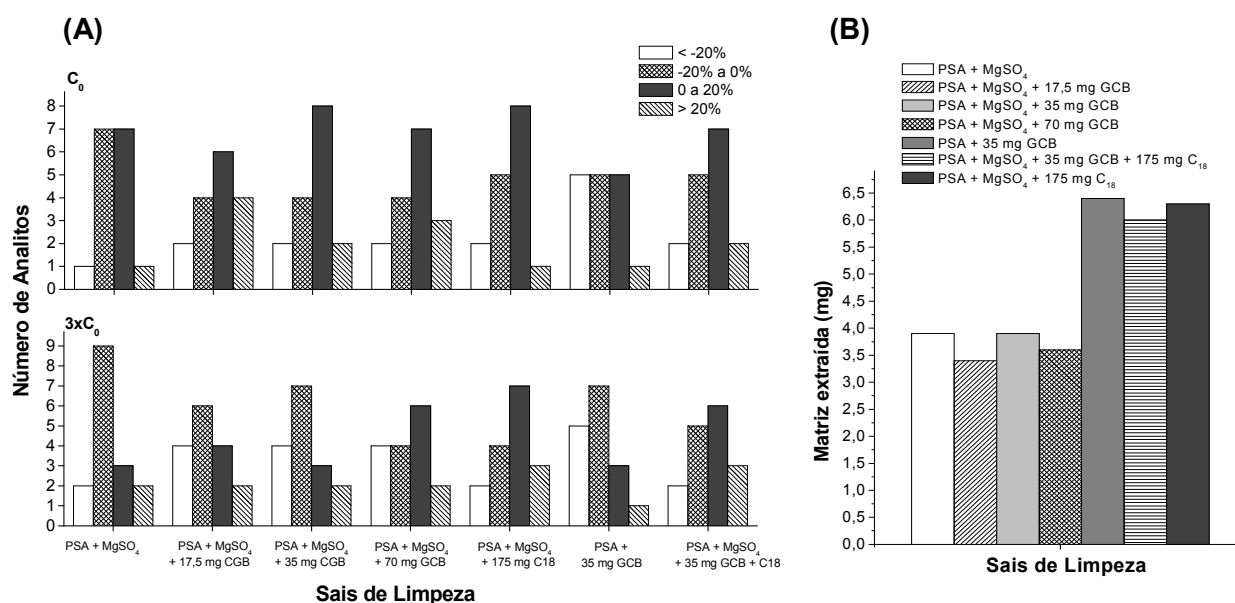


Figura 21: (A) Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de sal de limpeza empregado em QuEChERS, avaliado em dois níveis de fortificação (C₀ e 3xC₀) e (B) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.

Analisando-se a Tabela 18 e a Figura 21A, pode-se observar que as amostras submetidas à etapa de limpeza com PSA/MgSO₄, PSA/MgSO₄/35 mg GCB, PSA/MgSO₄/GCB/C18 e PSA/MgSO₄/C18 apresentaram menor número de analitos com efeito matriz significativo, em ambos os níveis de fortificação. Também, foi possível observar que o uso do C18 não conferiu nenhuma limpeza adicional à amostra, possivelmente pelo fato de ser eficiente na remoção de lipídios, que estão em baixas quantidades na matriz estudada.

Através da Figura 21B, pode-se observar que menor quantidade de componentes sólidos foi extraída da amostra, empregando-se os sais PSA/MgSO₄ e PSA/MgSO₄/GCB na etapa de limpeza da amostra do procedimento QuEChERS. Em relação à análise cromatográfica dos extratos “branco”, menor número de picos foi visualizado ao se empregarem as misturas de sais PSA, MgSO₄ e diferentes quantidades de GCB.

Portanto, a partir dos resultados de recuperação e efeito matriz, conclui-se que a mistura de sais 175 mg PSA, 1,050 g de MgSO₄ e 35 mg de GCB será empregada na etapa de limpeza das amostras de alface, uma vez que forneceu as maiores porcentagens de recuperação, baixo teor de resíduo sólido e efeito matriz pouco pronunciável.

4.2.5.1 Avaliação do sorvente Si(PFPMS)

A Figura 22 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas para os agrotóxicos, empregando-se o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza da amostra juntamente com combinações dos sais PSA, MgSO₄ e GCB. Cada experimento foi realizado utilizando-se tampão citrato, acetonitrila e centrifugação de 5 min a 5000 rpm.

Analisando a Figura 22, observa-se que para a maioria dos compostos obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa de 70 a 120%, exceto para o composto fenamidona, nos três diferentes experimentos estudados. O composto malationa também apresentou baixa porcentagem de recuperação, quando submetido à limpeza da amostra com o Si(PFPMS) e o MgSO₄. Os coeficientes de variação encontraram-se abaixo de 20%, na faixa de 1 a 12%, para todos os agrotóxicos analisados.

O comportamento da fenamidona frente ao sorvente Si(PFPMS) pode ser explicado devido ao mecanismo de seletividade diferencial dos sorventes do tipo fenil, uma vez que estes podem interagir com os analitos através de interações hidrofóbicas e interações do tipo π - π (entre grupos funcionais insaturados ou aromáticos). No caso da fenamidona, que possui em sua estrutura dois anéis aromáticos, átomos de nitrogênio e ligações duplas, sendo um composto com elevada densidade eletrônica (Figura 9), há uma forte interação do tipo π - π com o sorvente fenil, que também possui elétrons π em sua estrutura.

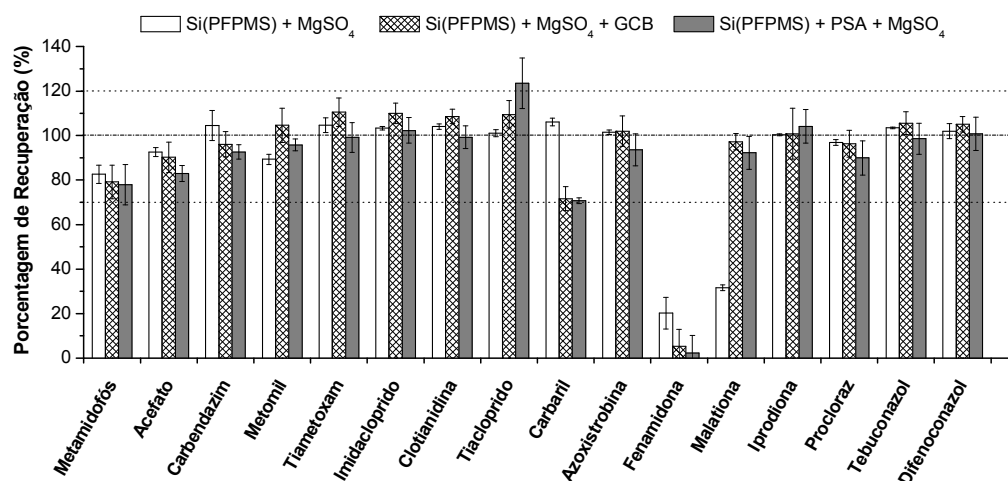


Figura 22: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método QuEChERS com o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza da amostra.

Para os demais analitos que possuem anéis aromáticos em sua estrutura (Figura 9), há também substituintes altamente eletronegativos no anel, como cloro e oxigênio, fazendo com que a densidade eletrônica desses anéis seja diminuída, disponibilizando menos elétrons π para interagirem fortemente com o sorvente fenil. Para esses compostos, obtiveram-se recuperações na faixa aceitável da literatura.

Através da análise de variância (Tabela A.7 e Figura A.7 do Apêndice), em termos de recuperação, as variações estudadas não foram significativas para 56% dos analitos. A fim de se avaliar a possível substituição do PSA pelo Si(PFPMS), realizou-se análise de variância comparando-se os resultados de recuperação obtidos com o emprego das misturas PSA/MgSO₄/GCB e Si(PFPMS)/MgSO₄/GCB. De acordo com os resultados obtidos (Tabela A.8 e Figura A.8 do Apêndice), para 81% dos analitos

(exceto o metamidofós, o acefato e a fenamidona), a variação estudada não foi significativa, podendo o sorvente Si(PFPMS) ser empregado em substituição ao PSA, obtendo-se resultados satisfatórios de recuperação, para a maioria dos analitos estudados (com exceção da fenamidona, para a qual se obteve recuperações abaixo de 50%), além de reduzir os custos envolvidos na etapa de preparo de amostra.

A Tabela 19 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C_0 e $3 \times C_0$). Na Figura 23, pode-se visualizar o número de analitos que apresentam efeito matriz negligenciáveis ou significativos, baseado nos dados da Tabela 19, assim como a quantidade média de matriz extraída, determinada pelo método gravimétrico (Figura 23C), empregando-se o sorvente do tipo fenil em diferentes combinações com outros sais de limpeza da amostra.

Tabela 19: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o sorvente Si(PFPMS) como um dos sais de limpeza da amostra.

Agrotóxico	Limpeza da amostra ^a com Si(PFPMS) – Efeito Matriz (%)					
	Si(PFPMS) + MgSO ₄		Si(PFPMS) + MgSO ₄ + GCB		Si(PFPMS) + PSA + MgSO ₄	
	LDi	3LDi	LDi	3LDi	LDi	3LDi
Metamidofós	-42	-42	-36	-37	-16	-15
Acefato	-12	-23	-7	-15	-12	-10
Carbendazim	-11	-18	-13	-10	-2	8
Metomil	23	-11	42	-6	73	1
Tiametoxam	-30	-25	-26	-24	-6	-3
Imidacloprido	-27	-29	-24	-25	1	-8
Clotianidina	-31	-36	-24	-35	-4	-15
Tiacloprido	-23	-25	-19	-19	-10	-7
Carbaril	-20	-22	-15	-15	-6	-10
Azoxistrobina	70	-5	63	17	90	39
Fenamidona	-8	-91	-6	-63	1	-19
Malationa	0	187	-1	2	108	7
Iprodiona	412	224	442	232	408	245
Procloraz	8	1	9	6	5	6
Tebuconazol	4	0	5	6	6	7
Difenoconazol	-1	-4	0	2	-4	4

^aLimpeza da amostra realizada com misturas de 175 mg Si(PFPMS), 1,050 g MgSO₄, 175 mg PSA (quando utilizado) e 35 mg GCB (quando utilizado).

Analizando-se a Tabela 19 e as Figuras 23A e 23B, verifica-se que efeito matriz menos pronunciado é observado empregando-se a mistura Si(PFPMS)/PSA/MgSO₄, nos dois níveis de fortificação. Comparando-se os resultados com a mistura Si(PFPMS)/MgSO₄ sem PSA, observa-se um aumento pronunciável do número de

compostos que apresenta efeito matriz significativo, com valores inferiores a -20%. Portanto, diante disso, pode-se verificar que o PSA possui grande influência na eficiência da limpeza da amostra do que o Si(PFPMS).

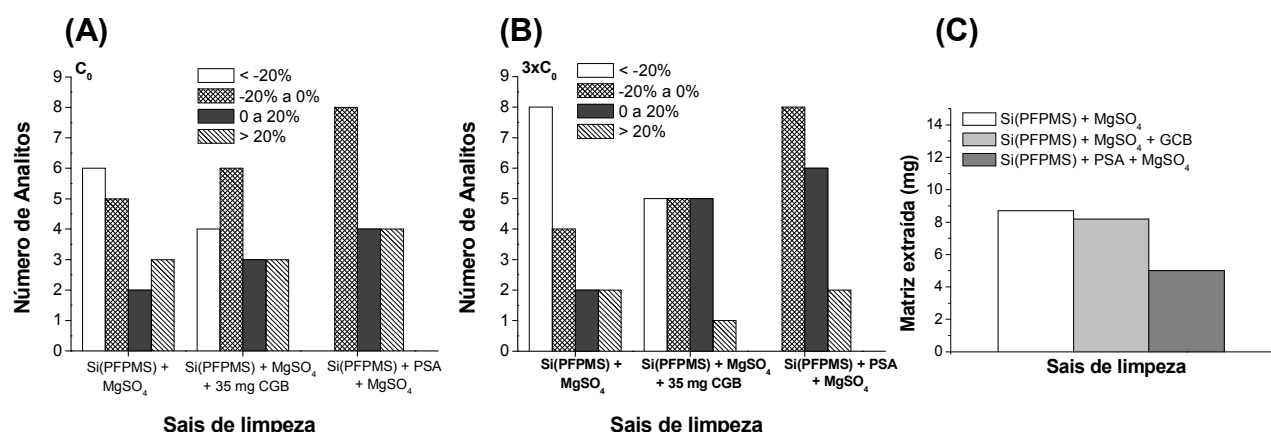


Figura 23: Distribuição numérica do efeito matriz, empregando o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza do método QuEChERS, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C_0 , (B) $3 \times C_0$; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.

Analisando-se a Figura 23C, tem-se que menor quantidade de resíduo sólido é obtida utilizando-se a mistura de Si(PFPMS)/PSA/ $MgSO_4$. Também, através da injeção no cromatógrafo dos extratos “branco”, observou-se menor número de picos ao empregar-se essa mistura de sais, em relação às demais combinações estudadas, contendo o sorvente Si(PFPMS). No entanto, a quantidade extraída é maior (aproximadamente 1,3 vezes) que a quantidade de matriz extraída empregando-se a limpeza da amostra com PSA/ $MgSO_4$ /35 mg GCB, sendo esse comportamento também observado ao se comparar os cromatogramas dos extratos “branco” das misturas Si(PFPMS)/ $MgSO_4$ /35 mg GCB e PSA/ $MgSO_4$ /35 mg GCB, nas quais se observou menor número de picos ao empregar-se o PSA.

Portanto, através dos resultados de recuperação, efeito matriz e teor de matriz sólida, o uso do sorvente Si(PFPMS), embora promissor, não se mostrou vantajoso para ser empregado na etapa de limpeza de amostras de alface, uma vez que fornece recuperações muito baixas para o composto fenamidona e é menos eficiente que o PSA para a limpeza do extrato, possivelmente pelo fato da matriz possuir elevado teor de pigmentos.

4.2.5.2 Emprego de ponteiras descartáveis na etapa de limpeza

A Tabela 20 apresenta os resultados de porcentagem de recuperação e efeito matriz avaliado através do método da comparação do sinal analítico (em dois níveis de fortificação), empregando-se as ponteiras descartáveis na etapa de limpeza da amostra, contendo a mistura de sais otimizada 37,5 mg PSA, 225 mg MgSO₄ e 7,5 mg GCB (quantidades proporcionais para a limpeza de 1,5 mL de extrato). O procedimento de preparo da amostra foi realizado utilizando-se tampão citrato, acetonitrila e centrifugação de 5 min a 5000 rpm apenas na etapa de extração.

Tabela 20: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o uso de ponteiras descartáveis na etapa de limpeza da amostra.

Agrotóxico	Porcentagem de Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)	Efeito Matriz (%) ^a	
			C ₀	3xC ₀
Metamidofós	91	3	22	7
Acefato	85	2	12	0
Carbendazim	96	4	2	5
Metomil	103	5	-4	-3
Tiametoxam	102	4	1	5
Imidacloprido	105	5	0	8
Clotianidina	102	4	-1	2
Tiacloprido	105	5	-3	0
Carbaril	106	5	-4	1
Azoxistrobina	105	10	14	13
Fenamidona	109	4	2	4
Malationa	102	4	6	4
Iprodiona	102	7	7	-4
Procloraz	96	4	2	1
Tebuconazol	100	2	2	5
Difenoconazol	109	2	0	1

^aEfeito matriz obtido pelo método da comparação do sinal analítico, determinado através da Equação 6.

Analisando-se os dados da Tabela 20, observa-se que todos os agrotóxicos estudados apresentaram porcentagens de recuperação na faixa de 70-120%, com coeficientes de variação abaixo de 20%.

Em termos de recuperação, realizou-se a análise de variância comparando-se os resultados obtidos com o método QuEChERS original, com agitação por vórtex e centrifugação, e o método empregando as ponteiras. De acordo com os resultados obtidos (Tabela A.9 e Figura A.9 do Apêndice), para a maioria dos analitos, com exceção do acefato e da fenamidona, obteve-se variação não significativa ao empregar ambos os métodos, indicando o uso promissor das ponteiras descartáveis.

Em relação ao efeito matriz, nos dois níveis de fortificação avaliados, observou-se que apenas o analito metamidofós apresentou efeito matriz significativo (acima de 20%), no nível C_0 . Comparando-se esses resultados com os obtidos pelo método QuEChERS realizado com os mesmos sais de limpeza, mas empregando-se agitação por vórtex e centrifugação, no qual 8 analitos apresentaram efeito matriz significativo, de acordo com a Tabela 18, observou-se que o uso das ponteiras descartáveis foi mais favorável, em relação ao efeito matriz. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato das ponteiras reterem os sais, conforme observado experimentalmente, não permitindo que eles migrem para o extrato. Com a realização do procedimento de limpeza empregando agitação por vórtex e centrifugação, ao coletar o sobrenadante, há possibilidades de pipetar quantidades de sais, que podem estar dispersos no extrato, influenciando na ionização do analitos e consequentemente, nos resultados de efeito matriz.

Também foram realizados estudos da quantidade de matriz extraída, através do método gravimétrico, empregando-se as ponteiras. Para a análise de 4 amostras de alface “branco” pesaram-se os extratos secos e obteve-se massa média de 2,9 mg de componentes da matriz extraídos. Comparando-se com os resultados do método gravimétrico empregando-se o método QuEChERS com agitação por vórtex e centrifugação, no qual se obteve 3,9 mg de componentes da matriz extraídos, conforme observado na Figura 21B, comprova-se que as ponteiras são eficientes na etapa de limpeza, principalmente evitando a dispersão dos sais no extrato.

Além disso, o uso das ponteiras descartáveis em substituição às etapas de agitação por vórtex e centrifugação, na etapa de limpeza da amostra, apresenta outras vantagens como a realização de análises mais rápidas (etapa realizada em apenas 1 minuto, para cada amostra) e a não necessidade de etapa adicional de filtração da amostra, uma vez que a ponteira já atua como filtro.

No entanto, uma desvantagem do uso dessas ponteiras é a disponibilidade comercial desses dispositivos, uma vez que há poucas empresas que comercializam esse produto, além de disponibilizarem poucas combinações de sais presentes no interior das ponteiras.

A Figura 24 apresenta uma ilustração das ponteiras utilizadas na etapa de limpeza do método QuEChERS, assim como os extratos de amostras de alface “branco” antes e após a submissão à etapa de limpeza da amostra, com o uso das ponteiras.

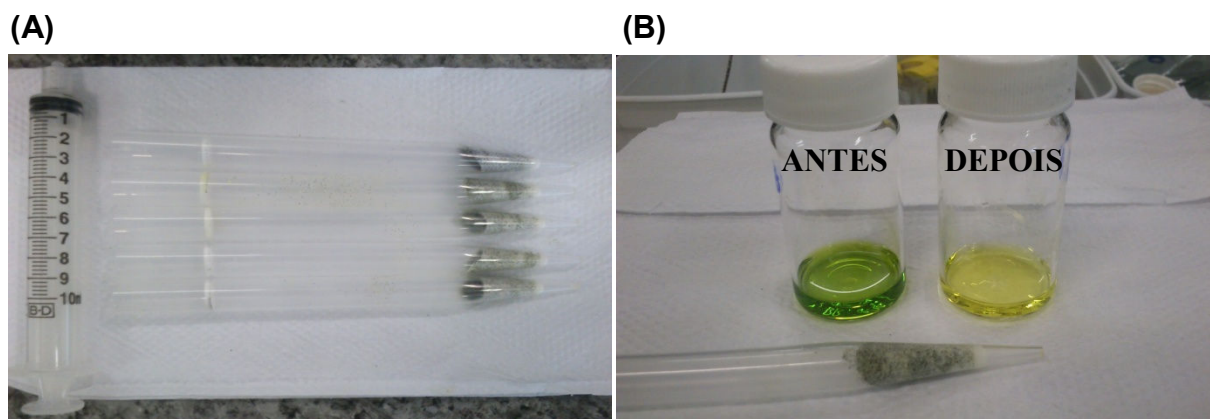


Figura 24: Representação ilustrativa das ponteiras descartáveis utilizadas na etapa de limpeza do método QuEChERS: (A) Ponteiras descartáveis, contendo a mistura de 37,5 mg PSA, 225 mg MgSO_4 e 7,5 mg de GCB. (B) Coloração dos extratos de amostra de alface antes e após a etapa de limpeza da amostra, empregando as ponteiras.

Portanto, através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o uso das ponteiras descartáveis é vantajoso, havendo redução no tempo e no número de etapas do preparo de amostra. No entanto, em virtude de sua indisponibilidade comercial, para análises de rotina o seu uso torna-se desfavorável.

4.2.5.3 Estudo do ultrassom como forma de agitação

O ultrassom é uma onda sonora que necessita de um meio físico para se propagar (por exemplo, água e solventes orgânicos), sendo bastante empregado na análise de amostras sólidas que necessitam de solventes para a extração dos analitos, gerando ciclos de expansão e compressão no meio líquido, que podem formar bolhas. O processo de formação e colapso das bolhas de ar na interface entre a matriz sólida e o meio líquido (cavitação) possibilita a extração de diferentes compostos da matriz para o solvente orgânico, devido às diferenças de pressão geradas, além de haver aumento da temperatura do meio, favorecendo a difusão dos analitos. Assim, de acordo com esse processo, o ultrassom pode ser empregado como forma de agitação no método QuEChERS, em substituição ao vórtex (agitação mecânica), favorecendo também o processo de extração dos analitos^{95,96}.

A Tabela 21 apresenta os resultados de porcentagem de recuperação e efeito matriz (em dois níveis de fortificação), empregando-se a agitação por ultrassom, nas etapas de extração e limpeza de amostra do método QuEChERS. O procedimento de extração foi realizado utilizando-se tampão citrato, acetonitrila, centrifugação de 5 min a 5000 rpm e limpeza da amostra com PSA, sulfato de magnésio e 35 mg de GCB.

Tabela 21: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com uso de ultrassom em substituição ao vórtex.

Agrotóxico	Porcentagem de Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)	Efeito Matriz (%) ^a	
			C ₀	3xC ₀
Metamidofós	79	20	99	59
Acefato	85	11	-7	8
Carbendazim	96	6	8	0
Metomil	102	4	-6	-8
Tiametoxam	104	6	11	15
Imidacloprido	102	3	-7	-2
Clotianidina	101	2	-23	-22
Tiacloprido	102	4	-31	-30
Carbaril	102	5	-28	-23
Azoxistrobina	101	6	-9	-8
Fenamidona	103	6	7	-6
Malationa	92	4	-3	-1
Iprodiona	91	2	13	25
Procloraz	87	5	-13	-4
Tebuconazol	103	5	-4	-3
Difenoconazol	101	5	-22	-13

^aEfeito matriz obtido pelo método da comparação do sinal analítico, determinado através da Equação 6.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 21, observa-se que todos os agrotóxicos estudados apresentaram porcentagens de recuperação na faixa de 70-120%, com coeficientes de variação abaixo de 20%.

Em termos de recuperação, a fim de se avaliar se existe diferença significativa entre o emprego da agitação por vórtex e o uso do ultrassom, realizaram-se estudos da análise de variância. De acordo com os resultados obtidos (Tabela A.10 e Figura A.10 do Apêndice), para 69% dos analitos não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as porcentagens de recuperação obtidas com o uso do vórtex e do ultrassom.

Em relação ao efeito matriz, através do método da comparação do sinal analítico (Tabela 21), observou-se que 6 analitos apresentaram efeito matriz significativo, considerando os dois níveis de fortificação, com o uso do ultrassom. Além disso, em

relação ao método gravimétrico, obteve-se uma quantidade média de matriz extraída igual a 15,8 mg. Essa quantidade elevada de componentes extraídos da matriz deve-se, principalmente, à presença de sais no extrato, uma vez que não se observou uma separação completa entre as fases orgânica e aquosa, mesmo após centrifugação das amostras. Através da análise cromatográfica do extrato “branco” obtido empregando-se ultrassom, observou-se a presença de 250 picos, sendo um valor aproximadamente 6 vezes maior do que o número de picos observados com o uso da agitação por vórtex.

Em relação ao procedimento operacional, ao empregar o ultrassom ao invés da agitação por vórtex, há ganhos em relação ao tempo total da etapa de extração, uma vez que várias amostras podem ser extraídas simultaneamente no ultrassom, o que não ocorre ao empregar o vórtex, que permite a agitação de apenas uma amostra por vez.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o uso do ultrassom em substituição ao vórtex seria vantajoso, reduzindo o tempo total da etapa de preparo de amostra, porém o seu uso não permitiu uma separação completa entre as fases aquosa e orgânica, durante as etapas de partição com sais e de limpeza da amostra, fazendo com que grande quantidade de sal permanecesse no extrato, influenciando na ionização dos analitos e comprometendo o sistema cromatográfico.

4.2.6 Estudo da radiação micro-ondas para a extração dos agrotóxicos

A Tabela 22 apresenta os resultados de porcentagem de recuperação e efeito matriz obtidos através do método da comparação do sinal analítico (em dois níveis de fortificação), empregando-se a radiação micro-ondas na extração dos agrotóxicos em amostras de alface.

Analisando-se os resultados da Tabela 22, observa-se que resultados semelhantes foram obtidos para as amostras submetidas à etapa de extração por micro-ondas com e sem a etapa adicional de limpeza da amostra, com os sais PSA, $MgSO_4$ e GCB, não se observando variação significativa para todos os analitos estudados, com exceção do carbendazim, de acordo com os resultados da ANOVA, apresentados na Tabela A.11 e na Figura A.11 do Apêndice.

Em relação ao efeito matriz, apenas 4 analitos apresentaram efeito matriz significativo, no entanto, entre esses analitos, o metamidofós apresentou efeito matriz

muito elevado, acima de 300% no nível C_0 , indicando que houve a extração de algum componente da matriz que está influenciando na ionização deste analito.

Em relação aos resultados obtidos pelo método gravimétrico, obtiveram-se elevadas quantidades de matriz extraída em ambos os experimentos realizados (6,0 mg), sugerindo que há maior quantidade de componentes da matriz extraídos ao utilizar-se a radiação micro-ondas em relação ao método QuEChERS otimizado, o que também foi observado na análise do número de picos dos cromatogramas dos extratos “branco”, havendo 4 vezes mais picos no extrato obtido com o uso das micro-ondas.

Tabela 22: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com uso de micro-ondas com e sem a etapa de limpeza da amostra.

Agrotóxico	Extração por micro-ondas sem limpeza ^a				Extração por micro-ondas com limpeza ^b			
	Recuperação (%)	CV (%)	Efeito Matriz (%) ^c		Recuperação (%)	CV (%)	Efeito Matriz (%) ^c	
			C_0	$3xC_0$			C_0	$3xC_0$
Metamidofós	99	20	587	79	71	6	506	341
Acefato	103	15	66	35	83	5	23	9
Carbendazim	104	10	-5	25	78	6	3	0
Metomil	85	20	-4	19	79	7	-12	3
Tiametoxam	111	9	-6	24	100	11	-8	3
Imidacloprido	107	4	-4	14	101	6	-3	7
Clotianidina	105	5	4	12	100	5	0	6
Tiacloprido	103	4	8	-1	102	5	-1	2
Carbaril	98	5	-3	-1	93	8	-3	3
Azoxistrobina	106	4	10	14	102	5	2	6
Fenamidona	106	6	-1	4	100	5	0	4
Malationa	85	11	2	8	76	11	6	4
Iprodiona	118	3	4	8	103	18	-12	-13
Procloraz	95	4	-1	0	92	6	1	0
Tebuconazol	89	7	-1	5	102	8	26	2
Difenoconazol	98	7	3	-7	100	8	48	0

^aResultados obtidos através da extração por micro-ondas com o uso de acetonitrila e sulfato de magnésio, sem etapa adicional de limpeza da amostra. ^bResultados obtidos através da extração por micro-ondas com etapa de limpeza da amostra empregando 175 mg PSA, 1,050 g $MgSO_4$ e 35 mg GCB.

^cEfeito matriz realizado através do método da comparação do sinal analítico.

Em termos de porcentagem de recuperação dos analitos, comparando-se a extração por micro-ondas com o método QuEChERS otimizado, observa-se que houve uma redução na recuperação para a maioria dos analitos, empregando-se as micro-ondas, fato que foi estatisticamente comprovado através dos resultados da análise de variância, apresentados na Tabela A.12 e na Figura A.12 do Apêndice.

Portanto, tem-se que a realização da extração dos agrotóxicos em alface por micro-ondas não é mais vantajoso que o uso do método QuEChERS otimizado, uma vez que menores recuperações foram obtidas, além de maiores quantidades de componentes da matriz serem extraídas, afetando na ionização dos analitos.

4.3 Quantificação dos agrotóxicos em alface pelo método QuEChERS

Através dos estudos para a otimização do preparo da amostra pelo método QuEChERS, definiu-se que a extração será realizada com o uso de acetonitrila, tampão salino citrato, centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm, limpeza da amostra com 175 mg PSA, 1,050 g MgSO_4 e 35 mg GCB e agitação com vórtex. Esta condição foi definida estudando as porcentagens de recuperação dos analitos no nível de fortificação $3 \times C_0$. A fim de confirmar a eficiência deste método, aplicaram-se essas condições otimizadas em amostras de alface, porém fortificadas na concentração C_0 , em dois diferentes dias. Analisando-se os resultados, obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa de 73 a 118%, com coeficientes de variação entre 0,6 e 9%, comprovando que o método de extração otimizado é eficiente para a análise de amostras de alface.

Após a otimização da etapa de preparo da amostra e antes da validação do método, realizaram-se alguns estudos, a fim de definir como seriam elaboradas as curvas analíticas para quantificação dos agrotóxicos.

No Brasil, para a quantificação de agrotóxicos em alimentos, comumente observa-se que a curva analítica é elaborada incluindo o LMR de cada agrotóxico permitido para ser aplicado na cultura, uma vez que se objetiva saber se as amostras analisadas encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA ou não. Por outro lado, para os agrotóxicos não permitidos, a curva analítica é elaborada abrangendo a menor concentração possível dos agrotóxicos, geralmente em função do limite de quantificação, uma vez que, de acordo com as legislações, esses agrotóxicos não devem ser encontrados nas culturas.

Para as amostras de alface, alguns agrotóxicos permitidos para aplicação possuem limites máximos de resíduos muito elevados, como a malationa (8 mg/kg) e a fenamidona (2 mg/kg). Nesses casos, o emprego da extração por QuEChERS com fator de concentração de 5 vezes não se torna viável, uma vez que serão injetadas no

cromatógrafo a líquido soluções de elevadas concentrações, que poderão influenciar na eficiência de ionização dos analitos no EM e até mesmo, saturar o detector.

Em relação aos agrotóxicos que não possuem LMR, em virtude da elevada detecção do espectrômetro de massas, ainda é possível determinar pequenas quantidades desses analitos, mesmo sem a etapa de concentração dos extratos das amostras. Portanto, diante disso, será empregado o método de preparo de amostra QuEChERS sem a etapa de concentração da amostra.

4.4 Validação do método por CLAE-EM/EM

4.4.1 Limites de detecção e de quantificação por CLAE-EM/EM

A Tabela 23 apresenta os dados das curvas analíticas obtidas para cada analito, elaboradas a partir da concentração de trabalho C_0 , utilizando-se a matriz “branco” fortificada, para determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento.

Tabela 23: Dados das curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico, empregadas na determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento.

Agrotóxico	Dados da curva analítica por CLAE-EM/EM				LDi ^a (µg/L)	LQi ^b (µg/L)	LMR (µg/kg) ^c
	Desvio do coeficiente linear (s)	Coeficiente angular (S)	r ²	s/S			
Metamidofós	118,2	65,7	0,998	1,8	5,9	18,0	NA ^d
Acefato	96,3	66,8	0,998	1,4	4,8	14,4	NA ^d
Carbendazim	245,3	487,6	0,998	0,5	1,7	5,0	NA ^d
Metomil	90,8	37,5	0,998	2,4	8,0	24,2	NA ^d
Tiametoxam	62,0	20,2	0,998	3,1	10,1	30,7	50
Imidacloprido	88,7	23,5	0,998	3,8	12,5	37,7	500
Clotianidina	102,1	32,1	0,998	3,2	10,5	31,8	100
Tiacloprido	145,4	98,9	0,998	1,5	4,9	14,7	200
Carbaril	40,4	81,5	0,999	0,5	1,6	5,0	NA ^d
Azoxistrobina	214,1	404,1	0,998	0,5	1,7	5,3	1000
Fenamidona	119,3	361,4	0,999	0,3	1,1	3,3	2000
Malationa	105,4	130,3	0,999	0,8	2,7	8,1	8000
Iprodiona	33,7	7,3	0,998	4,6	15,2	46,1	1000
Procloraz	218,0	213,8	0,998	1,0	3,4	10,2	NA ^d
Tebuconazol	184,9	450,7	0,999	0,4	1,4	4,1	NA ^d
Difenoconazol	176,4	259,6	0,999	0,7	2,2	6,8	500

^aLDi (limite de detecção do instrumento) calculado como 3,3 vezes a razão s/S; ^bLQi (limite de quantificação do instrumento) calculado como 10 vezes a razão s/S. ^cLMR de acordo com a ANVISA para a alface; ^dNA: agrotóxico não autorizado para emprego em alface.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que os limites de detecção e quantificação do instrumento alcançaram valores bem menores que os LMR estabelecidos pela ANVISA para os agrotóxicos autorizados para uso na cultura da alface. Para os agrotóxicos não permitidos para aplicação em alface (carbendazim, acefato, carbaril, tebuconazol, metamidofós, metomil e procloraz) obtiveram-se limites de quantificação abaixo de 24 µg/L.

4.4.2 Linearidade e curva analítica por CLAE-EM/EM

A Tabela 24 apresenta os intervalos definidos para a elaboração da curva analítica, os limites de quantificação do método (LQ) ajustados para cada agrotóxico estudado e os dados de regressão linear das curvas elaboradas em solvente (padronização externa) e por padronização externa com superposição de matriz, assim como os resíduos obtidos. De acordo com o documento SANCO, os resíduos devem ser inferiores a $\pm 20\%$ e para níveis de fortificação superiores ou iguais aos LMR os resíduos não devem ultrapassar $\pm 10\%$.

Tabela 24: Pontos definidos para a elaboração das curvas analíticas de cada agrotóxico, assim como os intervalos de concentração compreendidos pela curva, o limite de quantificação do método e os dados das curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz.

Agrotóxico	Intervalo de linearidade (µg/kg)	LQ ^e (µg/kg)	Padronização externa				Superposição de matriz			
			Coef. linear	Coef. angular	r ²	Res. ^f	Coef. linear	Coef. angular	r ²	Res. ^f
Metamidofós	18 – 90 ^a	18	47,2	32,6	1,000	< 2%	-284,7	112,5	0,999	< 5%
Acefato	14 – 70 ^a	14	138,4	44,4	0,999	< 8%	-251,1	75,5	0,999	< 3%
Carbendazim	5 – 25 ^a	5	-99,0	340,8	0,999	< 4%	-487,8	527,7	0,999	< 3%
Metomil	24 – 120 ^a	24	-116,4	31,8	0,998	< 3%	-142,9	38,0	0,999	< 3%
Tiametoxam	31 – 70 ^b	31	-8,2	13,9	0,998	< 2%	-89,5	20,7	0,996	< 5%
Imidacloprido	38 – 700 ^b	38	120,1	16,9	1,000	< 9%	-12,9	21,4	0,999	< 9%
Clotianidina	32 – 140 ^b	32	3,6	20,8	0,996	< 7%	-102,7	28,8	0,999	< 3%
Tiacloprido	15 – 280 ^b	15	-46,3	75,6	1,000	< 4%	-114,7	97,1	1,000	< 8%
Carbaril	5 – 25 ^a	5	71,5	96,7	0,998	< 5%	52,1	105,6	0,999	< 3%
Azoxistrobina	500 – 1400 ^c	500	20470,5	290,1	1,000	< 1%	-11222,7	378,6	0,998	< 5%
Fenamidona	1000 – 2800 ^c	1000	35638,3	279,3	0,998	< 4%	-10507,6	345,5	0,996	< 6%
Malationa	3200 – 8400 ^d	3200	55074,0	86,8	0,992	< 9%	1224,0	117,1	0,995	< 3%
Iprodiona	46 – 230 ^a	46	15,4	3,0	0,999	< 4%	-30,0	5,2	0,997	< 5%
Procloraz	10 – 50 ^a	10	-12,4	189,2	0,998	< 3%	-274,3	218,1	0,998	< 3%
Tebuconazol	5 – 25 ^a	5	113,4	324,3	1,000	< 3%	-211,0	405,2	0,999	< 3%
Difenoconazol	250 – 700 ^c	250	3727,1	188,6	0,998	< 3%	-6747,0	232,5	0,994	< 7%

Intervalo de linearidade: ^aLQ_i-5LQ_i; ^bLQ_i-1,4LMR; ^c0,5LMR-1,4LMR e ^d0,4LMR-1,05LMR. ^eLQ (limite de quantificação do método) estabelecido como o primeiro ponto da curva analítica. ^fResíduos da curva analítica, em módulo.

A Figura 25 apresenta as curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico estudado e a Figura 26 apresenta o gráfico de resíduos da regressão linear.

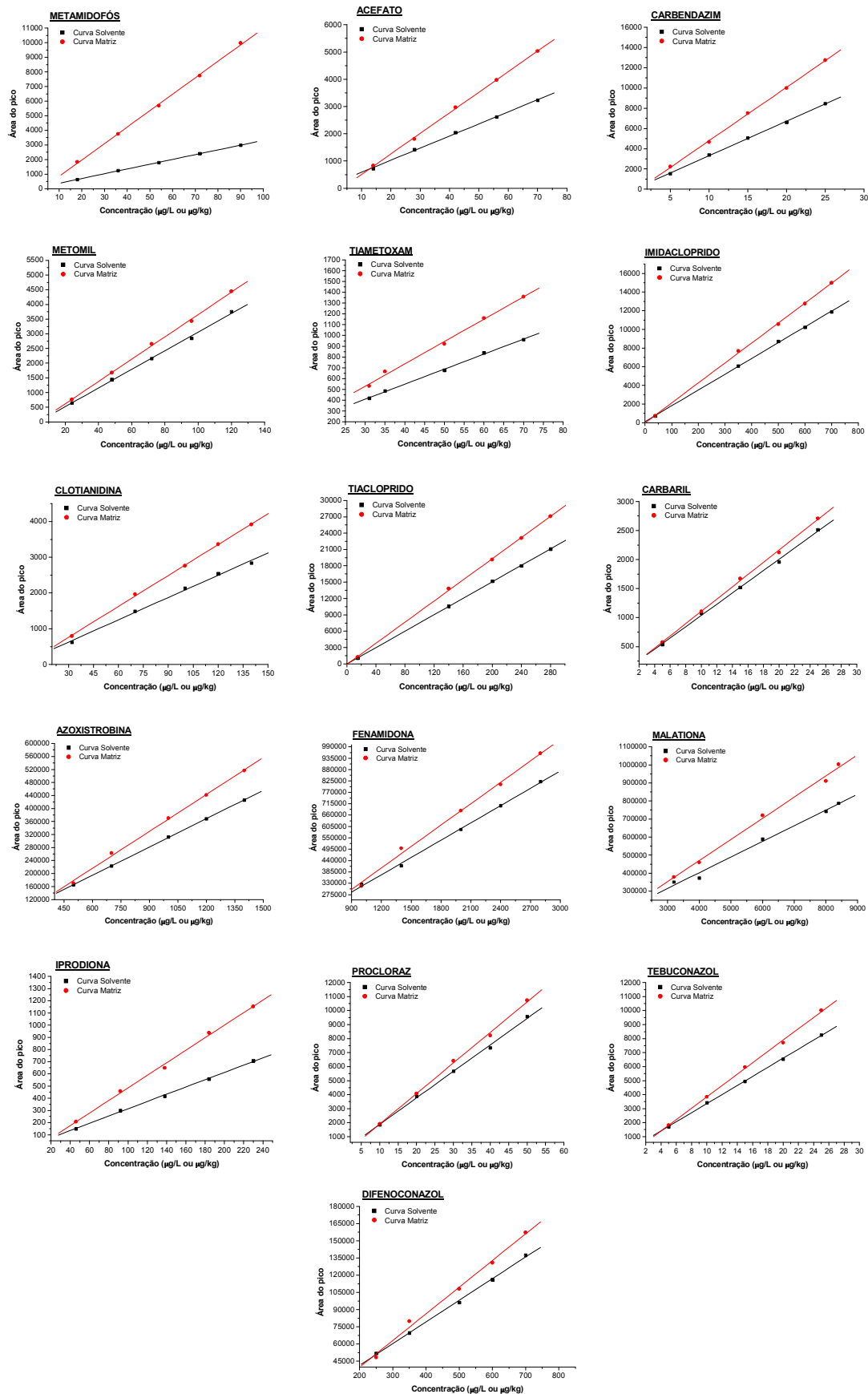


Figura 25: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados.

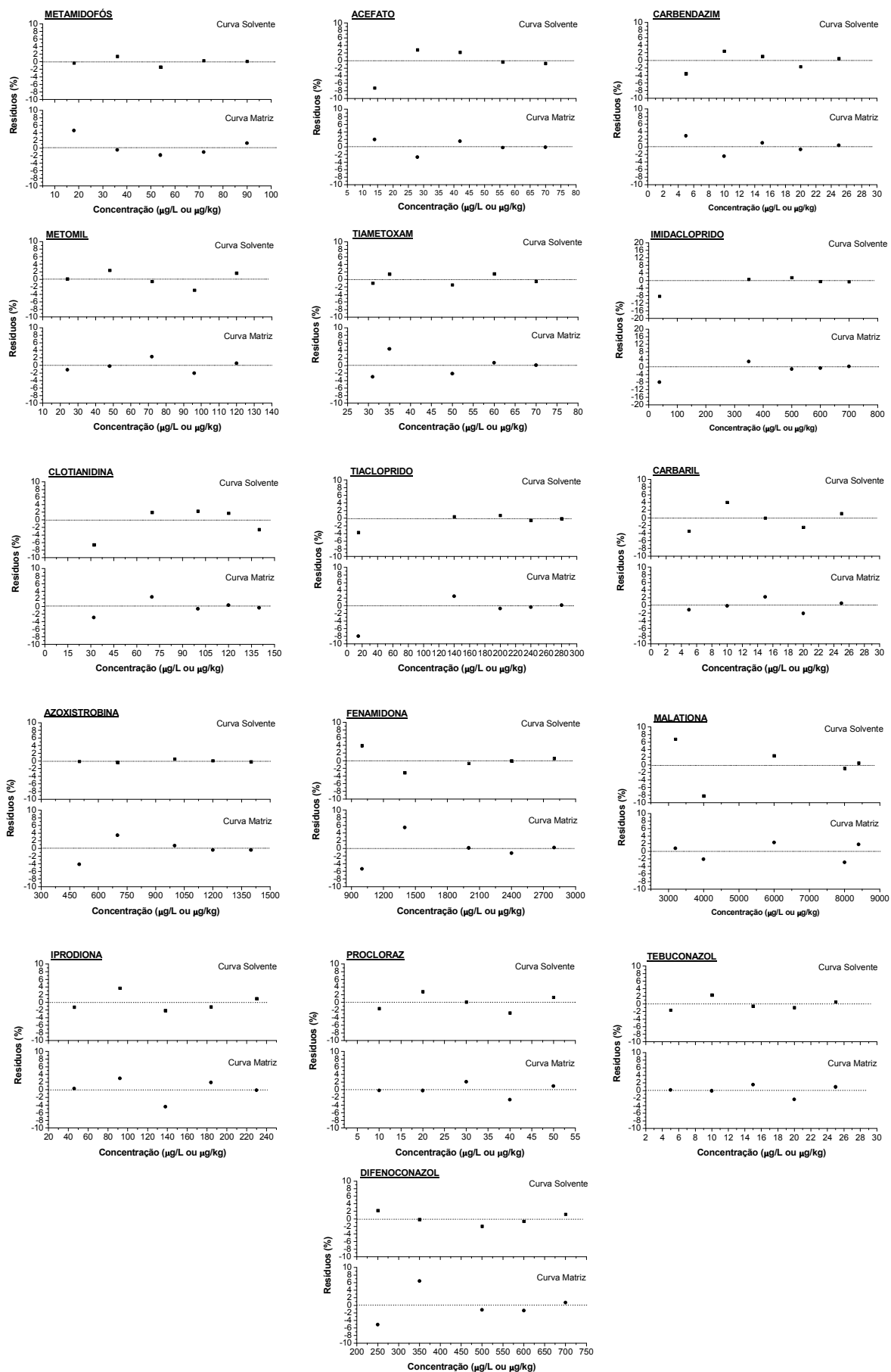


Figura 26: Resíduos da regressão linear obtida para cada um dos analitos estudados.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 24 e na Figura 25, tem-se que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo, apresentando coeficiente de determinação acima de 0,99 e resíduos abaixo de 9% e valores visualmente aleatórios (Figura 26), não mostrando tendência, confirmando a linearidade do método.

Analisando-se a Figura 25, comparando-se as curvas elaboradas em solvente e por superposição de matriz, observa-se que elas são diferentes, possuindo coeficientes linear e angular bem distintos, caracterizando a necessidade de se utilizarem curvas analíticas elaboradas com a matriz, para a quantificação dos agrotóxicos, devido ao efeito matriz presente, conforme também observado nos estudos realizados na otimização da etapa de preparo de amostra. Também, pode-se observar que as curvas analíticas elaboradas na matriz apresentaram maior coeficiente angular que as curvas em solvente, para todos os analitos estudados, indicando ganho de sinal dos analitos na presença da matriz, nos níveis de concentração na qual as curvas foram elaboradas.

4.4.3 Seletividade por CLAE-EM/EM

A Figura 27 apresenta a comparação entre os sinais analíticos de amostras de alface “branco” e fortificadas no nível do limite de quantificação do método (apresentados na Tabela 24), a fim de avaliar a seletividade do método.

Analisando-se as Figuras 27A e 27B, que foram apresentadas em escalas diferentes para facilitar a visualização dos ruídos na Figura 27A, observa-se que na amostra “branco” há um pico intenso em 18,4 minutos, que poderia interferir na quantificação do composto fenamidona, que elui em aproximadamente 19 minutos. No entanto, como a concentração deste analito é elevada no LQ, a área do interferente tornou-se desprezível frente à área do analito, como pode ser observado também comparando a intensidade dos picos (a intensidade do sinal do analito é aproximadamente 1000 vezes maior que a intensidade do interferente).

Para os demais analitos, não se observou a presença de interferentes próximos aos tempos de retenção dos compostos.

Portanto, através desse estudo, conclui-se que o método desenvolvido é seletivo.

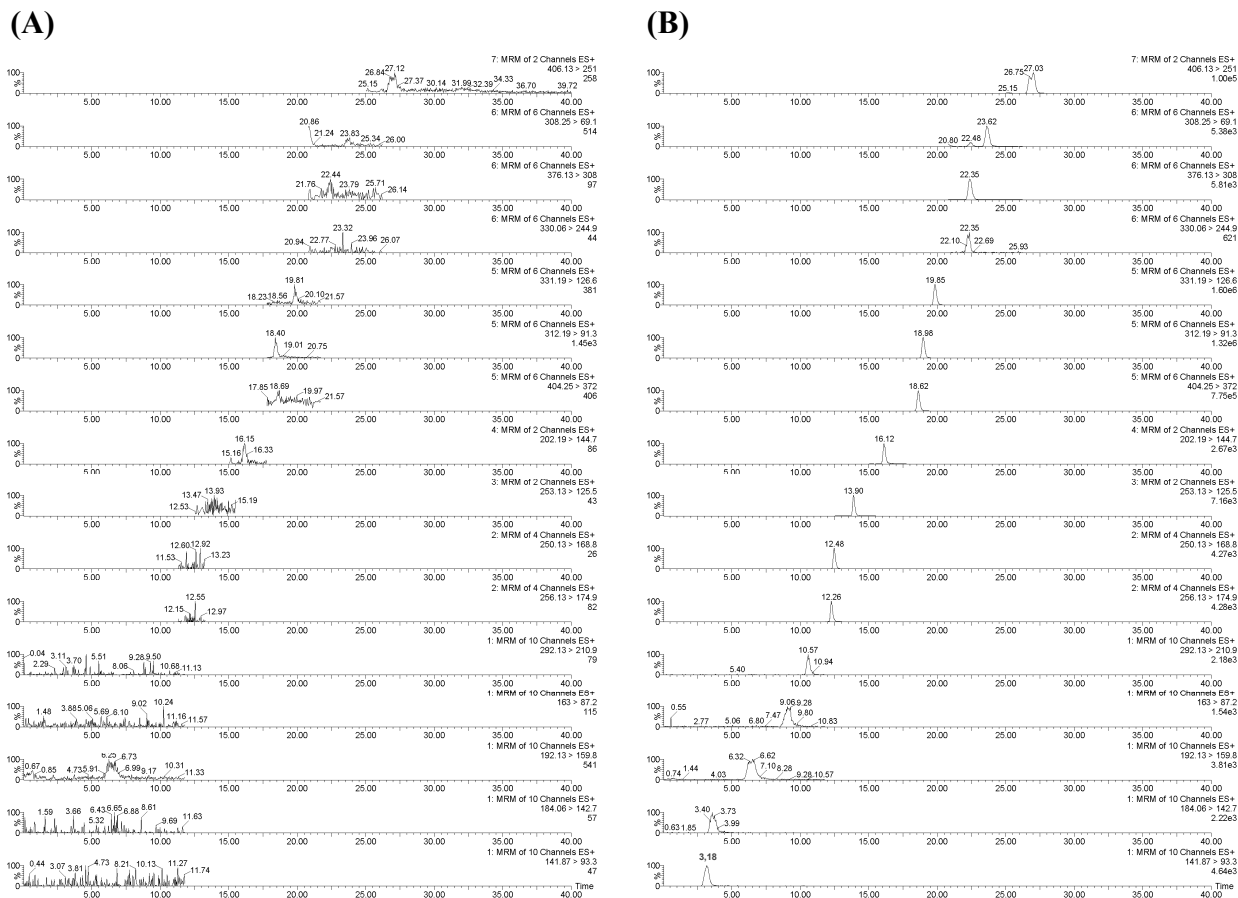


Figura 27: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos através da análise de: (A) uma amostra de alface crespa “branco” após a extração e (B) uma amostra de alface crespa fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.

4.4.4 Precisão e exatidão por CLAE-EM/EM

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos na avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método, assim como os resultados obtidos para a determinação da exatidão, calculada através da Equação 10.

Para a determinação da exatidão, foram elaboradas curvas analíticas para cada agrotóxico, acrescentando um nível inferior ao LQ (sendo $0,7 \times \text{LQ}$ para todos os agrotóxicos, exceto para a azoxistrobina, a fenamidona, a malationa e o difenoconazol, para os quais se definiu o nível $0,2 \times \text{LMR}$), cujos dados da regressão linear também estão na Tabela 25.

A precisão e a exatidão foram avaliadas em dois níveis de fortificação: LQ (limite de quantificação do método) e no LMR, para analitos autorizados para uso em alface, ou $3 \times \text{LQ}$, para analitos não autorizados.

Tabela 25: Precisão, curva analítica e exatidão obtidas na análise de 5 amostras fortificadas em dois níveis de concentração.

Agrotóxico	Precisão						Exatidão				
	CV (%)				CV (%) entre os dias ^a		Curva analítica			Recuperação (%)	
	Dia 1		Dia 2								
	LQ	LMR ou 3xLQ	LQ	LMR ou 3xLQ	LQ	LMR ou 3xLQ	Coef. linear	Coef. angular	r ²	LQ	LMR ou 3xLQ
Metamidofós	17	4	5	8	13	0	11,2	102,8	0,998	86	91
Acefato	4	3	4	8	2	5	13,8	70,1	0,999	96	86
Carbendazim	2	3	4	10	3	3	-131,7	531,6	0,997	99	79
Metomil	6	6	3	6	1	4	-30,8	38,0	0,999	106	84
Tiametoxam	12	5	5	4	4	5	-48,1	20,7	0,992	98	88
Imidacloprido	13	5	4	5	5	3	2,0	22,2	0,996	97	88
Clotianidina	12	5	4	5	6	4	-84,2	29,7	0,998	99	92
Tiacloprido	12	5	4	5	6	4	-68,4	101,0	0,996	95	93
Carbaril	2	3	3	8	1	3	60,5	102,8	0,996	114	92
Azoxistrobina	4	5	2	5	5	3	7049,6	374,5	0,997	103	101
Fenamidona	4	4	3	3	5	3	-6707,9	351,7	0,998	106	96
Malationa	8	9	8	4	7	1	23242,8	115,9	0,994	110	82
Iprodiona	10	3	8	6	4	3	-30,3	4,9	0,999	113	98
Procloraz	3	3	4	8	1	5	-208,3	219,9	0,999	105	88
Tebuconazol	3	4	4	8	1	1	-204,0	408,9	0,999	115	96
Difenoconazol	4	3	4	4	6	0	-2490,2	228,0	0,996	102	91

^acoeficiente de variação calculado através da média e estimativa do desvio padrão de 2 medidas: a área média das 5 amostras analisadas no dia 1 e a área média das 5 amostras analisadas no dia 2, para cada analito.

Através dos dados da Tabela 25, observa-se que os valores de coeficiente de variação encontram-se abaixo de 20%, considerando ambos os níveis de fortificação e a comparação entre os resultados obtidos em dois dias diferentes, concluindo que o método desenvolvido é preciso. Em relação à exatidão, todas as recuperações avaliadas nos dois níveis de fortificação apresentaram valores na faixa aceita pela literatura (70-120%, de acordo com o SANCO), indicando a adequada exatidão do método. Convém salientar que a diferença entre as recuperações dos mesmos analitos, para dois níveis de fortificação diferentes, pode ser justificada devido às possíveis interações entre os analitos e os componentes da matriz.

4.4.5 Robustez por CLAE-EM/EM

A Tabela 26 apresenta os coeficientes de variação calculados, através da comparação entre as áreas dos analitos obtidas no método “original” e após alterações realizadas na temperatura da coluna, porcentagem de ácido fórmico na água da fase móvel e marca da acetonitrila utilizada no procedimento de extração QuEChERS.

O método “original” corresponde ao emprego de temperatura da coluna de 25 °C, 0,1% de ácido fórmico na água da fase móvel e acetonitrila da marca J.T.Baker.

Tabela 26: Coeficientes de variação calculados comparando-se as áreas dos analitos obtidas no método original e após alterações em alguns parâmetros do método.

Agrotóxico	Coeficientes de variação (%)													
	Baker 26,3 °C		Baker 25 °C		Baker 26,3 °C		Tedia 25 °C		Tedia 26,3 °C		Tedia 25 °C		Tedia 26,3 °C	
	0,1% ác.		0,105% ác.		0,105% ác.		0,1% ac.		0,1% ác.		0,105% ác.		0,105% ac.	
	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b
Metamidofós	3	1	7	3	3	0	1	5	4	1	0	2	3	2
Acefato	9	1	6	2	5	1	5	9	6	4	2	6	6	3
Carbendazim	7	2	12	8	1	9	4	1	3	6	4	7	4	8
Metomil	6	4	3	1	6	2	3	4	3	2	5	2	1	4
Tiametoxam	6	3	6	6	0	6	2	4	8	8	2	14	2	13
Imidacloprido	9	5	2	2	6	4	4	3	10	5	7	7	8	6
Clotianidina	5	3	5	2	1	4	2	0	6	1	5	5	6	3
Tiacloprido	7	4	7	7	0	5	3	6	8	1	3	2	5	2
Carbaril	1	1	8	4	11	3	1	6	3	1	10	5	12	4
Azoxistrobina	6	0	5	4	0	4	2	1	9	1	3	3	2	0
Fenamidona	1	0	3	1	1	1	1	2	4	0	4	0	3	3
Malationa	1	0	5	0	1	0	17	0	19	4	20	2	20	4
Iprodiona	9	1	9	0	6	8	5	14	1	8	1	8	0	9
Procloraz	6	1	2	2	6	0	4	3	11	0	6	0	8	0
Tebuconazol	0	0	4	1	2	1	1	4	3	0	0	0	0	2
Difenoconazol	2	1	2	1	5	4	3	2	7	4	5	3	6	2

^a nível de fortificação LQ; ^b nível de fortificação LMR ou 3xLQ.

A Tabela 27 apresenta os coeficientes de variação calculados, através da comparação entre as porcentagens de recuperação obtidas para os analitos empregando as condições originais do método e as modificações realizadas.

Tabela 27: Coeficientes de variação calculados comparando-se as porcentagens de recuperação dos analitos obtidas no método original e após alterações em alguns parâmetros.

Agrotóxico	Coeficientes de variação (%)													
	Baker 26,3 °C		Baker 25 °C		Baker 26,3 °C		Tedia 25 °C		Tedia 26,3 °C		Tedia 25 °C		Tedia 26,3 °C	
	0,1% ác.		0,105% ác.		0,105% ác.		0,1% ac.		0,1% ác.		0,105% ác.		0,105% ac.	
	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b	1 ^a	2 ^b
Metamidofós	2	2	1	5	11	1	4	6	9	3	6	5	7	1
Acefato	12	1	15	2	12	2	13	6	12	2	8	4	10	0
Carbendazim	3	1	1	1	8	1	3	6	1	2	8	1	1	0
Metomil	7	5	2	1	15	0	1	5	3	1	8	1	2	3
Tiametoxam	5	2	6	2	14	2	3	3	8	8	12	8	5	10
Imidacloprido	3	1	6	3	15	2	6	0	8	5	15	4	9	4
Clotianidina	1	2	4	2	10	2	5	4	5	1	11	4	8	2
Tiacloprido	2	0	3	2	10	2	6	8	5	2	11	2	6	1
Carbaril	2	2	2	1	7	1	1	5	3	3	0	3	1	2
Azoxistrobina	4	1	2	1	8	0	5	3	6	1	8	1	1	0
Fenamidona	0	1	0	0	7	1	3	3	3	1	4	1	2	1
Malationa	0	0	1	1	5	1	20	2	16	5	20	2	17	6
Iprodiona	3	4	2	0	2	7	4	11	3	4	4	4	4	3
Procloraz	5	1	4	2	11	1	7	5	6	2	8	0	4	4
Tebuconazol	2	1	2	1	8	1	5	4	3	0	4	1	2	2
Difenoconazol	2	2	6	1	10	3	6	3	4	3	7	4	3	3

^a nível de fortificação LQ; ^b nível de fortificação LMR ou 3xLQ.

Analisando-se as Tabelas 26 e 27, verifica-se que foram obtidos coeficientes de variação abaixo de 20% para todas as variações estudadas, inclusive aquelas na qual se empregaram, simultaneamente, a variação de 5% nos três parâmetros avaliados, confirmando que o método é robusto no laboratório no qual foi desenvolvido.

Portanto, tem-se que o método desenvolvido é seletivo, preciso, exato e robusto, podendo ser empregado para a análise de agrotóxicos em amostras de alface.

4.5 Aplicação do método otimizado e validado por CLAE-EM/EM

4.5.1 Estudo de diferentes variedades de alface

Para a determinação das porcentagens de recuperação, amostras de alface lisa, americana, mimosa e roxa, isentas de agrotóxicos, foram fortificadas com concentrações de $3x C_0$ e submetidas à extração pelo método QuEChERS otimizado. Para todos os analitos estudados, nas diferentes variedades de alface avaliadas, observaram-se porcentagens de recuperação na faixa aceita pela literatura (70-120%) e coeficiente de variação abaixo de 20% (na faixa de 0,2 a 12%), conforme se pode observar na Figura 28.

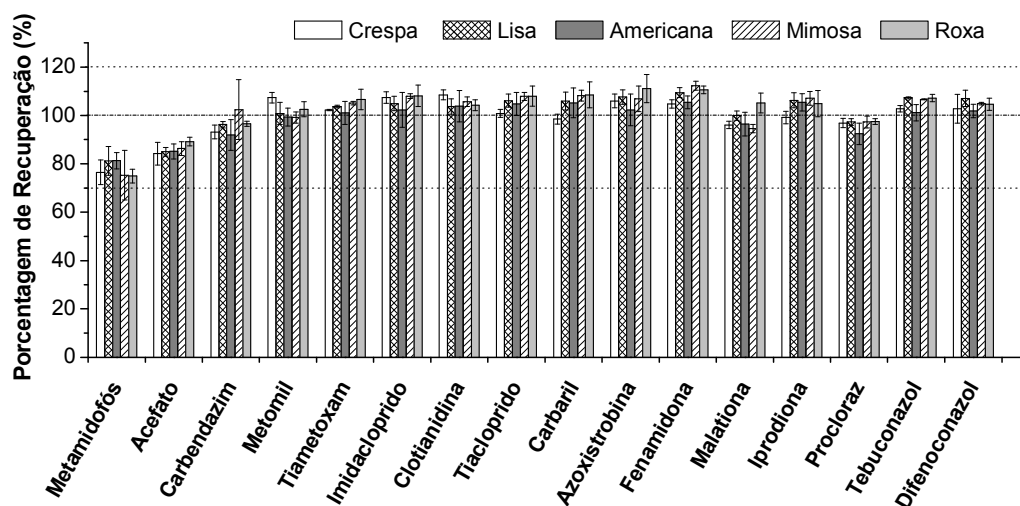


Figura 28: Porcentagens de recuperação dos analitos em estudo, empregando o método analítico otimizado e validado para diferentes variedades de alface.

A Tabela 28 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C_0 e $3x C_0$), determinado através da Equação 6, empregando-se as diferentes variedades de alface.

Tabela 28: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, para as diferentes variedades de alface, empregando o método analítico otimizado e validado.

Agrotóxico	Efeito Matriz ^a (%)									
	Variedades de alface									
	Crespa		Lisa		Americana		Mimosa		Roxa	
	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀
Metamidofós	28	27	5	3	28	-2	6	34	-1	22
Acefato	20	13	-10	-3	-10	-13	-12	-7	-18	-11
Carbendazim	13	-5	2	-2	2	-4	-17	-8	-6	0
Metomil	-1	-7	-7	0	-3	0	2	-2	-5	4
Tiametoxam	-14	-18	5	-1	-2	-2	-9	-2	-7	5
Imidacloprido	-14	-22	-8	-11	-11	-10	-4	-6	-10	1
Clotianidina	-26	-31	-21	-23	-19	-18	-9	-10	-19	-7
Tiacloprido	-16	-23	-9	-9	-11	-7	-13	-8	-16	-3
Carbaril	-31	-35	-14	-17	-13	-8	-11	-5	-8	3
Azoxistrobina	9	-8	47	8	28	10	5	13	4	18
Fenamidona	33	2	-9	0	-7	-2	-8	-3	-6	1
Malationa	8	-1	-1	1	-4	2	-4	1	-3	7
Iprodiona	5	56	52	2	43	3	45	3	32	10
Procloraz	5	1	-4	4	-7	5	-6	2	-2	9
Tebuconazol	16	-1	8	3	-1	3	0	3	3	3
Difenoconazol	1	-5	289	-2	-7	3	7	3	-4	6

^aEfeito matriz realizado através do método da comparação do sinal analítico.

A Figura 29 (Figuras 29A e 29B) apresenta o número de analitos que possuem efeito matriz negligenciáveis ou significativos, baseados nos dados da Tabela 28. A Figura 29C apresenta a quantidade média de componentes da matriz extraídos, determinada pelo método gravimétrico.

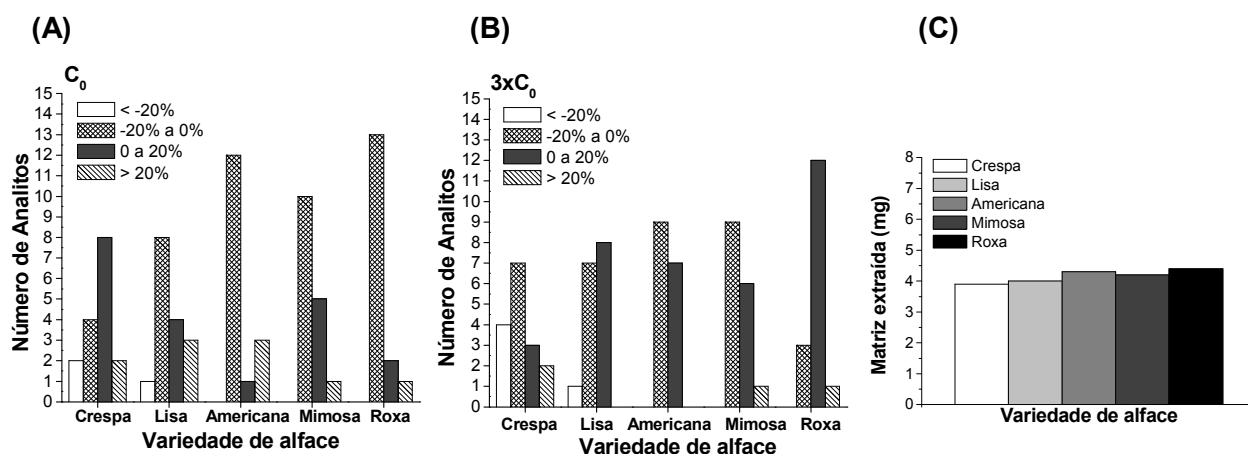


Figura 29: Distribuição numérica do efeito matriz em diferentes variedades de alface, avaliado nos níveis de fortificação: (A) C₀, (B) 3xC₀; e (C) representação da quantidade média de matriz extraída, obtida pelo método gravimétrico.

Analisando-se a Tabela 28 e a Figura 29A, observa-se que no nível C_0 , o maior número de analitos possui efeito matriz na faixa de $0 \pm 20\%$ (efeito matriz desprezível), para todas as variedades de alface estudadas. As alfaces crespa e lisa apresentaram maior número de analitos (25%) com efeito matriz significativo, enquanto que as alfaces mimosa e roxa apresentaram apenas um analito (6,25% dos analitos) com efeito matriz superior a 20%. A alface americana, por sua vez, apresentou 3 analitos com efeito matriz significativo.

Em relação ao nível de fortificação $3 \times C_0$ (Tabela 28 e Figura 29B), a alface crespa é a variedade com maior número de analitos com efeito matriz significativo (37,5% dos analitos), enquanto as variedades lisa, mimosa e roxa apresentam apenas 1 analito com efeito matriz superior a 20% ou inferior a -20%. Por sua vez, a alface americana apresentou efeito matriz não significativo para todos os analitos.

A partir da Figura 29C, pode-se observar que quantidades semelhantes de componentes da matriz foram extraídos das diferentes variedades de alface, indicando semelhança na composição deste vegetal folhoso.

Diante disso, mesmo com poucos analitos possuindo efeito matriz significativo, a elaboração de curvas analíticas por superposição de matriz é mais adequada, para fins de quantificação dos agrotóxicos nas diferentes matrizes, uma vez que mesmo pouco pronunciável, o efeito matriz existe.

Após estudos de efeito matriz, curvas analíticas por superposição de matriz foram elaboradas para cada matriz estudada, nos mesmos níveis de fortificação apresentados na Tabela 8.

Os resultados de regressão das curvas analíticas obtidas para as diferentes variedades de alface estão apresentadas na Tabela 29, exceto para a alface crespa, cujos dados estão na Tabela 24. Como se pode observar, para todas as variedades estudadas, obtiveram-se coeficientes de determinação acima de 0,991 e resíduos menores que 20% (valores em módulo), confirmando a linearidade do método.

Portanto, através desses estudos, pode-se concluir que o método desenvolvido pode ser aplicado para amostras de alface de diferentes variedades.

Tabela 29: Resultados de regressão linear obtidos para as diferentes variedades de alface.

Agrotóxico	Alface Lisa				Alface Americana			
	Coefficiente linear	Coefficiente angular	r^2	Resíduos	Coefficiente linear	Coefficiente angular	r^2	Resíduos
Metamidofós	-114,6	44,8	0,999	< 10%	-131,7	51,0	0,998	< 14%
Acefato	-23,1	48,8	0,998	< 11%	-17,7	49,2	0,997	< 15%
Carbendazim	-72,8	302,4	0,999	< 6%	-60,1	298,9	0,998	< 14%
Metomil	-29,2	32,8	1,000	< 6%	-17,1	31,2	0,998	< 10%
Tiametoxam	25,5	17,8	0,998	< 6%	50,2	16,6	0,999	< 3%
Imidacloprido	148,8	14,7	1,000	< 16%	149,3	13,8	0,999	< 16%
Clotianidina	27,1	20,7	0,999	< 3%	38,2	19,9	1,000	< 2%
Tiacloprido	74,6	67,2	1,000	< 9%	69,4	65,9	1,000	< 5%
Carbaril	37,7	76,3	0,999	< 7%	33,4	77,6	0,997	< 10%
Azoxistrobina	-3317,4	246,6	0,995	< 6%	-823,4	250,5	0,999	< 3%
Fenamidona	-13212,7	245,7	0,996	< 6%	-8183,0	254,4	0,998	< 4%
Malationa	1440,1	97,0	0,999	< 4%	2205,2	96,3	0,999	< 4%
Iprodiona	-26,6	5,1	0,998	< 18%	-11,2	4,4	0,999	< 3%
Procloraz	-56,8	144,2	0,999	< 8%	-104,7	147,2	0,999	< 10%
Tebuconazol	-113,0	283,8	0,999	< 8%	-126,8	293,5	0,999	< 10%
Difenoconazol	1262,8	199,5	0,994	< 8%	-1217,3	203,3	0,997	< 5%

Agrotóxico	Alface Mimosa				Alface Roxa			
	Coefficiente linear	Coefficiente angular	r^2	Resíduos	Coefficiente linear	Coefficiente angular	r^2	Resíduos
Metamidofós	-211,7	71,6	0,995	< 20%	-317,6	78,7	0,991	< 20%
Acefato	-101,6	52,3	0,995	< 20%	-73,6	42,8	0,996	< 20%
Carbendazim	-171,4	307,2	0,996	< 14%	-319,7	296,6	0,997	< 18%
Metomil	-100,3	32,0	0,998	< 12%	-63,6	26,4	0,998	< 9%
Tiametoxam	-29,6	18,3	0,993	< 7%	-34,4	14,7	0,995	< 6%
Imidacloprido	-58,6	14,8	0,996	< 20%	-140,5	13,7	0,994	< 20%
Clotianidina	-70,2	22,0	0,995	< 10%	-106,8	19,3	0,994	< 11%
Tiacloprido	-253,6	70,3	0,995	< 20%	-379,9	65,1	0,993	< 20%
Carbaril	3,5	78,1	0,997	< 8%	-87,4	74,2	0,995	< 18%
Azoxistrobina	-4134,3	248,2	0,996	< 5%	-14634,7	232,9	0,993	< 17%
Fenamidona	-7117,0	252,8	0,997	< 5%	-24199,6	242,0	0,996	< 12%
Malationa	-12016,2	98,1	0,998	< 5%	-29796,0	87,2	0,996	< 10%
Iprodiona	-44,5	4,8	0,994	< 20%	-32,7	4,3	0,996	< 19%
Procloraz	-214,0	149,4	0,995	< 13%	-244,8	144,1	0,995	< 12%
Tebuconazol	-185,6	302,3	0,998	< 13%	-227,8	284,5	0,999	< 11%
Difenoconazol	-4794,9	200,9	0,995	< 11%	-6060,7	186,1	0,991	< 14%

4.5.2 Determinação de agrotóxicos em amostras de alface disponíveis no comércio

A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos na determinação de agrotóxicos em amostras de diferentes variedades de alface adquiridas no comércio de Campinas-SP, assim como a adequação dessas amostras frente à ANVISA. A Tabela 30 também apresenta a natureza, procedência, tipo de cultivo e as porções analisadas de cada amostra.

Tabela 30: Agrotóxicos detectados e suas respectivas concentrações, nas diferentes porções e variedades de amostras de alface analisadas.

Amostra ^a	Origem e tipo de cultivo	Agrotóxicos detectados	Concentração do agrotóxico (µg/kg)				Concentrações encontradas estão de acordo com a ANVISA?
			Folhas sem lavagem	Folhas lavadas com água	Folhas lavadas com hipoclorito de sódio	Caule isolado	
C1	Paulínia-SP (Solo)	Imidacloprido	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	Sim (<LMR ^b)
C2	Paulínia-SP (Solo)	Imidacloprido	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	Sim (<LMR ^b)
		Clotianidina	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	Sim (<LMR ^b)
C3	Campinas-SP (Solo)	Metamidofós	161 ± 6*	69 ± 3	75 ± 6	14 ± 1	Não (NA ^c)
		Acefato	2196 ± 162*	667 ± 69*	947 ± 33*	103 ± 5*	Não (NA ^c)
		Carbendazim	84 ± 6*	17 ± 1	13 ± 1	31 ± 2*	Não (NA ^c)
		Imidacloprido	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	Sim (<LMR ^b)
C4	Itatiba-SP (Hidroponia)	Imidacloprido	1853 ± 142*	-	1624 ± 91*	-	Não (>LMR ^b)
		Tebuconazol	19 ± 1	-	11 ± 1	-	Não (NA ^c)
		Difenoconazol	< LQ	-	< LQ	-	Sim (<LMR ^b)
C5	Campinas-SP (Hidroponia)	Metamidofós	31 ± 1	-	19 ± 1	-	Não (NA ^c)
		Acefato	81 ± 2	-	69 ± 4	-	Não (NA ^c)
		Imidacloprido	1274 ± 52*	-	1255 ± 72*	-	Não (>LMR ^b)
		Azoxistrobina	< LQ	-	< LQ	-	Sim (<LMR ^b)
C6	Nova Odessa-SP (Hidroponia)	Imidacloprido	< LQ	-	< LQ	-	Sim (<LMR ^b)
		Fenamidona	< LQ	-	< LQ	-	Sim (<LMR ^b)
		Tebuconazol	< LQ	-	< LQ	-	Não (NA ^c)
L1	Campinas-SP (Solo)	Metamidofós	< LQ	< LQ	-	-	Não (NA ^c)
		Acefato	< LQ	< LQ	-	-	Não (NA ^c)
		Tiametoxam	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
L2	Ibiúna-SP (Hidroponia)	Tiametoxam	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Clotianidina	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	222 ± 14	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Fenamidona	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Iprodiona	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	211 ± 26	131 ± 11	-	-	Sim (<LMR ^b)
A1	Campinas-SP (Solo)	Acefato	< LQ	< LQ	-	-	Não (NA ^c)
		Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
A2	Paulínia-SP (Solo)	Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
M1	Solo	Difenoconazol	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
M2	Ibiúna-SP (Hidroponia)	Tiametoxam	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Clotianidina	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	405 ± 13	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Iprodiona	< LOQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Difenoconazol	445 ± 14	144 ± 24	-	-	Sim (<LMR ^b)
R1	Paulínia-SP (Solo)	Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
R2	Solo	Imidacloprido	< LQ	< LQ	-	-	Sim (<LMR ^b)
		Azoxistrobina	< LQ	ND*	-	-	Sim (<LMR ^b)

^aNatureza das amostras: C1 a C6 (alface crespa); L1 e L2 (alface lisa); A1 e A2 (alface americana); M1 e M2 (alface mimosa) e R1 e R2 (alface roxa). Uma amostra compreende 1 pé de alface selecionado aleatoriamente, sendo subdividido em folhas e caule, quando aplicável. ^bLMR: limite máximo de resíduo. ^cNA: analito não autorizado. *Amostras foram diluídas, na matriz “branco”, empregando-se diferentes taxas de diluição, para a quantificação dos agrotóxicos.

Analisando-se a Tabela 30, para a alface crespa, dentre as 3 amostras cultivadas em solo, apenas uma apresentou agrotóxicos não permitidos para serem empregados, sendo o metamidofós, o acefato e o carbendazim. Além disso, esses agrotóxicos foram determinados em maiores concentrações nas folhas do que no caule, evidenciando a ocorrência da aplicação foliar dos mesmos. Em relação às amostras hidropônicas, todas apresentaram agrotóxicos acima do LMR e/ou não permitidos para uso em alface.

A elevada incidência de agrotóxicos em amostras de origem hidropônica, que são produzidas em estufas protegidas, com o uso de soluções aquosas contendo nutrientes essenciais, que teoricamente seriam menos afetadas por insetos e patógenos, pode ser justificada pela aplicação foliar dos agrotóxicos, assim como a possibilidade de adição destes produtos na solução de hidroponia, fazendo com que haja elevada absorção do agrotóxico pela planta, o que não ocorre no solo, uma vez que os agrotóxicos são aplicados por pulverização, sendo parte dissipada no meio ambiente, podendo ser absorvido pelo solo, conduzido pelas águas de chuva, entre outros.

Também a partir da Tabela 30, para as outras variedades de alface, dentre as 8 amostras de alface analisadas, duas apresentaram inconformidades frente à ANVISA, uma vez que foram detectados os agrotóxicos metamidofós e acefato, não autorizados em alface, além do fato do uso do metamidofós ter sido proibido no Brasil, desde 2012. As demais amostras analisadas apresentaram agrotóxicos em concentrações abaixo do LQ do método e, conseqüentemente, abaixo do LMR estipulado pela ANVISA.

Em relação ao agrotóxico metamidofós, não foi possível confirmar sua presença nas amostras em que foi detectado, uma vez que este analito é um produto de degradação do acefato, podendo não ter sido aplicado diretamente nas amostras de alface. A própria ANVISA afirma que, para fins de monitoramento de resíduos, a presença do metabólito metamidofós será aceitável apenas quando em concentração inferior à concentração de acefato⁹⁷. Analisando-se os resultados obtidos, observa-se que em todas as amostras na qual se detectou o acefato, o metamidofós também estava presente em menores concentrações.

Analisando-se o efeito das etapas de lavagem, observou-se uma diminuição na concentração de todos os agrotóxicos após submissão das folhas à lavagem com água ou com uma mistura de água e hipoclorito de sódio. No entanto, a etapa de lavagem

não removeu completamente os agrotóxicos presentes na alface, contribuindo apenas para a remoção de parte dos agrotóxicos que se encontravam na superfície das folhas. Dentre os dois tipos de lavagem estudados, observou-se pouca diferença entre eles, sendo o hipoclorito de sódio responsável, principalmente, por eliminar os possíveis agentes microbiológicos presentes na alface.

De modo geral, de acordo com a Tabela 30, observou-se que 43% das amostras analisadas não estão satisfatórias, de acordo com a ANVISA, apresentando, em sua maioria, agrotóxicos não permitidos para serem aplicados em alface. Essa mesma tendência foi observada nas análises realizadas pelo PARA, nos anos de 2009 a 2011.

4.5.3 Aplicação do método para a análise de espinafre

Inicialmente, adquiriu-se uma amostra de espinafre, isenta de agrotóxicos, no comércio de Campinas-SP e avaliou-se a seletividade do método, a fim de verificar a possível presença de interferentes da matriz, com eluição próxima aos analitos.

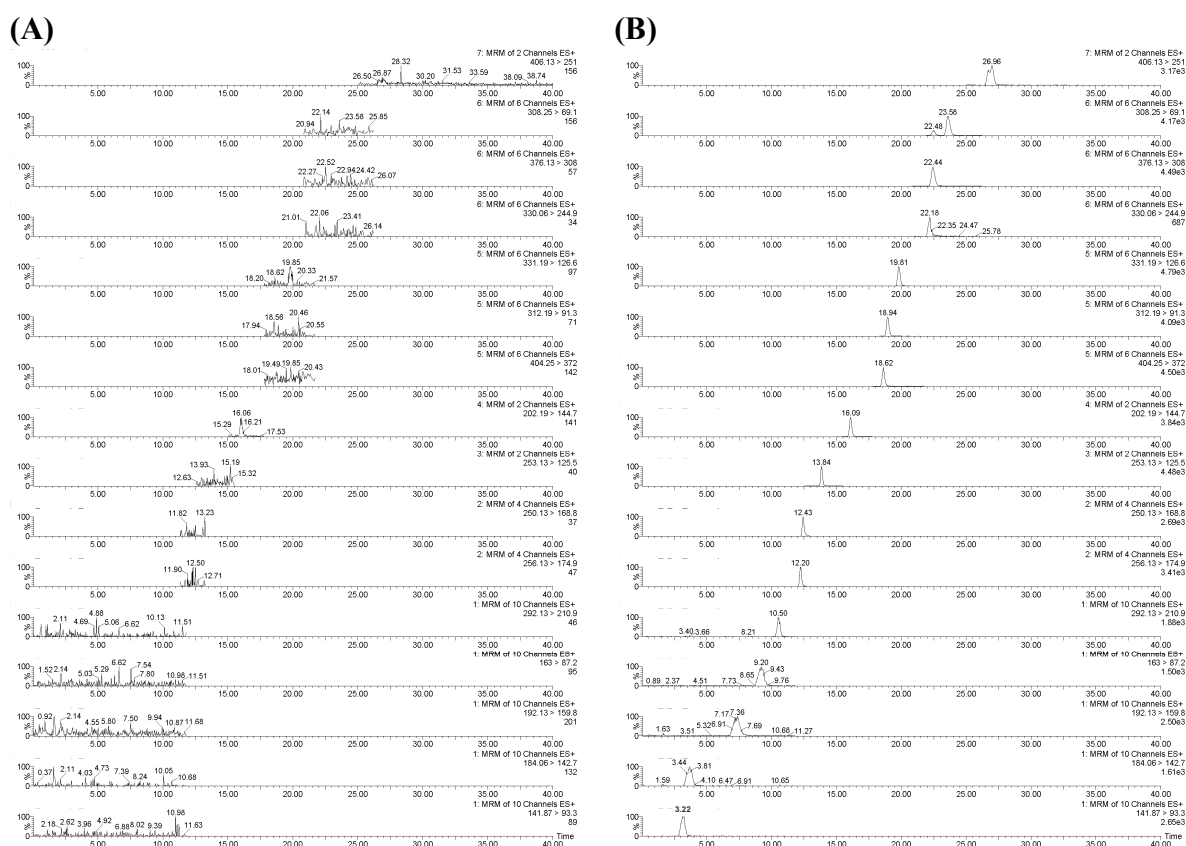


Figura 30: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos através da análise de: (A) uma amostra de espinafre “branco” após a extração e (B) uma amostra de espinafre fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.

Nesse estudo, apresentado na Figura 30, comparando os sinais analíticos obtidos através da análise de uma amostra “branco” e uma amostra fortificada, no limite de quantificação do método, não se observou a presença de picos interferentes, garantindo a seletividade do método.

Posteriormente, estudos de porcentagens de recuperação foram realizados, fortificando as amostras com concentração $3 \times C_0$, definido para cada analito, e submetendo-as à extração pelo método QuEChERS otimizado. O efeito matriz também foi avaliado para amostras de espinafre, através da comparação do sinal analítico e da análise gravimétrica. A Tabela 31 apresenta os resultados de recuperação e efeito matriz obtidos para a matriz espinafre.

Tabela 31: Porcentagens de recuperação, coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS para a análise de espinafre.

Agrotóxico	Porcentagem de Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)	Efeito Matriz (%) ^a	
			C_0	$3 \times C_0$
Metamidofós	74	3	4	2
Acefato	85	6	-11	-6
Carbendazim	98	7	-3	-4
Metomil	99	3	0	-3
Tiametoxam	101	5	0	2
Imidacloprido	106	11	1	-2
Clotianidina	103	9	-1	-4
Tiacloprido	104	11	-15	-12
Carbaril	106	11	5	2
Azoxistrobina	104	10	-2	8
Fenamidona	105	5	-5	0
Malationa	106	6	-2	0
Iprodiona	99	5	-12	4
Procloraz	105	8	-3	0
Tebuconazol	99	5	-2	1
Difenoconazol	114	14	-12	3

^aEfeito matriz obtido pelo método da comparação do sinal analítico, determinado através da Equação 6.

Analisando-se a Tabela 31, obtiveram-se porcentagens de recuperação na faixa de 74% a 114%, com coeficientes de variação inferiores a 14%, indicando que o método de extração otimizado para a alface também pode ser utilizado para a extração de agrotóxicos de amostras de espinafre. Em relação ao efeito matriz, obtiveram-se resultados na faixa de $0 \pm 20\%$ para todos os analitos estudados, indicando que o efeito matriz pode ser considerado desprezível, nas amostras de espinafre.

Em relação à análise gravimétrica, para 4 determinações, obteve-se uma quantidade média de resíduo sólido de 6,4 mg, maior que a massa de resíduo sólido encontrada nas amostras de alface, possivelmente devido à maior pigmentação do espinafre frente à alface. No entanto, mesmo com elevado teor de resíduo sólido, os compostos presentes não interferem significativamente na detecção dos analitos, conforme demonstrado nos estudos de efeito matriz.

Curvas analíticas em solvente e na matriz “branco” fortificada após o processo de extração foram elaboradas, para avaliação da linearidade do método, nos mesmos níveis de fortificação estabelecidos para a alface crespa e apresentados na Tabela 8. Os resultados obtidos da elaboração das curvas analíticas para a matriz espinafre estão apresentados na Tabela 32. Analisando-se os resultados obtidos, obtiveram-se coeficientes de determinação superiores a 0,990 e resíduos menores que 20%, para ambas as curvas elaboradas, confirmando a linearidade do método.

Tabela 32: Resultados de regressão linear obtidos pelas curvas analíticas elaboradas para a matriz espinafre em solvente e pelo método de superposição de matriz (fortificação de uma matriz “branco” extraída).

Agrotóxico	Curvas Analíticas para o Espinafre							
	Curva em Solvente				Curva por Superposição de Matriz			
	Coef. linear	Coef. angular	r ²	Resíduos ^a	Coef. linear	Coef. angular	r ²	Resíduos ^a
Metamidofós	-113,5	39,4	1,000	< 1%	2,5	40,0	0,990	< 7%
Acefato	-38,2	44,3	0,999	< 2%	52,7	35,1	0,997	< 4%
Carbendazim	-138,7	305,1	1,000	< 2%	256,7	248,8	1,000	< 4%
Metomil	-23,4	28,4	0,999	< 2%	95,2	21,6	0,999	< 4%
Tiametoxam	-91,1	15,0	0,999	< 2%	21,4	12,0	0,996	< 3%
Imidacloprido	-36,1	14,3	0,999	< 2%	93,7	14,5	0,999	< 15%
Clotianidina	-26,6	18,1	0,999	< 3%	19,5	18,6	0,998	< 5%
Tiacloprido	111,4	61,8	0,999	< 15%	119,6	61,4	0,999	< 16%
Carbaril	82,0	65,0	0,998	< 8%	100,7	65,2	0,999	< 4%
Azoxistrobina	11609,8	195,5	0,992	< 8%	11640,6	198,9	0,994	< 7%
Fenamidona	9424,7	203,4	0,994	< 7%	26407,1	199,1	0,996	< 6%
Malationa	-17542,2	83,2	0,999	< 3%	-1255,9	82,5	0,999	< 3%
Iprodiona	70,8	1,4	0,988	< 20%	-20,2	3,6	0,999	< 4%
Procloraz	160,2	112,7	0,998	< 5%	141,7	117,9	1,000	< 4%
Tebuconazol	49,9	245,6	1,000	< 1%	123,5	251,1	1,000	< 2%
Difenoconazol	8839,9	151,5	0,994	< 6%	3719,0	211,7	0,996	< 3%

^aResíduos da curva analítica, em módulo.

A Figura 31 apresenta as curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico estudado e a Figura 32 apresenta o gráfico de resíduos da regressão linear.

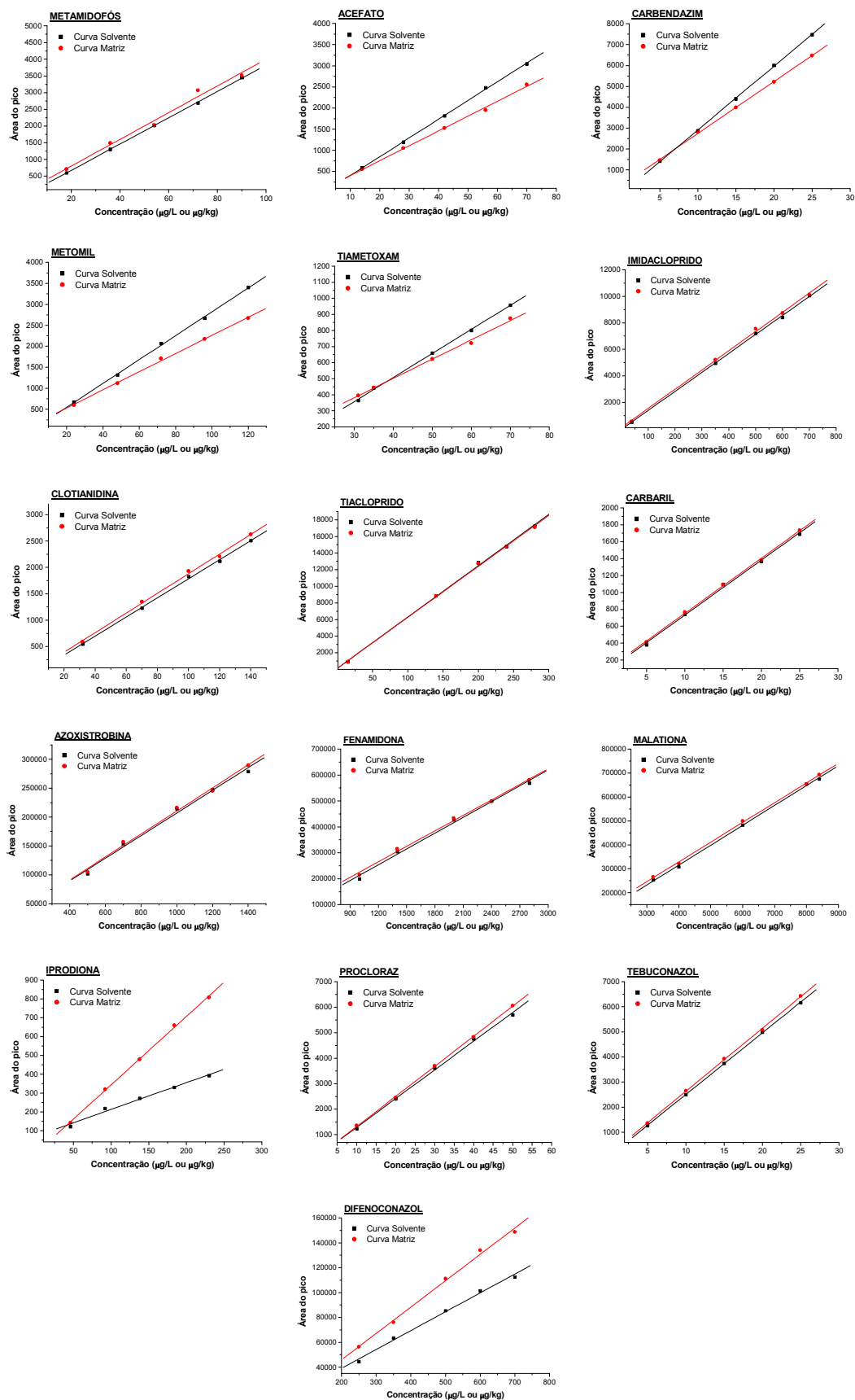


Figura 31: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados, na matriz espinafre.

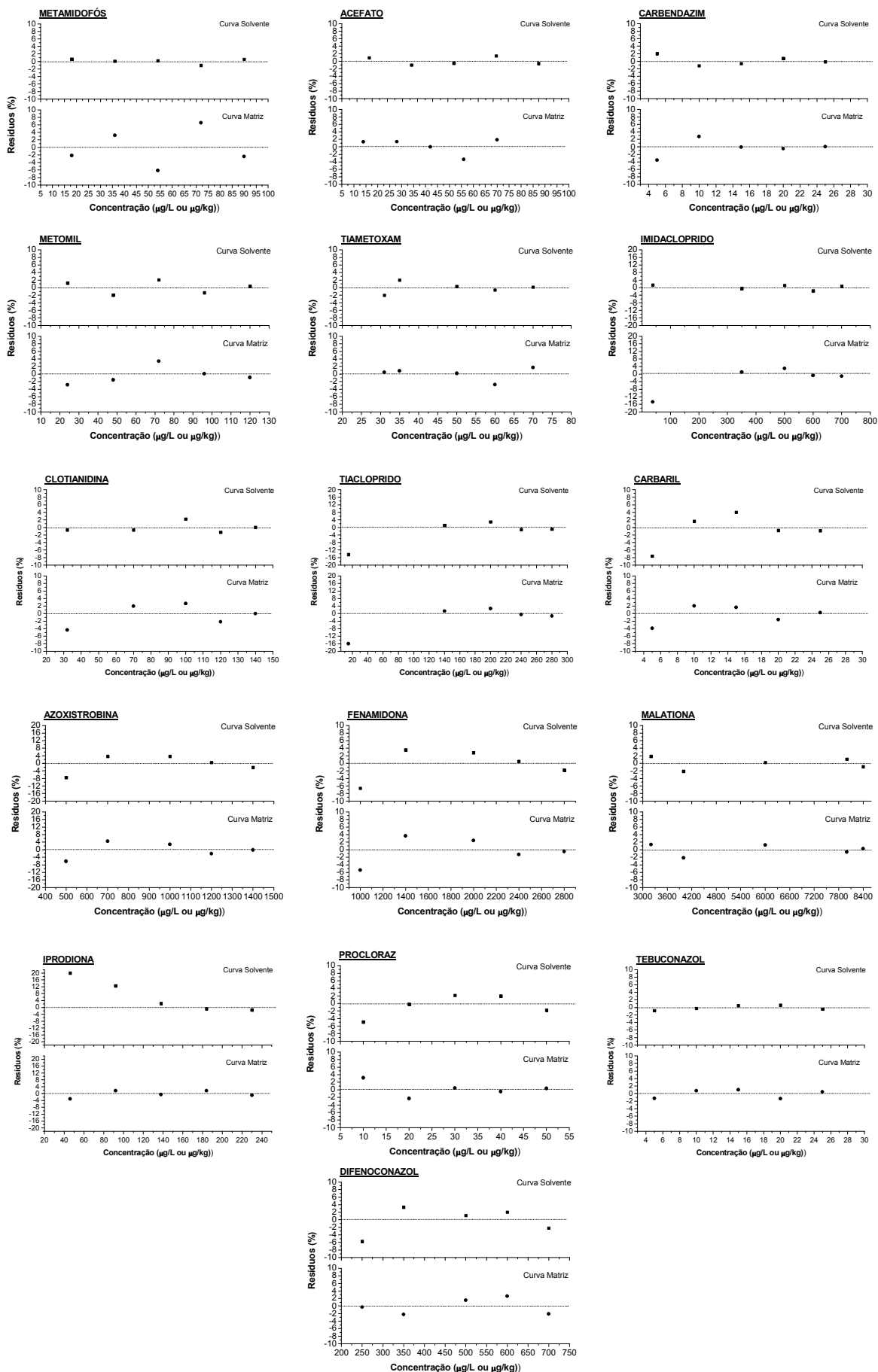


Figura 32: Resíduos da regressão linear obtida para os agrotóxicos estudados, em espinafre.

Analisando-se a Figura 31, comparando-se as curvas elaboradas em solvente e por superposição de matriz, observa-se que, para a maioria dos agrotóxicos, as curvas se sobrepõem ou são paralelas, confirmando a baixa incidência de efeito matriz nas amostras de espinafre, conforme também observado nos estudos de efeito matriz realizados por comparação do sinal analítico nas concentrações de C_0 e $3 \times C_0$.

Dessa forma, através dos estudos de recuperação, efeito matriz e linearidade, concluiu-se que o método desenvolvido e validado pode ser aplicado na análise de amostras de espinafre, fornecendo resultados confiáveis.

Uma vez que o método desenvolvido pode ser aplicável, amostras de espinafre foram adquiridas no comércio de Campinas-SP e foram submetidas à análise para verificar a presença de agrotóxicos. As características das amostras adquiridas e os respectivos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 33. As amostras foram analisadas *in natura*, sem nenhuma etapa de lavagem antes da homogeneização.

Na Tabela 33, estão apresentados os resultados de concentração dos agrotóxicos, obtidos através do emprego das curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz. Como o efeito matriz em amostras de espinafre é pouco pronunciável para todos os analitos, espera-se que sejam obtidos resultados semelhantes empregando-se ambas as curvas, havendo pequenos desvios entre os resultados.

Tabela 33: Agrotóxicos detectados e suas respectivas concentrações, assim como a procedência das amostras de espinafre adquiridas no comércio de Campinas-SP.

Amostra	Procedência	Agrotóxicos detectados	Concentração do agrotóxico ($\mu\text{g/kg}$)		
			Curva em Solvente	Curva por superposição de matriz	Estimativa do desvio padrão ^a
1	Paulínia-SP	Carbendazim	< LQ	< LQ	-
		Tiametoxam	$104 \pm 1^*$	$111 \pm 1^*$	5
		Imidacloprido	113 ± 5	106 ± 5	5
		Clotianidina	52 ± 1	49 ± 1	2
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-
2	-	Imidacloprido	< LQ	< LQ	-
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-
3	Campinas-SP	Imidacloprido	67 ± 4	60 ± 4	5
4	Teresópolis-RJ	Carbendazim	20 ± 2	22 ± 2	2
		Imidacloprido	54 ± 2	48 ± 2	4
		Difenoconazol	< LQ	< LQ	-

^aEstimativa do desvio padrão entre os resultados de concentração, obtidos pelas curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz. *Amostras foram diluídas, na matriz "branco".

Analisando-se a Tabela 33, através dos pequenos desvios obtidos na determinação da concentração dos agrotóxicos empregando diferentes curvas analíticas, observa-se que a quantificação de agrotóxicos em amostra de espinafre pode ser realizada empregando qualquer uma das curvas analíticas, uma vez que foram obtidos desvios na faixa de incerteza da medida dos resultados. Além disso, pode-se verificar que houve a detecção de agrotóxicos nas quatro amostras de espinafre analisadas, que não são autorizados para serem empregados nessa cultura, sugerindo a necessidade de se realizar o monitoramento dessa cultura, a fim de minimizar a incidência de agrotóxicos fora dos limites estabelecidos pela ANVISA.

4.6 Transferência do método desenvolvido para a CLUE-EM/EM

O método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em alface otimizado e validado com o uso da técnica de CLAE-EM/EM foi transferido para a CLUE-EM/EM. O mesmo procedimento de preparo de amostra QuEChERS otimizado foi empregado para a extração dos agrotóxicos e análise dos extratos por CLUE-EM/EM. Os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas também foram mantidos constantes, conforme descrito na seção 3.11.1.

4.6.1 Definição dos íons monitorados e dos parâmetros de fragmentação por CLUE-EM/EM

Através da infusão direta no espectrômetro de massas, os analitos em estudo, na presença de ácido fórmico e na fonte de *eletrospray*, foram ionizados na forma $[M+H]^+$, formando íons precursores, sendo M a massa monoisotópica de cada analito. No analisador, o íon precursor foi selecionado no primeiro quadrupolo, fragmentado na câmara de colisão por um potencial elétrico, gerando fragmentos de diferentes intensidades que foram analisados no terceiro quadrupolo.

Dessa forma, através da infusão direta dos analitos no espectrômetro de massas, foi possível definir o íon precursor e seus fragmentos, definindo as transições de massa para a quantificação e a confirmação dos agrotóxicos, assim como a voltagem do cone e a energia de colisão, parâmetros otimizados para cada transição de massa.

A Tabela 34 apresenta as transições de massas dos agrotóxicos estudados, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone de cada analito.

Tabela 34: Apresentação das transições de massa definidas para cada agrotóxico estudado, assim como a energia de colisão e a voltagem do cone otimizadas para cada transição, empregando-se CLUE-EM/EM.

Agrotóxico	Transição de Quantificação ^a	Transição de Confirmação ^b	Energia de Colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Metamidofós	141,91>93,8	141,91>124,9	14 (Q ^a) 12 (C ^b)	25
Acefato	184,03>143,0	184,03>125,0	8 (Q ^a) 20 (C ^b)	10
Carbendazim	192,09>160,1	192,09>132,1	18 (Q ^a) 28 (C ^b)	25
Metomil	163,03>87,8	163,03>105,9	8 (Q ^a) 10 (C ^b)	15
Tiametoxam	292,16>211,1	292,16>181,1	12 (Q ^a) 24 (C ^b)	20
Imidacloprido	256,16>175,1	256,16>209,3	20 (Q ^a) 12 (C ^b)	25
Clotianidina	250,09>169,0	250,09>132,0	12 (Q ^a) 16 (C ^b)	20
Tiacloprido	253,16>126,0	253,16>89,9	20 (Q ^a) 38 (C ^b)	30
Carbaril	202,16>145,0	202,16>127,0	8 (Q ^a) 28 (C ^b)	15
Azoxistrobina	404,22>372,2	404,22>344,2	14 (Q ^a) 24 (C ^b)	25
Fenamidona	312,22>91,9	312,22>236,3	24 (Q ^a) 16 (C ^b)	20
Malationa	331,16>127,0	331,16>98,9	12 (Q ^a) 20 (C ^b)	15
Iprodiona	330,16>245,1	330,16>288,2	16 (Q ^a) 10 (C ^b)	20
Procloraz	376,16>308,1	376,16>266,1	12 (Q ^a) 16 (C ^b)	20
Tebuconazol	308,28>69,7	308,28>125,0	20 (Q ^a) 30 (C ^b)	30
Difenoconazol	406,22>251,2	406,22>337,1	24 (Q ^a) 16 (C ^b)	35

^aTransição de quantificação. ^bTransição de confirmação.

4.6.2 Separação cromatográfica dos agrotóxicos por CLUE-EM/EM

As condições cromatográficas de separação foram inicialmente determinadas por meio da transferência dos parâmetros do método desenvolvido por CLAE para o sistema CLUE, empregando-se o *software Acquity Column Calculator* (Waters).

O *software* converteu as condições cromatográficas otimizadas em CLAE, para a CLUE, do seguinte modo: separação cromatográfica no modo gradiente linear, variando-se a composição da fase móvel MeOH:H₂O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) da seguinte maneira: 0 min – 15:85; 2,82 min – 15:85; 4,32 min - 40:60; 5,82 min – 60:40; 8,32 min – 70:30; 10,82 min – 70:30; 13,32 min – 85:15; 14,82 min – 85:15; 15,82 min – 15:85; 20 min – 15:85, empregando-se vazão de 0,147 mL/min, temperatura de 25 °C e volume de injeção de 1,7 µL. As condições de separação obtidas pelo software foram avaliadas experimentalmente e nenhuma alteração adicional foi necessária, uma vez que a separação cromatográfica apresentou-se satisfatória.

O cromatograma de íons totais obtido, durante os 15 minutos da separação cromatográfica e de mais 5 minutos de reequilíbrio da coluna, está apresentado na Figura 33. A Figura 33 também mostra um comparativo entre os cromatogramas, obtidos através das técnicas CLAE e CLUE.

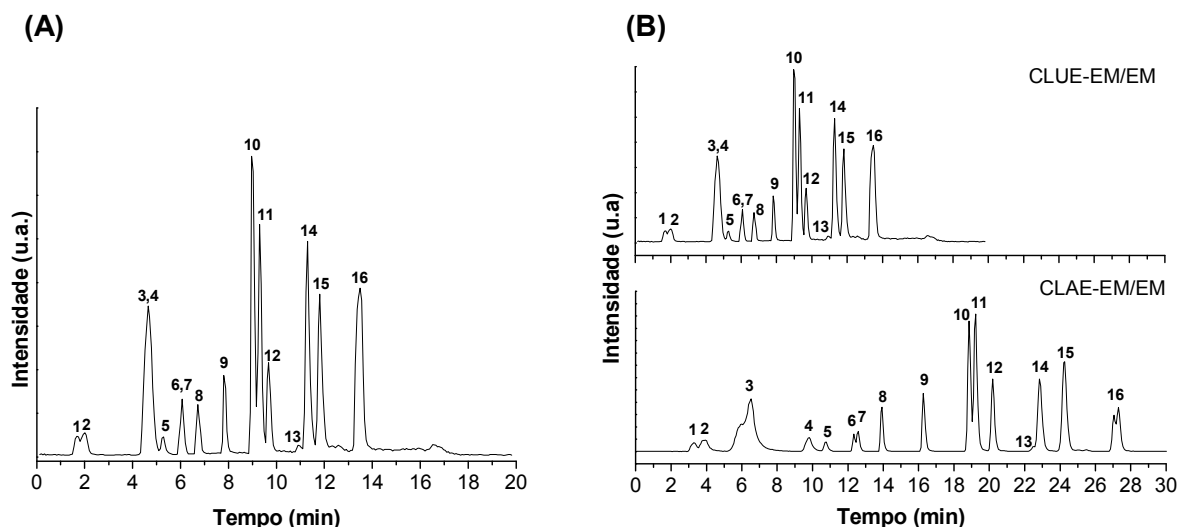


Figura 33: (A) Cromatograma de íons totais obtido na separação cromatográfica dos 16 agrotóxicos estudados por CLUE, utilizando-se coluna analítica Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) e coluna de guarda Van Guard® BEH C18 (5 x 2,1 mm, 1,7 µm). Condições cromatográficas: volume de injeção: 1,7 µL; fase móvel MeOH:H₂O 0,1% de ácido fórmico (% v/v) variando linearmente: 0 min – 15:85; 2,82 min – 15:85; 4,32 min – 40:60; 5,82 min – 60:40; 8,32 min – 70:30; 10,82 min – 70:30; 13,32 min – 85:15; 14,82 min – 85:15; 15,82 min – 15:85; 20 min – 15:85; vazão de 0,147 mL/min e temperatura de 25 °C. (B) Comparativo entre os cromatogramas de íons totais obtidos na separação cromatográfica dos agrotóxicos pelas técnicas de CLAE e CLUE. As condições cromatográficas de análise por CLAE estão descritas na Figura 11. Identificação dos picos: (1) metamidofós, (2) acefato, (3) carbendazim, (4) metomil, (5) tiametoxam, (6) imidacloprido, (7) clotianidina, (8) tiacloprido, (9) carbaril, (10) azoxistrobina, (11) fenamidona, (12) malationa, (13) iprodiona, (14) procloraz, (15) tebuconazol e (16) difenoconazol.

A Tabela 35 apresenta o tempo de retenção de cada analito, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, de acordo com a IUPAC⁸⁴.

Tabela 35: Tempo de retenção de cada agrotóxico estudado, no modo gradiente otimizado para a separação cromatográfica por CLUE, assim como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água de cada analito.

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	logP ^a
Metamidofós	1,64	-0,79
Acefato	1,92	-0,85
Carbendazim	4,29	1,48
Metomil	4,58	0,09
Tiametoxam	5,14	-0,13
Imidacloprido	5,94	0,57
Clotianidina	5,99	0,91
Tiacloprido	6,62	1,26

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	logP ^a
Carbaril	7,71	2,36
Azoxistrobina	8,84	2,50
Fenamidona	9,16	2,80
Malationa	9,51	2,75
Iprodiona	10,67	3,10
Procloraz	11,05	3,50
Tebuconazol	11,44	3,70
Difenoconazol	13,16	4,36

^alogaritmo do coeficiente de partição octanol/água em pH 7 e 20 °C, de acordo com a IUPAC⁸⁴.

Analisando-se a Figura 33A e a Tabela 35, observa-se que houve separação dos analitos em 15 minutos por CLUE-EM/EM, sendo metade do tempo empregado para a separação dos 16 agrotóxicos por CLAE-EM/EM, indicando a maior velocidade de análise pela técnica CLUE-EM/EM.

Analisando-se a Figura 33B, observa-se que os analitos mantiveram a mesma ordem de eluição, empregando-se as técnicas de CLAE e CLUE, uma vez que as colunas cromatográficas empregadas possuem fase estacionária de mesma natureza (C18), embora com propriedades e tecnologias diferentes, como dimensões da coluna, tamanho e tipo de partícula. Em relação ao comportamento dos analitos nas diferentes colunas e sistemas cromatográficos, obtiveram-se pequenas alterações na eluição dos compostos carbendazim, metomil, imidacloprido e clotianidina que coeluíram no sistema de CLUE-EM/EM, enquanto apresentaram maior resolução em CLAE-EM/EM, podendo afetar na detectabilidade desses analitos.

A Tabela 36 apresenta a subdivisão do cromatograma otimizado em janelas, assim como o *dwell time* definido para cada intervalo de tempo de análise por CLUE-EM/EM, a fim de otimizar a detectabilidade dos analitos e garantir que os picos cromatográficos sejam adquiridos com, no mínimo, 15 pontos.

Tabela 36: Compostos monitorados em cada intervalo de tempo da análise cromatográfica por CLUE-EM/EM, assim como o *dwell time* definido para cada janela.

Janela	Intervalo de Tempo (min)	Compostos Monitorados	Dwell Time (s)
1	0,00 – 4,00	Metamidofós e Acefato	0,5
2	2,50 – 7,60	Carbendazim, Metomil, Tiametoxam, Imidacloprido, Clotianidina e Tiacloprido	0,1
3	7,10 – 8,70	Carbaril	0,8
4	8,30 – 10,60	Azoxistrobina, Fenamidona e Malationa	0,3
5	10,10 – 13,20	Iprodiona, Procloraz e Tebuconazol	0,3
6	12,20 – 20,00	Difenoconazol	0,9

A Tabela 37 apresenta uma comparação dos resultados obtidos em relação à separação cromatográfica por CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM, em relação ao tempo de análise, vazão da fase móvel, volume de injeção e volume da fase móvel.

Através dos dados apresentados na Tabela 37, pode-se observar que houve uma redução de 50% no tempo da análise cromatográfica, quando se emprega o sistema CLUE-EM/EM, além do fato de menores vazões de fase móvel serem empregadas,

reduzindo a quantidade de solvente utilizada em aproximadamente 4 vezes e os custos das análises. Além disso, o volume de amostra a ser utilizado em CLUE-EM/EM também reduziu cerca de quatro vezes, fazendo com que menores quantidades de amostra sejam injetadas no equipamento, preservando a coluna e todo o sistema cromatográfico.

Tabela 37: Comparação dos resultados obtidos para a separação cromatográfica dos agrotóxicos, empregando os sistemas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.

Parâmetro	CLAE-EM/EM	CLUE-EM/EM	Vantagens da CLUE-EM/EM
Tempo de análise (min)	30	15	Redução 50%
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,3	0,147	Redução 51%
Volume de injeção (µL)	7	1,7	Redução 76%
Volume de fase móvel (mL)	9,0	2,2	Redução 76%

4.6.3 Determinação das concentrações iniciais de trabalho por CLUE-EM/EM

A Tabela 38 apresenta as concentrações iniciais de trabalho (C_0), definidas visualmente em solvente, empregando-se CLUE-EM/EM, observando-se a menor concentração detectável na qual foi possível distinguir claramente entre o sinal analítico e o ruído, e também considerando a repetitividade das áreas dos picos obtidas em três diferentes injeções. A Tabela 38 também apresenta os valores de C_0 obtidos por CLAE-EM/EM, anteriormente apresentados na Tabela 15, para fins de comparação.

Além dos valores de C_0 , a Tabela 38 também apresenta as razões entre a intensidade dos íons de quantificação e confirmação, gerados por *electrospray* no modo íon positivo, empregando-se a CLUE-EM/EM.

Através da Tabela 38, observa-se que a maioria dos analitos apresentou valores de concentração C_0 menores ou iguais ao empregar a CLUE-EM/EM, com exceção do analito acefato. Os valores dessas concentrações são indicativos da maior detectabilidade do sistema CLUE-EM/EM em relação à CLAE-EM/EM. Também, através desses valores, pode-se notar que a detectabilidade dos analitos carbendazim e metomil não foi afetada, em relação à CLAE-EM/EM pelo fato de estarem coelundo no sistema CLUE-EM/EM. No entanto, uma vez que os valores de C_0 são obtidos visualmente, o aumento da detectabilidade do sistema CLUE-EM/EM em relação ao CLAE-EM/EM apenas pode ser comprovada através dos estudos de determinação dos limites de detecção do instrumento.

Tabela 38: Concentrações iniciais de trabalho (C_0) para os agrotóxicos estudados empregando-se a CLAE-EM/EM e a CLUE-EM/EM e a razão entre os íons de quantificação e confirmação, obtida por CLUE-EM/EM, assim como seus desvios aceitos, de acordo com o SANCO.

Agrotóxico	CLUE-EM/EM		CLUE-EM/EM		CLAE-EM/EM	
	Razão entre os íons de quantificação e confirmação	Tolerância de desvio da razão entre os íons ^a	C_0 (µg/L)	$3xC_0$ (µg/L)	C_0 (µg/L)	$3xC_0$ (µg/L)
Metamidofós	1,8:1 (55%)	20%	15	45	20	60
Acefato	16,7:1 (6%)	50%	35	105	15	45
Carbendazim	6,1:1 (16%)	30%	5	15	5	15
Metomil	1,4:1 (70%)	20%	10	30	25	75
Tiametoxam	1,7:1 (58%)	20%	20	60	35	105
Imidacloprido	1,4:1 (73%)	20%	15	45	45	135
Clotianidina	1,2:1 (85%)	20%	15	45	30	90
Tiacloprido	4,7:1 (21%)	25%	5	15	15	45
Carbaril	4,1:1 (24%)	25%	5	15	10	30
Azoxistrobina	3,1:1 (32%)	25%	5	15	5	15
Fenamidona	1,0:1 (98%)	20%	5	15	5	15
Malationa	1,6:1 (64%)	20%	5	15	15	45
Iprodiona	4,3:1 (23%)	25%	40	120	45	135
Procloraz	6,9:1 (14%)	30%	5	15	10	30
Tebuconazol	10,4:1 (10%)	50%	5	15	5	15
Difenoconazol	3,0:1 (34%)	25%	5	15	10	30

^aAs tolerâncias aceitáveis de desvio da razão entre os íons expressas na tabela e utilizadas no trabalho estão descritas no Documento N° SANCO/12495/2011. No entanto, em revisões mais recentes deste guia (SANCO/12571/2013), as tolerâncias foram alteradas para 30%, independente do valor da razão entre os íons. Valores de tolerância maiores que 30% foram empregadas apenas para os analitos acefato e tebuconazol, porém não comprometeram a qualidade dos resultados obtidos.

Os valores de C_0 obtidos foram empregados nos estudos de porcentagem de recuperação e efeito matriz, avaliado através da comparação do sinal analítico, de acordo com a Equação 6.

4.6.4 Estudos de recuperação e efeito matriz da alface crespa por CLUE-EM/EM

A Tabela 39 apresenta os resultados de porcentagem de recuperação (obtidos na concentração $3xC_0$) e efeito matriz avaliado através do método da comparação do sinal analítico (em dois níveis de fortificação, C_0 e $3xC_0$), empregando-se o método QuEChERS otimizado, utilizando-se tampão citrato, acetonitrila, agitação por vórtex, centrifugação de 5 min a 5000 rpm e limpeza da amostra com 175 mg PSA, 1,050 g $MgSO_4$ e 35 mg GCB.

Tabela 39: Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação de cada agrotóxico estudado e estudos de efeito matriz realizado em dois níveis de fortificação, empregando-se o método QuEChERS com o uso da CLUE-EM/EM.

Agrotóxico	Porcentagem de Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)	Efeito Matriz (%) ^a	
			C ₀	3xC ₀
Metamidofós	78	12	12	-4
Acefato	90	17	10	8
Carbendazim	97	12	28	8
Metomil	98	19	-32	-19
Tiametoxam	102	20	-23	-28
Imidacloprido	106	16	-12	-10
Clotianidina	112	18	-18	-1
Tiacloprido	107	15	-23	-34
Carbaril	109	18	-13	-12
Azoxistrobina	103	15	-8	-15
Fenamidona	107	11	-8	-2
Malationa	100	12	-2	0
Iprodiona	115	17	-3	12
Procloraz	93	7	-5	2
Tebuconazol	102	13	-4	2
Difenoconazol	105	11	-4	0

^aEfeito matriz obtido pelo método da comparação do sinal analítico, determinado através da Equação 6.

Analisando-se os dados da Tabela 39, observa-se que todos os agrotóxicos estudados apresentaram porcentagens de recuperação na faixa de 70-120%, com coeficientes de variação abaixo de 20%.

Em relação ao efeito matriz, nos dois níveis de fortificação avaliados, observou-se que apenas 4 analitos apresentaram efeito matriz significativo (superior a 20% ou inferior a -20%). Comparando-se esses resultados com os obtidos empregando-se a CLAE-EM/EM, no qual 8 analitos apresentaram efeito matriz significativo, de acordo com a Tabela 19, pode-se observar uma menor influência dos componentes da matriz na ionização dos analitos, empregando a técnica de CLUE-EM/EM, para a alface crespa. A fim de se obterem maiores informações sobre a influência da técnica analítica nos resultados de efeito matriz, este também foi estudado para diferentes variedades de alface (lisa, americana, mimosa e roxa) e para a matriz espinafre.

4.6.5 Estudo do efeito matriz nas diferentes variedades de alface e espinafre por CLUE-EM/EM

A Tabela 40 apresenta os estudos de efeito matriz realizados através do método da comparação do sinal analítico, avaliado em dois níveis de concentração (C₀ e 3xC₀), para as alfaces lisa, americana, mimosa e roxa e para o espinafre.

Tabela 40: Porcentagens de efeito matriz obtidas em dois níveis de fortificação, para as alfaces lisa, americana, mimosa e roxa e para o espinafre, empregando-se CLUE-EM/EM.

Agrotóxico	Efeito Matriz ^a (%)									
	Alface								Espinafre	
	Lisa		Americana		Mimosa		Roxa		C ₀	3xC ₀
	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀	C ₀	3xC ₀
Metamidofós	81	99	64	146	9	-5	6	63	-4	-25
Acefato	129	186	72	186	40	15	38	141	13	3
Carbendazim	55	38	70	55	32	16	20	25	16	9
Metomil	-27	0	-3	-11	-24	-31	-34	-24	-38	-23
Tiametoxam	-17	-10	5	-5	-39	-24	-44	-7	-24	-30
Imidacloprido	-27	-18	4	-21	-13	-20	200	60	-14	-13
Clotianidina	-13	-14	-9	-20	-23	-15	-7	-13	-9	-15
Tiacloprido	-41	-23	-13	-34	-17	-29	-15	-26	-36	-35
Carbaril	-10	-13	-9	-16	-14	-9	-6	-6	3	-9
Azoxistrobina	-17	-18	-13	-19	-13	-17	-16	-17	-11	-14
Fenamidona	1	-1	2	-12	-1	-4	4	0	2	0
Malationa	1	1	-3	4	1	-5	1	0	-9	2
Iprodiona	-6	5	11	20	-7	19	-7	27	33	20
Procloraz	1	-1	-1	-12	0	-1	-4	5	-2	-4
Tebuconazol	-2	6	1	-8	3	1	-1	3	-7	-2
Difenoconazol	2	1	-5	-15	-6	-2	-6	4	2	-6

^aEfeito matriz obtido pelo método da comparação do sinal analítico, determinado através da Equação 6.

Na Figura 34, pode-se visualizar o número de analitos que apresentam efeito matriz negligenciáveis ou significativos, para todas as variedades de alface estudadas, inclusive a crespa, baseado nos dados das Tabelas 39 e 40.

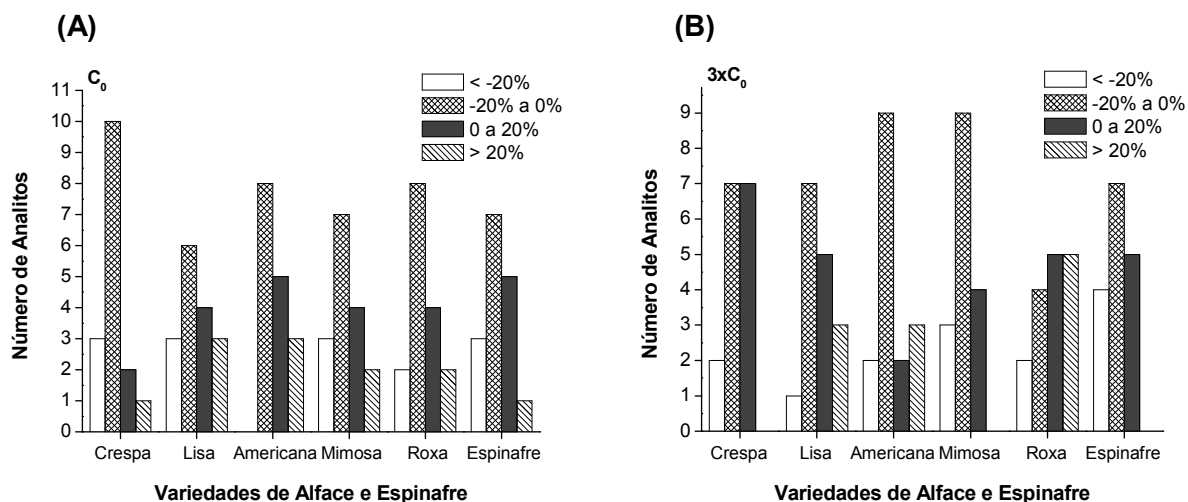


Figura 34: Distribuição numérica do efeito matriz em função do tipo de matriz estudada, avaliado por CLUE-EM/EM nos níveis de fortificação: (A) C₀ e (B) 3xC₀.

Através das Tabelas 39 e 40 pode-se verificar que, para as variedades de alface estudadas, considerando os dois níveis de fortificação estudados, o efeito matriz foi significativo para os analitos que eluem no início da separação cromatográfica, principalmente os analitos metamidofós e acefato, apresentando valores de efeito matriz na faixa de 40% a 186%. De acordo com a Figura 34, as alfaces lisa, americana e mimosa apresentaram um total de 37,5% dos analitos com efeito matriz significativo, enquanto que a alface roxa apresentou 50% dos analitos com efeito matriz superior a 20% (ou inferior a -20%). A alface crespa, por sua vez, conforme discutido anteriormente, apresentou 25% dos analitos com efeito matriz significativo. Em relação ao espinafre, cinco analitos (31,2%) apresentaram efeito matriz superior a 20% (ou inferior a -20%), com valores abaixo de 40%.

Comparando-se os resultados apresentados nas Tabelas 39 e 40 e na Figura 34, em relação aos dados de efeito matriz obtidos por CLAE-EM/EM, apresentados anteriormente na Tabela 28 e na Figura 29, pode-se observar um aumento no número de analitos que apresentaram efeito matriz significativo, para todas as variedades de alface estudadas e para o espinafre. Enquanto que por CLAE-EM/EM a alface crespa foi a matriz que apresentou maior número de compostos com efeito matriz significativo, em CLUE-EM/EM essa matriz foi a que obteve menor influência dos componentes da matriz na ionização dos analitos. Em relação ao espinafre, o efeito matriz foi maior em CLUE-EM/EM do que em CLAE-EM/EM, no qual pode ser considerado desprezível nas concentrações estudadas (C_0 e $3 \times C_0$).

O fato da CLUE-EM/EM apresentar maior incidência de efeito matriz pode ser justificada pelo fato da concentração dos analitos nos extratos ser inferior à concentração estudada por CLAE-EM/EM, fazendo com que os componentes da matriz, que estão na mesma concentração nos extratos, interfiram mais pronunciadamente na quantificação dos analitos em menores concentrações. Também, uma vez que o tempo de análise em CLUE-EM/EM é metade do tempo da CLAE-EM/EM, tem-se que os componentes da matriz estão eluindo no início da separação cromatográfica, juntamente com vários analitos, fazendo com que haja maior influência desses compostos na ionização dos agrotóxicos.

4.6.6 Validação do método por CLUE-EM/EM

4.6.6.1 Limites de detecção e de quantificação por CLUE-EM/EM

A Tabela 41 apresenta os dados das curvas analíticas para cada analito, elaboradas a partir da concentração de trabalho C_0 , obtida por CLUE-EM/EM, utilizando-se a matriz “branco” fortificada (alface crespa), para determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento.

Tabela 41: Dados das curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico, empregadas na determinação dos limites de detecção e quantificação do instrumento por CLUE-EM/EM.

Agrotóxico	Dados da curva analítica por CLUE-EM/EM				LDi ^a (µg/L)	LQi ^b (µg/L)	LMR (µg/kg) ^c
	Desvio do coeficiente linear (s)	Coeficiente angular (S)	r ²	s/S			
Metamidofós	11,6	19,1	0,999	0,6	2,0	6,1	NA ^d
Acefato	41,5	27,6	0,999	1,5	5,0	15,0	NA ^d
Carbendazim	47,7	150,9	0,998	0,3	1,0	3,2	NA ^d
Metomil	22,3	27,7	0,997	0,8	2,6	8,0	NA ^d
Tiametoxam	10,3	8,6	0,998	1,2	4,0	12,0	50
Imidacloprido	8,6	11,5	0,999	0,8	2,5	7,5	500
Clotianidina	6,3	10,6	0,999	0,6	2,0	6,0	100
Tiacloprido	8,4	51,9	1,000	0,2	0,5	1,6	200
Carbaril	11,2	39,3	0,999	0,3	0,9	2,8	NA ^d
Azoxistrobina	68,3	187,6	0,998	0,4	1,2	3,6	1000
Fenamidona	25,1	80,8	0,998	0,3	1,0	3,1	2000
Malationa	12,5	44,8	0,999	0,3	0,9	2,8	8000
Iprodiona	11,2	4,2	0,998	2,7	8,9	26,9	1000
Procloraz	55,4	145,5	0,997	0,4	1,3	3,8	NA ^d
Tebuconazol	55,8	180,4	0,998	0,3	1,0	3,1	NA ^d
Difenoconazol	89,3	179,3	0,996	0,5	1,6	5,0	500

^aLDi (limite de detecção do instrumento) calculado como 3,3 vezes a razão s/S; ^bLQi (limite de quantificação do instrumento) calculado como 10 vezes a razão s/S. ^cLMR de acordo com a ANVISA para a alface; ^dNA: agrotóxico não autorizado para emprego em alface.

A partir dos resultados da Tabela 41, pode-se observar que os limites de detecção e de quantificação do instrumento alcançaram valores menores que os LMR estabelecidos pela ANVISA para os agrotóxicos autorizados para uso na cultura da alface. Para os agrotóxicos não permitidos para aplicação em alface (carbendazim, acefato, carbaril, tebuconazol, metamidofós, metomil e procloraz) obtiveram-se limites de quantificação abaixo de 15 µg/L.

A Figura 35 apresenta um comparativo entre os limites de detecção do instrumento obtidos pelas técnicas analíticas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.

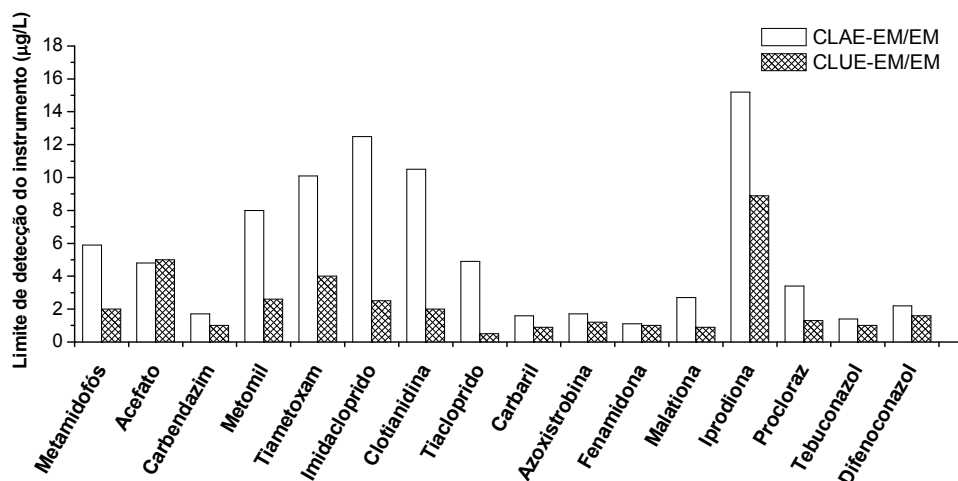


Figura 35: Comparativo entre os limites de detecção do instrumento, obtidos para a análise de 16 agrotóxicos em alface, empregando-se as técnicas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM.

De acordo com a Figura 35, menores limites de detecção do instrumento puderam ser obtidos através da técnica de CLUE-EM/EM para a maioria dos agrotóxicos estudados, com exceção do acefato, que apresentou menor LDi empregando-se CLAE-EM/EM. Através desse comportamento, observa-se aumento na detectabilidade dos analitos ao empregar-se a técnica de CLUE-EM/EM, sendo vantajoso principalmente na detecção dos analitos não autorizados para uso em alface, uma vez que, idealmente, não devem estar presentes na hortaliça. Para os analitos autorizados para serem empregados em alface, na qual há LMR estipulados, com valores muito superiores aos LDi, o ganho em detectabilidade observado em CLUE-EM/EM não afetará nos resultados de conformidade das amostras, quando submetidas às análises para verificação da presença dos agrotóxicos.

4.6.6.2 Linearidade e curva analítica por CLUE-EM/EM

A Tabela 42 apresenta os intervalos definidos para a elaboração da curva analítica, os limites de quantificação do método (LQ) ajustados para cada agrotóxico estudado e os dados de regressão linear das curvas elaboradas em solvente (padronização externa) e por padronização externa com superposição de matriz, assim como os resíduos obtidos.

Tabela 42: Intervalos de concentração das curvas analíticas obtidas por CLUE-EM/EM, o limite de quantificação do método e os dados de regressão das curvas analíticas elaboradas em solvente e por superposição de matriz.

Agrotóxico	Intervalo de linearidade (µg/kg)	LQ ^d (µg/kg)	Padronização externa				Superposição de matriz			
			Coef. linear	Coef. angular	r ²	Res. ^e	Coef. linear	Coef. angular	r ²	Res. ^e
Metamidofós	6 – 30 ^a	6	-21,7	25,1	0,997	< 9%	-15,3	24,7	0,993	< 7%
Acefato	15 – 75 ^a	15	-67,5	31,5	0,993	< 10%	97,0	30,5	0,995	< 5%
Carbendazim	3 – 16 ^a	3	-220,2	207,2	0,992	< 10%	-25,4	174,3	0,995	< 5%
Metomil	8 – 40 ^a	8	-73,5	48,0	0,994	< 7%	-87,7	47,7	0,997	< 6%
Tiametoxam	25 – 70 ^b	25	95,3	43,5	0,993	< 5%	-27,1	23,3	0,990	< 6%
Imidacloprido	250 – 700 ^b	250	1338,9	21,1	0,995	< 4%	-194,7	15,5	0,993	< 4%
Clotianidina	50 – 140 ^b	50	107,1	16,6	0,989	< 5%	-22,8	13,9	0,997	< 5%
Tiacloprido	100 – 280 ^b	100	4408,1	134,4	0,995	< 5%	-211,8	75,2	0,995	< 4%
Carbaril	3 – 14 ^a	3	49,7	102,0	0,997	< 6%	1,2	78,0	0,999	< 7%
Azoxistrobina	500 – 1400 ^b	500	101758,6	283,4	0,995	< 5%	39452,1	289,4	0,999	< 2%
Fenamidona	1000 – 2800 ^b	1000	699,9	103,6	0,996	< 4%	-1004,7	101,0	0,995	< 4%
Malationa	3200 – 8400 ^c	3200	94903,8	82,5	1,000	< 2%	18996,4	79,9	0,999	< 2%
Iprodiona	500 – 1400 ^b	500	-120,7	7,2	0,995	< 5%	32,2	7,3	0,997	< 4%
Procloraz	4 – 19 ^a	4	-18,4	190,8	0,999	< 2%	-37,3	180,1	1,000	< 1%
Tebuconazol	3 – 16 ^a	3	-99,1	194,5	0,997	< 5%	0,8	186,5	0,997	< 7%
Difenoconazol	250 – 700 ^b	250	-2133,0	198,0	0,997	< 3%	-4011,4	211,3	0,995	< 4%

Intervalo de linearidade: ^aLQ_i-5LQ_i; ^b0,5LMR-1,4LMR e ^c0,4LMR-1,05LMR. ^dLQ (limite de quantificação do método) estabelecido como o primeiro ponto da curva analítica. ^eResíduos da curva analítica, em módulo.

A Figura 36 apresenta as curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico estudado e a Figura 37 apresenta o gráfico de resíduos da regressão linear.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 42 e na Figura 36, tem-se que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo, apresentando coeficiente de determinação acima de 0,990 e resíduos abaixo de 10% e valores visualmente aleatórios (Figura 37), não apresentando tendência, confirmando a linearidade do método.

Também na Figura 36, pode-se observar que as curvas analíticas elaboradas na matriz apresentaram coeficientes angulares iguais ou inferiores aos coeficientes das curvas em solvente, para a maioria dos agrotóxicos estudados, com exceção do procloraz. Esse comportamento indica a supressão de sinal dos analitos, na presença dos componentes da matriz, nos níveis de concentração nos quais as curvas foram elaboradas. Essa tendência foi contrária à observada nas curvas analíticas elaboradas por CLAE-EM/EM. Diante disso, observa-se a presença do efeito matriz, fazendo com que seja necessária a elaboração de curvas na matriz, para a quantificação de agrotóxicos em alface.

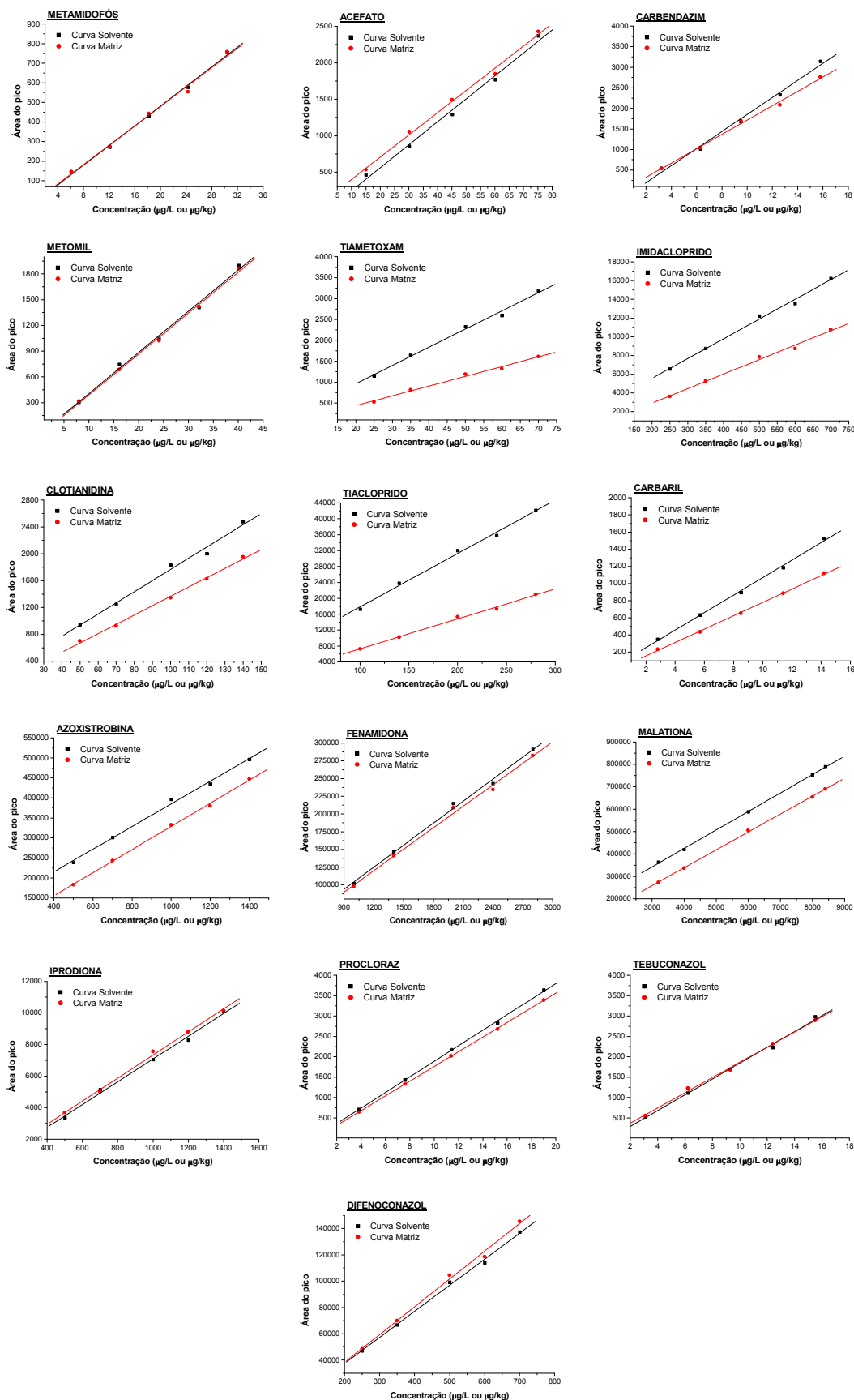


Figura 36: Curvas analíticas obtidas em solvente e por padronização externa com superposição de matriz para cada um dos analitos estudados, empregando-se a CLUE-EM/EM.

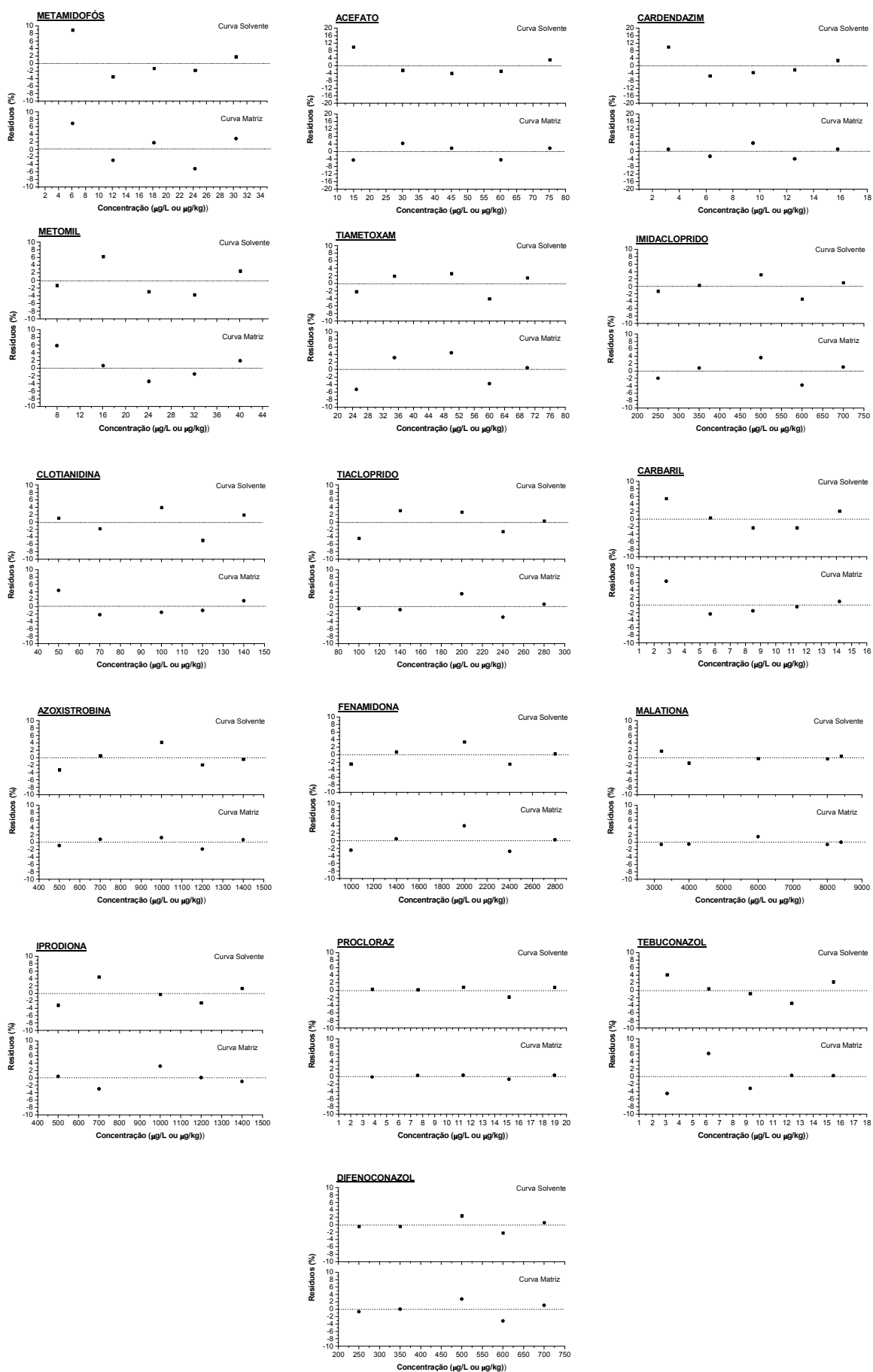


Figura 37: Resíduos da regressão linear obtida para os analitos analisados por CLUE-EM/EM.

A Figura 38 apresenta um comparativo entre os limites de quantificação do método obtidos pelas técnicas analíticas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM, para os analitos não autorizados para uso em alface (Figura 38A) e para os analitos autorizados (Figura 38B).

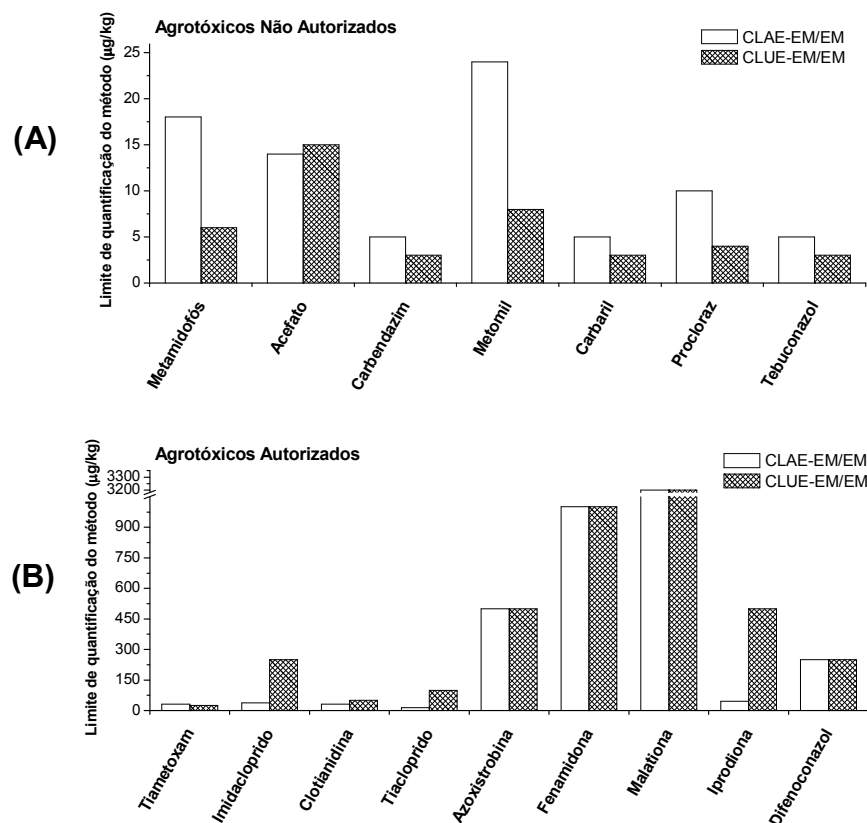


Figura 38: Comparativo dos limites de quantificação do método, obtidos através das técnicas analíticas CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM para a análise de: (A) agrotóxicos não autorizados para uso em alface; e (B) agrotóxicos autorizados.

Analisando-se a Figura 38A, observa-se que menores limites de quantificação foram obtidos para a maioria dos agrotóxicos não autorizados para uso em alface, com exceção do acefato, empregando-se a técnica de CLUE-EM/EM. A obtenção de menores LQ para analitos não autorizados é altamente vantajoso, uma vez que estes compostos, idealmente, não devem estar presentes nas amostras de alface. Em relação à Figura 38B, observa-se que houve um aumento no LQ dos agrotóxicos imidacloprido, clotianidina, tiacloprido e iprodiona, empregando-se a CLUE-EM/EM. No entanto, uma vez que esses agrotóxicos são autorizados para uso em alface, mesmo com maiores valores de LQ, eles ainda se encontram inferiores aos LMR de cada analito.

4.6.6.3 Seletividade por CLUE-EM/EM

A Figura 39 apresenta a comparação entre os sinais analíticos de amostras de alface crespa “branco” e fortificadas no nível do limite de quantificação do método (apresentados na Tabela 42), a fim de avaliar a seletividade do método.

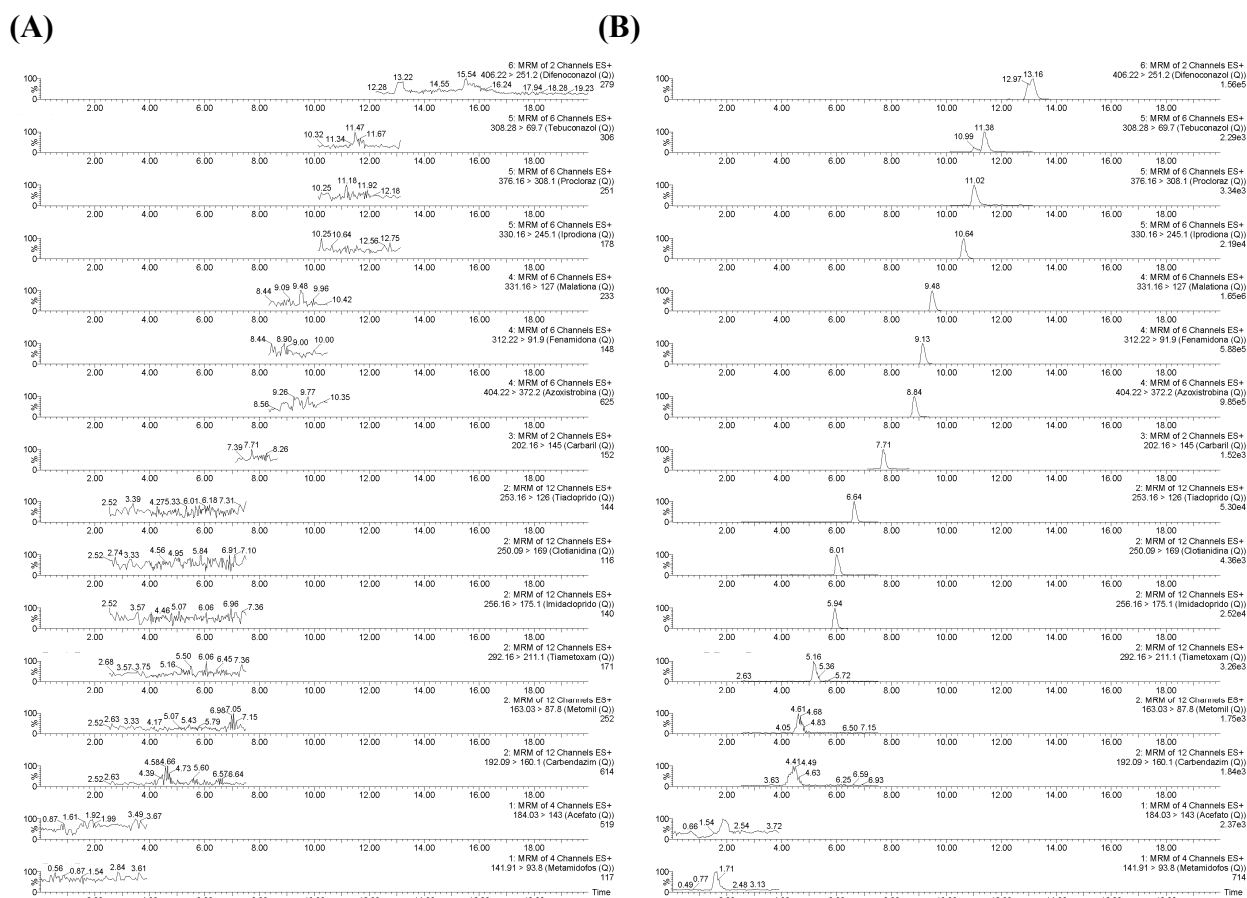


Figura 39: Comparação dos sinais analíticos dos 16 agrotóxicos estudados, obtidos por CLUE-EM/EM através da análise de: (A) uma amostra de alface crespa “branco” após a extração e (B) uma amostra de alface crespa fortificada após a extração, no limite de quantificação do método.

Analisando-se as Figuras 39A e 39B, que foram apresentadas em escalas diferentes para facilitar a visualização dos ruídos na Figura 39A, observa-se que na amostra “branco” não houve a presença de interferentes próximos aos tempos de retenção dos compostos, nem mesmo para o agrotóxico fenamidona, que apresentou sinal na amostra “branco” quando analisada por CLAE-EM/EM. Portanto, pode-se concluir que o método aplicado em CLUE-EM/EM é seletivo.

4.6.6.4 Precisão e exatidão por CLUE-EM/EM

A Tabela 43 apresenta os resultados obtidos na avaliação da repetitividade e precisão intermediária do método, assim como os resultados obtidos para a determinação da exatidão, através da Equação 10, avaliados em dois níveis de fortificação: LQ e no LMR (analitos autorizados) ou 3xLQ (analitos não autorizados).

Para a determinação da exatidão, foram elaboradas curvas analíticas para cada agrotóxico, acrescentando um nível inferior ao LQ (sendo 0,7xLQ para todos os agrotóxicos não autorizados e 0,2xLMR para todos os agrotóxicos autorizados), cujos dados da regressão linear também estão mostrados na Tabela 43.

Tabela 43: Precisão, curva analítica e exatidão obtidas na análise de 5 amostras fortificadas por CLUE-EM/EM, em dois níveis de concentração.

Agrotóxico	Precisão						Exatidão					
	CV (%)				CV (%) entre os dias ^a		Curva analítica			Recuperação (%)		
	Dia 1		Dia 2									
	LQ	LMR ou 3xLQ	LQ	LMR ou 3xLQ	LQ	LMR ou 3xLQ	Coef. linear	Coef. angular	r ²	LQ	LMR ou 3xLQ	
Metamidofós	5	7	4	8	1	1	-15,6	24,7	0,995	97	84	
Acefato	5	8	5	6	0	1	47,7	31,3	0,995	102	88	
Carbendazim	5	9	4	8	1	1	-13,9	173,4	0,996	110	93	
Metomil	4	9	3	7	1	1	-69,1	47,1	0,998	117	96	
Tiametoxam	5	4	4	5	1	1	-6,1	22,9	0,994	86	83	
Imidacloprido	2	3	2	6	0	2	-150,7	15,4	0,996	95	94	
Clotianidina	5	1	1	5	3	3	-34,4	14,0	0,998	94	93	
Tiacloprido	2	4	3	6	1	1	-140,0	74,9	0,998	95	94	
Carbaril	3	8	3	7	0	1	0,3	78,0	0,999	110	97	
Azoxistrobina	3	3	2	3	1	0	23354,0	304,0	0,997	84	83	
Fenamidona	2	3	2	5	0	1	-1641,8	101,2	0,997	102	100	
Malationa	2	3	1	3	1	0	16639,6	80,2	1,000	82	110	
Iprodiona	3	6	7	2	3	3	-31,2	7,4	0,998	75	77	
Procloraz	2	6	4	7	1	1	-38,1	180,1	1,000	105	92	
Tebuconazol	5	7	6	7	1	0	-20,8	188,3	0,998	119	107	
Difenoconazol	2	2	4	7	1	4	-2599,9	208,7	0,997	114	112	

^aCoeficiente de variação calculado através da média e desvio de 2 dados: a área média das 5 amostras analisadas no dia 1 e a área média das 5 amostras analisadas no dia 2, para cada analito.

Analisando-se a Tabela 43, observa-se que os valores de coeficiente de variação encontram-se abaixo de 20%, considerando ambos os níveis de fortificação e a comparação entre os resultados obtidos em dois dias diferentes, concluindo que o método desenvolvido é preciso. Em relação à exatidão, todas as recuperações avaliadas nos dois níveis de fortificação apresentaram valores na faixa aceita pela literatura (70-120%), indicando a adequada exatidão do método.

5 CONCLUSÕES

Métodos analíticos para a determinação de 16 agrotóxicos em alface foram desenvolvidos, otimizados e validados, empregando-se o método de preparo de amostra QuEChERS e as cromatografias líquidas de alta e de ultra eficiência acopladas à espectrometria de massas sequencial.

O método de extração QuEChERS foi otimizado para a extração de agrotóxicos em amostras de alface, de modo que o uso dos seguintes reagentes forneceram porcentagens de recuperação na faixa aceita pela literatura, com desvios inferiores a 20% e efeito matriz pouco pronunciável: acetonitrila como solvente extrator, tampão salino citrato, etapa de limpeza realizada com 175 mg PSA, 1,050 g de MgSO_4 e 35 mg de GCB, centrifugação de 5 min a 5000 rpm e uso da agitação por vórtex. Além disso, o método de extração otimizado mostrou-se rápido e eficiente, quando aplicado em amostras de alface.

Em relação à análise instrumental, o emprego da técnica de CLAE-EM/EM foi inicialmente estudada, sendo que as condições cromatográficas otimizadas foram transferidas para a CLUE-EM/EM e ambos os métodos foram validados, avaliando-se os limites de detecção e de quantificação, linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

Os limites de quantificação dos métodos variaram na faixa de 5 a 3200 $\mu\text{g/kg}$ para a CLAE-EM/EM e na faixa de 3 a 3200 $\mu\text{g/kg}$ para a CLUE-EM/EM. Em relação aos limites de detecção dos instrumentos, estes variaram na faixa de 1,4 a 15,2 $\mu\text{g/L}$ e de 0,5 a 8,9 $\mu\text{g/L}$ para a CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM, respectivamente. Os limites de quantificação dos métodos para os analitos permitidos para serem empregados na cultura de alface foram menores que os limites máximos de resíduos, definidos pela ANVISA.

As curvas analíticas, elaboradas por padronização externa com superposição da matriz, apresentaram coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,990 para os intervalos de concentração estudados, com resíduos menores que 20%.

Os métodos mostraram-se precisos, em termos de repetitividade para a análise de 5 amostras e precisão intermediária, obtendo-se coeficientes de variação abaixo de

20%. Para avaliação da exatidão do método, os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de fortificação variaram na faixa de 75 a 119%.

Em relação à seletividade, comparando-se os sinais analíticos dos agrotóxicos, obtidos através da análise de uma amostra “branco” e uma amostra fortificada, no limite de quantificação do método, não se observou a presença de picos interferentes.

Portanto, tem-se que os métodos desenvolvidos são seletivos, precisos e exatos, podendo ser empregados para a análise de agrotóxicos em amostras de alface.

Os métodos analíticos desenvolvidos, otimizados e validados, inicialmente para a alface crespa, foram aplicados nas análises de diferentes variedades de alface, incluindo a lisa, a americana, a mimosa e a roxa, obtendo-se porcentagens de recuperação dos analitos na faixa aceita na literatura (70-120%), com coeficientes de variação inferiores a 20% e efeito matriz pouco significativo. Os métodos também foram estudados para a determinação de agrotóxicos em espinafre, que é uma hortaliça de composição similar à alface, possuindo elevado teor de água, obtendo-se excelentes resultados em relação à porcentagem de recuperação dos analitos (70-120%), coeficiente de variação (abaixo de 20%), linearidade adequada (r^2 acima de 0,990 e resíduos menores que 20%) e efeito matriz pouco significativo.

As análises de amostras de diferentes variedades de alface adquiridas no comércio da região de Campinas-SP mostraram que 43% das 14 amostras analisadas não estavam em concordância com a ANVISA, apresentando, em sua maioria, agrotóxicos não permitidos para serem aplicados em alface. Para o espinafre, no qual nenhum dos agrotóxicos estudados é autorizado para ser aplicado, foram detectados agrotóxicos nas quatro amostras analisadas. Nesse contexto, torna-se indispensável o monitoramento dessas culturas, fiscalizando e regulamentando a produção agrícola dessas hortaliças, a fim de que produtos de melhores qualidades sejam disponibilizados no comércio, assegurando a qualidade do meio ambiente e da saúde humana e animal.

A transferência do método desenvolvido por CLAE-EM/EM para a CLUE-EM/EM mostrou uma redução significativa no tempo da análise cromatográfica, de 30 para 15 minutos e menores vazões de fase móvel foram empregadas, reduzindo significativamente os custos das análises. Além disso, o volume de amostra a ser utilizado em CLUE-EM/EM também reduziu, fazendo com que menores quantidades de

amostra sejam injetadas no sistema, aumentando o tempo de vida útil da coluna e preservando todo o sistema cromatográfico.

Portanto, os métodos desenvolvidos e validados mostraram-se inovadores, uma vez que, até o presente momento, e conforme discutido anteriormente, não há relatos na literatura de trabalhos que envolvam a análise de agrotóxicos pertencentes à diferentes grupos químicos simultaneamente (análise multirresíduos), otimizados para a análise matriz alface. Conforme dados disponibilizados na literatura para a análise multirresíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, inclusive a alface (Tabela 4), as porcentagens de recuperação e os coeficientes de variação obtidos foram semelhantes àqueles dos métodos desenvolvidos e validados neste trabalho. No entanto, em relação aos limites de quantificação do método, menores limites foram atingidos para a análise dos agrotóxicos estudados, aplicando-se o método QuEChERS otimizado e a detecção por CLUE-EM/EM, fato que é altamente vantajoso, uma vez que se objetiva a determinação de quantidades cada vez menores de resíduos de agrotóxicos em alface.

REFERÊNCIAS

- 1 KREYCI, P. F.; MENTEN, J. O. M. Limitadoras de produtividade. **Revista Cultivar - Caderno Técnico**, p. 3-10, 2013.
- 2 COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- 3 BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.
- 4 BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo decreto nº 98816. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Em: **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 1989.
- 5 CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde**. Rio de Janeiro-RJ: ABRASCO, 2012. 89 p.
- 6 ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of currently used pesticides in biota. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2659-2681, 2012.

- 7 FILHO, J. P. A. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo-SP: Annablume Editora, 2002. 188 p.
- 8 SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 187-194, 2012.
- 9 IBGE. **Censo Agropecuário 2006: Brasil, grandes regiões e unidades de federação**. Rio de Janeiro-RJ, 2006. 777 p.
- 10 Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **Projeto para o Levantamento dos Dados Socioeconômicos da Cadeia Produtiva de Hortaliças no Brasil, 2012**, p. 1-58, 2014.
- 11 SILVA, E. M. N. C. P.; FERREIRA, R. L. F.; NETO, S. E. A.; TAVELLA, L. B.; SOLINO, A. J. S. Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 242-245, 2011.
- 12 Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **Pesquisa de Mercado de Sementes de Hortaliças: 2007 a 2009**. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>. Acesso em: maio de 2014.
- 13 HENZ, G. P.; SUINAGA, F. Tipos de Alface Cultivados no Brasil. **Comunicado Técnico Embrapa - Número 75**, p. 1-7, 2009.
- 14 NETO, E. B.; BARRETO, L. P. As técnicas de hidroponia. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 8, p. 107-137, 2012.
- 15 FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; FONSECA, M. C. M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.
- 16 LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da Alface**. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2010. 68 p.
- 17 BARRIÈRE, V.; LECOMPTE, F.; NICOT, P. C.; MAISONNEUVE, B.; TCHAMITCHIAN, M.; LESCOURRET, F. Lettuce cropping with less pesticides. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 175-198, 2014.
- 18 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.
- 19 KAIPPER, B. I. A.; MADUREIRA, L. A. S.; CORSEUIL, H. X. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique for analysis of pesticide residues in tomatoes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 514-518, 2001.
- 20 ZHANG, L.; LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.
- 21 CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

- 22 MILLS, P. A.; ONLEY, J. H.; GAITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 46, p. 186-191, 1963.
- 23 PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- 24 SCHENCK, F. J.; CALLERY, P.; GANNETT, P. M.; DAFT, J. R.; LEHOTAY, S. J. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1177-1180, 2002.
- 25 LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 58, n. 5, p. 1020-1026, 1975.
- 26 OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSU, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S. Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 51, n. 9, p. 2501-2505, 2003.
- 27 SOBHANZADEH, E.; BAKAR, N. K. A.; ABAS, M. R.; NEMAT, K. Sample preparation methods for pesticides analysis in food matrices and environmental samples by chromatography-based techniques: A review. **Journal of Fundamental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 106-128, 2009.
- 28 PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 488, p. 73-87, 2001.
- 29 ZAMBONIN, C. G. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 1, p. 73-80, 2003.
- 30 BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.
- 31 BARKER, S. A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 63-68, 2000.
- 32 RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.
- 33 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- 34 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.

- 35 PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. 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. 1697-1714, 2007.
- 36 LEHOTAY, S. J.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. 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. 595-614, 2005.
- 37 PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- 38 LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485-520, 2007.
- 39 LEHOTAY, S. J.; KOESUKWIWAT, U.; VAN DER KAMP, H.; MOL, H. G. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Qualitative aspects in the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using fast, low-pressure gas chromatography - time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7544-7556, 2011.
- 40 CAMINO-SANCHEZ, F. J.; ZAFRA-GOMEZ, A.; OLIVER-RODRIGUEZ, B.; BALLESTEROS, O.; NAVALON, A.; CROVETTO, G.; VILCHEZ, J. L. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005-accredited method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetable samples by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 27, p. 1532-1544, 2010.
- 41 ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Chapter 46. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. Em: **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**, p.439-458, 2007.
- 42 CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.
- 43 GERSTEL. Automated Disposable Pipette Extraction - DPX. **Global Analytical Solutions**, p. 1-4, 2014.
- 44 CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229-248, 2000.
- 45 TADEO, J. L.; PÉREZ, R. A.; ALBERO, B.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C. Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residues in soil. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 5, p. 1258-1271, 2012.
- 46 PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

- 47 PICÓ, Y.; FONT, G.; RUIZ, M. J.; FERNANDÉZ, M. Control of pesticides residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 917-960, 2006.
- 48 QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A.; ANDRADE, J. A.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 17 p.
- 49 ESTURK, O.; YAKAR, Y.; AYHAN, Z. Pesticide residue analysis in parsley, lettuce and spinach by LC-MS/MS. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 458-466, 2014.
- 50 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas-SP: UNICAMP, 2006. 456 p.
- 51 MEYER, V. R. **Practical High Performance Liquid Chromatography**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 357 p.
- 52 LANÇAS, F. M. **Cromatografia Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas-SP: Editora Átomo, 2009. 382 p.
- 53 MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC-Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.
- 54 MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.
- 55 GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 475-482, 2007.
- 56 GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 430-440, 2008.
- 57 QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.
- 58 MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry - IUPAC Recommendations. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, p. 1-48, 2006.
- 59 VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclatura de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.
- 60 STEFANO, V. D.; AVELLONE, G.; BONGIORNO, D.; CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; DRAHOS, L.; VÉKEY, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74-85, 2012.

- 61 BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-40, 2012.
- 62 CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- 63 CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.
- 64 WATERS. **Micromass Quattro micro API Mass Spectrometer: Operator's Guide**, p. 1-230, 2002.
- 65 FAN, S.; DENG, K.; YU, C.; ZHAO, P.; BAI, A.; LI, Y.; PAN, C.; LI, X. Influence of different planting seasons of six leaf vegetables on residues of five pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9036-9044, 2013.
- 66 FAN, S.; ZHANG, F.; DENG, K.; YU, C.; LIU, S.; ZHAO, P.; PAN, C. Spinach or amaranth contains highest residue of metalaxyl, fluazifop-P-butyl, chlorpyrifos, and lambda-cyhalothrin on six leaf vegetables upon open field application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2039-2044, 2013.
- 67 PERUGA, A.; HIDALGO, C.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 126-134, 2013.
- 68 DONG, F.; CHEN, X.; LIU, X.; XU, J.; LI, Y.; SHAN, W.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of five pyrazole fungicides in cereals, vegetables and fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 98-106, 2012.
- 69 PERUGA, A.; GRIMALT, S.; LÓPEZ, F. J.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Optimisation and validation of a specific analytical method for the determination of thiram residues in fruits and vegetables by LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 135, p. 186-192, 2012.
- 70 WANG, S.; XU, Y.; PAN, C.; JIANG, S.; LIU, F. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 673-685, 2007.
- 71 NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 881-899, 2006.
- 72 KEBARLE, P.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase: The mechanism of electrospray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 972A-986A, 1993.
- 73 KRUBE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58 - 66, 2008.

- 74 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
- 75 CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 22-34, 2007.
- 76 PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. 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, p. 123-136, 2007.
- 77 PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- 78 Document SANCO/12495/2011. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, p. 40, 2012.
- 79 European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. **Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANCO/12571/2013**, p. 1-46, 2013.
- 80 Codex Alimentarius - Codex Committee on Pesticide Residues. **Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticides Residue Analysis. CAC/GL 40-1993**, p. 1-36, 2010.
- 81 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 82 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 1 ed. São Carlos-SP: RiMa, 2004. 46 p.
- 83 ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bionanalíticos**. 2003.
- 84 IUPAC - Global availability of information on agrochemicals. **Pesticide Properties Database**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>. Acesso em: maio de 2014.
- 85 U.S. Environmental Protection Agency. **EPA Method 1699: Pesticides in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS**, p. 1-96, 2007.
- 86 LEBEDEV, A. **Comprehensive Environmental Mass Spectrometry**. UK: ILM Publications, 2012. 510 p.
- 87 IWAFUNE, T.; OGINO, T.; WATANABE, E. Water-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoid insecticides and their metabolites in green pepper/tomato samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2790-2796, 2014.
- 88 NETO, B. B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. Campinas-SP: Editora Unicamp, 2007. 480 p.

- 89 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow-UK: Pearson/Prentice Hall, 2005. 268 p.
- 90 DOMÍNGUEZ, A. M.; PLACENCIA, F.; CERECEDA, F.; FADIC, X.; QUIROZ, W. Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 2, p. 148-156, 2014.
- 91 BEGNINI, F. R. **Preparação e caracterização de fase estacionária reversa fenil-propil-metil-siloxano, imobilizada por micro-ondas, para cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2011. 108 p.
- 92 BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Preparation and characterization of a new microwave immobilized poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane stationary phase for reversed phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1297, p. 113-122, 2013.
- 93 PAÍGA, P.; MORAIS, S.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; ALVES, A. Determination of carbamate and urea pesticide residues in fresh vegetables using microwave-assisted extraction and liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 199-210, 2009.
- 94 MILESTONE. **Milestone Start E User Manual**. 2007. 58 p.
- 95 LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.
- 96 AL-TAHER, F.; CHEN, Y.; WYLIE, P.; CAPPOZZO, J. Reduction of pesticide residues in tomatoes and other produce. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 3, p. 510-515, 2013.
- 97 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia do Agrotóxico Acefato**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: maio de 2014.

APÊNDICE

Tabela A.1: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se diferentes tempos e velocidades de centrifugação.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas					
	1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	2 vs 3	2 vs 4	3 vs 4
Metamidofós	0,591	0,100	0,845	0,231	0,469	0,074
Acefato	0,866	0,610	0,042	0,501	0,055	0,018
Carbendazim	0,825	0,274	0,813	0,372	0,987	0,380
Metomil	0,283	0,195	0,010	0,799	0,060	0,090
Tiametoxam	0,220	0,255	0,849	0,920	0,289	0,333
Imidacloprido	0,150	0,032	0,637	0,349	0,304	0,069
Clotianidina	0,066	0,026	0,661	0,573	0,032	0,013
Tiacloprido	0,173	0,063	0,001	0,529	0,009	0,023
Carbaril	0,075	0,692	0,043	0,140	0,737	0,082
Azoxistrobina	0,331	0,234	0,026	0,807	0,006	0,004
Fenamidona	0,897	0,796	0,183	0,699	0,150	0,268
Malationa	0,015	0,007	0,039	0,624	0,557	0,294
Iprodiona	0,075	0,011	0,202	0,252	0,531	0,095
Procloraz	0,080	0,086	0,491	0,962	0,235	0,252
Tebuconazol	0,618	0,809	0,024	0,795	0,054	0,035
Difenoconazol	0,033	0,109	0,189	0,460	0,286	0,724

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança (correspondem à probabilidade de se obter valores estatisticamente diferentes para os resultados observados). Tempo e velocidade de centrifugação (fatores) - 1: 5 min a 4000 rpm, 2: 5 min a 5000 rpm, 3: 10 min a 5000 rpm e 4: 5 min a 5500 rpm.

Tabela A.2: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se diferentes tempos de interação dos agrotóxicos com a matriz.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas	
	1 vs 2	
Metamidofós	0,633	
Acefato	0,988	
Carbendazim	0,910	
Metomil	0,917	
Tiametoxam	0,929	
Imidacloprido	0,628	
Clotianidina	0,799	
Tiacloprido	0,681	
Carbaril	0,326	
Azoxistrobina	0,780	
Fenamidona	0,866	
Malationa	0,035	
Iprodiona	0,166	
Procloraz	0,827	
Tebuconazol	0,534	
Difenoconazol	0,962	

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Tempo de interação dos agrotóxicos com a matriz - 1: 30 minutos e 2: 1 hora.

Tabela A.3: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se diferentes sais na etapa de particionamento.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas									
	1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	1 vs 5	2 vs 3	2 vs 4	2 vs 5	3 vs 4	3 vs 5	4 vs 5
Metamidofós	0,179	0,111	0,573	0,004	0,010	0,408	0,047	0,042	0,000	0,011
Acefato	0,000	0,029	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,265	0,015	0,109
Carbendazim	0,653	0,005	0,867	0,086	0,011	0,539	0,180	0,004	0,123	0,064
Metomil	0,002	0,000	0,095	0,001	0,031	0,034	0,483	0,001	0,106	0,010
Tiametoxam	0,292	0,002	0,624	0,080	0,015	0,137	0,424	0,001	0,062	0,034
Imidacloprido	0,945	0,005	0,926	0,071	0,006	0,871	0,079	0,004	0,150	0,060
Clotianidina	0,937	0,006	0,722	0,107	0,005	0,781	0,094	0,003	0,123	0,058
Tiacloprido	0,001	0,003	0,914	0,023	0,529	0,001	0,079	0,002	0,222	0,019
Carbaril	0,000	0,000	0,265	0,001	0,476	0,001	0,326	0,003	0,776	0,005
Azoxistrobina	0,001	0,001	0,088	0,019	0,000	0,000	0,000	0,017	0,077	0,395
Fenamidona	0,507	0,520	0,945	0,026	0,983	0,550	0,084	0,564	0,081	0,030
Malationa	0,000	0,000	0,388	0,002	0,351	0,002	0,418	0,000	0,098	0,008
Iprodiona	0,004	0,060	0,141	0,013	0,131	0,000	0,464	0,004	0,398	0,001
Procloraz	0,004	0,002	0,257	0,008	0,766	0,028	0,662	0,016	0,467	0,059
Tebuconazol	0,034	0,000	0,013	0,001	0,016	0,569	0,069	0,043	0,409	0,178
Difenoconazol	0,175	0,003	0,305	0,007	0,033	0,713	0,084	0,017	0,590	0,044

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Tipo de sal - 1: $MgSO_4$ e NaCl (Original), 2: $MgSO_4$ (Original sem NaCl), 3: Tampão citrato sem NaCl, 4: Tampão citrato e 5: Tampão acetato.

Tabela A.4: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se tampão acetato e diferentes quantidade de PSA na etapa de limpeza.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas	
	1 vs 2	
Metamidofós	0,473	
Acefato	0,190	
Carbendazim	0,472	
Metomil	0,576	
Tiametoxam	0,866	
Imidacloprido	0,380	
Clotianidina	0,570	
Tiacloprido	0,182	
Carbaril	0,341	
Azoxistrobina	0,282	
Fenamidona	0,009	
Malationa	0,630	
Iprodiona	0,802	
Procloraz	0,360	
Tebuconazol	0,051	
Difenoconazol	0,465	

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Quantidade de PSA na etapa de limpeza, empregando-se tampão acetato com sal de particionamento - 1: 175 mg PSA e 2: 350 mg PSA.

Tabela A.5: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se diferentes solventes extratores.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas					
	1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	2 vs 3	2 vs 4	3 vs 4
Metamidofós	0,000	0,000	0,000	0,546	0,639	0,296
Acefato	0,000	0,000	0,000	0,062	0,092	0,799
Carbendazim	0,486	0,107	0,006	0,035	0,002	0,096
Metomil	0,799	0,578	0,054	0,424	0,036	0,131
Tiametoxam	0,073	0,201	0,010	0,521	0,243	0,089
Imidacloprido	0,911	0,235	0,023	0,276	0,027	0,165
Clotianidina	0,354	0,142	0,010	0,539	0,047	0,128
Tiacloprido	0,901	0,325	0,025	0,274	0,020	0,126
Carbaril	0,474	0,320	0,064	0,108	0,020	0,307
Azoxistrobina	0,183	0,059	0,009	0,006	0,001	0,254
Fenamidona	0,113	0,001	0,001	0,018	0,006	0,485
Malationa	0,165	0,003	0,000	0,023	0,001	0,074
Iprodiona	0,004	0,001	0,000	0,357	0,000	0,000
Procloraz	0,097	0,001	0,000	0,018	0,003	0,275
Tebuconazol	0,096	0,000	0,000	0,001	0,001	0,733
Difenoconazol	0,011	0,000	0,000	0,006	0,002	0,449

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Solventes extratores - 1: Acetato de etila, 2: Acetona, 3: Acetonitrila:acetona (1:1 v/v) e 4: Acetonitrila.

Tabela A.6: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se diferentes combinações dos sais de limpeza PSA, $MgSO_4$ e GCB.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas					
	1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	2 vs 3	2 vs 4	3 vs 4
Metamidofós	0,003	0,000	0,303	0,147	0,001	0,000
Acefato	0,083	0,045	0,712	0,711	0,045	0,025
Carbendazim	0,187	0,695	0,057	0,102	0,456	0,030
Metomil	0,186	0,121	0,708	0,781	0,321	0,215
Tiametoxam	0,221	0,137	0,868	0,753	0,173	0,106
Imidacloprido	0,407	0,537	0,846	0,824	0,314	0,423
Clotianidina	0,074	0,136	0,697	0,702	0,137	0,245
Tiacloprido	0,536	0,630	0,517	0,888	0,222	0,273
Carbaril	0,000	0,103	0,569	0,000	0,000	0,248
Azoxistrobina	0,017	0,029	0,250	0,000	0,003	0,194
Fenamidona	0,002	0,005	0,035	0,434	0,065	0,227
Malationa	0,000	0,377	0,138	0,000	0,000	0,032
Iprodiona	0,038	0,161	0,393	0,379	0,154	0,539
Procloraz	0,863	0,148	0,658	0,192	0,542	0,073
Tebuconazol	0,081	0,011	0,070	0,001	0,004	0,271
Difenoconazol	0,787	0,035	0,410	0,023	0,284	0,136

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Sais de limpeza da amostra - 1: PSA e $MgSO_4$; 2: PSA, $MgSO_4$ e 17,5 mg GCB; 3: PSA, $MgSO_4$ e 35 mg GCB e 4: PSA, $MgSO_4$ e 70 mg GCB.

Tabela A.7: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, empregando-se o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas		
	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
Metamidofós	0,490	0,349	0,790
Acefato	0,507	0,027	0,070
Carbendazim	0,108	0,038	0,476
Metomil	0,010	0,168	0,074
Tiametoxam	0,278	0,298	0,058
Imidacloprido	0,121	0,804	0,085
Clotianidina	0,168	0,164	0,020
Tiacloprido	0,300	0,023	0,105
Carbaril	0,711	0,970	0,683
Azoxistrobina	0,919	0,135	0,117
Fenamidona	0,000	0,000	0,004
Malationa	0,000	0,000	0,232
Iprodiona	0,948	0,593	0,637
Procloraz	0,893	0,156	0,189
Tebuconazol	0,615	0,282	0,138
Difenoconazol	0,493	0,796	0,356

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Combinações de sais com o sorvente Si(PFPMS) - 1: Si(PFPMS) e $MgSO_4$, 2: Si(PFPMS), $MgSO_4$ e GCB e 3: Si(PFPMS), PSA e $MgSO_4$.

Tabela A.8: Valores de P (probabilidade) obtidos nas combinações estudadas do método QuEChERS, comparando-se a limpeza da amostra com os sais PSA/ $MgSO_4$ /GCB e Si(PFPMS)/ $MgSO_4$ /GCB.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas	
	1 vs 2	
Metamidofós	0,027	
Acefato	0,024	
Carbendazim	0,620	
Metomil	0,245	
Tiametoxam	0,777	
Imidacloprido	0,604	
Clotianidina	0,422	
Tiacloprido	0,348	
Carbaril	0,100	
Azoxistrobina	0,128	
Fenamidona	0,000	
Malationa	0,407	
Iprodiona	0,891	
Procloraz	0,144	
Tebuconazol	0,543	
Difenoconazol	0,146	

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Sais empregados na etapa de limpeza - 1: PSA, $MgSO_4$ e GCB e 2: Si(PFPMS), $MgSO_4$ e GCB.

Tabela A.9: Valores de P (probabilidade) obtidos comparando-se o método QuEChERS original, com agitação por vórtex e centrifugação, e o método empregando ponteiras descartáveis.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas
	1 vs 2
Metamidofós	0,543
Acefato	0,025
Carbendazim	0,534
Metomil	0,118
Tiametoxam	0,058
Imidacloprido	0,623
Clotianidina	0,071
Tiacloprido	0,098
Carbaril	0,082
Azoxistrobina	0,141
Fenamidona	0,015
Malationa	0,835
Iprodiona	0,750
Procloraz	0,093
Tebuconazol	0,083
Difenoconazol	0,307

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Método QuEChERS empregando - 1: Agitação e centrifugação (original) e 2: Ponteiras descartáveis.

Tabela A.10: Valores de P (probabilidade) obtidos empregando-se o método QuEChERS com agitação por vórtex ou ultrassom.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas
	1 vs 2
Metamidofós	0,440
Acefato	0,136
Carbendazim	0,590
Metomil	0,092
Tiametoxam	0,136
Imidacloprido	0,259
Clotianidina	0,029
Tiacloprido	0,040
Carbaril	0,036
Azoxistrobina	0,145
Fenamidona	0,010
Malationa	0,103
Iprodiona	0,136
Procloraz	0,013
Tebuconazol	0,269
Difenoconazol	0,071

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Modo de agitação- 1: Vórtex e 2: Ultrassom.

Tabela A.11: Valores de P (probabilidade) obtidos comparando-se o emprego da extração por micro-ondas com e sem a etapa adicional de limpeza da amostra, com os sais PSA, MgSO₄ e GCB.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas
	1 vs 2
Metamidofós	0,277
Acefato	0,087
Carbendazim	0,021
Metomil	0,553
Tiametoxam	0,276
Imidacloprido	0,215
Clotianidina	0,321
Tiacloprido	0,866
Carbaril	0,356
Azoxistrobina	0,327
Fenamidona	0,253
Malationa	0,283
Iprodiona	0,239
Procloraz	0,441
Tebuconazol	0,096
Difenoconazol	0,806

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Extração por micro-ondas - 1: Sem etapa de limpeza e 2: Com etapa de limpeza.

Tabela A.12: Valores de P (probabilidade) obtidos comparando-se o emprego do método QuEChERS otimizado com a extração por micro-ondas.

Agrotóxico	Valores de P* nas diferentes combinações das variações estudadas
	1 vs 2
Metamidofós	0,001
Acefato	0,080
Carbendazim	0,002
Metomil	0,004
Tiametoxam	0,158
Imidacloprido	0,236
Clotianidina	0,053
Tiacloprido	0,055
Carbaril	0,013
Azoxistrobina	0,098
Fenamidona	0,005
Malationa	0,015
Iprodiona	0,812
Procloraz	0,046
Tebuconazol	0,309
Difenoconazol	0,099

*Valores de P inferiores a 0,050 ($P < 0,050$) indicam diferença significativa entre os fatores analisados, considerando-se 95% de confiança. Método de extração - 1: QuEChERS otimizado e 2: Extração por micro-ondas.

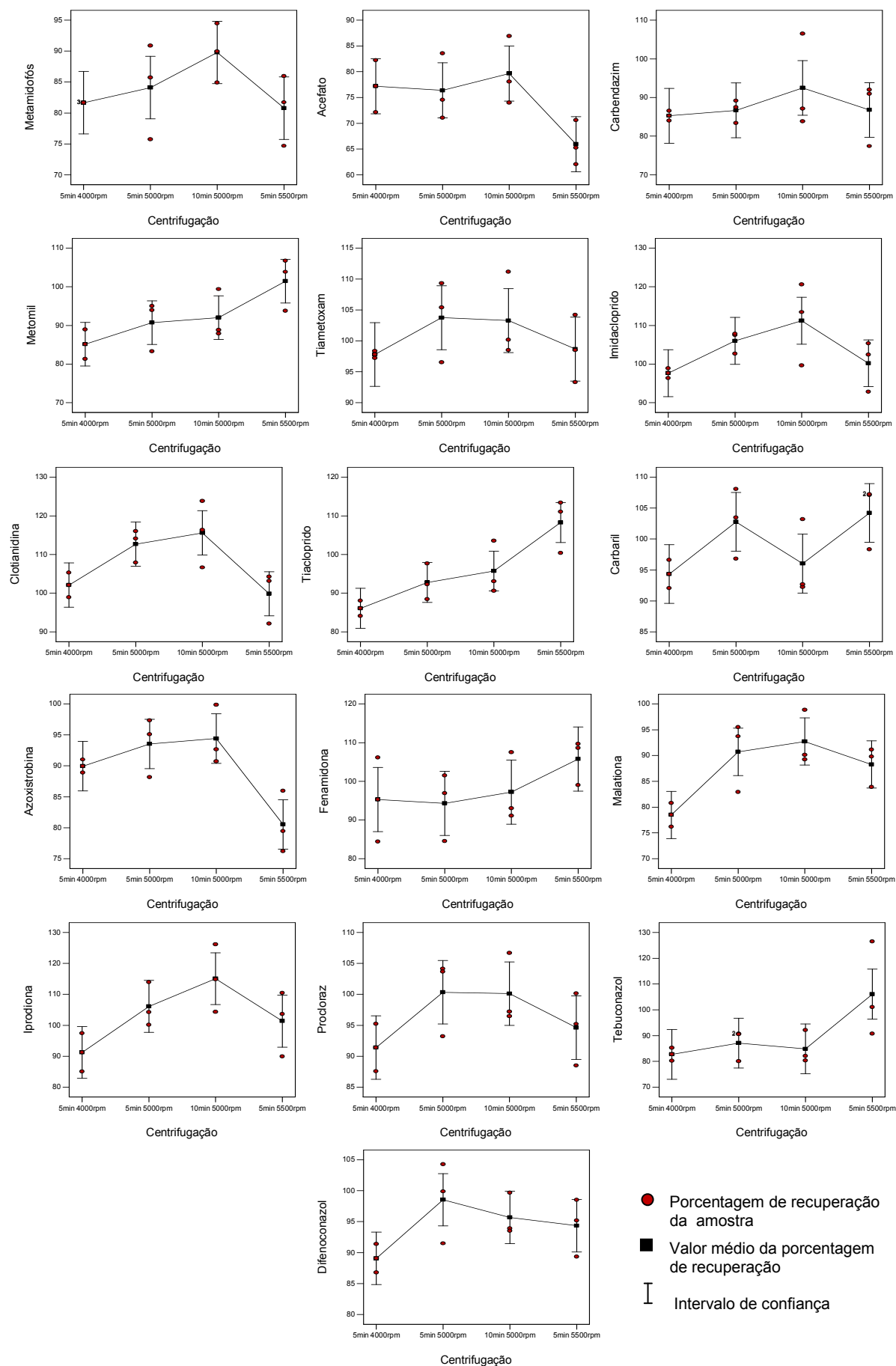


Figura A.1: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, variando-se o tempo e velocidade de centrifugação empregada no método QuEChERS.

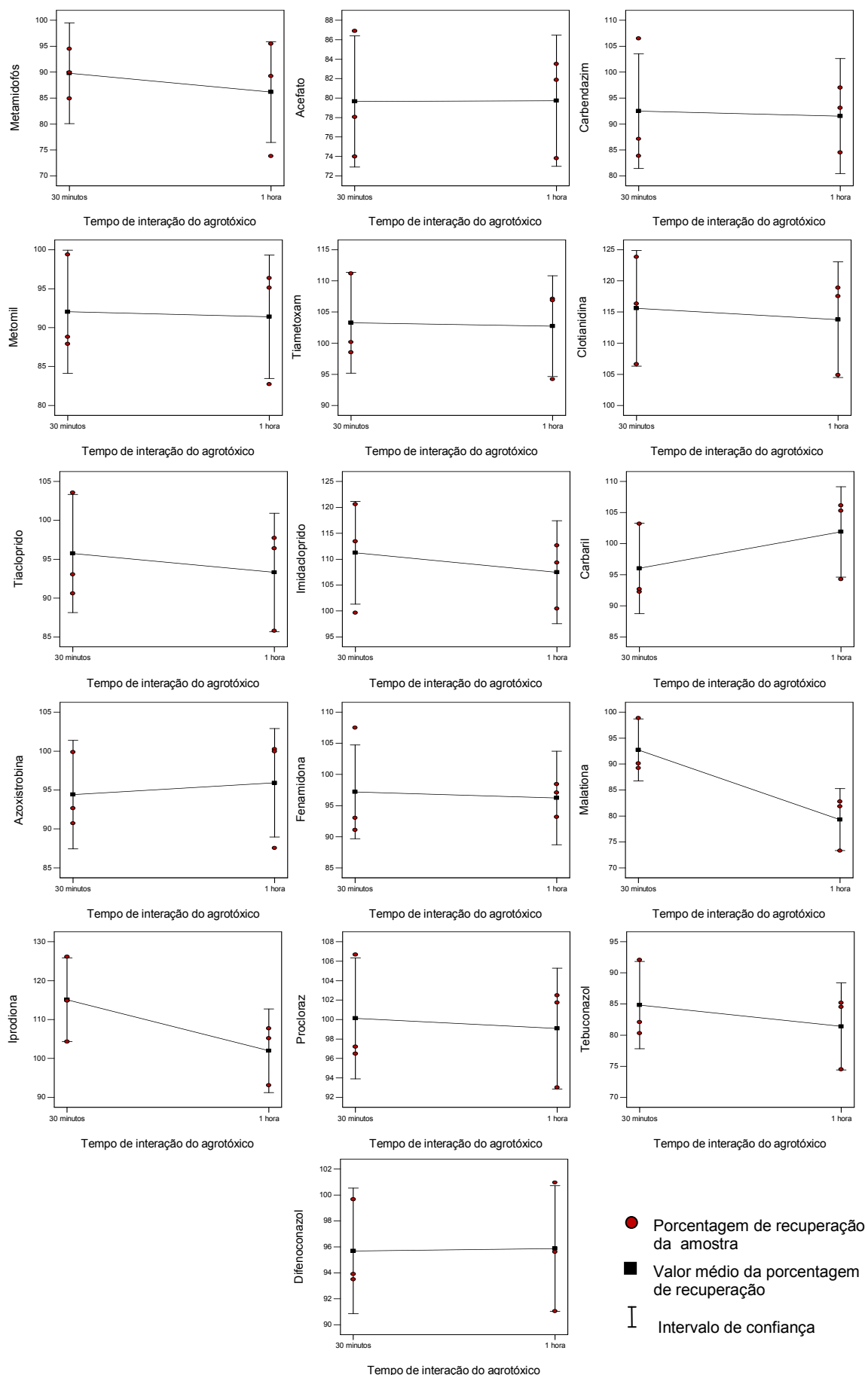


Figura A.2: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, variando-se o tempo de interação dos agrotóxicos no método QuEChERS.

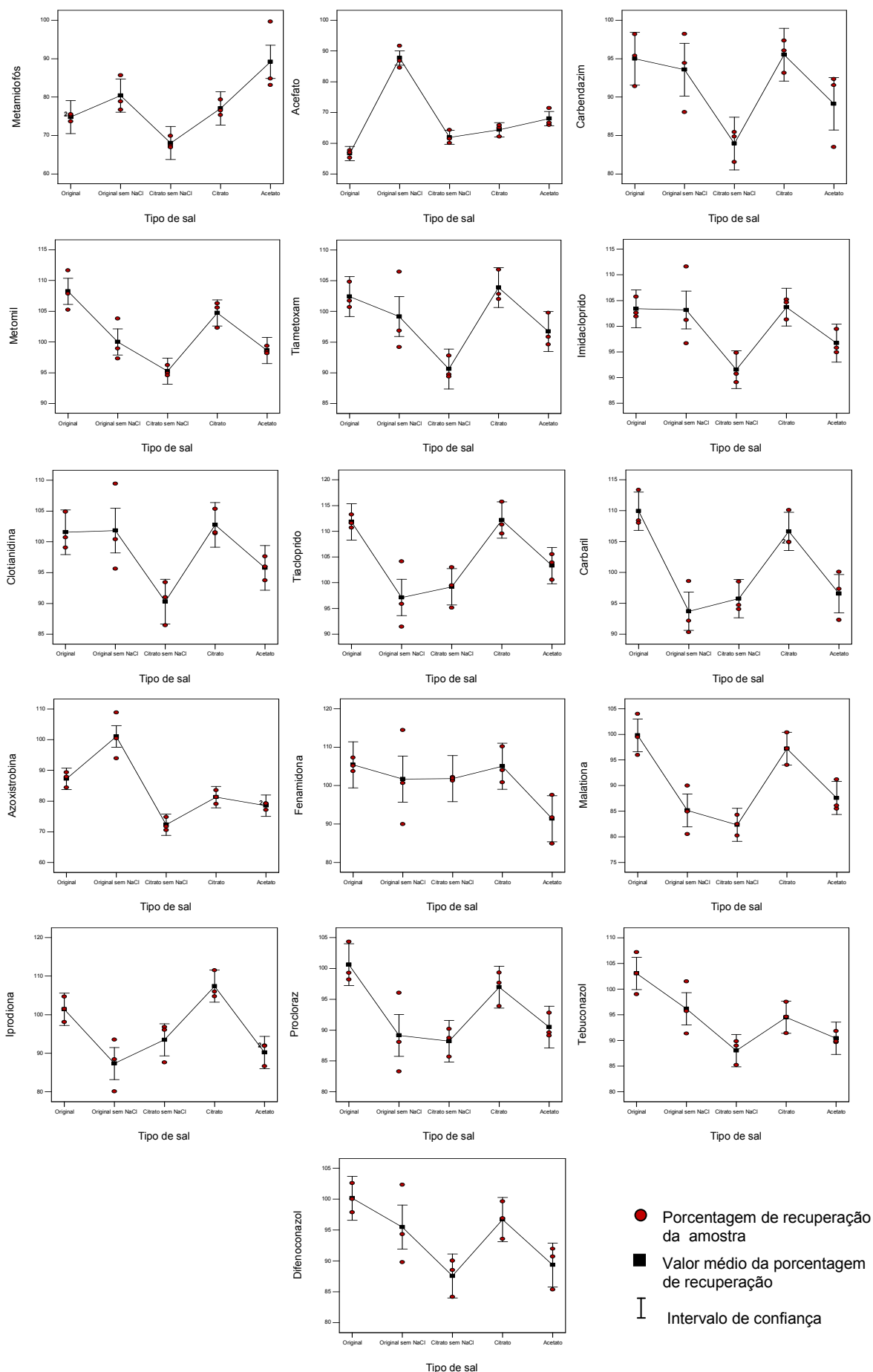


Figura A.3: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, variando-se o tipo de sal empregado no método QuEChERS.

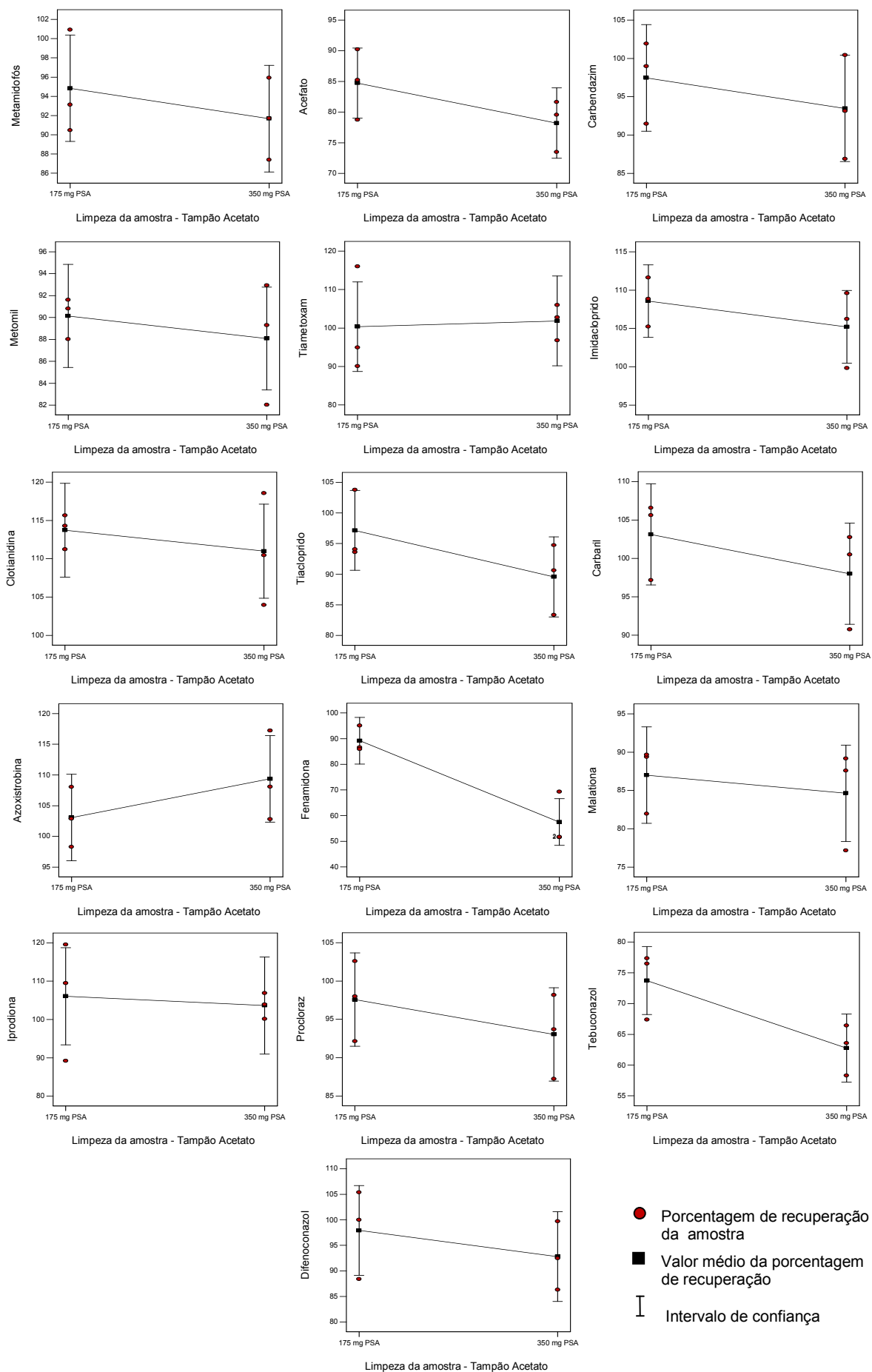


Figura A.4: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, empregando o método QuEChERS com o tampão salino acetato, variando-se a quantidade de PSA utilizada na etapa de limpeza da amostra.

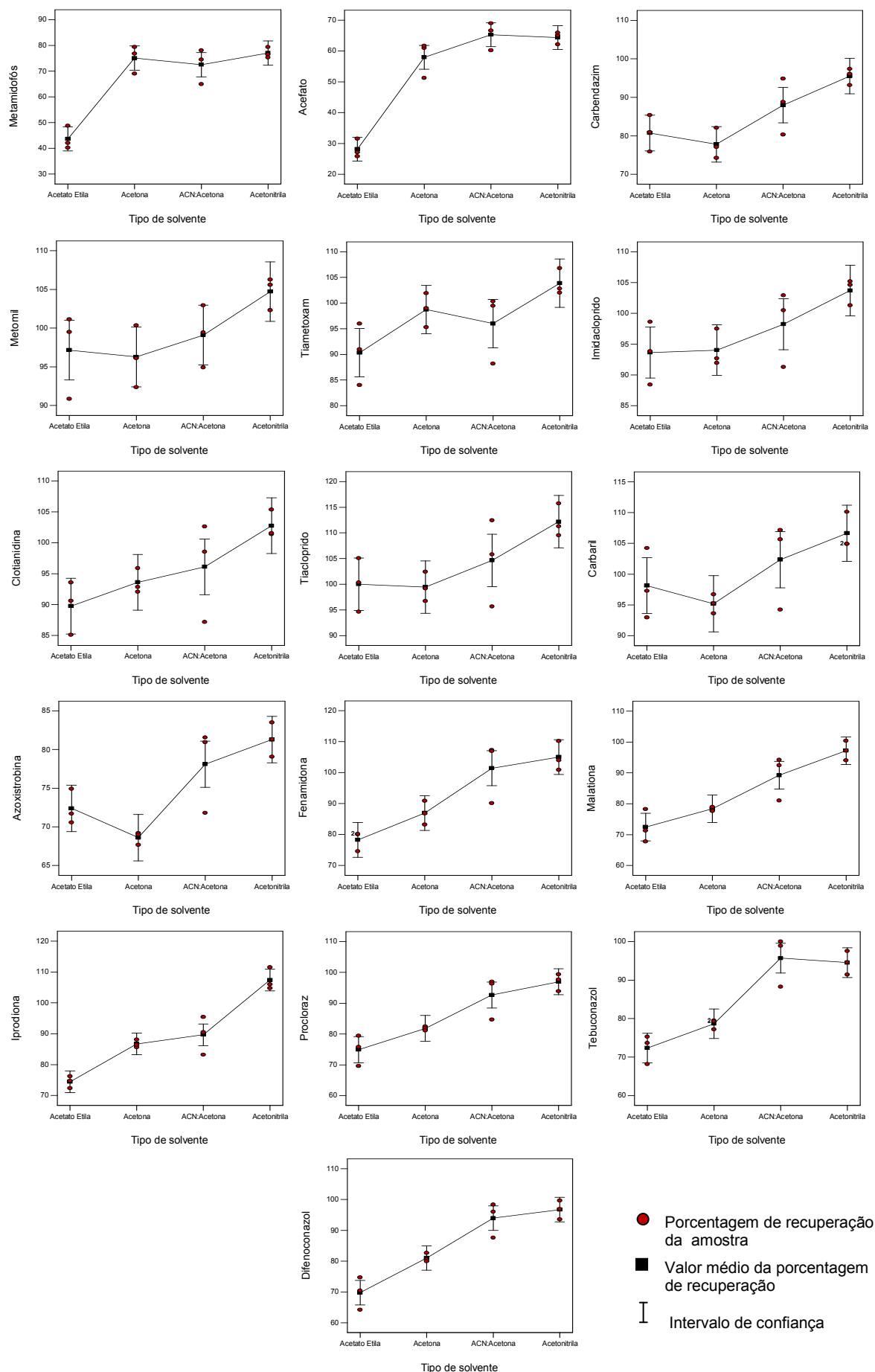


Figura A.5: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, variando-se o solvente extrator utilizado na primeira etapa de extração do método QuEChERS.

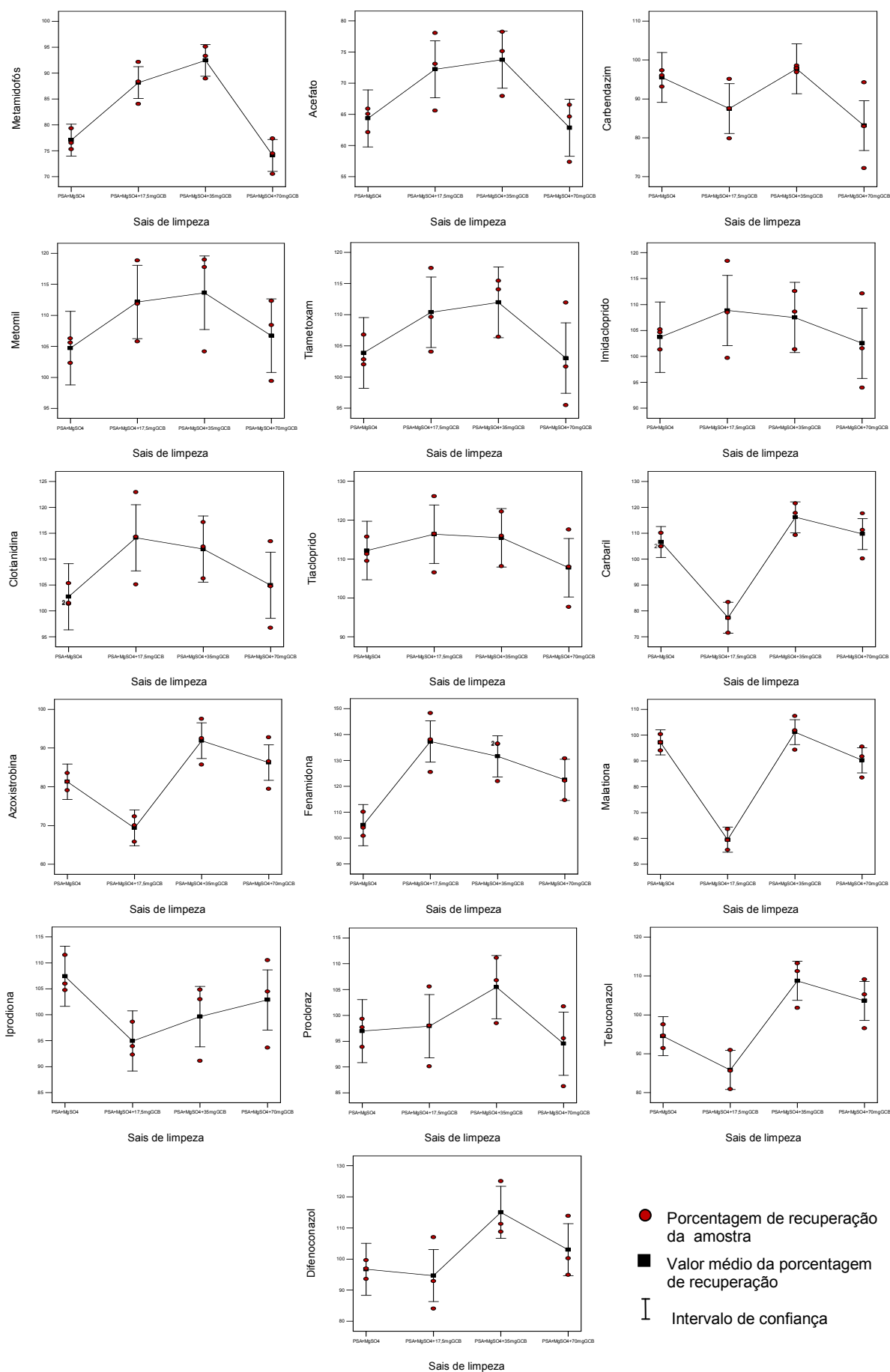


Figura A.6: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, variando-se a quantidade de carbono grafítico empregado na etapa de limpeza da amostra do método QuEChERS.

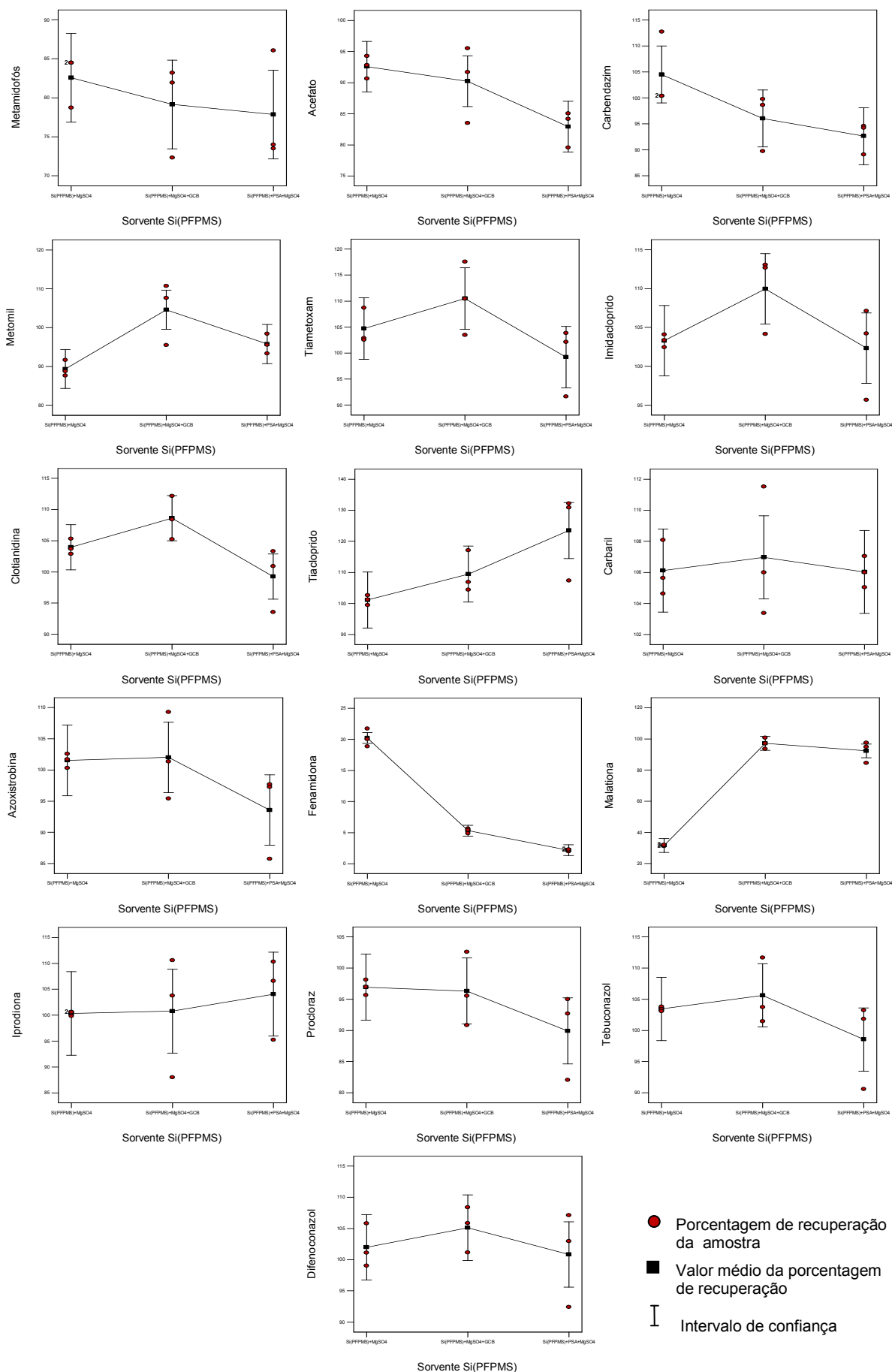


Figura A.7: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, empregando o método QuEChERS com o sorvente Si(PFPMS) na etapa de limpeza da amostra.

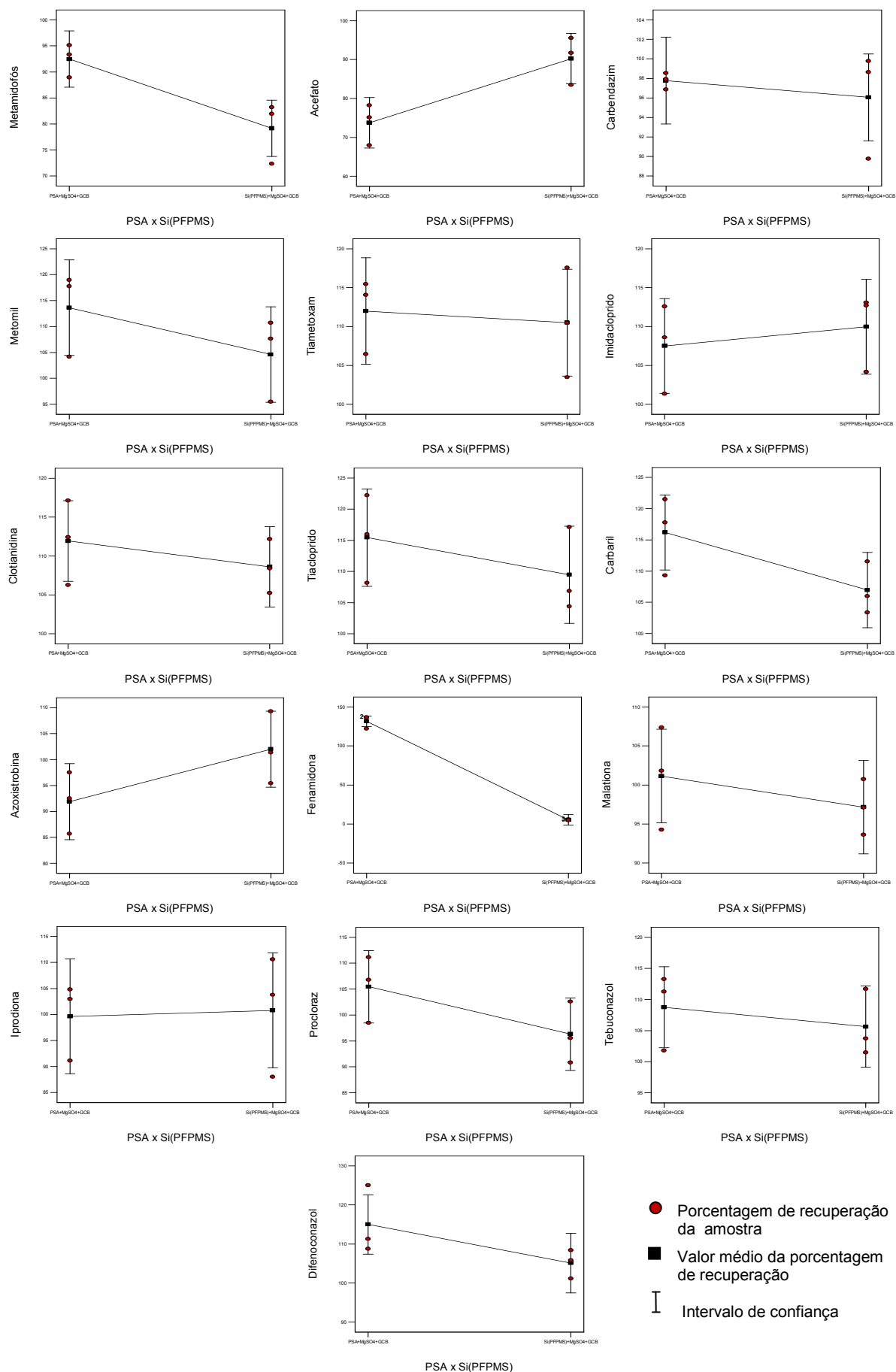


Figura A.8: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, comparando-se o método QuEChERS realizado com os sais de limpeza PSA/MgSO₄/GCB e Si(PFPMS)/MgSO₄/GCB.

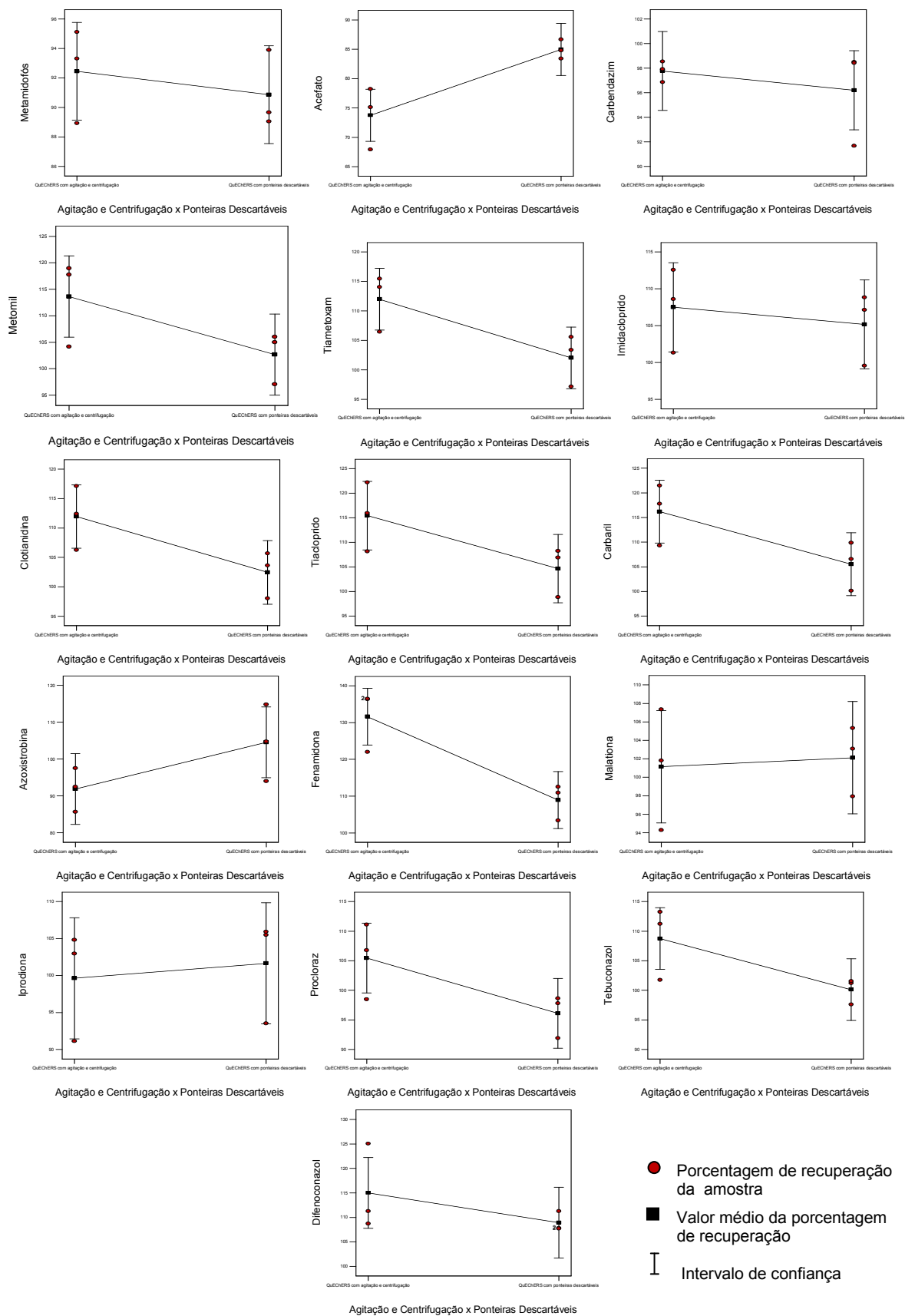


Figura A.9: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, comparando-se o método QuEChERS original, com agitação por vórtex e centrifugação, e o método empregando ponteiros descartáveis.

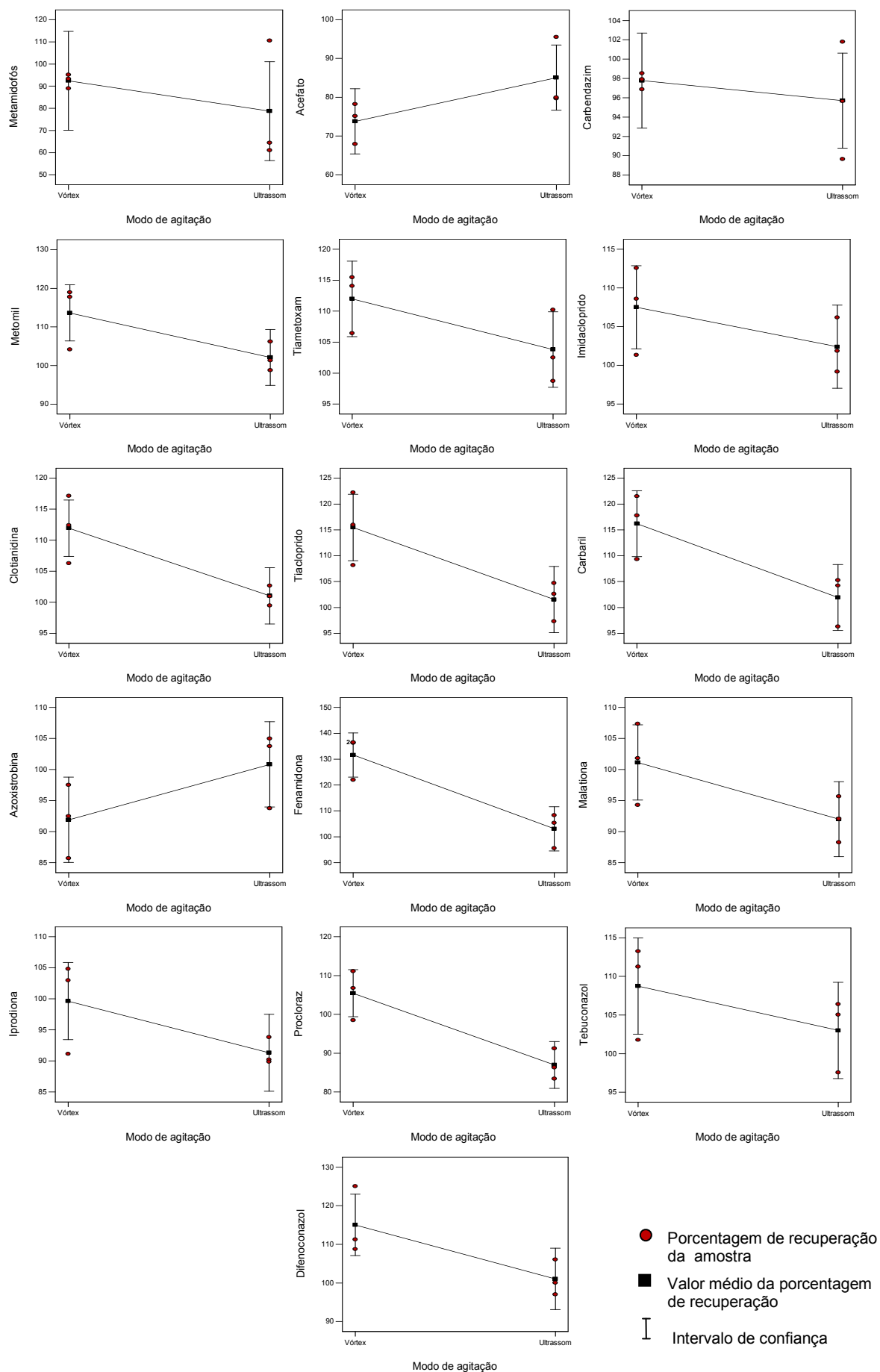


Figura A.10: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, comparando-se o emprego da agitação por vórtex e o uso do ultrassom como formas de agitação do método QuEChERS.

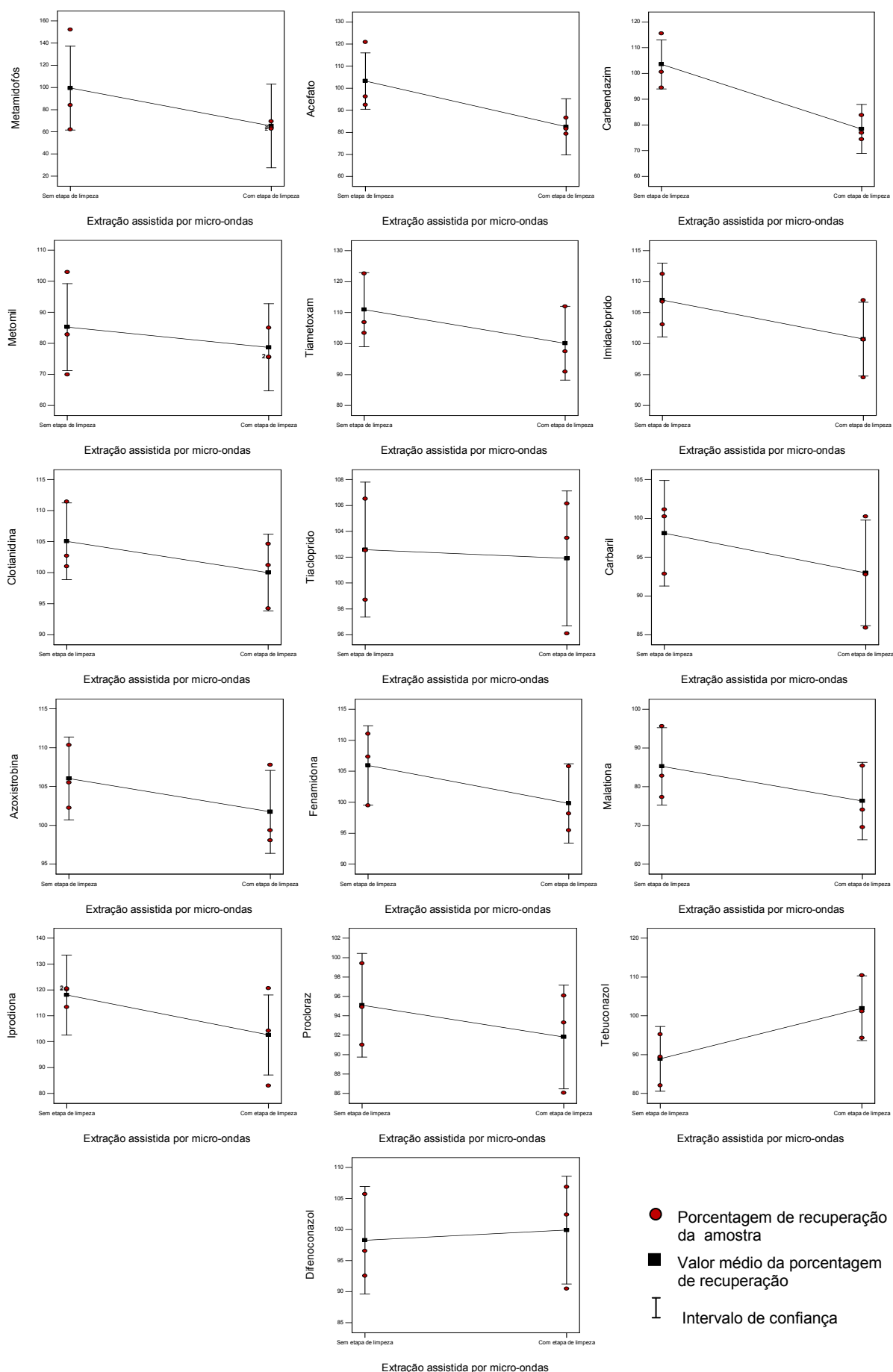


Figura A.11: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, comparando-se o emprego da extração por micro-ondas com e sem a etapa adicional de limpeza da amostra, com os sais PSA, MgSO_4 e GCB.

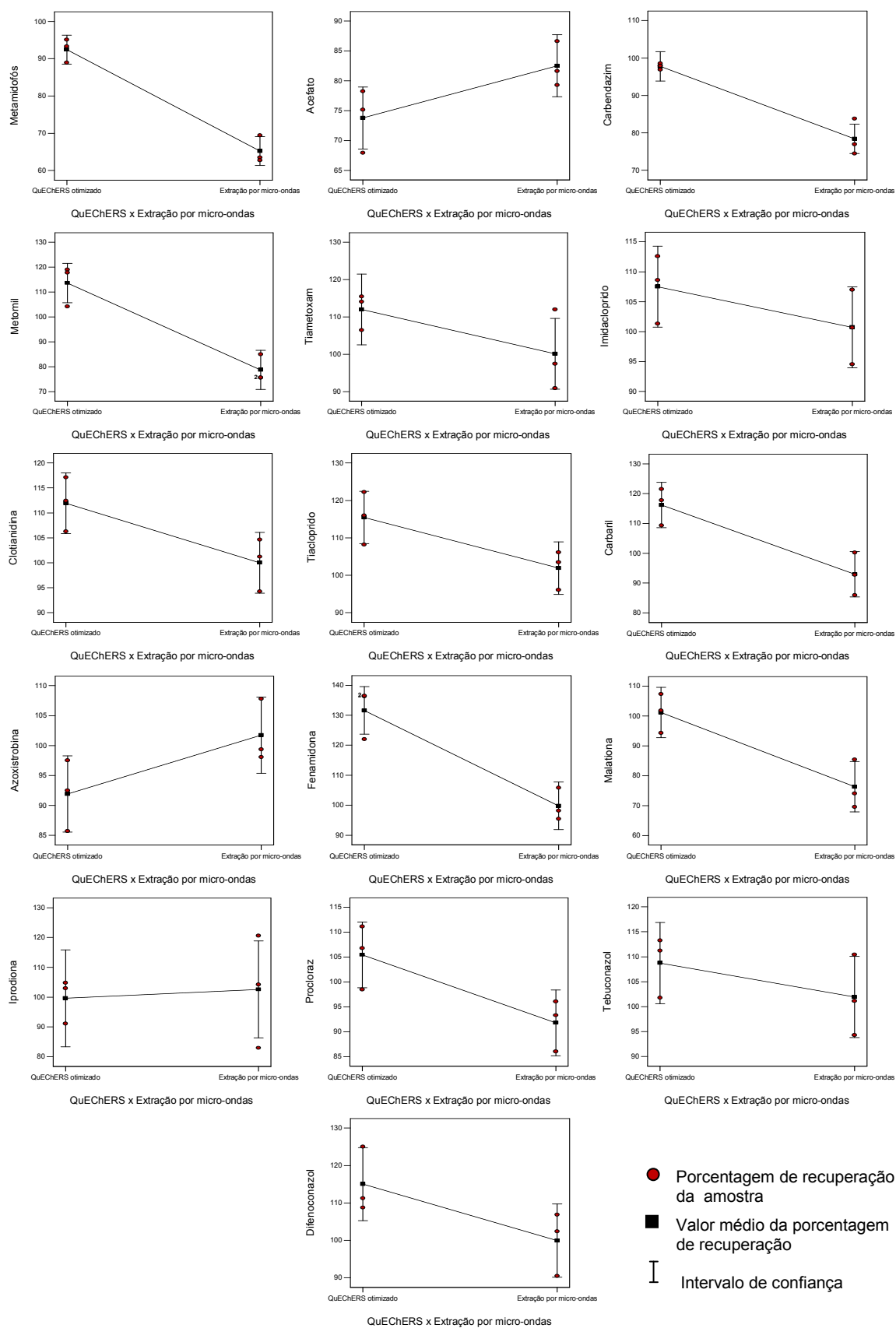


Figura A.12: Gráficos de intervalo de confiança das médias, obtidos com os valores de porcentagens de recuperação de cada analito, comparando-se o emprego do método QuEChERS otimizado com a extração por micro-ondas.