



DANIELE OSHITA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MORANGO
POR LC-MS/MS E COMPARAÇÃO COM UHPLC**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

DANIELE OSHITA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MORANGO
POR LC-MS/MS E COMPARAÇÃO COM UHPLC**

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 DANIELE OSHITA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ISABEL CRISTINA SALES FONTES
JARDIM.**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

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

Os4d Oshita, Daniele, 1981-
Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morango por LC-MS/MS e comparação com UHPLC / Daniele Oshita. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. 2. Cromatografia líquida de ultra eficiência. 3. Morango. 4. Método QuEChERS. 5. Validação de método analítico. 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 an analytical method for multiresidue determination of pesticides in strawberries by LC-MS/MS and comparison with UHPLC

Palavras-chave em inglês:

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Ultra high performance liquid chromatography

Strawberries

QuEChERS

Validation of analytical method

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim [Orientador]

Martha Bohrer Adaime

Anízio Marcio de Faria

Ivo Milton Raimundo Júnior

Carol Hollingworth Collins

Data de defesa: 12-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Química

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à memória do meu pai,
pelos ensinamentos e valores
que me orientam nesta vida.*

AGRADECIMENTOS

Eu considero esta etapa uma oportunidade para registrar meus sinceros agradecimentos para todas as pessoas que contribuíram de forma, direta ou indireta, para a realização desta Tese de Doutorado.

A Deus, por ser minha força espiritual que é capaz de enfrentar todas as dificuldades e obstáculos.

Ao meu filho Lucas que me ensinou o verdadeiro significado do amor incondicional. O seu sorriso é a grande motivação da minha vida.

Ao Márcio, meu querido e amado marido, que acompanhou todo este trabalho e deu força nos momentos de dificuldades. Meus sinceros agradecimentos por fazer parte da minha vida com tanto amor, carinho e dedicação.

A minha mãe Sirlene e meu irmão Marcelo pelo amor e carinho.

A minha nova família Guima, pais e irmãos do meu marido, que me acolheram com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Isabel Jardim, minha orientadora, gostaria de fazer um agradecimento especial pela sua confiança, carinho e dedicação. Muito obrigada pela oportunidade de realizar meu trabalho, por todo apoio oferecido e pelos novos conhecimentos adquiridos para minha formação. Minha admiração pelo seu profissionalismo e pela sensibilidade de comunicação com todos os alunos.

À Profa. Dra. Carol Collins agradeço pelas discussões e colaborações no desenvolvimento do meu trabalho. Saiba que foi uma honra imensa ter convivido com uma pessoa que é um dos ícones da Cromatografia.

A Lucília, técnica responsável pelo LabCrom e grande amiga que conheci na Unicamp, muito obrigada por ter contribuído com meu trabalho e pela amizade.

Aos amigos e colegas do LabCrom, que já concluíram os trabalhos e os atuais, agradeço pelas dicas, discussões e momentos agradáveis.

A CAPES, CNPq e FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da Unicamp, meus agradecimentos pela contribuição para a realização deste trabalho.

A equipe da Waters Technologies do Brasil, principalmente, para Dr. Amadeu H. Iglesias (especialista de aplicação em Espectrometria de Massas) e Dr. Fernando de Paula (especialista de aplicação em Cromatografia Líquida de Ultra Performance), meus agradecimentos pelo apoio e discussões para o desenvolvimento deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2003 - 2005	Mestrado em Ciências (Química Analítica) - Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, SP. Título: "Extração de Contaminantes Oriundos de Águas de Curtumes Usando Espumas de Poliuretana Derivadas de Óleo Vegetal". Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice. Bolsista: CNPq
1999 - 2002	Bacharelado em Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP. Iniciação Científica: "Determinação Direta e Simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em Cachaça por Espectrofotometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite". Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

Estagiária Docente

2011	Disciplina de Química Analítica IV - QA 416 (Experimental). Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, SP.
2004	Disciplina de Química II (Teórica e Experimental). Instituto de Química - USP, São Carlos, SP.

Professora

2001 - 2002	Disciplina de Física. Curso preparatório Pré-vestibular do Instituto de Química - UNESP com parceria da Prefeitura Municipal, Araraquara, SP.
-------------	--

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2007 – 2009	Química T&E Analítica - Centro Analítico e Científico, Campinas, SP.
2007 – 2007	Química Instituto Cimed de Pesquisa e Desenvolvimento - REBLAS, Pouso Alegre, MG.
2006 – 2007	Analista Química Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Análises Cromatográficas, USP - ESALQ, Dep. de Entomologia Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Piracicaba, SP.
2005 – 2006	Auxiliar Técnico Administrativo Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, SP.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 7

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS: 8

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Oshita, D.; Jardim, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. *Scientia Chromatographica* 4 (2012) 52.

Cangemi, J.M.; Santos, A.M; Claro Neto, S.; Oshita, D. Vegetable-origin foam employed in dye extraction in tanning and leather processing facilities. *Polímeros* 19 (2009) 218.

Oshita, D.; Oliveira, A.P.; Gomes Neto, J.A. ; Moraes, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Eclética Química* 28 (2003) 91.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MORANGO POR LC-MS/MS E COMPARAÇÃO COM UHPLC

Este trabalho envolve o desenvolvimento, a otimização e a validação de um método analítico para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de morango, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). No preparo de amostra utilizou o método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que foi testado nas três versões, Original, AOAC *Official Method* e *European Committee for Standardization* (CEN) *Standard Method* EN 15662, além da versão CEN 15662 modificada. Também foram otimizados os solventes de extração, massas do agente secante e, na etapa de *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), o sorvente comercial PSA (*primary secondary amine*), alguns preparados no laboratório à base de polímeros de siloxano, como octadecil, octil, amino, fenil, e a mistura PSA e octadecil. As avaliações dos métodos basearam-se, principalmente, nos valores de recuperação e nos estudos sobre o uso de diferentes sorventes, outros parâmetros que estimam a eficiência do *clean-up* também foram utilizados, como aspecto físico do extrato final, quantidade de coextratos da matriz, obtida por medidas gravimétricas, e efeito matriz. O método desenvolvido foi validado por meio dos parâmetros analíticos de seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão e precisão, conforme o guia Sanco para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos e, posteriormente, amostras comerciais de morango da região de Campinas foram analisadas. O método validado por LC-MS/MS apresentou-se seletivo, preciso, exato e atingiu concentrações abaixo dos respectivos limites máximos de resíduos (LMR) para determinação de agrotóxicos em morango. Este método foi transferido para cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC), que mostrou redução no tempo de análise, na vazão da fase móvel (MP) e no volume de injeção de amostra e da MP, e similaridade na detectabilidade dos analitos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN STRAWBERRIES BY LC- MS/MS AND COMPARISON WITH UHPLC

This work involves the development, optimization and validation of an analytical method for multiresidue determination of pesticides in strawberry samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Sample preparation used the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method, which was tested in three versions, Original, AOAC Official Method and European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662, and also CEN 15662 modified version. The factors optimized were extraction solvents, amount of drying agent and in the clean-up step by dispersive solid phase extraction (d-SPE), the commercial sorbent PSA (primary secondary amine), several prepared in the laboratory based on siloxane polymers, such as octadecyl, octyl, amine, phenyl, and the mixture PSA and octadecyl. The evaluation of the methods was based mainly on the recovery values and for the study of different sorbents, other parameters that estimate the efficiency of the clean-up were also used such as the physical aspect of the final extract, the amount of interference matrix obtained using gravimetric measurements, and the matrix effect. The developed method was validated by the analytical parameters of selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, accuracy and precision, as described in the Sanco guide for analysis of pesticide residues in foods. After, commercial strawberry samples from the Campinas region were analyzed. The validated method by LC-MS/MS was selective, precise, accurate and reached levels below the respective maximum residue limits (MRLs) for the determination of pesticides in strawberries. This method was transferred to ultra high performance liquid chromatography (UHPLC), which showed a reduction in analysis time, the mobile phase (MP) flow rate and the injection volume of the sample and MP, and similarity in the detectability of the analytes.

ÍNDICE

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Agrotóxicos.....	1
1.1.1. Breve histórico e classificação dos agrotóxicos	1
1.1.2. Aplicação de agrotóxicos	3
1.1.3. Aspectos negativos dos agrotóxicos: impacto ambiental, problemas sanitários dos trabalhadores rurais e segurança alimentar dos consumidores	4
1.2. Morango e suas propriedades físico-químicas	7
1.2.1. Produção agrícola do morango	8
1.2.2. Dificuldades na pré-colheita, colheita e pós-colheita do morango	10
1.2.3. Legislação alimentar: avaliação dos resíduos de agrotóxicos em morango ..	11
1.3. Produtos orgânicos no Brasil.....	13
1.4. Técnicas de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos com enfoque em amostras de morango.....	14
1.4.1. Versatilidades do QuEChERS	16
1.5. Determinação de resíduos de agrotóxicos com destaque para cromatografia líquida moderna.....	20
1.5.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).....	21
1.5.2. Métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango.....	25
1.6. Tendências futuras de determinação de resíduos de agrotóxicos - UHPLC	27
1.7. Validação de métodos analíticos.....	31
1.7.1. Seletividade	32
1.7.2. Limites de Detecção (LOD).....	33
1.7.3. Limite de Quantificação (LOQ).....	34

1.7.4. Linearidade	34
1.7.5. Precisão	38
1.7.6. Exatidão	39
2. OBJETIVOS	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1. Reagentes	42
3.2. Equipamentos	50
3.3. Preparo das soluções dos agrotóxicos.....	50
3.4. Processamento de amostras de morango.....	51
3.5. Versões do método QuEChERS	51
3.5.1. Seleção dos solventes de extração.....	53
3.5.2. Influência da massa de sulfato de magnésio no método de preparo de amostra	53
3.5.3. Preparo dos sorventes utilizados na d-SPE para <i>clean-up</i>	53
3.5.3.1. Caracterização dos sorventes por CHN	57
3.5.4. Avaliação dos sorventes no método de preparo de amostra	57
3.5.4.1. Aspecto físico do extrato final	58
3.5.4.2. Recuperação.....	58
3.5.4.3. Medidas gravimétricas dos interferentes da matriz	58
3.5.4.4. Efeito matriz	58
3.6. Validação do método analítico	58
3.6.1. Seletividade	59
3.6.2. LOD e LOQ	59
3.6.3. Curva analítica	59
3.6.4. Exatidão (Recuperação)	60
3.6.5. Precisão intra e inter	60
3.7. Aplicação do método para análises de agrotóxicos em morangos.....	60
3.8. Transferência do método desenvolvido em HPLC para UHPLC	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Determinação das condições cromatográficas e espectrométricas (LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS).....	62

4.2. Versões do método QuEChERS	71
4.2.1. Recuperações obtidas com as versões do método QuEChERS	71
4.2.2. Recuperações em diferentes solventes de extração utilizando método QuEChERS na versão CEN 15662 modificada	75
4.2.3. Recuperações usando diferentes massas de sulfato de magnésio na versão CEN 15662 modificada do método QuEChERS.	77
4.2.4. Aplicação dos sorventes na etapa de <i>clean-up</i>	78
4.2.4.1. Caracterização química dos sorventes por CHN	78
4.2.4.2. Recuperação dos agrotóxicos utilizando os sorventes preparados e comercial na etapa de <i>clean-up</i>	79
4.2.5. Avaliação de outros parâmetros para seleção dos sorventes	85
4.2.5.1. Aspecto físico do extrato final	85
4.2.5.2. Recuperação.....	86
4.2.5.3. Medidas gravimétricas dos interferentes da matriz.....	86
4.2.5.4. Efeito matriz	88
4.3. Validação analítica	91
4.3.1. Seletividade	91
4.3.2. LOD e LOQ	91
4.3.3. Curva Analítica e Efeito Matriz.....	94
4.3.4. Recuperação.....	96
4.3.5. Precisão intra e inter	96
4.4. Determinação de agrotóxicos em morangos	101
4.5. Transferência do método de análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango por HPLC para UHPLC	105
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO - Agricultura Orgânica

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

APPI - Fotoionização à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*)

BPA - Boas Práticas Agrícolas

C8 - Octil

C18 - Octadecil

CID - Dissociação Induzida por Colisão (*Collision Induced Dissociation*)

CV - Coeficiente de Variação (*Coefficient of Variation*)

DAD - Detector por Arranjo de Diodos (*Diode Array Detector*)

d-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction*)

ESI - Ionização por Eletrospray (*Electrospray Ionization*)

FT - Transformada de Fourier (*Fourier Transform*)

GCB - Carbono Grafitizado (*Graphitized Carbon Black*)

GC - Cromatografia Gasosa (*Gas chromatography*)

HRMS - Espectrometria de Massas de Alta Resolução (*High Resolution Mass Spectrometry*)

LC - Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (*Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*)

LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid Liquid Extraction*)

LMR - Limites Máximos de Resíduos

LOD - Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

LOQ - Limite de Quantificação (*Limit of Quantification*)

MAE - Extração Assistida por Micro-ondas (*Microwave Assisted Extraction*)

ME - Efeito Matriz (*Matrix Effect*)

MP - Fase Móvel (*Mobile Phase*)

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*)

MS/MS - Espectrometria de Massas Sequencial (*Tandem*)
MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*)
PI - Produção Integrada
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PLE - Extração Líquida Pressurizada (*Pressurized Liquid Extraction*)
PSA - Amina Primária e Secundária (*Primary-Secondary Amine*)
QqQ - Triplo Quadrupolo
QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)
SBSE - Extração Sortiva em Barras de Agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*)
SIM - Monitoramento de Íon Seleccionado (*Selected Ion Monitoring*)
SLE - Extração Sólido-Líquido (*Solid Liquid Extraction*)
S/N - Razão sinal/ruído (*Signal to Noise*)
SP - Fase Estacionária (*Stationary Phase*)
SPE - Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)
SPME - Microextração em Fase Sólida (*Solid-Phase Microextraction*)
TIC- Cromatograma de Íon Total (*Total Ion Chromatogram*)
TOF - Tempo de Voo (*Time of Flight*)
UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)
UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valor nutricional do morango em 100 g de amostras.....	8
Tabela 2: Porcentagem de amostras de morango insatisfatórias.	13
Tabela 3: Características físico-químicas e LMR dos agrotóxicos empregados na cultura do morango.....	44
Tabela 4: Condições otimizadas de operação do detector MS/MS.....	62
Tabela 5: Tolerâncias máximas permitidas para variação na intensidade relativa iônica determinadas por LC-MS/MS. Adaptação do guia Sanco. ¹³²	63
Tabela 6: Parâmetros dos agrotóxicos analisados por LC-MS/MS.....	64
Tabela 7: Resultados de análise elementar dos sorventes preparados e comercial	78
Tabela 8: Coloração do extrato final do morango após a etapa de <i>clean-up</i> empregando os diferentes sorventes.	86
Tabela 9: Coextratos (%) em amostras de morango após etapa de <i>clean-up</i> utilizando diferentes sorventes	87
Tabela 10: Parâmetros de validação do método desenvolvido para determinação de resíduos de agrotóxicos em morango por LC-MS/MS. Os níveis de fortificação são representados por F1, F2 e F3.....	97
Tabela 11: Concentrações de agrotóxicos em morangos, adquiridos no comércio de Campinas e região, empregando o método desenvolvido e validado.	102
Tabela 12: Parâmetros cromatográficos obtidos nas análises de agrotóxicos em morango por LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das versões do preparo de amostra QuEChERS determinados por LC-MS/MS. Adaptado de <i>Lehotay</i> , 2010. ¹⁰⁵	18
Figura 2: Maneiras de preparar a curva analítica: (A) Solvente puro; (B) Fortificação no extrato final e (C) Fortificação no branco da amostra. Adaptado de <i>Trufelli</i> 2011. ¹¹⁴ ...	36
Figura 3: Fluxograma geral do QuEChERS empregado nas análises de morango.....	52
Figura 4: Estruturas moleculares dos sorventes (A) C18, (B) C8, (C) Amino, (D) Fenil e (E) PSA ligada a sílica utilizados na etapa de <i>clean-up</i> na extração de agrotóxicos em morango.	55
Figura 5: Preparo dos sorventes utilizados na etapa de d-SPE. Adaptado de M.P. Segato, 2010.	56
Figura 6: TIC dos agrotóxicos presentes numa solução de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e determinação por LC-MS/MS em oito janelas de aquisição, no modo MRM.....	67
Figura 7: Cromatogramas dos agrotóxicos isolados, 100 ng mL^{-1} em metanol, que foram determinados por LC - MS/MS. Janelas de aquisição 01a 04.....	69
Figura 8: Recuperações (%) e CV (%) dos agrotóxicos e padrões de controle, 10 ng g^{-1} , empregando as versões do método QuEChERS por LC-MS/MS. (n = 3)	73
Figura 9: Recuperações (%) e CV (%) dos agrotóxicos e padrões de controle, 100 ng g^{-1} , empregando as versões do método QuEChERS por LC-MS/MS. (n = 3).....	74
Figura 10: Recuperações (%) dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g^{-1} , extraídos do morango com os solventes acetonitrila, acetona e acetato de etila, na versão modificada do método QuEChERS CEN 15662 e determinados por LC-MS/MS. (n = 3) Identificação dos agrotóxicos e padrões de controle no item 4.2.1. da página 71.	76
Figura 11: Recuperação total (%) e CV (%) dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g^{-1} , utilizando 3 diferentes massas de sulfato de magnésio 4, 6 e 8 g na versão CEN 15662 modificada em morangos determinados por LC-MS/MS. (n = 3).....	77
Figura 12: Diferenças de recuperação dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g^{-1} , submetidos a etapa de <i>clean-up</i> com alteração de massa de PSA de 25 para 50 mg por mL de extrato de morango no método QuEChERS, na versão modificada CEN 15662, determinadas por LC-MS/MS.	80

Figura 13: Recuperação (%) e CV (%) obtidas nas extrações de agrotóxicos de morango, na concentração de 100 ng g ⁻¹ , usando sorventes diferentes na etapa de limpeza do método QuEChERS e determinação por LC-MS/MS. (n = 3).....	83
Figura 14: Recuperação (%) e CV (%) obtidas nas extrações de agrotóxicos de morango, na concentração de 100 ng g ⁻¹ , usando mistura de sorventes, PSA e C18, na etapa de limpeza do método QuEChERS e determinação por LC-MS/MS. (n = 3).....	85
Figura 15: Porcentagem dos números de agrotóxicos que apresentaram efeito matriz, em amostras de morango, utilizando sorventes diferentes na etapa de <i>clean-up</i>	89
Figura 16: Cromatogramas para avaliar as seletividades de alguns agrotóxicos estudados em morango determinados por LC-MS/MS. Janelas de aquisição de 01 a 04, onde o lado esquerdo (branco da amostra) e lado direito (amostra fortificada).....	92
Figura 17: Curvas analíticas para alguns agrotóxicos determinados por LC-MS/MS: Curva em solvente (verde), Curva com fortificação no extrato final (vermelho) e Curva com fortificação no branco da matriz (azul).	95
Figura 18: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes na amostra nove de morango determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.....	103
Figura 19: TIC dos agrotóxicos presentes numa solução de 0,5 µg mL ⁻¹ em metanol e determinação por UPLC-MS/MS em seis janelas de aquisição, no modo MRM.	105
Figura 20: Porcentagem dos agrotóxicos, distribuídos em função dos LOQ, em amostras de morango analisados por LC-MS/MS e UPLC-MS/MS.....	107

1. INTRODUÇÃO

Ultimamente, a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem obtido grande destaque no desenvolvimento de métodos analíticos. O interesse nesta área de pesquisa está relacionado ao aumento da utilização de agrotóxicos, na maioria das vezes, não controlada pelas boas práticas agrícolas (BPA). Neste contexto, o uso de agrotóxicos pode ocasionar impacto ambiental, preocupações com o bem-estar dos consumidores que podem estar ingerindo alimentos contendo resíduos em concentrações superiores aos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos, com a saúde dos trabalhadores rurais, tanto pela exposição excessiva como pela falta de cuidados básicos, e com a exigência de certificação de qualidade dos alimentos para exportação que contribui para à expansão econômica nacional. O LMR é definido como a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos oficialmente aceita para a cultura, desde a sua produção até o consumo, expressa em partes de agrotóxicos por milhão de partes de alimento (mg kg^{-1}), ¹ sendo que, estes valores são fornecidos pelos órgãos reguladores nacionais ou internacionais.

O morango vem se destacando por estar presente na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil, por vários anos consecutivos, ter consumo elevado por crianças e adultos, principalmente na forma *in natura*, possuir propriedades funcionais diversificadas e ser bastante usado na culinária. O estudo de resíduos de agrotóxicos no morango constitui uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, que pode envolver a população consumidora ou não e os seres vivos que compartilham o mesmo ambiente da produção agrícola desse fruto ou aqueles para os quais os agrotóxicos foram lixiviados com o decorrer do tempo. ²

1.1. Agrotóxicos

1.1.1. Breve histórico e classificação dos agrotóxicos

Há mais de dois mil anos, os agricultores utilizavam substâncias que preveniam os danos causados por pragas, sendo uma das primeiras o enxofre. No século XV,

utilizavam outras substâncias tóxicas como arsênio, mercúrio e chumbo e no século XVII começaram a empregar o sulfato de nicotina que era extraído das folhas de tabaco.³

No Brasil, o uso de agrotóxicos industrializados já tem mais de meio século e uma das primeiras substâncias aplicadas nas lavouras foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT). A Portaria nº 329, de 2 de Setembro de 1985⁴ proibiu, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária, exceto, para uso como iscas formicidas e de cupimicidas, combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias, em uso emergencial na agricultura e na preservação de madeiras. O DDT, como todos os demais organoclorados, foi banido, tendo em vista seus efeitos nocivos baseados na neurotoxicidade, no aumento de câncer de mama em mulheres, em alterações causadas pelos efeitos estrogênicos, além dos problemas ambientais, como rápida absorção e bioconcentração nos organismos, redução da capacidade reprodutiva das aves e estabilidade alta à decomposição ou à degradação ambiental.^{5, 6, 7}

A busca por agrotóxicos menos persistentes no meio ambiente promoveu o uso dos organofosforados e carbamatos.⁶

A classificação dos agrotóxicos constitui tema de controvérsia, pois várias denominações têm sido empregadas para designar sua ação ou organismo alvo (defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários e agrotóxicos). No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de Julho de 1989,⁸ conhecida como “Lei de Agrotóxicos”, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 4 de Janeiro de 2002,⁹ adota e define o termo “agrotóxico” para ser utilizado em todos os casos, substituindo os demais termos supra-citados.⁷ A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA¹⁰ define o termo agrotóxico como sendo uma substância química ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou mesmo, para regular, desfolhar e dessecar plantas.

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a: Finalidade (acaricida, aficida, formicida, fungicida, herbicida, inseticida, larvicida, ovicida, raticida, entre outros); Modo de Ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante); Origem, provenientes de compostos orgânicos ou inorgânicos, de vegetais, bactérias ou fungos.^{7, 11, 12} Os agrotóxicos inorgânicos foram muito utilizados no passado, porém, atualmente não

representam mais que 10% do uso total, enquanto os agrotóxicos orgânicos constituem o maior grupo compreendendo os de origem vegetal e os organossintéticos.¹³ Outra maneira de classificar os agrotóxicos é segundo as classes toxicológicas, em função da dose letal mediana (DL50).¹⁴ Dependendo da toxicidade do agrotóxico, a cor dos rótulos das embalagens ou as numerações podem variar: I = rótulo vermelho (extremamente tóxico); II = rótulo amarelo (altamente tóxico); III = rótulo azul (medianamente tóxico) e IV = rótulo verde (pouco tóxico).^{15, 16} Além destas classificações, existe o registro de propriedade industrial como produtos sob Proteção de Patentes ou Genéricos.¹⁷ Segundo a Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos (AENDA)¹⁸, esse mercado representa mais de 70% em volume e 50% do valor negociado no mundo.

Os agrotóxicos somente podem ser utilizados no Brasil se estiverem registrados em um órgão federal competente. Segundo o Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002⁹, os três órgãos competentes para o registro de agrotóxicos são: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

1.1.2. Aplicação de agrotóxicos

Os agrotóxicos pertencem a diversas classes químicas e são aplicados na agricultura visando aumentar a produção agrícola, por combater as pragas, e também para preservar a qualidade no pós-colheita ou no armazenamento dos alimentos, evitando deteriorações patológicas que podem causar uma depreciação no valor de mercado do produto.^{19, 20}

Na prática, dados estatísticos revelam que cada brasileiro consome em média 5,2 L de agrotóxicos por ano e que o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008.²¹ O crescimento da aplicação dos agrotóxicos gera preocupação, principalmente, com os alimentos que são consumidos em grandes quantidades, *in natura* e com pouca higienização por parte do consumidor. É importante destacar que menos de 0,1% dos agrotóxicos que são aplicados atingem o alvo,

enquanto o restante pode alcançar outros ambientes, como as águas subterrâneas e superficiais, solo e ar.^{22, 23}

Somado a isto, ao longo do tempo, as pragas alvo têm desenvolvido resistência aos agrotóxicos, acarretando o crescimento das suas populações, o que requer aumento na quantidade ou número de aplicações dos agrotóxicos.²⁴ Dessa forma, uma opção inicial considerada eficiente pode gerar problemas sérios no futuro.

Outra grande preocupação com o uso destes compostos refere-se aos agrotóxicos que possuem metabólitos persistentes e bioacumulativos.^{25, 26} Segundo *Schwarzenbach et al.*,²⁷ a maioria dos agrotóxicos possui alta hidrofobicidade e baixa reatividade no meio ambiente, que são as características responsáveis pela tendência em se acumularem ou bioconcentrarem nos tecidos dos organismos vivos.

O emprego dos agrotóxicos nas culturas de alimentos é um mal necessário para o benefício da produção agrícola e comercialização dos alimentos, porém os agricultores devem ser conscientizados da quantidade e do número de aplicações necessárias para as culturas, tendo em vista a problemática advinda da resistência, bioacumulação e desperdício que são gerados quando não são seguidas rigorosamente as BPA.

1.1.3. Aspectos negativos dos agrotóxicos: impacto ambiental, problemas sanitários dos trabalhadores rurais e segurança alimentar dos consumidores

Os agrotóxicos são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígenos, mimetizadores de hormônios, entre outros.^{25, 28} A contaminação dos alimentos por resíduos de agrotóxicos pode vir de uma aplicação direta em uma das fases da produção da cultura, do transporte ou do armazenamento.²⁹

Os agrotóxicos possuem vários caminhos que podem gerar rotas de contaminação no ar, solo, água e lençol freático. Os agrotóxicos, quando aplicados diretamente no solo, podem ser degradados por via química, fotólise ou micro-organismos, produzindo metabólitos ou compostos mais simples. Entretanto, as

substâncias com alta persistência ou baixa taxa de degradação podem permanecer no ambiente, sem sofrerem qualquer alteração e podem ser adsorvidas pelas plantas ou nas partículas do solo, e serem, posteriormente, desorvidas e lixiviadas pela presença das chuvas ou dos ventos. Os agrotóxicos podem ser transportados para regiões distantes das de aplicação ou atingirem as águas superficiais ou percolarem para os lençóis subterrâneos. Nos ambientes aquáticos, os agrotóxicos podem sofrer adsorção ou desorção nas partículas dos sedimentos, serem degradados por via química, biológica ou fotólise, ou serem volatilizados. Na atmosfera, o transporte depende das propriedades dos agrotóxicos (solubilidade, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol/água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, tempo de meia-vida, constante de ionização, entre outros); condições ambientais (clima, textura e conteúdo de água no solo); topografia e práticas de manejo (tipo de cultura e método de aplicação dos agrotóxicos).^{11, 22, 30, 31, 32, 33}

Um fenômeno ecológico chamado de biomagnificação, no qual ocorre acumulação de agrotóxicos ao longo da cadeia alimentar, leva a um aumento da concentração de uma determinada substância com o aumento do nível trófico. Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes.³⁴

Outro fator preocupante é a contaminação ocupacional que pode ser representada pela Intoxicação Aguda, na qual os sintomas surgem rapidamente, de forma leve, moderada ou grave, dependendo do tempo de exposição e da toxicidade dos agrotóxicos, e é caracterizada por fraqueza, vômitos, convulsões, contrações musculares, dores de cabeça, dificuldade respiratória e sangramento nasal; e a Intoxicação Crônica, que surge tardiamente, em função de exposições repetidas e gera danos, na maioria das vezes, irreversíveis.^{7, 35}

As principais fontes de intoxicações dos trabalhadores rurais são: não uso de vestimenta protetora; despreparo; falta de conhecimento dos perigos causados pelos agrotóxicos; ausência de recursos alternativos para o controle das pragas; indução ao uso excessivo, incentivado por vendedores e propagandas, com o intuito de garantir maior eficiência; condições precárias do trabalhador, como baixa escolaridade, impedindo a leitura das recomendações que constam nas embalagens e falta de acesso

às informações sobre os perigos gerados pelo contato com os agrotóxicos, moradias inadequadas, difícil acesso ao tratamento de saúde e proximidade entre as residências e o campo de aplicação dos agrotóxicos.^{28, 36, 37}

Frutas e vegetais com resíduos de agrotóxicos acima dos LMR causam grandes prejuízos aos produtores rurais, pois são proibidas de entrarem em mercados externos que possuem legislação controlada e rigorosa. Além das perdas econômicas, o fator mais preocupante está relacionado com a falta de segurança alimentar dos consumidores.

Uma alternativa para manter a qualidade do alimento e amenizar os impactos ambientais é a Produção Integrada (PI) que é um sistema que se situa entre a produção convencional e orgânica, gerando alimentos de qualidade, mediante o uso de recursos naturais e métodos ecologicamente corretos e seguros, nos quais se minimizam a aplicação de insumos e contaminantes, para assegurar a sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica.³⁸ Na PI, o uso de agrotóxicos é restrito a acaricidas seletivos ou específicos, com baixa persistência, que não deixem resíduos nos frutos, e a manutenção da cultura pode ser realizada pelo controle químico, biológico ou cultural que reduzem a ação das pragas e, conseqüentemente, diminuem a quantidade de agrotóxicos aplicados no campo.

Devido às exigências cada vez mais rigorosas do comércio nacional e internacional em relação aos produtos agropecuários, a necessidade de implementação da PI tornou-se uma realidade. Este sistema emprega tecnologias que permitem o controle efetivo do sistema produtivo agropecuário, por meio do monitoramento de todas as etapas, desde a aquisição dos insumos até a oferta ao consumidor.³⁹

A adoção do sistema de PI evoluiu em curto espaço de tempo, sendo que, no Brasil, as atividades da Produção Integrada de Frutas (PIF) tiveram início entre 1998 e 1999. No estágio atual, o Sistema PIF já atingiu a consolidação em 18 culturas, sendo que o morango ingressou em 03/04/2008.⁴⁰ A Produção Integrada do Morango (PIMo) surgiu em função da conscientização dos produtores sobre a necessidade de se adaptarem aos novos princípios e se qualificarem, a fim de poderem competir no mercado internacional.⁴¹

Dessa forma, os agricultores devem manter o equilíbrio ecológico através da redução de aplicação dos agrotóxicos nas culturas, para evitar a contaminação dos alimentos produzidos e do meio ambiente.

1.2. Morango e suas propriedades físico-químicas

As frutas são alimentos essenciais em uma dieta equilibrada e balanceada, pois são fontes importantes de vitaminas e minerais que são nutrientes indispensáveis para uma vida saudável. O morangueiro pertence à família das Rosáceas e ao gênero (*Fragaria x ananassa* Duch.); a parte comestível é formada por um receptáculo carnoso e suculento, de coloração vermelha viva, formando um pseudofruto. Os frutos verdadeiros são os aquênios, estruturas diminutas, que contêm as sementes presas ao receptáculo. Este fruto é produzido e apreciado em várias regiões do mundo, sendo uma das espécies de grande evidência e de maior expressão econômica entre as frutas pequenas, por seu alto consumo mundial.^{42, 43, 44} Os consumidores apreciam a coloração, o aroma, o sabor e as propriedades nutritivas do morango, o que aumenta o seu poder de comercialização em muitos países. O maior consumo de morango ocorre *in natura*, mas pode ser industrializado como, geleia, caldas, polpas para sucos, iogurtes e sorvetes.⁴⁵

O morango, como alimento, possui 1,3% de fibras, 92,8% de água e 39,0 calorias em 100 gramas de frutos, vitaminas, elementos minerais e também é rico em frutose e sacarose e pobre em carboidratos. Quando o morango é consumido numa refeição bem balanceada, há uma reação química que triplica os índices de absorção de ferro presente nos vegetais, ovos e carnes. Os valores nutricionais do morango podem ser visualizados na Tabela 1.^{15, 46}

O morango possui poder antioxidante elevado, associado aos compostos fenólicos e pigmentos, que são representados pelas antocianinas, metabólitos pertencentes à classe dos flavonóides. A atividade antioxidante das antocianinas provém da sua estrutura química formada por três anéis que possuem ligações duplas conjugadas e por hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura, que possibilitam o sequestro de radicais livres, causadores de danos celulares e de doenças

degenerativas.⁴⁷ O morango também contém uma quantidade elevada de ácido elágico, um constituinte com propriedades antimutagênicas e anticancerígenas. Devido à presença dessas variedades de componentes naturais, o morango é capaz de atuar na prevenção e/ou na cura de várias doenças e é considerado antioxidante, anticarcinogênico, antineurodegenerativo, anti-inflamatório, diurético, laxativo e previne doenças coronarianas.^{48, 49, 50}

Tabela 1: Valor nutricional do morango em 100 g de amostras.

Nutrientes	100 g	Nutrientes	100 g
Glicídios (g)	7,4	Sódio (mg)	31,5
Lipídios (g)	0,6	Zinco (mg)	0,23
Proteína (g)	1	Vitamina A (µg)	3
Cálcio (mg)	22,0	Vitamina B (µg)	30
Cobre (mg)	0,20	Vitamina B2 (µg)	40
Enxofre (mg)	11,5	Vitamina B5 (mg)	0,4
Ferro (mg)	0,900	Vitamina C (mg)	72,8
Fósforo (mg)	22	Vitamina E (mg)	0,416
Iodo (µg)	0,16	Vitamina K (mg)	3,333
Potássio (mg)	155,2	-----	---

1.2.1. Produção agrícola do morango

O Brasil, depois da China e da Índia, é o 3º maior produtor de frutas do mundo, que é uma das atividades agrícolas mais importantes para o País. A maior porcentagem da produção é destinada para o consumo interno e apenas, aproximadamente, 2% da produção é exportada.^{51, 52}

Os seis principais países em produção e produtividade de morango são, respectivamente, Estados Unidos (740.800 t; 41 t ha⁻¹), Espanha (306.000 t; 38 t ha⁻¹), Japão (200.000 t; 25 t ha⁻¹), Itália (172.600 t; 23,5 t ha⁻¹), Coreia do Sul (151.200 t; 20,5

t ha⁻¹) e Polônia (145.000 t; 3 t ha⁻¹).⁴⁵ Em 2007, a produtividade média da cultura no Brasil foi de aproximadamente 29 t ha⁻¹. Embora o Brasil não figure entre os maiores produtores, sua produção vem crescendo, concentrando-se principalmente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Distrito Federal. Os três primeiros estados produzem aproximadamente 80% do morango brasileiro.^{42, 45, 47, 53, 54}

No Brasil, a produção de morango encontra-se difundida em regiões de clima temperado e subtropical, que se destacam pela alta rentabilidade por área e demanda intensa de mão de obra.^{42, 55} A produção é quase toda voltada para o mercado doméstico, sendo cerca de 70% destinada ao consumo *in natura* e 30% industrializada de diversas formas.⁴¹

A produção do morango tem tendência crescente devido ao alto consumo, porém tem deparado com muitas dificuldades, sendo as principais: incidência de pragas e doenças (28%), aquisição de mudas (24%), custo de embalagens (24%), necessidade de mão de obra (19%) e custos de produção elevados (5%).⁵⁶

A sazonalidade da produção de morango no Brasil é um dos principais problemas da cultura, pois esses pseudofrutos em época de entressafra têm seu preço elevado. Embora cresçam melhor em regiões mais frias, os morangueiros podem se desenvolver bem em clima quente e seco. Segundo Ronque (apud Tessarioli Neto *et al.*),⁵⁷ a produção do morango é dependente de fatores climáticos, sendo de maior expressão a temperatura e o fotoperiodismo, e de menor intensidade a estiagem, chuvas excessivas, umidade e intensidade da luz. Devido a esses empecilhos, há grande busca por novas e melhores técnicas de cultivo e tipo de cultivar, para aumentar a produtividade e a lucratividade dessa cultura. Os métodos de cultivos utilizados são: convencional, orgânico e hidropônico, a céu aberto ou em cultivo protegido.^{42, 44}

O sistema de produção do morango deve priorizar a utilização de métodos naturais, agrícolas, biológicos e biotecnológicos de controle de pragas e doenças, concomitantemente com a utilização de mudas saudáveis ou certificadas; emprego de técnicas adequadas como, irrigação, adubação e manejo dos túneis; limpeza do entorno das áreas de produção e adoção de técnicas que conservam o solo.¹⁵ Estas práticas reduzem a aplicação de agrotóxicos e, conseqüentemente, contribuem para preservação ambiental e segurança alimentar.

1.2.2. Dificuldades na pré-colheita, colheita e pós-colheita do morango

Um dos principais problemas na cultura do morango é a incidência elevada de doenças que podem atacar em várias fases do ciclo da cultura, desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção.²

Diversos fungos, bactérias e vírus atacam o morangueiro destruindo folhas, caules, frutos e raízes. As medidas gerais de controle das doenças são principalmente as preventivas e o uso de mudas sadias. As pragas que destroem o morangueiro são ácaros, insetos (broca-dos-frutos, grilos, pulgões, lagarta-rosca, etc.), nematóides, lesmas e caracóis.¹⁵ Os ácaros são considerados as pragas primárias que causam os maiores danos e prejuízos à cultura do morangueiro, podendo reduzir a produção do morango em até 80%. O seu controle é difícil, pois as colheitas são realizadas diariamente e o fruto é consumido *in natura*, requerendo a aplicação de acaricidas que possuem um período curto de carência e baixa toxicidade.^{38, 58}

A colheita do morango é uma das operações mais delicadas e importantes de todo o ciclo da cultura, porque os frutos do morangueiro são altamente perecíveis, muito delicados e pouco resistentes em virtude da epiderme delgada, possuem grande porcentagem de água e alto metabolismo. Quando colhidos muito maduros, poderão chegar ao mercado em decomposição e com podridões; ou quando colhidos ainda verdes, terão alta acidez, adstringência e ausência de aroma. Em ambos os casos, o produto possui baixo valor comercial.^{15, 59} Os morangos possuem vida útil curta pós-colheita, devido à rápida deterioração causada por fungos, à elevada taxa respiratória e ao aumento da produção de etileno, mesmo quando armazenados sob refrigeração.⁴³ Esta taxa elevada de perecibilidade requer cuidados quanto à embalagem, transporte e conservação.

Quando as medidas preventivas e biológicas de controle não são eficientes, recomenda-se a utilização do Controle Químico. Neste contexto, podem ser aplicados na cultura do morangueiro acaricidas registrados, observando-se as doses e os períodos de carência, e deve-se controlar primeiramente os focos de ácaros e, se

necessário, toda a lavoura, além de variar os acaricidas com diferentes modos de ação.¹⁵

As dificuldades existentes na etapa de produção até o pós-colheita ocasionam desde perdas nutritivas até econômicas, pois os consumidores não compram frutos com um aspecto físico ruim.

Para tentar contornar a grande incidência de doenças e pragas na cultura do morango utilizam-se grande quantidade e várias aplicações de agrotóxicos. Conseqüentemente, a cultura do morango necessita de um controle rigoroso, que é realizado por meio do monitoramento de resíduos de agrotóxicos, para assegurar alimentos mais saudáveis para os consumidores.

1.2.3. Legislação alimentar: avaliação dos resíduos de agrotóxicos em morango

O estudo da avaliação dos riscos crônicos da ingestão de agrotóxicos é um processo no qual a exposição humana a um dado composto, por meio de dieta, é comparada a um parâmetro toxicologicamente seguro. Em geral, os governos conduzem estudos de avaliação de risco durante o processo de registro do agrotóxico e seus resultados podem influenciar no estabelecimento dos LMR permitidos e restringir o uso em algumas culturas. No âmbito internacional, os estudos são conduzidos pela Reunião Conjunta de Peritos em Resíduos de Agrotóxicos da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), e os resultados são posteriormente encaminhados ao Comitê do *Codex Alimentarius* para avaliação pelos Governos membros.^{12, 60, 61}

O LMR é estabelecido pela legislação federal de cada país, e no Brasil, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O objetivo principal do LMR é garantir que a população, ao consumir diariamente produtos, cujos níveis de agrotóxicos estejam dentro dos limites estabelecidos, não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter qualquer problema de saúde. A legislação também estabelece o intervalo de segurança ou período de carência de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola.⁶²

Devido às várias aplicações de agrotóxicos no morangueiro; à possibilidade de consumo ocorrer sem pré-lavagem; ao intervalo curto de segurança, que é o período entre a colheita e a venda; ao fato de que a maioria dos produtores de morango ser de pequeno porte e a grande parte deles não está associada à entidades de classe que adotam os princípios da BPA, torna-se imprescindível o monitoramento dos resíduos no fruto.^{56, 63, 64} Os aspectos negativos da produção do morango podem ser verificados pelos resultados divulgados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), iniciado em 2001, pela ANVISA, que constatou que o morango, desde 2002 até os dias atuais, lidera a lista de alimentos que apresentam maiores irregularidades, tanto pela aplicação de agrotóxicos não autorizados para a cultura, como pela presença de agrotóxicos em concentrações acima do LMR.^{65, 66, 67} Além disso, foi verificado pelos últimos dados divulgados, PARA de 2012, que dentre as culturas monitoradas, o morango apresentou elevado percentual de amostras com resultados insatisfatórios tanto por conter resíduos de agrotóxicos com concentrações acima do LMR como, apresentar até cinco diferentes agrotóxicos irregulares na mesma amostra. Tal fato evidencia a utilização dessas substâncias em desacordo com as indicações constantes nos rótulos e bulas. A Tabela 2 mostra a porcentagem de amostras de morango insatisfatórias entre 2002 e 2012.^{65, 66, 67}

Através destes resultados observa-se que a utilização de agrotóxicos é muito intensa, caracterizando o índice crescente de irregularidades na produção do morango. Destaca-se que o maior consumo do fruto ocorre *in natura*, o que é um benefício para os consumidores, por ingerirem alimentos frescos, com todas as propriedades nutricionais e sem conservantes. Porém, o fruto pode conter resíduos de agrotóxicos em níveis elevados, principalmente se uma boa lavagem não tiver sido efetuada ou se o intervalo entre o tempo de aplicação do agrotóxico e de consumo for menor que o recomendado, trazendo malefícios aos consumidores.

Tabela 2: Porcentagem de amostras de morango insatisfatórias.

Ano	%	Ano	%
2002	46,03	2008	36,05
2003	54,55	2009	50,80
2004	39,07	2010	63,4
2005	N	2011	N
2006	37,68	2012	59,0
2007	43,62	-----	

N: análises não realizadas.

Os resultados referem-se aos estados: AC, BA, DF, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SE, TO (entre os anos de 2002 a 2008); 25 estados e DF (2009 a 2011); 26 estados e DF (2012).

1.3. Produtos orgânicos no Brasil

A Agricultura Orgânica (AO) é um processo produtivo que emprega um mínimo de insumos externos, porém esta prática não garante a ausência total de resíduos, devido à existência de contaminação ambiental. Ela assegura o fornecimento de alimentos saudáveis, mais saborosos e de maior durabilidade por apresentar maior resistência ao ataque de micro-organismos. Por não utilizar agrotóxicos e empregar sistema de manejo mínimo, preserva o meio ambiente e assegura a estrutura e fertilidade dos solos, evitando erosões e degradação, contribuindo assim para promover e restaurar a biodiversidade local.^{68, 69} Alguns procedimentos da AO são: uso da adubação verde ou orgânica, minhocultura, manejo da vegetação nativa, rotação de culturas, cultivos protegidos e uso racional da água de irrigação.

No Brasil, a AO possui sua legislação estabelecida pelo Decreto 6.323 de 27 de dezembro de 2007,⁷⁰ que regulamenta a Lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003.⁷¹ Segundo esta legislação, o termo AO engloba todas as diferentes correntes de agricultura alternativa ou sustentável ou ecológica.

*Krolow et al.*⁷² avaliaram os aspectos físicos e químicos do morango cv. Aromas cultivado de maneira orgânica e convencional. Os resultados mostraram que os morangos cultivados pelo sistema de AO apresentaram maiores diferenças percentuais para os teores de antocianinas, sólidos solúveis totais e razão de sólidos solúveis totais/acidez total titulável (SST/ATT), que foram de 106,1%, 16,1% e 24,3%, respectivamente, e superiores ao sistema convencional. O principal aspecto negativo da AO foi à redução de 8,4% no teor de ácido ascórbico em relação ao convencional. Porém, é importante destacar que não somente o sistema de produção influencia nestes índices, mas o ponto de maturação em que a fruta é colhida, haja vista que os produtores tendem a colhê-las um pouco verdes para que resistam até o momento de comercialização. Pelos resultados encontrados neste experimento para os dois sistemas de produção, observa-se que não apresentaram grandes diferenças, exceto para antocianinas, a qual pode ser explicada pela diferença do ponto de maturação.

A grande preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos aumentou a procura por alimentos orgânicos, devido aos seus benefícios. Contudo, os entraves à expansão deste segmento são o preço superior aos dos produtos de cultivo convencional e a disponibilidade de comercialização que é maior apenas nos grandes centros urbanos. Porém, estes entraves estão sendo superados aos longos dos anos e tendem a ser minimizados pela maior acessibilidade à toda a população e maior conscientização dos produtores rurais sobre a competição de mercado com os alimentos convencionais que apresentem melhor qualidade.

1.4. Técnicas de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos com enfoque em amostras de morango

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é feito empregando uma técnica de preparo de amostra, visando a extração dos analitos e o *clean-up* dos interferentes, associado a uma técnica de determinação dos agrotóxicos que engloba separação, identificação e quantificação dos analitos, e caso necessário, confirmação do resultado para uma análise mais segura, sendo a cromatografia líquida (*Liquid Chromatography* -

LC) e a cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC) as mais utilizadas nas análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos.^{20, 73, 74, 75}

Dentre as etapas analíticas no desenvolvimento de métodos de análises de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, o preparo de amostra é considerado uma das mais críticas e importantes, uma vez que analisa matrizes complexas contendo analitos com propriedades físico-químicas diversificadas e em concentrações baixas, que são algumas das adversidades a serem superadas, além disso, compreendem etapas laboriosas, que demandam tempo, são de custo elevado e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos.^{76, 77, 78}

A análise de resíduos de agrotóxicos teve início na década de 60, com determinações de organoclorados; na década de 70 foram introduzidas mudanças para ampliar o intervalo de polaridade dos compostos analisados, que se estenderam para os organofosforados e nitrogenados; e nas décadas posteriores, começaram a surgir preocupações com a utilização dos solventes clorados e com a quantidade de resíduos gerados na etapa de extração, exigindo mudanças nas técnicas de preparo de amostra.^{77, 79, 80}

Numerosas técnicas de extração foram empregadas para determinar agrotóxicos em alimentos, inclusive em morango, podendo destacar o uso de particionamento de solventes como extração líquido-líquido (*Liquid Liquid Extraction* - LLE), extração sólido-líquido (*Solid Liquid Extraction* - SLE),^{81, 82, 83, 84} extração assistida por micro-ondas (*Microwave Assisted Extraction* - MAE),^{85, 86} microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction* - SPME),^{87, 88, 89, 90} extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE),^{91, 92, 93, 94, 95} dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion* - MSPD),^{96, 97} extração líquida pressurizada (*Pressurized Liquid Extraction* - PLE)⁹⁸ e extração sortiva em barra de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction* - SBSE)^{99, 100} que foram utilizadas com determinação por LC ou GC.^{77, 101}

Pode-se verificar que existem várias técnicas de preparo de amostras para alimentos, porém os parâmetros principais que um analista deve levar em consideração para optar por uma técnica de extração são: números e classes de agrotóxicos, limites de quantificação que devem ser atingidos e composição da amostra a ser analisada. O preparo de amostra apresenta vantagens e desvantagens que vão depender de:

volume de solvente, extração de coextrativos, uso de solventes não clorados, quantidade de amostra, extração específica ou seletiva, processamento manual ou automatizado, *on-line* ou *off-line*, facilidade de acoplamento para determinação por LC ou GC, entre outras.

1.4.1. Versatilidades do QuEChERS

Em 2003, *Anastassiades et al.*,⁸⁰ com o objetivo de superar as limitações práticas das técnicas de preparo de amostra de multirresíduos de agrotóxicos utilizadas e disponíveis, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras denominado método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), que consiste na extração com solvente orgânico, seguida por partição líquido-líquido com adição de sais, para efeito *salting out*, tamponamento quando necessário, secagem e uma etapa de *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction, d-SPE*).^{76, 102, 103}

Dependendo das características físico-químicas dos analitos e da matriz, podem ser introduzidas modificações no método QuEChERS representadas pelas diferentes versões, como:^{104, 105}

- Original (*Anastassiades, Lehotay et al.* - 2003), não tamponado;
- AOAC *Official Method* (*Lehotay* - 2007), utiliza o tampão acetato;
- *European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662* (*Anastassiades* - 2008), utiliza o tampão citrato.

As diferenças entre as versões consistem, principalmente, nos valores de pH resultantes da adição de tampão, mas também podem ocorrer mudanças no uso de diferentes solventes orgânicos na etapa de extração e utilização de diversos tipos de sorventes na etapa de *clean-up*, em função do tipo de amostra a ser analisada. As versões do método QuEChERS podem ser visualizadas na Figura 1.

Ao contrário do *clean-up* em SPE que utiliza cartucho, coluna ou disco,^{106, 107} no preparo de amostra QuEChERS emprega-se a extração em fase sólida dispersiva que possibilita a redução de interferentes e a redução de água residual sejam efetuadas de forma simultânea e rápida. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final

de menor polaridade, o que facilita a precipitação de coextrativos ou interferentes polares e permite a injeção direta do extrato final nos equipamentos de GC ou LC.^{76, 108} Na etapa de d-SPE, desenvolvida por *Anastassiades et al.*,⁸⁰ utilizou-se o PSA para o *clean-up*, porém, recentemente, em alguns trabalhos utilizam-se outros tipos de sorventes, tanto isolados como misturados com PSA, sendo o octadecil e o carbono grafitizado (*Graphitized Carbon Black* - GCB) os mais empregados nas extrações de resíduos de agrotóxicos em alimentos.^{109, 110, 111, 112, 113} O emprego de sorventes alternativos ao PSA depende da composição da amostra, pois esta substituição poderá causar uma maior interação dos interferentes da matriz com os sorventes e, conseqüentemente, uma remoção mais eficiente dos coextratos da matriz.

A versatilidade do preparo de amostra QuEChERS, principalmente, nas variações dos sorventes na etapa de *clean-up* por d-SPE, pode contribuir favoravelmente na determinação analítica, tanto na parte instrumental, por fornecer extratos com menor quantidade de interferentes, evitando danos ou diminuindo a manutenção do sistema cromatográfico e aumentando o tempo de vida útil das colunas, como também na detecção, com melhor detectabilidade e menor possibilidade de falso-positivos que são atribuídos ao efeito matriz.^{74, 114, 115} Além disso, o custo das análises é mais baixo pela menor quantidade de reagentes e solventes utilizados no preparo de amostra.

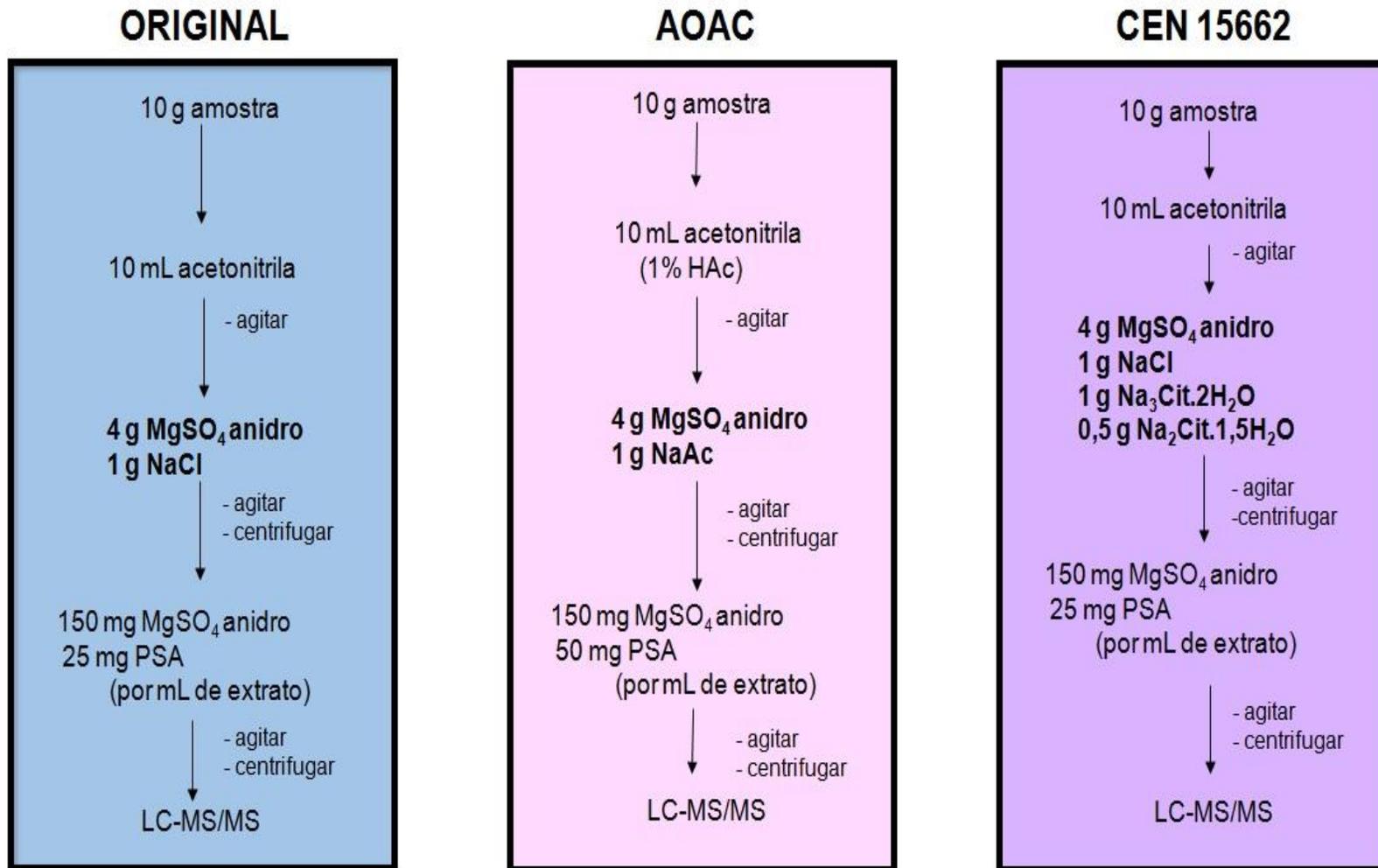


Figura 1: Fluxograma das versões do preparo de amostra QuEChERS determinados por LC-MS/MS. Adaptado de *Lehotay, 2010.* ¹⁰⁵

Na literatura, encontram-se alguns trabalhos que utilizam o método QuEChERS no preparo de amostra de morango. *Fernandes et al.*¹¹⁶ utilizaram o QuEChERS com mistura dos sorventes PSA e C18 na etapa d-SPE para o *clean-up* em morangos fortificados com 14 agrotóxicos que foram determinados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC-ECD), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS). As recuperações variaram de 46-128% com CV <15%, no intervalo de concentração de 0,005-0,250 mg kg⁻¹. Os agrotóxicos lindano e β-endossulfam foram detectados acima dos valores de LMR, enquanto outros organoclorados (aldrin, o,p-DDT e seus metabólitos, e metoxiclor) foram detectados abaixo de seus LMR. O método QuEChERS foi aplicado por *Lehotay et al.*¹¹⁷ para análise de aproximadamente 150 agrotóxicos em amostras de frutas e vegetais, inclusive morango, utilizando uma mistura de sorventes de PSA, C18 e GCB na etapa d-SPE e determinação por cromatografia gasosa de baixa pressão acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (LP-GC-TOF). O método apresentou resultados quantitativos e qualitativos aceitáveis empregando esta combinação, do preparo de amostra QuEChERS e da determinação por LP-GC-TOF, para resíduos de agrotóxicos em amostras de frutas e vegetais.

Atualmente, o método QuEChERS está sendo muito empregado nas determinações de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, devido a uma série de vantagens, entre elas: porcentagens altas de recuperação dos agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas; não utilização de solventes clorados, contribuindo para a Química Verde; baixo custo e manipulação fácil. Porém, o fator de concentração que pode ser alcançado é menor quando comparado ao obtido empregando a SPE. Em vista disso, esse é um parâmetro importante que deve ser considerado, pois, dependendo do tipo de detector a ser utilizado, os LMR estabelecidos podem não ser alcançados. O grande número de trabalhos que aplica este tipo de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos demonstra nitidamente as vantagens desta técnica que é rápida, fácil, econômica, efetiva, robusta e segura.

1.5. Determinação de resíduos de agrotóxicos com destaque para cromatografia líquida moderna

Na década de 70, a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) passou a ter seu uso intensificado em várias áreas, quando Snyder propôs uma denominação mais abrangente para a técnica, como cromatografia líquida moderna (*Modern Liquid Chromatography*). Este nome descreve a técnica instrumental desenvolvida em contraposição à LC clássica, não tendo sentido temporal, ou seja, moderna por ser contemporânea.^{118, 119} Atualmente, devido à grande expansão da LC moderna, em contraste ao uso reduzido da LC clássica, muitas vezes, se emprega somente a denominação cromatografia líquida (LC).

Nas últimas décadas, a LC tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada para fins qualitativos e, principalmente, quantitativos em aplicações científicas e industriais, nas áreas farmacêutica, médica, alimentícia, ambiental e polimérica.^{118, 120, 121}

As principais vantagens da LC incluem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente de volatilidade, estabilidade térmica e polaridade, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade.^{122,}

¹²³

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica com um poder de resolução excelente, o que facilita a análise de diversos analitos numa mesma amostra.¹²⁴ Entretanto, a polaridade e instabilidade térmica de alguns agrotóxicos, tornam as análises por GC mais difíceis,¹²⁵ fazendo-se necessária uma etapa de derivatização, o que pode aumentar o tempo e o custo da análise. A expansão do uso da LC se deve à síntese de agrotóxicos mais polares, por serem menos persistentes e tóxicos que os apolares.^{6, 19, 126} As determinações por LC podem ser realizadas empregando-se vários tipos de detectores, sendo os mais utilizados o arranjo de diodos (DAD) e o espectrômetro de massas (MS), que realizam análises qualitativas e/ou quantitativas.

1.5.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)

As análises de alimentos representam um campo amplo e diversificado, sendo que, na última década, o número de trabalhos envolvendo estas matrizes dobraram empregando GC-MS, enquanto metodologias que usam LC-MS aumentaram quase dez vezes, no mesmo período.¹²⁷

O acoplamento de um cromatógrafo a líquido com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural, massa molar, aumento adicional de seletividade e detectabilidade).^{74, 128}

As moléculas são desorvidas e ionizadas no espectrômetro de massas, em seguida, os íons formados são acelerados por um campo elétrico ou magnético e separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z).¹²⁹ O equipamento é constituído por três partes principais que são representadas pela fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons, sendo que, os dois primeiros possuem grandes variedades que podem ser empregadas em função das propriedades dos analitos (polaridade, massa molar, ionização, etc.) e do tipo de análise (identificação ou quantificação) que será realizada no equipamento.

A fonte de ionização é o compartimento onde os íons são gerados, sendo que, uma das mais empregadas é a ionização por Eletrospray (*Electrospray Ionization* - ESI) que se baseia no mecanismo de "explosão coulombica". De forma geral, nesta interface os analitos são ionizados pela aplicação de uma voltagem e, posteriormente, são volatilizados pela passagem de um gás de dessolvatação para evaporar o solvente dos analitos.¹²⁹ A interface ESI é excelente para o estudo de moléculas polares e ionizáveis, tanto no modo positivo ou negativo. A sensibilidade depende da estrutura molecular, sendo que, compostos de baixa polaridade não podem ser eficientemente analisados por este tipo de fonte de ionização e deve ser empregada a Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI) ou a Fotoionização à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization* - APPI) como alternativas para ionizar as moléculas das amostras.^{127, 130}

Após a etapa de ionização, os analisadores realizam a identificação dos íons por meio da razão (m/z). Atualmente, o analisador mais empregado nestas análises é o Triplo Quadrupolo (QqQ), onde o primeiro quadrupolo é um filtro de massas para o analito alvo (íon precursor), o segundo quadrupolo é uma célula de colisão que fragmenta o íon precursor e gera os íons produtos, pela colisão com um gás inerte por um processo conhecido como dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation* - CID), e o terceiro quadrupolo é um filtro de massas para os íons produtos que serão enviados ao detector.^{124, 129} O analisador de massas com quadrupolo é como um filtro de massas, onde todos os íons entram por uma extremidade, mas somente os íons com um valor determinado de razão (m/z) atravessam o filtro e o restante é perdido na trajetória. Este analisador é simples, robusto, relativamente barato, alta sensibilidade, faixa dinâmica linear grande e excelente para quantificação, porém apresenta baixa resolução.¹³⁰

O detector tem como função converter íons em um sinal elétrico que serão processados para gerar dados de aquisição. O detector do tipo multiplicadora de elétrons é empregado para maioria das análises de rotina, no qual cada íon que alcança o detector dá origem a uma cascata de elétrons, por uma série de dinodos de conversão do sistema que é uma superfície mantida em alta tensão, a fim de que os íons que colidam com essa superfície produzam partículas secundárias com carga, que são posteriormente detectadas. Este dispositivo multiplica o número de elétrons (aproximadamente 10^5) antes que eles alcancem o anodo, onde a corrente é medida. O espectro de massas mostra a corrente proveniente do detector em função do valor de m/z selecionado. Em geral, multiplicadoras de elétrons são robustas, confiáveis, capazes de fornecer altos ganhos de corrente e tempos de resposta de nanosegundos.^{124, 129, 131}

A espectrometria de massas sequencial (em série ou *Tandem*) representa os espectros de íons produto à partir de íons precursores, em um primeiro estágio de análise de massas. A espectrometria de massas sequencial pode ser realizada em instrumentos com mais de um analisador fisicamente separados (espectrometria de massas sequencial no espaço) ou o espectro de íons produto é registrado em um mesmo analisador de (m/z) em intervalos de tempo distintos, nos instrumentos do tipo

ion trap (espectrometria de massas sequencial no tempo).¹³¹ Esse modo tem sido considerado uma ferramenta de identificação e confirmação, no qual o monitoramento dos fragmentos fornece maior discriminação que um único estágio, reduzindo a necessidade de etapas excessivas de preparo de amostra; além de diminuir os resultados falsos positivo/negativo em amostras complexas, como frutas e vegetais; permitir a identificação de analitos a níveis de ultratraços (ng ou menor) e com características físico-químicas diferentes; resultar em menor tempo e custo das análises pela quantidade reduzida de reagentes utilizados no preparo de amostra; fornecer menor detectabilidade e maior seletividade.^{84, 126, 128} Segundo dados, 2/3 dos trabalhos no setor agroalimentar, publicados em 2011, relacionados a LC com detecção por espectrometria de massas empregaram análises por MS/MS.¹²⁷ A LC-MS/MS está sendo cada vez mais utilizada na área química, principalmente, em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

O emprego da MS/MS aumenta a seletividade, que é um parâmetro de fundamental importância em análises de traços em matrizes complexas, porque reduz a influência do efeito matriz e incrementa a detectabilidade, uma vez que, aumenta a razão sinal/ruído (*Signal to Noise* – S/N), e conseqüentemente, permite que os LMR sejam atingidos com maior facilidade. O analisador QqQ pode analisar os íons no modo seleção (dados adquiridos somente para um ou mais íons específicos) ou varredura de íons (obtenção do espectro de massas de todos íons). A análise dos íons pode ser representada, principalmente, pelo monitoramento de íon selecionado (*Selected Ion Monitoring* - SIM), que não é o mais adequado para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos por não ser tão seletivo, ou pelo modo varredura que é realizado pelo monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* - MRM), considerado a forma mais adequada para determinação de agrotóxicos, por ser mais seletivo e reduzir a probabilidade de interferentes no espectro de massas, devido ao monitoramento de pelo menos duas transições, conforme o Guia Sanco, e ser mais sensível nas determinações analíticas.^{130, 131, 132}

A complexidade de certas matrizes pode causar problemas na eficiência de ionização, conseqüentemente, na determinação analítica, pela presença de compostos da amostra com massas semelhantes aos analitos alvos, podendo gerar uma

identificação equívoca, ou seja, detecção de falsos positivo/negativo. Além da MS sequencial, a espectrometria de massas com alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS) é outra alternativa que proporciona aumento da seletividade numa análise de multirresíduos que contenha quantidade grande de compostos com massas semelhantes aos analitos alvos, sendo empregados analisadores como, Tempo de Voo (*Time of Flight* - TOF), *Orbitrap* ou *Transformada de Fourier* (*Fourier Transform* - FT). Portanto, esta ferramenta, com grande poder de resolução, fornece um maior grau de especificidade e é essencial para minimizar a detecção de resultados falsos e também uma ferramenta atrativa para análises de varredura que identifica os analitos alvos e não alvos simultaneamente em amostras complexas. Porém, os analisadores do tipo QqQ são ainda os mais utilizados nas determinações de rotina de resíduos de agrotóxicos em alimentos, porque o HRMS apresenta algumas limitações como, saturação do detector para certos analitos, faixa dinâmica linear menor e presença de falsos positivo no modo *full scan*, entre outros.^{127, 133} O analisador TOF é simples e robusto, entretanto possui resolução limitada no formato linear e menor sensibilidade na configuração do tipo refletor.

Outra preocupação na área química, além da quantificação analítica para segurança alimentar, é a verificação da autenticidade dos alimentos que pode demandar o acoplamento de diferentes analisadores ou acoplamento híbrido com analisadores de alta resolução e exatidão.^{78, 127}

Em virtude da versatilidade do detector MS, este pode ser utilizado em análises qualitativas como, na determinação de massa molar, informações estruturais e identificação de compostos na amostras, ou quantitativas para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas. O tipo de análise determina a escolha do analisador, que poderá ser o acoplamento de analisadores ou espectrômetro de massas híbrido, para realizar as determinações analíticas. Os parâmetros principais a serem levados em consideração para seleção do tipo de analisador são: a resolução que influencia na identificação analítica, porque os equipamentos com alta resolução possuem maior capacidade em separar picos que correspondam a valores de massas semelhantes, e a detectabilidade que deve possibilitar a quantificação de analitos em concentrações em nível de traços.

1.5.2. Métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango

Na literatura existem alguns trabalhos de desenvolvimento e/ou validação empregando as técnicas de preparo de amostras, que já foram apresentadas, em análises de resíduos de agrotóxicos em morango determinados por LC. A seguir estão apresentados alguns destes trabalhos, com ênfase nos valores de recuperação, precisão e detectabilidade dos métodos.

*Soler et al.*⁹⁶ compararam duas técnicas de extração: a MSPD utilizando C18 como dispersante, diclorometano e metanol como eluente, e a SLE com o solvente acetato de etila, empregados na determinação de nove agrotóxicos (acrinatrina, carbosulfano, ciproconazol, γ -cialotrina, cresoxim metílico, pirifenox, piriproxifem, propanil, e tebufempirado) em amostras de laranja e morango, por LC-MS/MS. Recuperações na faixa de (51,5-108)% e de (59-101)% e CV de <16% e <17%, foram obtidas para MSPD e SLE, respectivamente. Contudo, para a maioria dos agrotóxicos, os LOQ foram melhores para SLE (0,01-0,4) mg kg⁻¹ que para MSPD (0,05-2) mg kg⁻¹. Os autores concluíram que a SLE permitiu melhor detectabilidade que a MSPD, devido aos valores dos LOQ, porém a MSPD apresentou a vantagem de utilizar menor volume de solvente.

Um trabalho que é considerado ambientalmente correto, por utilizar água como solvente de extração, foi desenvolvido por *Falqui-Cao et al.*⁸⁵ Os autores empregaram duas técnicas de extração, assistida por micro-ondas focalizada (*Focused Microwave-Assisted Extraction* - FMAE) e SPME acoplada à LC-DAD para determinação de cinco agrotóxicos (azoxistrobina, bupirimato, carbendazim, dietofencarbe, napropamida) em amostras de morango. As amostras foram extraídas com água por FMAE e o extrato aquoso foi exposto a uma fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenzeno (PDMS/DVB) na SPME. Os agrotóxicos foram dessorvidos na interface SPME/LC para sua quantificação, com limites de detecção inferiores a $\mu\text{g kg}^{-1}$, que estão abaixo dos LMR.

Em um trabalho desenvolvido por *Soler et al.*,¹³⁴ empregaram-se três tipos de analisadores de massas acoplados a três diferentes LC: Triplo Quadrupolo (QqQ), Quadrupolo Armadilha de Íons (*Ion Trap* - QIT) e Quadrupolo por Tempo de Voo

(*Quadrupole Time-of-Flight* - QqTOF), na determinação de doze de agrotóxicos (acrinatrina, bupirimato, buprofezina, ciproconazol, γ -cialotrina, fluvalinato, hexaflumurom, cresoxim metílico, propanil, pirifenox, piriproxim e tebufenpirado), em seis matrizes (cereja, damasco, laranja, morango, pera e pêsego) e extração por PLE. Os CV foram menores para QqQ (5 - 12)%, em comparação ao QIT (6 - 15)% e QqTOF (14 - 19)%, entretanto todos estavam no intervalo aceito na literatura. A faixa linear dinâmica foi pelo menos de três ordens de grandeza maior para o QqQ, enquanto para QIT e QqTOF foram de duas e uma ordem, respectivamente. O QqQ foi pelo menos 20 vezes mais sensível que QIT e QqTOF. Contudo, o QqQ não foi adequado para identificação do etirimol que é o metabólito do bupirimato. Portanto, verifica-se que o analisador ideal depende do tipo específico de análise, que pode ser qualitativa ou quantitativa, e do analito.

*Sagratini et al.*¹³⁵ analisaram agrotóxicos das classes carbamato e feniluréia em sucos de frutas (cereja, laranja, maçã e morango), empregando SPME acoplada à LC-MS e LC-QIT/MS. Os agrotóxicos foram extraídos com três fibras diferentes, *Carbowax/resina template* (CW/TPR) de 50 μm , poli(dimetilsiloxano)/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 60 μm e poliacrilato de 85 μm , sendo que as duas primeiras fibras forneceram melhores recuperações na faixa de 25-82%. Os valores de LOQ (0,005 - 0,05) $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos usando qualquer uma das fibras empregadas no preparo de amostra apresentaram concentrações abaixo dos LMR estabelecidos pela legislação italiana e espanhola. O trabalho provou que a interface (SPME/LC) é um acoplamento válido para unir a micro-extração em fase sólida com o sistema de cromatografia líquida, e os analisadores apresentaram resultados similares em relação aos valores de recuperação.

*Peruga et al.*¹³⁶ otimizaram e validaram um método específico para resíduos de tiram em berinjela, alface e morango, que foram determinados por LC-MS/MS. O preparo de amostra (SLE) foi realizado a baixa temperatura, aproximadamente 5°C, com auxílio do banho de gelo. O procedimento foi cuidadosamente estudado porque o agrotóxico é sensível ao pH, componentes da matriz e temperatura. Recuperações satisfatórias entre 80-106% e CV < 10% foram obtidos nos níveis de fortificação 0,1 e 0,01 mg kg^{-1} e também, limites de detecção abaixo de 0,0012 mg kg^{-1} foram atingidos.

Existe uma diversidade de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em morango por LC, com diferentes justificativas para o seu uso, porém se deve priorizar um método abrangente, rápido, confiável, de custo baixo, ambientalmente correto e que seja capaz de analisar diversas classes de agrotóxicos com maior detectabilidade.

1.6. Tendências futuras de determinação de resíduos de agrotóxicos - UHPLC

Desde o início da cromatografia líquida (LC) até o seu desenvolvimento nos dias atuais, muitos avanços foram alcançados com o aperfeiçoamento contínuo de novas partículas de fases estacionárias (*Stationary Phase* - SP) que fossem capazes de gerar colunas mais seletivas, eficientes e com maior estabilidade química e mecânica. Na última década, a LC tem sido direcionada à necessidade de análises mais rápidas e/ou de melhor resolução, sem diminuir o desempenho cromatográfico. Recentemente, com mudanças nos sistemas cromatográficos, foi possível o uso de SP com partículas < 2 µm, dando origem a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) ou UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) para distinguir da técnica convencional da HPLC, além disso, UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) patenteada pela empresa *Waters* ou RRLC (*Rapid Resolution Liquid Chromatography*) da *Agilent*.^{121, 137}

Atualmente, as análises de resíduos de agrotóxicos são obtidas pelo acoplamento UHPLC-MS/MS, que une as vantagens da técnica de separação com a detecção. Este acoplamento proporciona análises mais rápidas, menor consumo de fase móvel, melhor resolução dos picos cromatográficos, maior detectabilidade, maior razão sinal/ruído que, por sua vez, diminui o valor do LOQ.^{19, 138, 139} Outra vantagem interessante que deve ser destacada, é a influência sobre o efeito matriz causada pela separação pelo UHPLC que proporciona picos mais estreitos devido a melhor resolução, conseqüentemente, os analitos coeluem com menos interferentes durante ionização e minimizam ou eliminam estes efeitos na amostra analisada.¹⁴⁰ Resumindo, UHPLC-MS/MS representa grandes avanços em seletividade, detectabilidade e velocidade.

Ainda não existem muitos trabalhos sobre determinação de resíduos empregando UHPLC-MS/MS, mas há uma tendência crescente de tornar-se uma técnica bem estabelecida, uma vez que, existem vários artigos publicados em diversas áreas como, biológica, farmacêutica e metabólica.^{141, 142, 143} Importante destacar que, o volume de amostra disponível é um parâmetro relevante em muitas situações práticas como análise clínica e química forense que, muitas vezes, dispõem de volume de amostra pequeno. Nestes casos, o uso do UHPLC é extremamente benéfico e adequado pois empregam volumes de amostras reduzidos, devido à dimensão das colunas cromatográficas que são menores que as de HPLC.¹¹⁸ Outro fator preponderante é a economia de solvente, por empregar menor vazão de MP para realizar a separação cromatográfica, que em uma empresa gera grande economia no custo total das análises.

Dois trabalhos publicados na literatura, o de *Kovalczuk et al.*¹⁹ e *Leandro et al.*¹⁴⁴ permitem que se realize uma boa comparação da HPLC com a UHPLC. No primeiro trabalho foram analisados dezessete agrotóxicos em maçãs por HPLC e UHPLC acoplados ao MS/MS com as mesmas fontes de ionização e analisadores. As principais vantagens fornecidas pelo UHPLC foram: menor consumo de solvente, menor LOQ e velocidade de análise (redução maior que 50% no tempo de análise). No segundo trabalho foram analisados dezesseis agrotóxicos em alimentos infantis por HPLC e UHPLC acoplados ao MS/MS com as mesmas fontes de ionização e analisadores. Os métodos de determinação foram simples, rápidos e adequados para quantificação e confirmação desses agrotóxicos. As principais vantagens fornecidas pelo UHPLC foram a velocidade de análise (2,5 vezes mais rápida) e os picos mais estreitos (razão S/N maior), que melhoram as respostas dos analitos com menor sensibilidade.

Existem alguns trabalhos nos quais se utilizaram HPLC e UHPLC, nas mesmas análises, porém empregando analisadores de massas diferentes, como o trabalho de *Wang et al.*,¹⁴⁵ no qual se empregaram cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por *eletrospray* (LC/ESI-MS/MS) e cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas híbrido quadrupolo e tempo de voo (UHPLC-QqTOFMS) na análise de cento e quarenta e oito agrotóxicos em frutas e vegetais. Pelos resultados apresentados verificou-se que

alguns parâmetros como, detectabilidade, repetibilidade, exatidão de massa, resolução, análise por monitoramento seletivo ou varredura prevaleceram, mais ou menos, dependendo do tipo de analisador empregado na análise.

*Frenich et al.*¹³⁸ desenvolveram e validaram um método para determinação de 53 agrotóxicos em frutas e vegetais, incluindo morango, por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). No preparo de amostra foi empregado o QuEChERS, na versão AOAC e sem *clean-up*, para as amostras não gordurosas e a separação cromatográfica foi realizada em menos de 10 minutos. Recuperações satisfatórias entre 70-109% e CV < 20% foram obtidas para todos os agrotóxicos. Este método combina as vantagens do QuEChERS com UHPLC-MS/MS resultando em um método rápido, sensível e confiável que pode ser aplicado em análises de rotina.

Os trabalhos disponíveis na literatura sobre UHPLC-MS/MS apontam muitos benefícios dessa técnica analítica, porém muitos autores não discutem sobre o volume de amostra injetado e utilizam o mesmo volume empregado nas análises por HPLC em UHPLC, mesmo com colunas de menor capacidade, conseqüentemente, pode ocorrer perda de eficiência e sobrecarga da coluna quando ultrapassam a capacidade máxima da coluna com volumes altos de amostras injetados.¹²² Somente alguns autores tentam ser mais cuidadosos e utilizam o mesmo volume de amostra para estudar a razão S/N pela mesma quantidade de extrato cru da amostra, porém com colunas com capacidades diferentes.¹⁹ São informações que na prática podem interferir nos resultados finais, porque para tentar manter ou aumentar a detectabilidade do método modificam os volumes de injeções, mesmo que cromatograficamente não seja ideal, por acarretar em sobrecarga de amostra na coluna com diminuição de tempo de vida útil.

O tempo de aquisição (*dwell time*) para o monitoramento de cada transição (MRM) dos íons de quantificação e confirmação é outra preocupação que não é muito discutida.¹³⁸ Numa corrida analítica de menor tempo, um maior número de analitos são coeluídos e, conseqüentemente, deve-se reduzir o tempo de aquisição para que todas as transições sejam monitoradas. Esta diminuição no tempo de aquisição poderá acarretar em um pico cromatográfico com formato inadequado ou com menor número de pontos para a sua construção, o que interfere na integração cromatográfica,

influenciando negativamente na quantificação analítica, na detectabilidade, na precisão entre as injeções, além de causar problemas na linearidade do método analítico. Importante destacar que, o número mínimo de pontos necessários para construção do pico cromatográfico pode variar em função da marca do equipamento por causa da sua eletrônica.

O emprego da UHPLC, que representa um tipo de cromatografia rápida (*fast liquid chromatography*), pode superar as limitações das análises por HPLC, principalmente pelo tempo de análise reduzido, sem perda na eficiência de separação. Conseqüentemente, a cromatografia rápida tornou-se uma necessidade nos laboratórios que analisam centenas de amostras diariamente ou aqueles que necessitam de respostas muito rápidas, como os laboratórios que trabalham com segurança alimentar.¹⁴⁶

Uma técnica de determinação analítica, que engloba a separação e a detecção, eficiente, rápida e ambientalmente correta é o desejo de todos analistas. Neste contexto, pode-se confirmar que o emprego da UHPLC-MS/MS possui muitas vantagens para cada vez mais consolidar como uma ferramenta indispensável em diversas áreas, principalmente, a de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

1.7. Validação de métodos analíticos

A validação é uma etapa que deve ser realizada após o desenvolvimento do método analítico e antes das análises das amostras disponíveis no comércio, para assegurar que serão gerados resultados com credibilidade, precisão e exatidão adequados. A validação pode ser compreendida como um processo de verificação que demonstra que o método desenvolvido é adequado ao objetivo desejado e assegura confiabilidade às medidas experimentais do método.^{147, 148}

Na validação de resíduos de agrotóxicos em alimentos existem os guias de procedimentos analíticos desenvolvidos pela ANVISA (Guia para o Controle de Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os Laboratórios Integrantes do PARA),¹⁴⁹ SANCO (*Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*)¹³² ou CODEX (*Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis*),¹⁵⁰ entre outros. Os guias desenvolvidos pelo INMETRO (Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos - Instituto Nacional de Metrologia)¹⁵¹ e EURACHEM (*The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*)¹⁵² possuem uma versão geral que não especifica o tipo de analito, mas discute questões relacionadas com as figuras de mérito ou parâmetros analíticos de validação analítica.

Neste estudo, utilizaram-se para validação do método analítico para análise de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos por LC-MS/MS, os parâmetros analíticos de validação ou figuras de mérito considerados mais importantes e usuais propostos nos guias das agências reguladoras nacionais e internacionais, como seletividade, limites de detecção (*Limit of Detection* - LOD), limite de quantificação (*Limit of Quantification* - LOQ), linearidade, precisão e exatidão (recuperação). As formas de obtenção e os critérios de aceitação foram baseados, principalmente, no guia Sanco¹³² por ser bem elaborado e direcionado para estas análises.

1.7.1. Seletividade

A seletividade representa a capacidade do método em discriminar entre o analito e as substâncias análogas como, metabólitos, isômeros, componentes da matriz e entre outros, que são considerados interferentes da amostra. O termo seletividade pode ser confundido com especificidade, sendo que o método seletivo analisa um grupo de compostos com uma característica em comum, com distinção entre eles, enquanto a especificidade é a capacidade de diferenciar um único analito de todos os componentes na amostra. Normalmente, os métodos cromatográficos analisam vários analitos simultaneamente, portanto, é mais apropriado o termo seletividade. Este parâmetro pode ser minimizado ou eliminado pela mudança do branco da matriz, que é uma amostra que contém todos os constituintes exceto o analito, pelo preparo de amostra na etapa de *clean-up* que poderá eliminar os interferentes ou por meio de uma separação cromatográfica mais eficiente.

A seletividade pode ser obtida pela comparação dos picos cromatográficos do padrão analítico, branco da amostra e amostra fortificada com os agrotóxicos estudados, utilizando detectores por DAD ou MS. No caso do DAD, a seletividade é avaliada pela pureza do pico cromatográfico, determinada pela comparação do perfil dos espectros de absorção obtidos em posições diferentes no pico cromatográfico como início, máximo e final, sendo que, espectros idênticos confirmam a pureza e variações indicam a presença de impurezas que foram coeluídas com o analito, ou pela comparação dos espectros de absorção obtidos em comprimentos de ondas diferentes. Para garantir maior confiança ou ser ainda mais específico com este parâmetro, pode-se utilizar o detector por MS para comparar o espectro de massas da amostra e do padrão analítico, como também, pela utilização da análise em *tandem* que gera transições de quantificação e confirmação para a determinação analítica dos agrotóxicos.

A seletividade pode ser determinada pela análise de brancos da amostra para monitorar e comparar, através dos cromatogramas, a presença de algum sinal no tempo de retenção correspondente aos agrotóxicos estudados. Segundo recomendações do guia Sanco, um método é considerado ter seletividade aceitável mesmo contendo

substâncias interferentes até 30% da concentração do limite de quantificação do analito no branco da amostra analisada.

1.7.2. Limites de Detecção (LOD)

O limite de detecção é a menor concentração do analito na matriz, na qual ocorre uma identificação positiva e não quantitativa, que pode ser atingida sob condições experimentais estabelecidas. Existem várias formas de determinação do limite de detecção como, do método baseado nos parâmetros da equação da reta da curva analítica, das medidas de dispersão dos brancos da amostra ou da razão sinal/ruído.

No método baseado nos parâmetros da equação da reta da curva analítica que leva em consideração o desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação da curva com concentrações próximas ao LOQ, e a sensibilidade do método analítico que é o coeficiente angular da equação. O LOD pode ser obtido de acordo com a Equação 1.

$$LOD = 3 X \frac{s}{S} \quad \text{Equação 1}$$

s: estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica

S: coeficiente angular da equação da reta da curva analítica

Outra forma de determinação do LOD está em função das medidas dos brancos da amostra que pode ser verificada na Equação 2.

$$LOD = y_B + 3s_B \quad \text{Equação 2}$$

y_B: valor médio do sinal dos brancos da amostra

s_B: estimativa do desvio padrão dos brancos da amostra

A forma mais comum, na prática, para determinar o LOD é através da determinação da razão sinal/ruído, na qual se deve injetar concentrações decrescentes dos analitos até obter uma razão sinal/ruído > 3.

Este é um parâmetro muito importante que deve ser avaliado no início do desenvolvimento de método, pois a partir dele o analista terá uma idéia da capacidade de detecção do equipamento e se as concentrações serão atingidas facilmente ou será necessário um preparo de amostra mais eficiente.

1.7.3. Limite de Quantificação (LOQ)

O LOQ é a menor concentração do analito na matriz que pode ser quantificada sob condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado da mesma forma que o limite de detecção, porém com razão sinal/ruído > 10 ou conforme as Equações 3 e 4.

$$LOQ = 10 X \frac{s}{S} \quad \text{Equação 3}$$

$$LOQ = y_B + 10s_B \quad \text{Equação 4}$$

No desenvolvimento de um método de análise de resíduos de agrotóxicos, este parâmetro deve ter valor menor que o LMR estabelecido para cada agrotóxico selecionado. A forma mais comum, experimentalmente, para determinar o LOQ é através da determinação da razão sinal/ruído, na qual se deve injetar concentrações decrescentes dos analitos até que esta razão sinal/ruído seja > 10. Segundo recomendações do guia Sanco, o limite de quantificação também deve ter valor na média das replicatas de recuperações (70-120) % e CV menor que 20%.

1.7.4. Linearidade

A linearidade é obtida pela resposta do sinal do detector em função da concentração do analito, sendo que, a faixa linear é definida como o intervalo no qual a sensibilidade pode ser considerada constante ou a resposta do detector é diretamente proporcional à concentração. Esta faixa abrange no nível inferior o LOQ e no nível superior a concentração que depende da resposta do detector em função da sensibilidade do analito, ou seja, maior concentração que se relaciona de forma linear com o sinal do analito registrado pelo detector. A faixa linear deve englobar, sempre que possível, as concentrações das amostras analisadas no seu centro. A curva analítica pode ser representada pela Equação 5:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 5}$$

y: resposta ou sinal analítico

x: concentração

a: coeficiente angular

b: coeficiente linear

A curva analítica pode ser preparada de três formas diferentes, padrões dissolvidos em solventes puros ou por superposição de matriz “*matrix-matched calibration*” que é a fortificação ou adição dos padrões dos analitos em estudo em concentrações variadas. Esta fortificação pode ser realizada antes (adição no branco da amostra) ou depois (adição no extrato final) do preparo de amostra. As três formas de preparar uma curva analítica podem ser visualizadas na Figura 2:

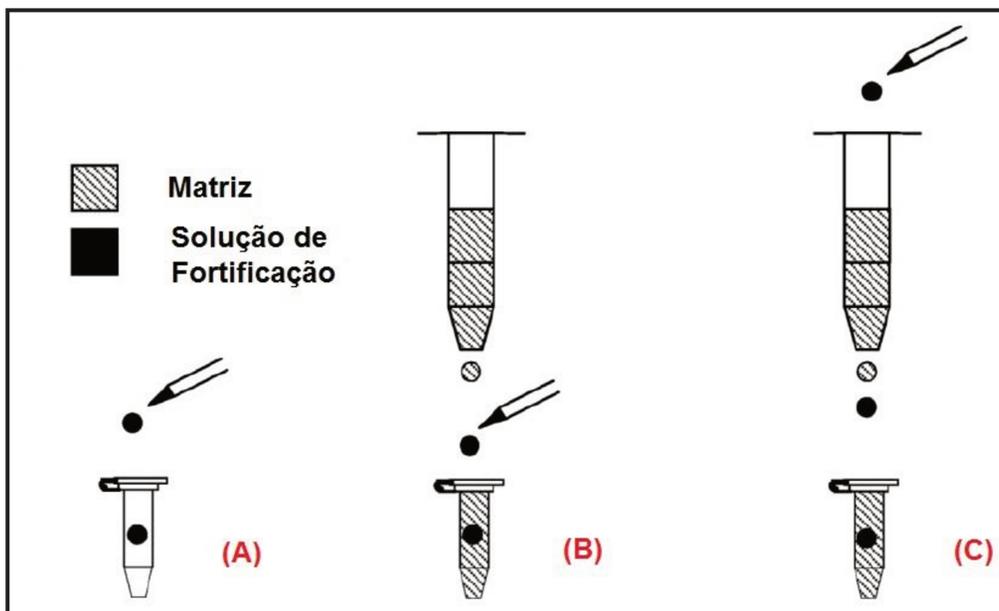


Figura 2: Maneiras de preparar a curva analítica: (A) Solvente puro; (B) Fortificação no extrato final e (C) Fortificação no branco da amostra. Adaptado de *Trufelli* 2011.¹¹⁴

A seleção da forma de preparo da curva analítica baseia-se na avaliação da presença ou ausência do efeito matriz (*Matrix Effect* - ME), que é gerado pelas interações entre o analito e os coextrativos da matriz. A grande maioria das amostras apresenta efeito matriz oriundo da presença do grande número de interferentes na sua composição e da concentração baixa dos resíduos de agrotóxicos. O ME pode ser avaliado pela razão da resposta analítica do extrato final da amostra, que foi fortificado com a solução dos agrotóxicos, pela solução dos padrões em solvente, na mesma concentração. O ME pode ser calculado pela Equação 6:

$$ME (\%) = \frac{\text{área (fortificação extrato final)}}{\text{área (padrão em solvente)}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em uma análise de multirresíduos é importante avaliar este parâmetro, porque comportamentos diversificados podem ser observados, uma vez que, os agrotóxicos podem apresentar nenhum, pouco ou grande efeito matriz, dependendo da característica físico-química. Após a seleção do preparo da curva analítica, deve-se

escolher, conforme o tipo de amostra ou analitos que serão analisados, o procedimento de quantificação dos analitos para assegurar maior confiança nos resultados analíticos. Eles podem ser quantificados por padronização externa, padronização interna ou adição de padrão.

A padronização externa é um dos procedimentos mais utilizados nas análises de resíduos de agrotóxicos por ser mais simples, rápido e barato e envolver apenas a relação proporcional do sinal do detector pela concentração do analito.

A padronização interna envolve a adição de um padrão interno, em concentração constante, nos padrões e nas amostras, e a construção da curva analítica é representada pela razão do sinal analítico do analito pelo padrão interno em função das concentrações do analito. A utilização deste padrão tem a função de corrigir ou verificar erros durante o preparo de amostra e variações no cromatógrafo que representam fatores que podem passar despercebidos na etapa experimental. A grande limitação deste tipo de padronização é que o padrão interno deve ter comportamento semelhante ao analito como, solubilidade, alta pureza, tempo de retenção aproximado, baixo custo, estabilidade e não deve estar presente na amostra. Porém, em análises de multirresíduos torna-se mais problemático empregar padrão interno, porque existem vários analitos de diferentes características físico-químicas e, conseqüentemente, deve-se adicionar vários padrões internos para contemplar as diversidades dos grupos químicos dos agrotóxicos. Em análises por detecção por espectrometria de massas, preferencialmente, devem ser utilizados padrões internos deuterados que têm comportamento muito semelhante aos analitos, porém são de custos elevados para serem aplicados em análises de rotina e tornam difícil sua aplicação nas análises de multirresíduos de agrotóxicos.

A padronização por adição de padrão é utilizada nos casos em que não existem brancos da matriz. Nestes casos, adicionam-se concentrações crescentes de padrões de analitos na matriz para construção da curva analítica. A concentração do analito na matriz é obtida pela intersecção da reta no eixo da abcissa (concentração analítica), ou seja, onde a resposta do sinal analítico é nula.

O número e as replicatas dos níveis de concentração para a construção da curva analítica dependem do guia utilizado, dos valores de LMR e das concentrações das

amostras a serem analisadas, mas normalmente deve ser construída uma curva com mais de cinco níveis de concentração. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.

Pelos dados da regressão linear deve-se avaliar, primeiramente, o coeficiente de correlação (r) e a seguir os valores de resíduos, que representam os desvios verticais da reta ajustada pelo método dos mínimos quadrados e permitem avaliar a qualidade de linearidade da curva. Segundo recomendações do guia Sanco, os resíduos das replicatas dos níveis de concentrações injetados devem ser menores que $\pm 20\%$ e os níveis sugeridos podem variar de 1-10 vezes o LOQ ou LMR de cada analito.

1.7.5. Precisão

A precisão descreve o grau de concordância ou dispersão entre os resultados obtidos de uma mesma amostra em condições definidas. A precisão pode ser avaliada em termos de repetitividade ou repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, e deve ser expressa como estimativa do desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation* - RSD) ou coeficiente de variação (*Coefficient of Variation* - CV). O desvio padrão e o CV podem ser obtidos utilizando-se as Equações 7 e 8, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \text{Equação 7}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

X_i : valor individual

n : número de medições

\bar{X} : média aritmética

s : estimativa do desvio padrão

A repetitividade é determinada pela avaliação das injeções realizadas nas mesmas condições experimentais (preparo de amostra, analista, equipamento, laboratório) dentro de um curto intervalo de tempo, em medições sucessivas.

A precisão intermediária é avaliada por injeções realizadas pelo mesmo preparo de amostra, no mesmo laboratório, mas pelo menos um fator deve ser variado (analista, equipamento ou tempo), sendo que, dias diferentes é a mudança mais comum para analisar a variação deste parâmetro.

A reprodutibilidade corresponde a precisão interlaboratorial, na qual se realizam as análises em laboratórios diferentes, como estudos colaborativos que têm como objetivo a padronização de procedimentos analíticos ou a verificação do desempenho dos métodos por comparação dos resultados entre os laboratórios.

Os parâmetros mais comuns para serem avaliados em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são a repetitividade e a precisão intermediária. Segundo recomendações do guia Sanco, a precisão deve ser expressa pelos valores de CV, cujos valores devem ser $\leq 20\%$, e estes podem ser obtidos pela média de um mínimo de cinco replicatas, em dois níveis de concentrações diferentes.

1.7.6. Exatidão

A exatidão representa a concordância entre os resultados de um ensaio e o valor de referência que é aceito convencionalmente como verdadeiro. Esse parâmetro pode ser avaliado por diferentes formas como, comparação do valor obtido com o valor de uma amostra certificada, de concentração conhecida ou material de referência padrão; comparação com os resultados obtidos por outro métodos analíticos de referência e pelo parâmetro da recuperação, que pode ser estimado pela comparação entre as intensidades dos sinais analíticos em amostras adicionadas de soluções de padrões, também conhecida como fortificação ou "*spiking*", antes e após o preparo da amostra ou pode ser realizado pela determinação da concentração da amostra fortificada antes do preparo de amostra pela equação da reta construída com o extrato final da amostra.

A recuperação pode ser calculada utilizando-se a Equação 9.

$$R (\%) = \frac{\text{área (fortificação branco da matriz)}}{\text{área (fortificação extrato final)}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

No método de multirresíduos a forma mais comum para avaliar a exatidão, e um dos parâmetros iniciais determinados no desenvolvimento do método, é a recuperação R (%). Segundo recomendações do guia Sanco, os valores de recuperação devem estar na faixa de (70-120)% e $CV \leq 20\%$, em cada nível de fortificação. Recomenda-se que a recuperação seja calculada em pelo menos dois níveis de fortificação, podendo ser no LOQ e em outro nível maior de concentração, que poderá ser uma concentração do LMR ou próxima deste valor, e nos casos nos quais se usam dois níveis de concentração devem ser feitas no mínimo cinco replicatas em cada nível.

O objetivo final da validação é provar que os métodos analíticos desenvolvidos são seletivos, precisos, exatos, confiáveis, adequados e comparáveis a sua aplicação. Os dados experimentais relevantes no desenvolvimento do método analítico, como os resultados da etapa de validação, devem ser registrados, documentados e arquivados para a possibilidade de rastreabilidade do estudo quando este for solicitado.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização e validação de método para análise de multirresíduos de agrotóxicos aplicados em morango, empregando o método QuEChERS no preparo de amostra e determinação analítica por LC-MS/MS. Para desenvolver e validar o método foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar os agrotóxicos a serem avaliados;
- Realizar a otimização espectrométrica e cromatográfica;
- Otimizar o preparo de amostra avaliando as versões diferentes do método QuEChERS, os solventes de extração, a massa do agente secante e os sorventes utilizados na etapa de d-SPE para o *clean-up* da amostra;
- Avaliar o emprego de diferentes sorventes em função, principalmente, dos valores de recuperação e também de outros parâmetros que estimam a eficiência do *clean-up* como, coloração do extrato final, quantidade de coextratos da matriz, obtida por medidas gravimétricas, e efeito matriz;
- Validar o método por meio da determinação dos parâmetros analíticos de seletividade, detectabilidade (LOD e LOQ), curva analítica, precisão e exatidão (recuperação);
- Analisar amostras de morango adquiridas no comércio.

O método estabelecido para a LC-MS/MS foi transferido para a UHPLC-MS/MS, a fim de comparar o desempenho destas duas técnicas analíticas em relação ao tempo de corrida analítica, vazão de MP, volume de injeção de amostra e de MP e detectabilidade dos analitos.

Também foi realizado um estudo, ANEXO, para comparar a extração em fase sólida dispersiva a temperatura ambiente e baixa com extração em cartucho, empregando em ambos os casos o sorvente PSA para o *clean-up* de extratos de morango, usando o método QuEChERS modificado e determinação por UHPLC-DAD.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Os reagentes e os solventes utilizados no preparo de amostra, preparo dos sorventes e nas análises cromatográficas foram de grau analítico e grau HPLC, respectivamente. Acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, metanol, n-hexano e n-pentano foram obtidos da *Tedia (California, USA)*, acetona e acetato de etila da *Mallinckrodt Chemicals (New Jersey, USA)*, tolueno da *J.T. Baker (Mexico State, Mexico)*, ácido fórmico foi adquirido da *Synth (São Paulo, Brasil)*, ácido acético glacial da *Mallinckrodt ChromAR HPLC (Kentucky, USA)*, acetato de sódio da *Dyne Prod. Quim. Ind. e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil)*, sulfato de magnésio anidro da *Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)*, citrato de sódio tribásico diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquidratado da *Sigma-Aldrich (Missouri, USA)*, cloreto de sódio da *Ecibra (São Paulo, Brasil)* e Bondesil PSA (40 μm) da *Varian (California, USA)*. A água ultrapura foi obtida no sistema *Milli-Q Plus system* da *Millipore (Massachusetts, USA)* com 18,2 M Ω cm de resistividade e foi usada para preparar todas as soluções e as MP.

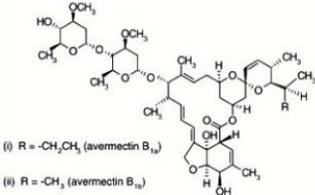
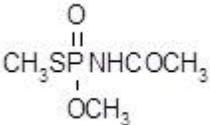
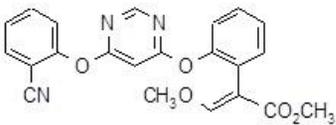
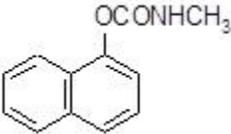
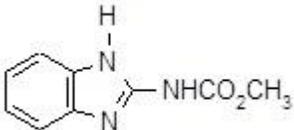
No preparo dos sorventes utilizados na etapa de d-SPE, como suporte foi utilizada a sílica gel de tamanho da partícula de 0,035–0,070 mm, com 60 Å de tamanho de poro, da *Acros Organic (New Jersey, USA)*. Os polímeros utilizados foram *poly(methyloctadecylsiloxane)*, *poly(methyloctylsiloxane)* e *aminopropyl terminated poly(dimethylsiloxane)* da *United Chemical Technologies (Pennsylvania, USA)* e o copolímero de (52-48%)*dimethyl*-(48-52%)*methylphenyl-siloxane* da *Aldrich (Missouri, USA)*. Estes sorventes serão representados, respectivamente, por C18, C8, amino e fenil.

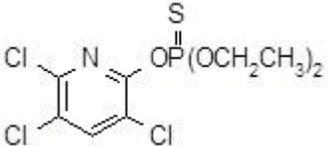
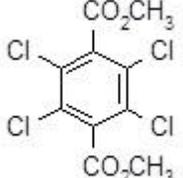
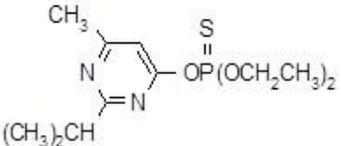
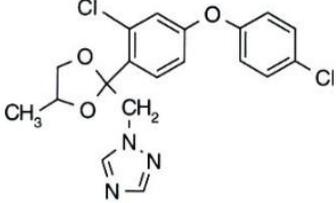
Os agrotóxicos empregados neste trabalho foram selecionados por constarem nas listas dos órgãos reguladores nacionais e/ou internacionais e apresentarem valores de LMR definidos para cultura do morango. Também foram selecionados alguns agrotóxicos não autorizados mas que constam nas listas dos dados divulgados pelo PARA.⁶⁵ Os grupos químicos organofosforado, piretróide e benzimidazol lideram a lista

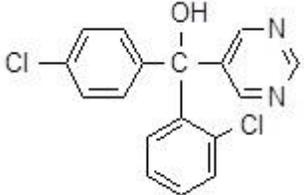
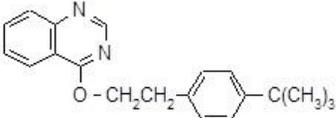
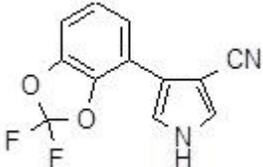
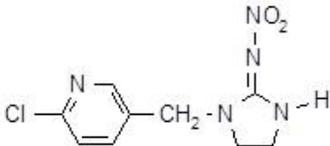
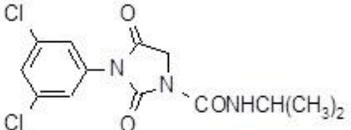
de agrotóxicos detectados em amostras insatisfatórias.⁶⁶ Ainda como critério, tentou-se abranger o máximo possível de classes químicas diferentes como: avermectina, benzimidazol, benzoiluréia, carbamato, dicarboximida, neonicotinóide, organofosforado, triazina, triazol e outras. Os agrotóxicos selecionados foram adquiridos das seguintes empresas *Chem Service (Pennsylvania, USA)*, *Dr. Ehrenstorfen GmbH (Bavaria, Germany)*, *Fluka Analytical* ou *Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Gallen, Switzerland)* e *Pestanal*[®] ou *Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Lower Saxony, Germany)*, todos com pureza maior que 97%. Os compostos usados como padrões de controle ou *surrogate* do método analítico foram atrazina, da *Chem Service*, e trifetil fosfato (TTP), da *Sigma-Aldrich*.

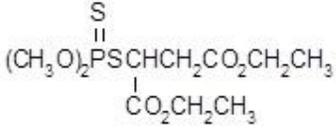
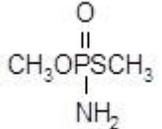
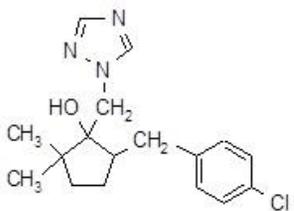
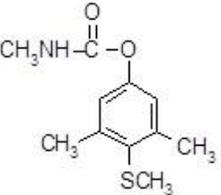
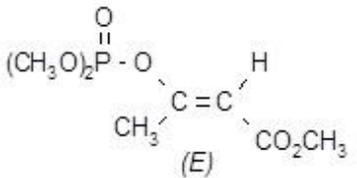
Na Tabela 3 encontram-se as características físico-químicas como, coeficiente de partição (*Kow*), estrutura molecular, grupo químico, classe, classificação toxicológica e LMR dos agrotóxicos estudados neste trabalho. Alguns parâmetros foram disponibilizados pela Anvisa, por meio das monografias da avaliação e reavaliação toxicológica dos ingredientes ativos destinados ao uso agrícola, domissanitário, não agrícola, ambientes aquáticos e preservante de madeira.¹⁵³ Os valores de LMR estabelecidos pelas agências reguladoras, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *CODEX Alimentarius* e União Européia (EU), apresentam grandes diversidades de valores, assim como também não há concordância entre os agrotóxicos que são ou não autorizados para utilizar em morango.^{61, 65, 154} Os valores de LMR foram utilizados para estabelecer os valores de concentração a serem estudados neste trabalho, sendo que, o objetivo primordial é atingir valores inferiores aos LMR estabelecidos.

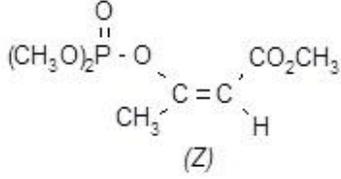
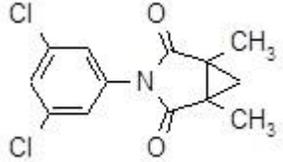
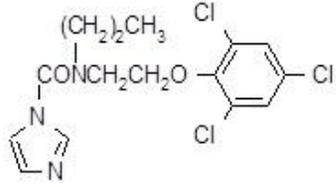
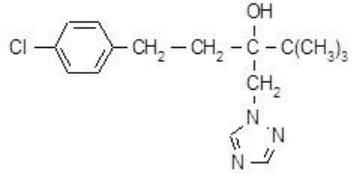
Tabela 3: Características físico-químicas e LMR dos agrotóxicos empregados na cultura do morango.

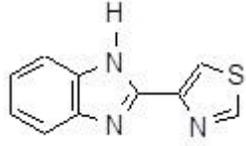
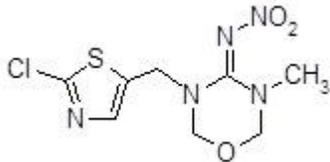
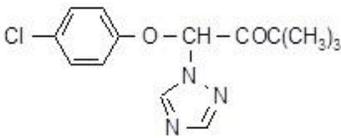
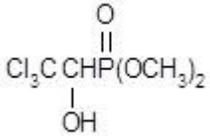
Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(1) Abamectina (4,4)	 <p>(i) R = -CH₂CH₃ (avermectin B_{1a}) (ii) R = -CH₃ (avermectin B_{1a})</p>	avermectina	acaricida inseticida nematicida	I	0,02	0,02	0,1
(2) Acefato (-0,89)		organofosforado	inseticida acaricida	III	NA	-----	-----
(3) Azoxistrobina (2,5)		estrobilurina	fungicida	III	0,3	10,0	10,0
(4) Carbaril (1,85)		metilcarbamato de naftila	inseticida	II	NA	-----	-----
(5) Carbendazim (1,38)		benzimidazol	fungicida	III	0,5	-----	-----

Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(6) Clorpirifós (4,7)		organofosforado	inseticida formicida acaricida	II	NA	0,3	0,2
(7) Clortal-dimetílico (4,28)		ácido benzenodicarboxílico subst.	herbicida	III	NA	-----	-----
(8) Diazinona (3,3)		organofosforado	inseticida acaricida	II	NA	0,1	-----
(9) Difeconazol (4,2)		triazol	fungicida	I	0,5	-----	0,4
(10) Diflubenzurom (3,89)		benzoiluréia	inseticida acaricida	IV	NA	-----	2,0

Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(11) Fenarimol (3,69)		pirimidinil carbinol	fungicida	III	NA	1,0	0,3
(12) Fenazaquin (5,51)		quinazolina	acaricida	ND	NA	-----	1,0
(13) Fludioxonil (4,12)		fenilpirrol	fungicida	III	-----	3,0	3,0
(14) Imidacloprido (0,57)		neonicotinóide	inseticida	III	NA	0,5	0,5
(15) Iprodiona (3,0)		dicarboximida	fungicida	IV	2,0	10	15,0

Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(16) Malationa (2,75)		organofosforado	inseticida acaricida	III	1,0	1,0	1,0
(17) Metamidofós (-0,8)		organofosforado	inseticida acaricida	ND	NA	-----	-----
(18) Metconazol (3,85)		triazol	fungicida	I	0,1	-----	-----
(19) Metiocarbe (3,08)		metilcarbamato de fenila	inseticida	II	NA	1,0	1,0
(20) Mevinfos (E) (0,127)		organofosforado	inseticida acaricida	I	1,0	-----	-----

Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(21) Mevinfos (Z) (0,127)		organofosforado	inseticida acaricida	I	1,0	-----	-----
(22) Procimidona (3,14)		dicarboximida	fungicida	IV	3,0	10,0	-----
(23) Procloraz (4,12)		imidazolil- carboxamida	fungicida	I	NA	-----	-----
(24) Simazina (2,1)		triazina	herbicida	III	NA	-----	-----
(25) Tebuconazol (3,7)		triazol	fungicida	IV	0,1	-----	-----

Agrotóxicos (Kow)	Estrutura Molecular	Grupo Químico	Classe	Classif. Toxic.	ANVISA (mg kg ⁻¹)	Codex (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
(26) Tiabendazol (2,39)		benzimidazol	fungicida	IV	NA	-----	-----
(27) Tiametoxam (-0,13)		neonicotinóide	inseticida	III	0,1	-----	0,5
(28) Triadimefom (3,11)		triazol	fungicida	III	NA	0,7	0,5
(29) Triclorfom (0,43)		organofosforado	inseticida acaricida	ND	NA	-----	-----

NA: não autorizado

Classificação Toxicológica: Classe I (extremamente tóxico); Classe II (altamente tóxico); Classe III (medianamente tóxico); Classe IV (pouco tóxico);

ND: não disponível

3.2. Equipamentos

Nas análises cromatográficas foram utilizados dois sistemas: cromatógrafo a líquido *Alliance 2695* e UPLC *Acquity*, acoplados ao espectrômetro de massas, *Micromass Quatro Micro*™ API, com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por *Electrospray* (ESI), todos da *Waters (Manchester, UK)*. O sistema de aquisição de dados foi o *software MassLynx 4.1*. As colunas cromatográficas para o sistema LC foram *Nova-Pak*® C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula) precedida da coluna de guarda C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm diâmetro de partícula) e para o UPLC foram *Acquity UPLC*® BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula) precedida da coluna de guarda *Van Guard*™ BEH C18 (5 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm diâmetro de partícula), todas da *Waters*.

Os equipamentos e materiais utilizados foram: agitador magnético, *Fisatom*, modelo 752A; agitador Vórtex, *Phoenix*, modelo AP 56; analisador elementar, *Perkin Elmer*, modelo 2400; balança analítica, *Sartorius*, modelo CP 225 D; balança analítica, *Fisher Scientific*, A-250; banho de ultrassom, *Thornton*, modelo T14; banho de ultrassom, *Thornton*, modelo T50; bomba de HPLC, *Waters*, 510; bomba de vácuo, *Millipore*; bomba de vácuo, WP, 6111560; bomba KNF *Laboport Neuberger* acoplada ao manifold *Supelco Visiprep*™ (12 amostras), centrífuga *Hettich*, modelo *Rotofix 32A*; estufa a vácuo, *Yamato*, *Vacuum Oven ADP-21*; estufa, EDG Equipamentos, 10 P-S; estufa, *Soc Fabbe LTDA*; micropipetas de (0,5-10 ; 10-100 ; 100-1000 ; 500-5000) µL , *Eppendorf Research*; pH metro, *Metrohm*, 827 pH Lab; sistema de deionização de água, *Milli-Q-Plus*, *Millipore*.

3.3. Preparo das soluções dos agrotóxicos

A solução estoque de cada agrotóxico foi preparada em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹, exceto para o carbendazim e a simazina que foram de 0,2 mg mL⁻¹, devido as suas baixas solubilidades neste solvente. Neste preparo foi considerado a pureza analítica de cada agrotóxico analisado. A partir da solução estoque foram realizadas diluições adequadas para preparar as soluções de trabalho.

Estas soluções consistiram de uma mistura de todos os agrotóxicos em metanol e foram utilizadas na fortificação dos brancos da amostra para obtenção dos parâmetros analíticos de validação. As soluções foram estocadas em freezer a -20 °C, sendo que as soluções estoque foram armazenadas por até quatro meses e as soluções de trabalho foram preparadas semanalmente.

3.4. Processamento de amostras de morango

Os brancos da amostra de morango, empregados no desenvolvimento e validação do método, foram obtidos em um estabelecimento comercial da cidade de Campinas-SP, especializado em produtos orgânicos.

Os morangos foram lavados em água corrente, secos à temperatura ambiente em peneiras para escorrer a água de lavagem e foram processados utilizando-se um liquidificador de uso doméstico. Em seguida, foram acondicionados em frascos de vidro que foram tampados e mantidos em freezer, a cerca de -20°C, até o momento de utilização no preparo de amostra. Antes de ser utilizado, o morango foi mantido no frasco sobre uma bancada do laboratório até atingir a temperatura ambiente.

3.5. Versões do método QuEChERS

O desenvolvimento do método de preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e laboriosas na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Para selecionar o método de preparo de amostra foram testadas as três versões do método QuEChERS: ^{103,104,105}

- Original;
- AOAC;
- CEN 15662.

Também foi testada a CEN 15662 modificada, na qual o extrato final foi acidificado com ácido fórmico. A acidificação tem como finalidade proporcionar maior estabilidade para os agrotóxicos que são sensíveis ou degradam em valores de pH mais altos, sendo que, deve-se considerar na etapa de *clean-up* com a utilização do

solvente PSA, ocorre um aumento no pH da solução da amostra.^{103, 155} Para avaliação dos métodos foram utilizadas concentrações dos agrotóxicos de 10 e 100 ng g⁻¹, que foram adicionadas em amostras de morango, segundo o procedimento geral mostrado na Figura 3.

A versão do método QuEChERS mais adequada foi selecionada para extração de multirresíduos de agrotóxicos em morango e empregada nos experimentos posteriores. A fortificação dos brancos da amostra, com os padrões analíticos, foi feita no início da primeira etapa experimental.

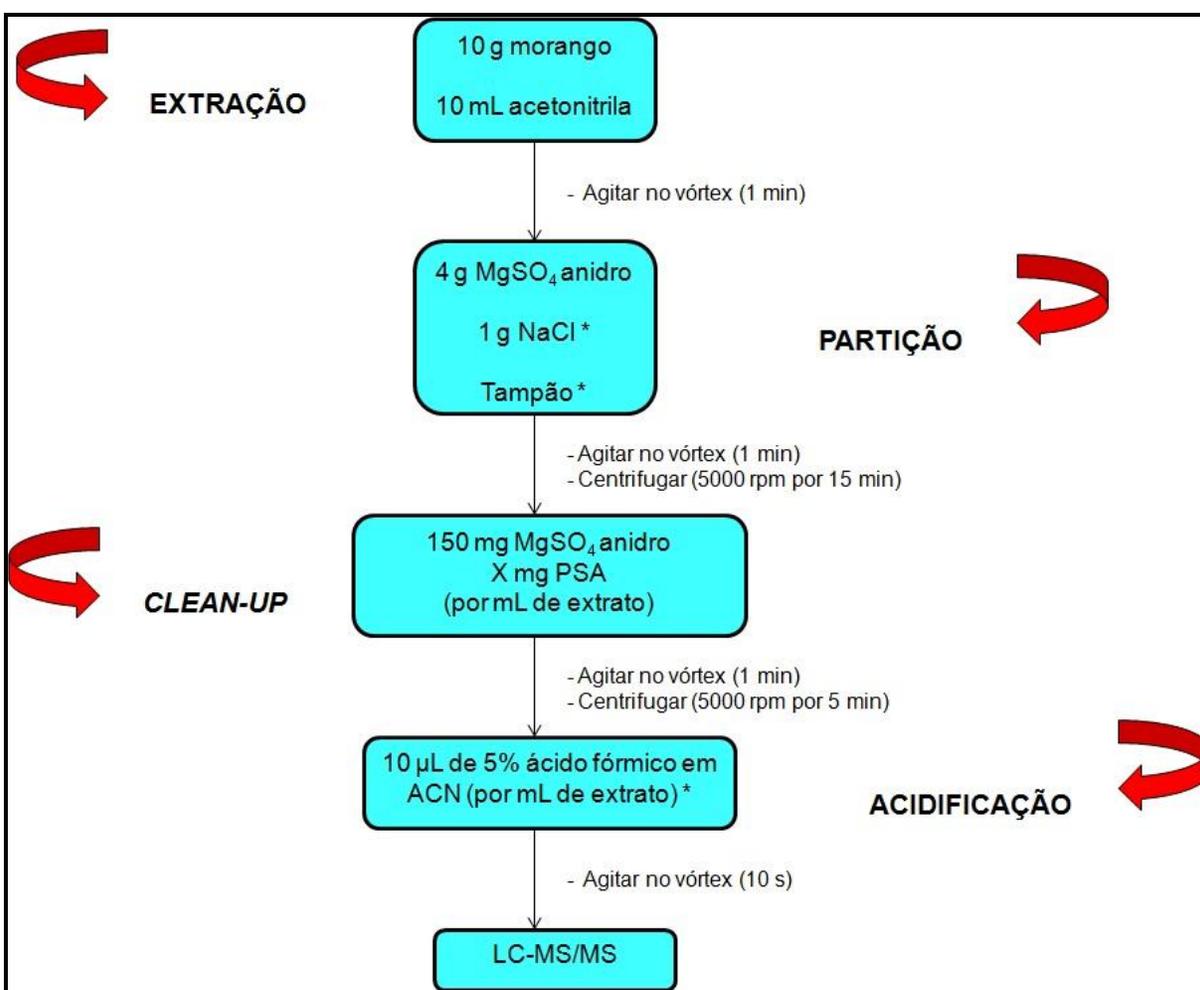


Figura 3: Fluxograma geral do QuEChERS empregado nas análises de morango.

* Emprego alternativo dependendo da versão utilizada de método QuEChERS

3.5.1. Seleção dos solventes de extração

A escolha do solvente de extração representa um dos pontos fundamentais no procedimento de preparo de amostra, porque ele exerce influência na recuperação dos agrotóxicos, na seletividade, no *clean-up*, no custo final em função do tipo e volume do solvente, e no impacto ambiental gerado pela quantidade de resíduos produzida e/ou a toxicidade dos solventes, como os clorados que devem ser evitados, uma vez que são considerados prejudiciais à preservação do meio ambiente.^{76, 156}

Os solventes avaliados foram o acetato de etila, a acetona e a acetonitrila que são os mais utilizados na etapa de extração de agrotóxicos de alimentos no método QuEChERS.

3.5.2. Influência da massa de sulfato de magnésio no método de preparo de amostra

O sulfato de magnésio ($MgSO_4$) é um agente secante que tem a função de remover a água residual da fase orgânica, sendo que, a matriz morango tem na sua composição mais de 90% de água. Avaliaram-se por meio das porcentagens de recuperação dos agrotóxicos, as diferentes massas de $MgSO_4$ de 4, 6 e 8 g por 10 g de morango utilizado na etapa inicial do preparo de amostra.

3.5.3. Preparo dos sorventes utilizados na d-SPE para *clean-up*

Visando selecionar um sorvente que proporcionasse extratos mais limpos e altas recuperações dos agrotóxicos estudados, testaram-se o sorvente PSA comercial já bem estabelecido e quatro sorventes de características químicas diversificadas como, C18, C8, amino e fenil, preparados no laboratório.

O preparo dos sorventes consistiu, fundamentalmente, na sorção física do polímero na superfície e nos poros do suporte de sílica, seguido pelo processo de imobilização térmica, que fixa melhor o polímero e deixa mais estável o sorvente

preparado. As etapas experimentais simplificadas empregadas no preparo dos sorventes foram:

- Ativação da sílica a 150 °C por um período de 24 horas;
- Preparo da mistura: quantidades apropriadas de polímero dissolvido em solvente orgânico, como n-pentano para C18 e amino, diclorometano para C8 e clorofórmio para fenil, foram adicionadas à sílica;
- Sonicação da mistura por 10 minutos no ultrassom, posteriormente, agitação por 3 horas no agitador magnético à temperatura ambiente;
- Sorção do polímero sobre o suporte: a mistura sílica-polímero depois de agitada foi deixada em repouso por vários dias, na capela com exaustão, para evaporação do solvente, resultando em uma fase sorvida;
- Imobilização térmica: após a sorção do polímero no suporte, o sorvente sorvido foi colocado em estufa e submetido ao processo de imobilização por tratamento térmico à 120 °C por 4 horas para C18 e amino, 120 °C por 8 horas para C8 e 150 °C por 4,5 horas para fenil;
- Extração do excesso de polímero: o polímero não imobilizado no suporte foi extraído, utilizando-se um tubo de aço inoxidável que foi preenchido com sorvente imobilizado e, posteriormente, conectado a uma bomba cromatográfica passando uma vazão de 1 mL min⁻¹ de solvente orgânico, escolhido de acordo com a metodologia de preparo, por 2 horas. Para C18 e amino utilizou-se n-hexano seguido por metanol, para C8 utilizou-se n-hexano à 50 °C e para fenil utilizou-se clorofórmio seguido por metanol. Após esse procedimento, o sorvente foi colocado na capela com exaustão para evaporação do solvente, obtendo-se o sorvente imobilizado para ser utilizado na etapa de *clean-up* das amostras.

No preparo dos sorventes C18 e amino, empregaram-se uma carga de polímero de 40% (m/m) e os procedimentos descritos por Melo *et al.*^{157, 158} Esses polímeros foram imobilizados termicamente sob atmosfera de ar.

No preparo do sorvente C8, a carga de polímero foi de 35% (m/m), seguiu o procedimento descrito por Vigna *et al.*¹⁵⁹ e a imobilização térmica foi feita sob fluxo de nitrogênio (atmosfera inerte).

No preparo do sorvente fenil, a carga de polímero foi de 50% (m/m), seguiu o procedimento descrito por Jardim *et al.* ¹⁶⁰ e a imobilização térmica foi feita sob atmosfera de ar.

Na Figura 4 podem ser visualizadas as estruturas moleculares dos sorventes utilizados na etapa de *clean-up* da extração de resíduos de agrotóxicos em morango pelo método QuEChERS.

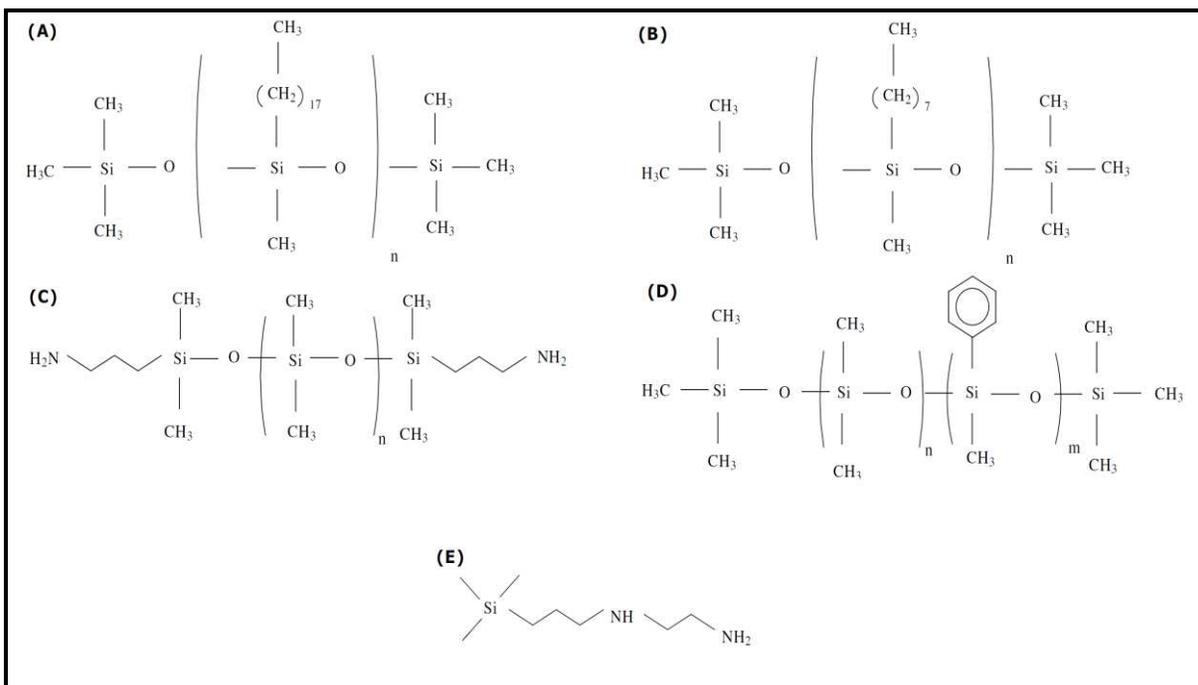


Figura 4: Estruturas moleculares dos sorventes (A) C18, (B) C8, (C) Amino, (D) Fenil e (E) PSA ligada a sílica utilizados na etapa de *clean-up* na extração de agrotóxicos em morango.

Na Figura 5 está apresentado um fluxograma do preparo dos sorventes utilizados na etapa d-SPE para o *clean-up* de amostras de morango.

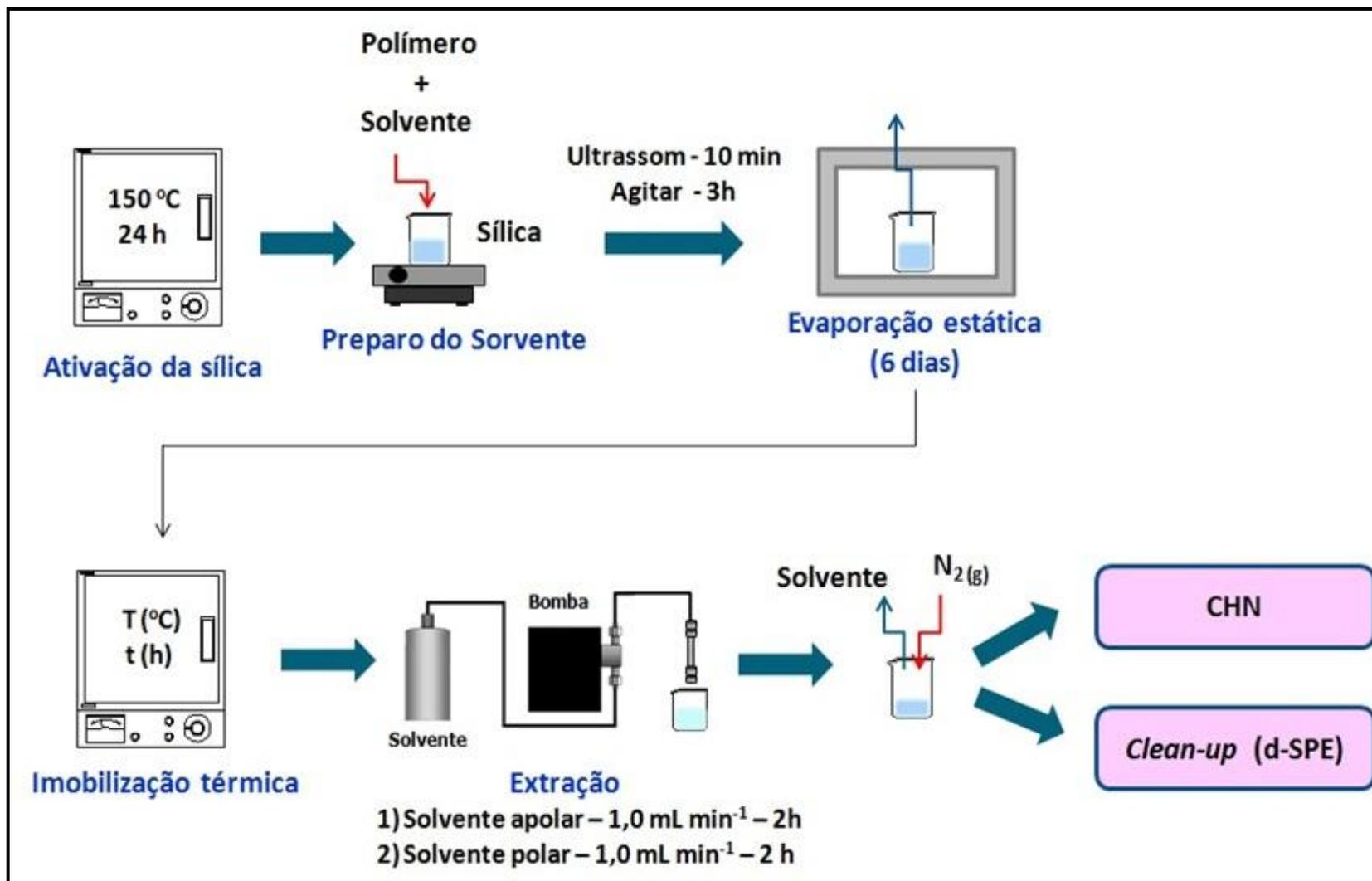


Figura 5: Preparo dos sorventes utilizados na etapa de d-SPE. Adaptado de M.P. Segato, 2010. ¹⁶¹

3.5.3.1. Caracterização dos sorventes por CHN

Os sorventes preparados e o comercial foram caracterizados quimicamente por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), utilizando o método de combustão para converter os elementos da amostra em gases simples como CO₂, H₂O e N₂. A amostra foi primeiramente oxidada em uma atmosfera de oxigênio, e os gases resultantes foram homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume e, então, despressurizados através de uma coluna, separados, detectados em função de suas condutividades térmicas e convertidos em % C, % H e % N na amostra. (*User's Manual Elemental Analysis, Perkin Elmer, Norwalk, 1996*)

Os sorventes foram submetidos à análise elementar para caracterização química das porcentagens de carbono e nitrogênio. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.5.4. Avaliação dos sorventes no método de preparo de amostra

O sorvente utilizado na etapa de *clean-up* tem influência em diversos parâmetros como, recuperação, seletividade e efeito matriz que influenciam tanto o desempenho do sistema cromatográfico como o de detecção.

Antes de avaliar os parâmetros de eficiência do *clean-up*, realizou-se um estudo preliminar empregando diferentes massas do sorvente PSA, 25 e 50 mg por mL de extrato de morango, para verificar a quantidade que proporcionaria melhor recuperação dos analitos.

À partir destes resultados, o desempenho dos sorventes foi avaliado pela comparação do grau de limpeza dos extratos obtidos das amostras de morango fortificadas com 100 ng g⁻¹ dos agrotóxicos estudados, segundo alguns critérios apresentados abaixo para poder selecionar o sorvente mais adequado. ^{104, 110, 114, 162}

3.5.4.1. Aspecto físico do extrato final

A avaliação visual da cor, intensidade e transparência do extrato final são características que estão relacionadas com a presença de coextratos da matriz.

3.5.4.2. Recuperação

A recuperação da extração foi determinada por comparação da resposta analítica das amostras fortificadas com os agrotóxicos estudados, em concentração de 100 ng g^{-1} , antes e depois do preparo de amostra usando o método QuEChERS.

3.5.4.3. Medidas gravimétricas dos interferentes da matriz

Os extratos das amostras foram divididos em duas partes, extrato sem *clean-up* e o extrato com *clean-up*, e posteriormente, o solvente foi evaporado, os resíduos pesados e calculou-se a porcentagem de interferentes (%) que permaneceram após a etapa de d-SPE para a limpeza dos extratos de morango.^{162, 163} Pela avaliação das massas pode-se estimar a eficiência dos sorventes na etapa de d-SPE.

3.5.4.4. Efeito matriz

O efeito matriz é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector. Foi calculado pela razão da resposta analítica do extrato final da amostra, que foi fortificado com a solução dos agrotóxicos, pela solução dos padrões em solvente, na mesma concentração.^{164, 165}

3.6. Validação do método analítico

Definidas as condições cromatográficas de separação, detecção e o método de extração dos agrotóxicos estudados, foi realizada a validação do método analítico

desenvolvido por meio da determinação dos parâmetros analíticos descritos na seção (1.7.). Para avaliar variações foram utilizados dois padrões de controle no método de preparo na versão QuEChERS CEN 15662 modificada, sendo que, para o controle nas etapas de extração/limpeza foi utilizada a atrazina que foi adicionada no branco da amostra (início do preparo de amostra) e para o controle instrumental foi utilizado o TPP que foi adicionado no extrato final da amostra (fim do preparo de amostra). Pela análise dos valores de intensidade do sinal analítico destes padrões, tanto nos padrões da curva analítica como nas amostras analisadas, pode-se ter um controle se houveram variações significativas durante as análises por meio da avaliação dos valores das áreas de cada replicata das injeções.

3.6.1. Seletividade

A seletividade do método foi determinada para algumas amostras de morango orgânico, consideradas brancos da amostra que foram injetadas para monitorar, através das janelas de aquisição, os cromatogramas de íon total (*Total Ion Chromatogram - TIC*). Esse monitoramento foi realizado para verificar se nos tempos de retenção correspondentes aos agrotóxicos estudados havia a coeluição de interferentes da matriz, o que indicaria falta de seletividade.

3.6.2. LOD e LOQ

Para determinar o LOD e LOQ foram feitas injeções de concentrações decrescentes dos analitos até que a razão sinal/ruído atingisse valores maiores que os solicitados, de 3 e 10, respectivamente.

3.6.3. Curva analítica

A curva analítica foi preparada de três formas diferentes, padrões em solventes puros ou por superposição de matriz "*matrix-matched calibration*" que consiste na fortificação ou adição dos padrões, em concentrações variadas, nos brancos da

amostra que pode ser realizado antes (adição na amostra) ou depois (adição no extrato final) do preparo de amostra, com a finalidade de avaliar a forma mais adequada para este estudo envolvendo morangos fortificados com agrotóxicos. O preparo das curvas pode ser visualizado na Figura 2. A curva analítica foi construída em oito níveis de concentrações (10 - 400) ng g⁻¹, com quantificação utilizando padronização externa com 3 replicatas em cada nível.

3.6.4. Exatidão (Recuperação)

A recuperação R (%) foi avaliada por meio da comparação do sinal analítico do detector de amostras fortificadas com os agrotóxicos estudados antes e após o método de preparo de amostra. Esse parâmetro foi obtido pelas injeções de cinco amostras, em três níveis de concentrações (10, 25 e 100) ng g⁻¹.

3.6.5. Precisão intra e inter

Esses parâmetros foram obtidos pela média de cinco injeções feitas em três níveis de concentrações (10, 25 e 100) ng g⁻¹, diariamente, a fim de obter a repetibilidade ou precisão intra e em dias diferentes para calcular a precisão intermediária.

3.7. Aplicação do método para análises de agrotóxicos em morangos

Depois da validação do método analítico, doze amostras de morango, sendo duas do tipo orgânica, adquiridas em supermercados e feiras da cidade de Campinas e região, foram analisadas para avaliar a presença de resíduos dos agrotóxicos estudados.

3.8. Transferência do método desenvolvido em HPLC para UHPLC

Com o objetivo de comparar as duas técnicas instrumentais, HPLC e UHPLC, em termos de tempo de corrida analítica, vazão da MP, volume de injeção de amostra e da MP e detectabilidade dos analitos, após a finalização dos estudos na LC, foi realizada a transferência do gradiente de eluição para separação cromatográfica da LC para UPLC, com auxílio do conversor *Acquity UPLC Columns Calculator* da empresa *Waters*.

Para obter as novas condições cromatográficas pelo emprego deste conversor, deve-se considerar os dados empregados na separação por LC como, comprimento, diâmetro e tamanho da partícula da coluna cromatográfica; vazão da MP; temperatura do forno e volume de injeção da amostra.

Na transferência de um método de separação, outros fatores também precisam ser otimizados como, o volume extra coluna e o tempo de residência do gradiente, que representa o tempo que a MP leva para percorrer o sistema cromatográfico desde a saída do misturador até o topo da coluna, para minimizar o alargamento do pico cromatográfico e obter a máxima eficiência da coluna.¹²¹ Para isto, certificou-se que as colunas recheadas com fase estacionária, de mesmo tipo C18, estavam sendo utilizadas nos dois equipamentos e como a eluição no método por HPLC foi por gradiente, se faz necessário verificar se o tempo de residência da MP poderá ser considerado desprezível, ou seja, a razão entre o tempo de residência da MP e o tempo de retardamento da MP permaneceu constante, a fim de que não houvessem variações nos tempos de retenção dos agrotóxicos, comprometendo a resolução, sobretudo dos primeiros analitos eluídos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação das condições cromatográficas e espectrométricas (LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS)

A primeira etapa no desenvolvimento de um método analítico empregando LC-MS/MS consiste na obtenção das condições otimizadas no espectrômetro de massas para os analitos selecionados. Com o objetivo de obter o íon precursor e dois íons produto para as transições de quantificação e confirmação de cada analito, foi realizada a infusão individual dos agrotóxicos no espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização por *Eletrospray* com modo de aquisição por varredura MRM. Na infusão foi realizado o bombeamento de soluções de agrotóxicos de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, na vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$, juntamente com a fase móvel metanol : ácido fórmico 0,1% (50 : 50 v:v) na vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Em seguida, os parâmetros foram ajustados a fim de obter maior eficiência de ionização ou maior intensidade dos agrotóxicos. As condições otimizadas de operação do MS/MS podem ser verificadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições otimizadas de operação do detector MS/MS

Parâmetros	Condição
Modo de ionização	+ / -
Capilar (kV)	3,50
Temperatura Fonte (°C)	130
Temperatura Dessolvatação (°C)	450
Vazão Cone (L h^{-1})	60
Vazão Dessolvatação (L h^{-1})	750
Voltagem do Cone (V)	f (agrotóxico)
Energia de Colisão (eV)	f (agrotóxico)
<i>Multiplier</i>	700
Pressão Gás Colisão (mbar)	$2,5 \times 10^{-3}$

Com os parâmetros do detector otimizados foram verificadas novamente as transições de quantificação e confirmação, que são recomendadas na análise de multirresíduos, para garantir uma determinação analítica mais segura. Além da presença destas transições, deve-se calcular a intensidade relativa que é obtida pela razão das intensidades dos íons de quantificação pelos íons de confirmação, sendo que, para ocorrer a integração do pico cromatográfico a fim de quantificar os analitos estudados, existe uma tolerância máxima permitida de variação em função da sua respectiva intensidade relativa. A tolerância máxima permitida em análises determinadas por LC-MS/MS estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Tolerâncias máximas permitidas para variação na intensidade relativa iônica determinadas por LC-MS/MS. Adaptação do guia Sanco. ¹³²

Intensidade Relativa (% do pico da base)	Tolerância Máxima (LC-MS/MS)
> 50 %	± 20 %
> 20 % a 50 %	± 25 %
> 10 % a 20 %	± 30 %
≤ 10%	± 50 %

Em uma análise por espectrometria de massas sequencial, as amostras analisadas podem apresentar as duas transições, quantificação e confirmação, mas caso a intensidade relativa iônica estiver fora da faixa de tolerância máxima permitida, não poderá ser feita a integração do pico cromatográfico, porque pode ser um indicativo da presença de interferentes que irão gerar resultados falso positivos. Portanto, uma determinação analítica de resíduos de agrotóxicos apenas pode ser realizada quando houver o cumprimento de todos parâmetros de identificação do analito como, tempo de retenção, presença das duas transições e razão de intensidade relativa das transições no intervalo de tolerância máxima.

Na Tabela 6 estão apresentados as transições iônicas, voltagem do cone e energia de colisão (CE) dos agrotóxicos utilizados neste trabalho.

Tabela 6: Parâmetros dos agrotóxicos analisados por LC-MS/MS.

Agrotóxico	Íon Precursor	Íons Produto	Cone (V)	CE (eV)
Abamectina	895,6	327,2 751,4	49	45 34
Acefato	184,0	124,5 142,6	15	17 8
Azoxistrobina	404,3	344,1 372,0	24	24 14
Carbaril	202,1	126,6 144,7	15	27 7
Carbendazim	192,1	131,6 159,7	27	30 15
Clorpirifos	349,9	124,5 197,7	24	18 23
Clortal-dimetílico	332,9	222,7 300,8	34	38 19
Diazinona	305,2	152,8 168,8	28	19 19
Difeconazol	406,0	250,9 336,9	30	23 15
Diflubenzurom	311,2	140,6 157,7	21	31 13
Fenarimol	331,1	138,6 268,0	38	37 21
Fenazaquin	307,3	90,3 160,8	27	67 15
Fludioxonil	247,2	125,6 179,9	46	31 23
Imidacloprido	256,2	174,8 209,0	23	18 12
Iprodiona	330,1	244,9 287,9	25	15 10
Malationa	331,0	126,5 284,9	18	12 6
Metamidofós	141,9	93,2 111,4	25	15 10
Metconazol	320,1	69,0 124,5	30	20 17
Metiocarbe	226,2	120,6 168,8	16	17 8
Mevinfós (E)	225,1	126,5 192,8	15	14 6

Agrotóxico	Íon Precursor	Íons Produto	Cone (V)	CE (eV)
Mevinfós (Z)	225,1	126,5 192,8	15	14 6
Procimidona	376,0	265,9 307,9	20	16 10
Procloraz	284,2	94,3 255,9	30	22 17
Simazina	202,2	123,6 131,6	32	17 18
Tebuconazol	308,1	124,5 150,7	30	34 25
Tiabendazol	202,1	130,7 174,8	43	32 24
Tiametoxam	292,0	180,8 210,9	20	22 10
Triadimefom	294,2	196,9 225,0	24	14 12
Triclorfom	257,1	108,4 220,9	24	17 10
<u>Atrazina</u>	216,3	103,3 173,8	27	29 17
<u>TPP</u>	327,2	151,9 214,9	41	32 24

* As transições em negrito referem-se aos íons de quantificação

A próxima etapa, após o estabelecimento das condições espectrométricas, foi o desenvolvimento da separação cromatográfica. No LC foram testados o tipo de eluição isocrático e gradiente, os tipos de solventes e proporções de MP, como: solventes orgânicos (metanol e acetonitrila tanto acidificados como não acidificados) e solventes aquosos (ácido fórmico 0,1% e tampão formiato de amônio em 5 mmol L⁻¹). Foi avaliada a intensidade das áreas em termos de área e tempos de retenção dos agrotóxicos. Para maioria dos agrotóxicos, a melhor separação obtida foi com a mistura de metanol : ácido fórmico 0,1% e eluição por gradiente.

As melhores condições cromatográficas de análise empregando LC foram estabelecidas com volume de injeção: 20 µL; vazão da MP: 0,4 mL min⁻¹; temperatura

do forno de 30 °C, eluição por gradiente: fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase móvel B: (metanol), variando de 70% A a 95 % B em 30 min.

Por meio da utilização do conversor *Acquity UPLC Columns Calculator* foram fornecidas as condições cromatográficas de análise empregando UHPLC como volume de injeção: 1,9 µL; vazão de MP: 0,12 mL min⁻¹; temperatura do forno de 30 °C, eluição por gradiente: fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase móvel B: (metanol), variando de 70% A a 95 % B em 10 min.

Na Figura 6 podem ser visualizados os cromatogramas de íon total, adquiridos em oito janelas de aquisição, no modo MRM, nas quais foram analisadas as transições de quantificação e confirmação, de uma mistura contendo todos os agrotóxicos. Os íons precursores $[M + H]^+$ ou $[M + Na]^+$ ou $[M - H]^-$ selecionados para obterem as transições MRM para o monitoramento dos analitos, estão representados no primeiro canal (Acefato, Metamidofós e Tiametoxam); segundo (Carbaril, Carbendazim, Imidacloprido, Mevinfós (E), Mevinfós (Z), Simazina, Tiabendazol e Triclorfom); terceiro (Azoxistrobina, Malationa, Metiocarbe e Triadimefom); quarto (Fludioxonil); quinto (Diflubenzurom, Fenarimol, Iprodiona, Procimidona); sexto (Clortal-Dimetílico, Diazinona, Difeconazol, Metconazol e Tebuconazol), sétimo (Clorpirifós e Procloráz) e oitavo (Abamectina e Fenazaquin). Os padrões de controle Atrazina e Trifenil Fosfato estão na segunda e sexta janela, respectivamente.

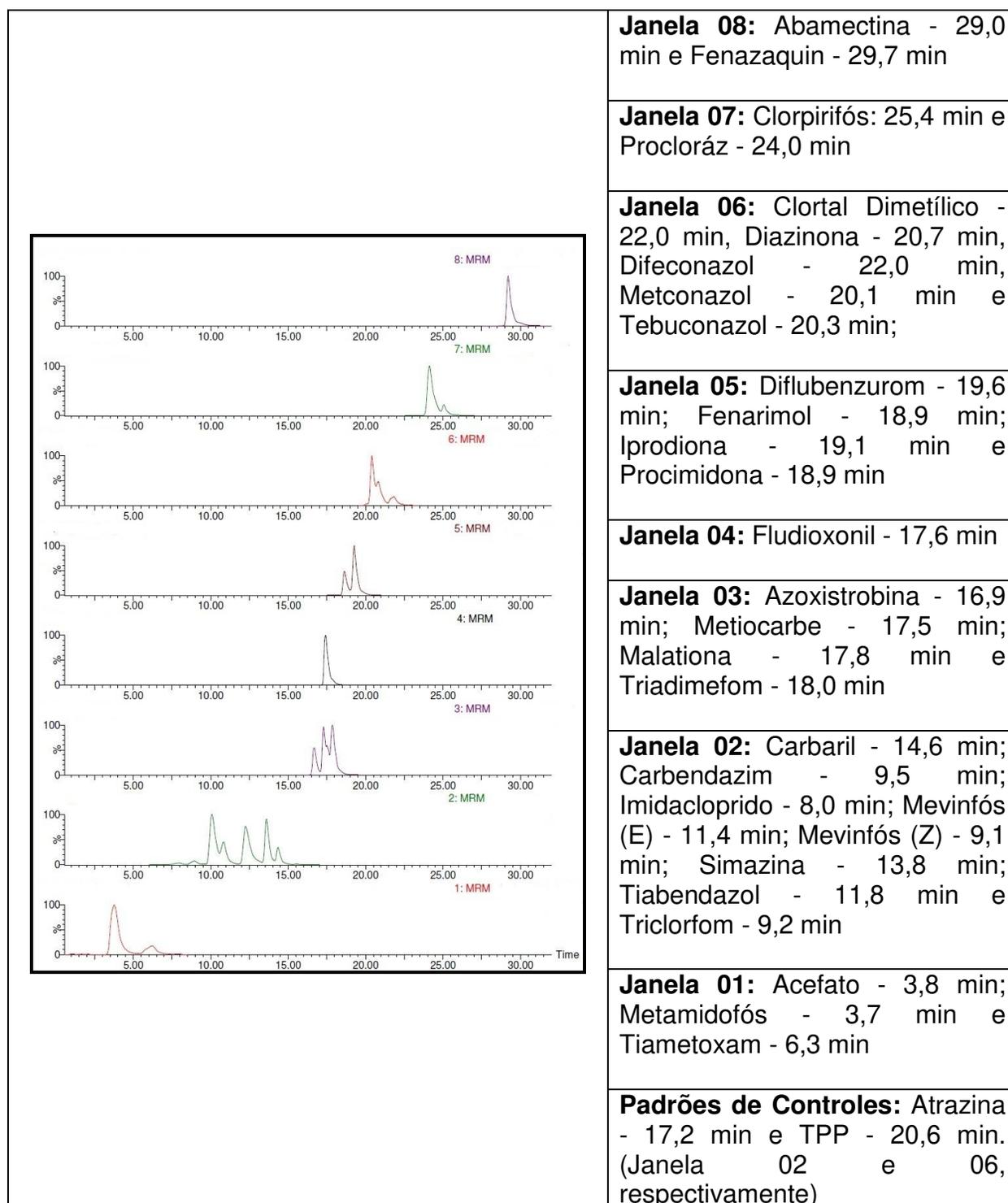


Figura 6: TIC dos agrotóxicos presentes numa solução de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e determinação por LC-MS/MS em oito janelas de aquisição, no modo MRM.

Devido à alta seletividade do espectrômetro de massas é possível identificar os agrotóxicos sem necessidade de separá-los completamente, pois os analitos podem coeluírem sem causar problemas de interferência no modo de aquisição MRM, em que se consegue identificar individualmente os analitos, em canais isolados, mesmo que não tenham sido separados totalmente. Entretanto, a separação dos picos dos analitos aumenta a detectabilidade no analisador Triplo Quadrupolo. Portanto, quanto menor o número de analitos nas janelas de aquisição do detector, maior será a área obtida, conseqüentemente, melhor a detectabilidade do método analítico desenvolvido.

Como o objetivo deste trabalho era desenvolver um método de análise confiável e que conseguisse atingir os LMR de cada agrotóxico, ordem de mg kg^{-1} , houve a necessidade de se obter a melhor separação cromatográfica possível dos agrotóxicos, para não se ter perda significativa na detectabilidade e para obter o número mínimo de pontos recomendados para cada pico cromatográfico em função do tempo de aquisição (*dwell time*) para o monitoramento de cada transição.

Para melhor visualização dos picos cromatográficos, na Figura 7, estão os cromatogramas de cada agrotóxico selecionado neste trabalho, em suas respectivas janelas de aquisição no espectrômetro de massas, sendo Janela 01 (0,5-8,5) min, Janela 02 (6,0-17,0) min, Janela 03 (16,0-19,5) min, Janela 04 (16,5-18,5) min, Janela 05 (17,5-21,0) min, Janela 06 (19,5-23,5) min, Janela 07 (22,5-27,0) min e Janela 08 (27,5-32,0) min. De uma maneira possível, as janelas de aquisição foram determinadas com o objetivo de englobar um menor número de analitos em cada intervalo de tempo selecionado.

As otimizações das condições espectrométricas e cromatográficas foram realizadas para obterem análises mais confiáveis pela maior seletividade e sensíveis pela melhor detectabilidade.

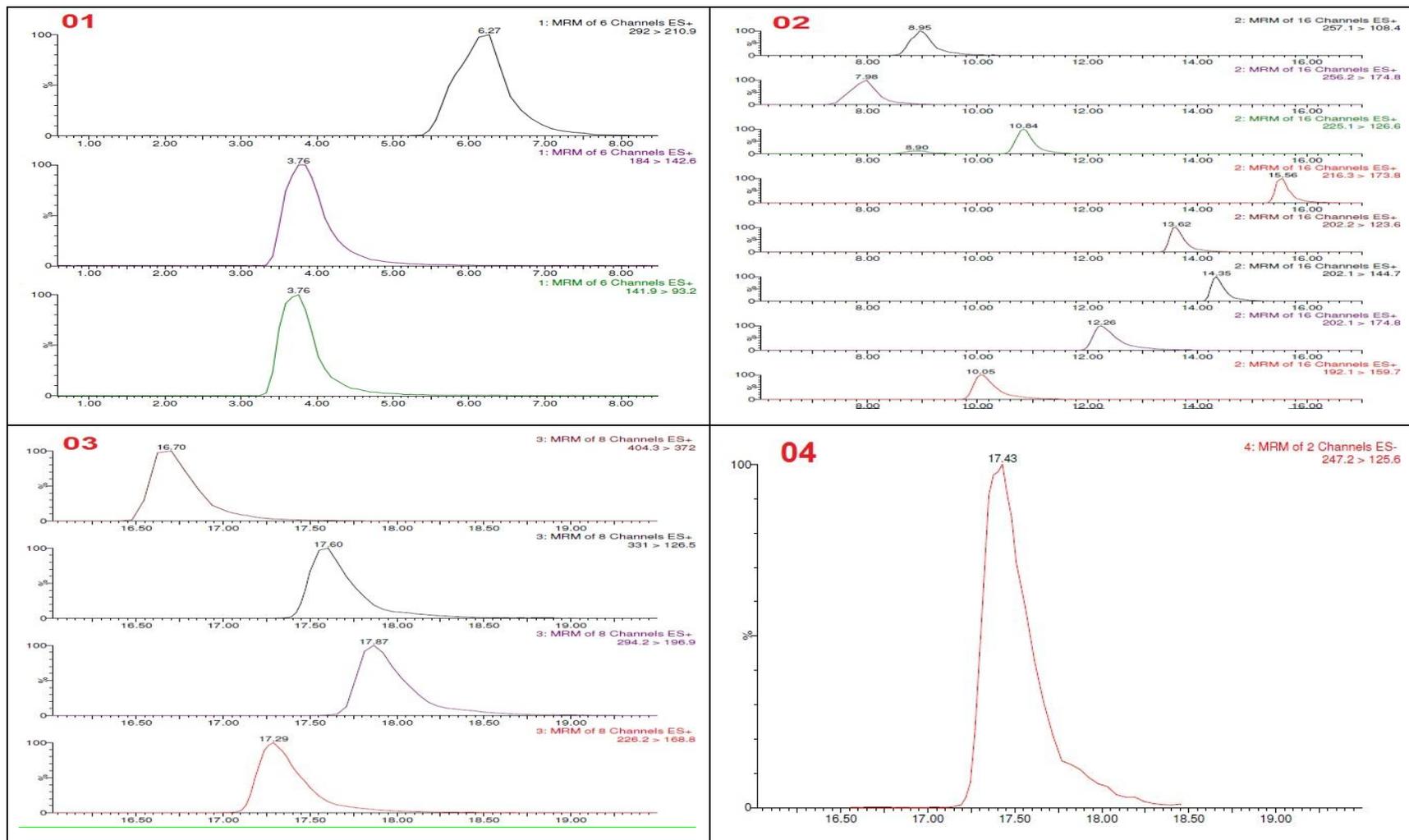


Figura 7: Cromatogramas dos agrotóxicos isolados, 100 ng mL⁻¹ em metanol, que foram determinados por LC - MS/MS. Janelas de aquisição 01a 04.

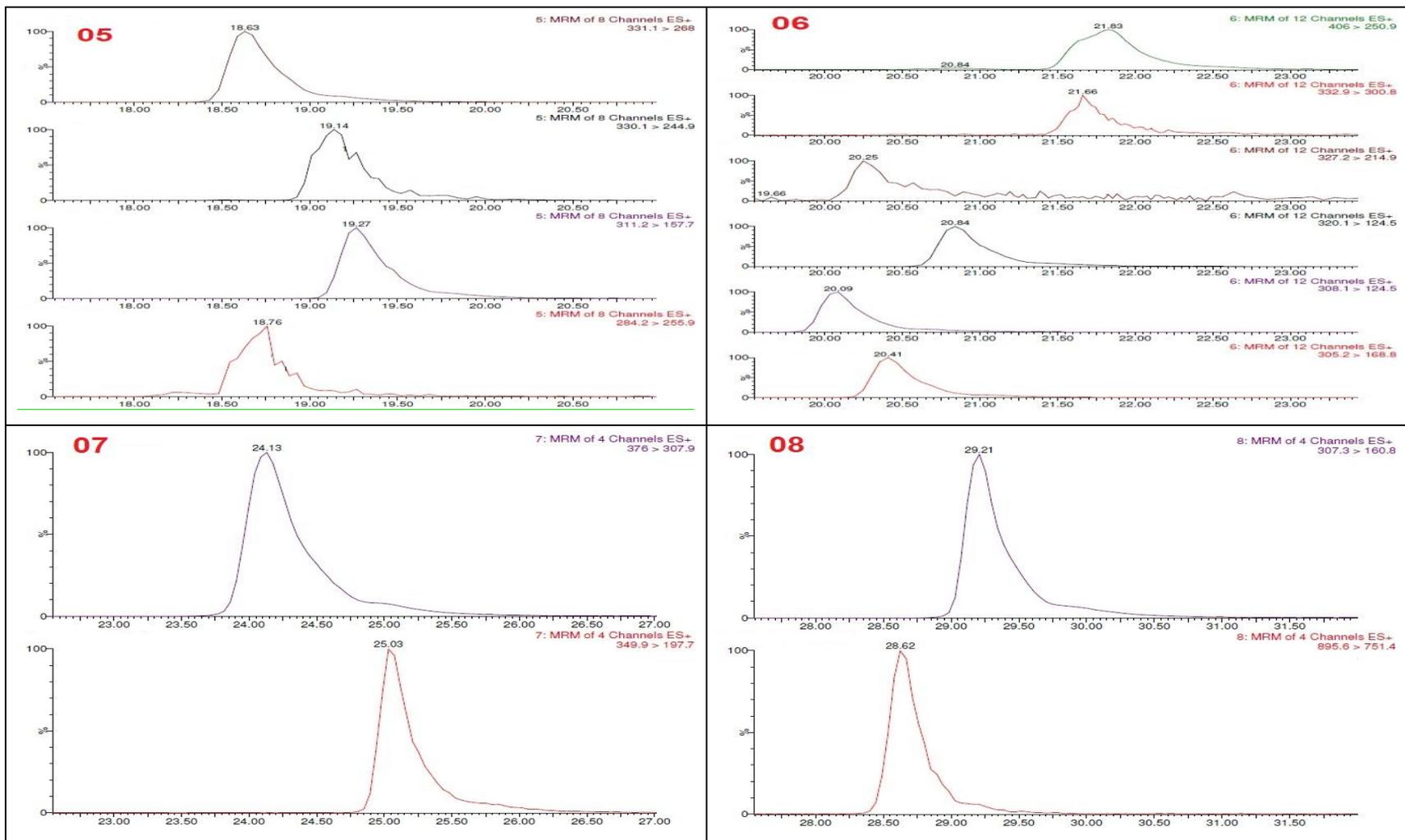


Figura 7: Cromatogramas dos agrotóxicos isolados, 100 ng mL⁻¹ em metanol, que foram determinados por LC - MS/MS. Janelas de aquisição 05 a 08.

4.2. Versões do método QuEChERS

4.2.1. Recuperações obtidas com as versões do método QuEChERS

Nas Figuras 8 e 9 encontram-se os gráficos com os valores de porcentagens de recuperação (%) e seus respectivos CV (%), indicados pelas barras de erros, obtidos na extração dos agrotóxicos e dos padrões de controle empregando as concentrações de 10 e 100 ng g⁻¹ dos analitos.

A identificação da numeração dos agrotóxicos, nas Figuras 8 e 9, encontra-se em ordem alfabética conforme a disposição: (1) Abamectina, (2) Acefato, (3) Azoxistrobina, (4) Carbaril, (5) Carbendazim, (6) Clorpirifos, (7) Clortal-dimetílico, (8) Diazinona, (9) Difeconazol, (10) Diflubenzurom, (11) Fenarimol, (12) Fenazaquin, (13) Fludioxonil, (14) Imidacloprido, (15) Iprodiona, (16) Malationa, (17) Metamidofós, (18) Metconazol, (19) Metiocarbe, (20) Mevinfos (E), (21) Mevinfos (Z), (22) Procimidona, (23) Procloraz, (24) Simazina, (25) Tebuconazol, (26) Tiabendazol, (27) Tiametoxam, (28) Triadimefom, (29) Triclorfom, e os padrões de controle (30) Atrazina e (31) TPP.

Observou-se, pelos resultados obtidos, que todos os agrotóxicos, exceto o metamidofós em todas as versões do método QuEChERS e o acefato na versão AOAC, apresentaram valores de recuperação entre 70-120 % e CV < 20%, conforme recomendações do guia da Sanco.¹³² Ressalta-se que, estes analitos que apresentaram recuperações abaixo de 70%, não foram analisados na concentração baixa (10 ng g⁻¹), porque o valor do LOQ era maior que a concentração analisada neste experimento.

Dependendo da característica físico-química do analito, principalmente a polaridade e o caráter iônico, uma partição inadequada pode ocorrer durante a extração. Para o metamidofós e o acefato, que pertencem a classe dos organofosforados e possuem caráter muito polar, pode ter ocorrido uma transferência parcial para fase orgânica e, conseqüentemente, seus valores de recuperação foram menores. É importante destacar que, valores de recuperação fora do intervalo de 70-120%, podem ser aceitos, desde que o CV seja < 20%, mostrando que o método

analítico é preciso.¹⁴⁹ Os valores de CV do metamidofós variaram de 6,0-10,9% e para acefato foi de 8,4%, ou seja, ambos estão na faixa aceitável nas extrações de concentração alta (100 ng g⁻¹).

Apesar do metamidofós e acefato terem apresentados uma recuperação baixa, resolveu-se mantê-los no desenvolvimento do método, pois mesmo não sendo autorizados para a cultura do morango, eles são encontrados com frequência nos monitoramentos realizados pelo PARA.

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 8 e 9, verifica-se que todas as versões do QuEChERS, Original, AOAC e CEN 15662 poderiam ser empregadas no preparo de amostra de morango, contudo selecionou a versão CEN 15662 modificada, por ter fornecido médias de recuperação maiores para todos os analitos, tanto na concentração de 10 como de 100 ng g⁻¹, e também, os agrotóxicos mais sensíveis a variação de pH apresentaram melhor estabilidade e maior tempo de estocagem, sem sofrerem degradação.

Neste trabalho não houve problema com a estabilidade dos agrotóxicos selecionados, porém, como se trata de uma análise de multirresíduos e com possibilidade de se acrescentarem outros agrotóxicos, este cuidado pode ser útil na utilização deste método de determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango.

Os valores de recuperação na faixa de 70-120 % obtidos para quase todos os agrotóxicos estudados demonstram a grande versatilidade do método QuEChERS no preparo de amostras complexas, contendo agrotóxicos com características físico-química diversificadas e em concentrações baixas. Muitas vezes, empregando outro preparo de amostra, como por exemplo a SPE, poderia fornecer recuperações aceitáveis para certos grupos químicos de agrotóxicos e muito baixas para outros analitos.

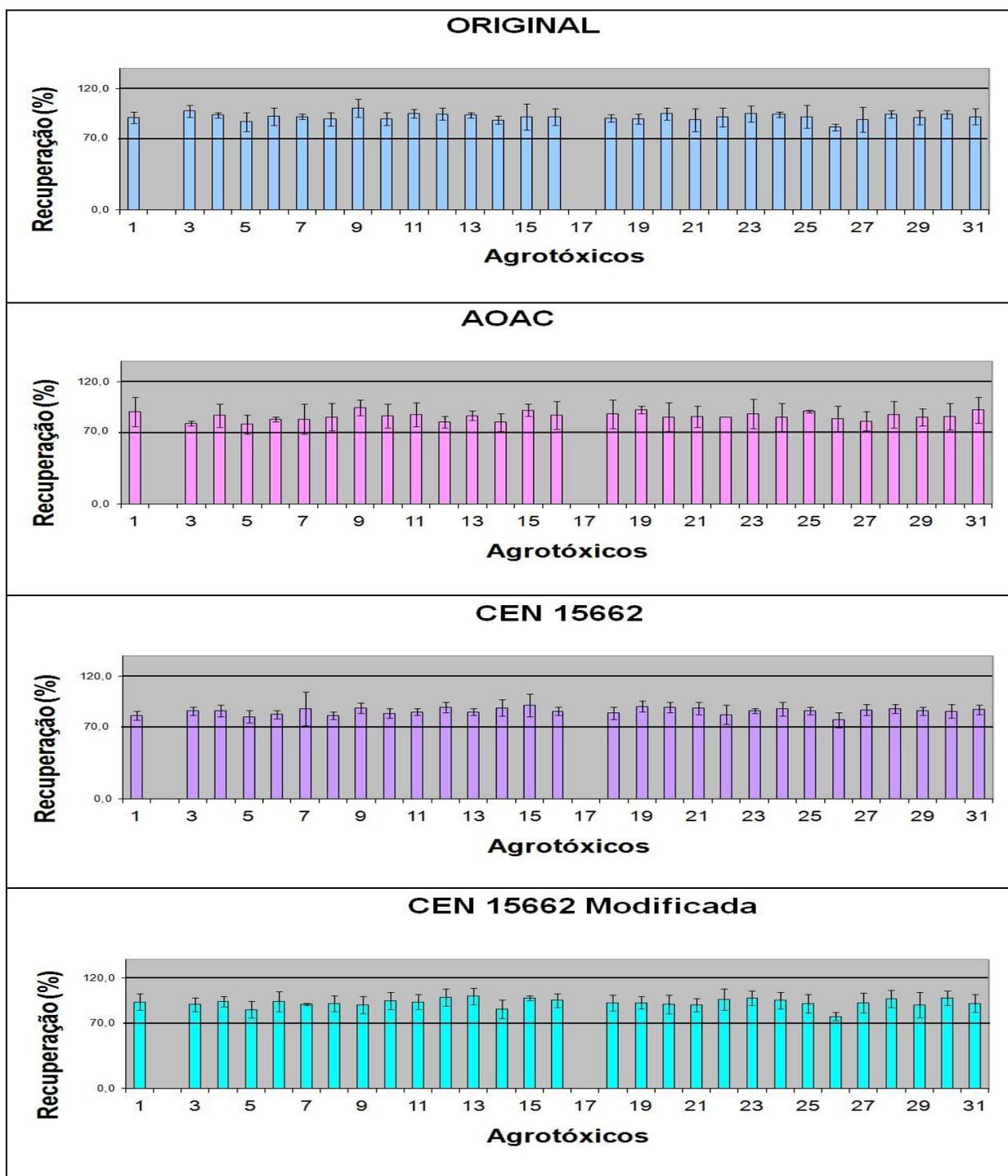


Figura 8: Recuperações (%) e CV (%) dos agrotóxicos e padrões de controle, 10 ng g^{-1} , empregando as versões do método QuEChERS por LC-MS/MS. (n = 3)

* A identificação dos agrotóxicos e dos padrões de controle estão disponíveis no item 4.2.1. da página 71.

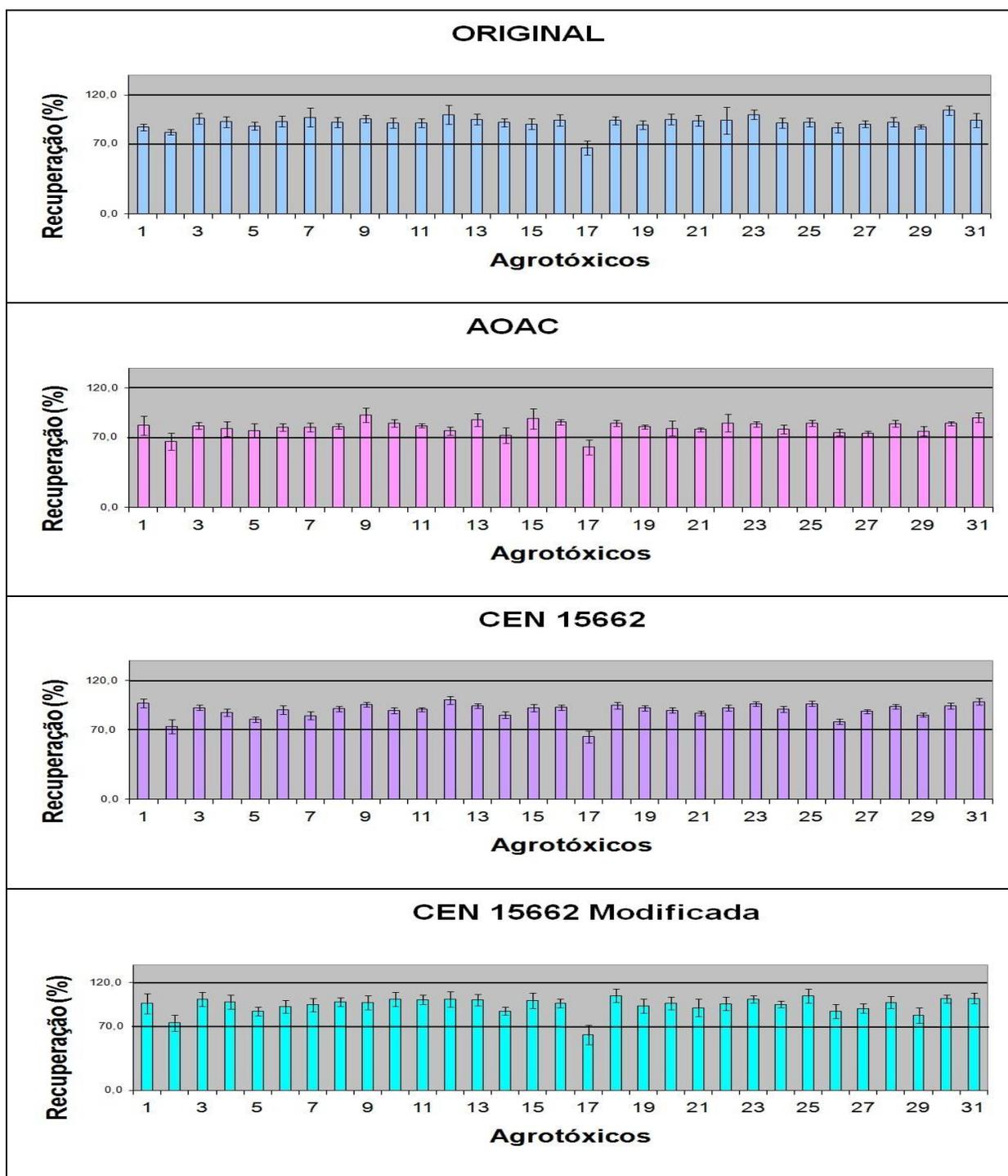


Figura 9: Recuperações (%) e CV (%) dos agrotóxicos e padrões de controle, 100 ng g⁻¹, empregando as versões do método QuEChERS por LC-MS/MS. (n = 3)

* A identificação dos agrotóxicos e dos padrões de controle estão disponíveis no item 4.2.1. da página 71.

4.2.2. Recuperações em diferentes solventes de extração utilizando método QuEChERS na versão CEN 15662 modificada

Na Figura 10 pode ser visualizado o gráfico das porcentagens de recuperação dos agrotóxicos (%) e seus respectivos CV (%), indicados pelas barras de erros, em amostras de morango extraídas com diferentes solventes de extração. Para a maioria dos agrotóxicos obtiveram-se recuperações entre 70-120 %, exceto para o acefato e o metamidofós, que apresentaram valores de recuperações mais baixos, devido a maior dificuldade de extração, como discutido no item (4.2.1.), e também, a abamectina empregando extração com acetato de etila.

Apesar das recuperações obtidas com o uso de acetona terem sido maiores que as da acetonitrila e acetato de etila, a acetonitrila foi selecionada, mesmo tendo como ponto negativo o maior ponto de ebulição (acetona: 56 °C; acetato de etila: 77 °C; acetonitrila: 82 °C), o que implica em evaporação mais lenta na etapa de concentração que a com os outros dois solventes. As vantagens da acetonitrila para sua escolha como solvente de extração referem-se à facilidade e eficiência no particionamento com a água depois da adição dos sais; adequação ao sistema de detecção por espectrometria de massas; valores de recuperação aceitáveis, conforme recomendações do guia Sanco; ¹³² maior seletividade; melhor *clean-up* dos extratos de morango em relação aos obtidos com acetato de etila, que se apresentaram turvos e os com acetona que continham partículas visualmente grandes.

A partição das fases aquosa e orgânica na extração é preocupante, pois quando o solvente é muito miscível com a água, como a acetona, a separação das fases torna-se mais difícil sem o auxílio de outro solvente de caráter apolar, o que gera maiores gastos com solventes, maior tempo na extração e diluição do extrato da amostra. ⁷⁹ O acetato de etila é parcialmente imiscível com a fase aquosa, podendo resultar em perdas dos analitos no processo de transferência da fase aquosa para fase orgânica. ^{77,} ⁸⁰ O aspecto físico dos extratos obtidos empregando acetato de etila e acetona, como solvente de extração, constituiu em desvantagem, pois pode afetar negativamente o desenvolvimento do preparo de amostra pela menor seletividade que influenciará significativamente nos valores de LOQ dos agrotóxicos selecionados.

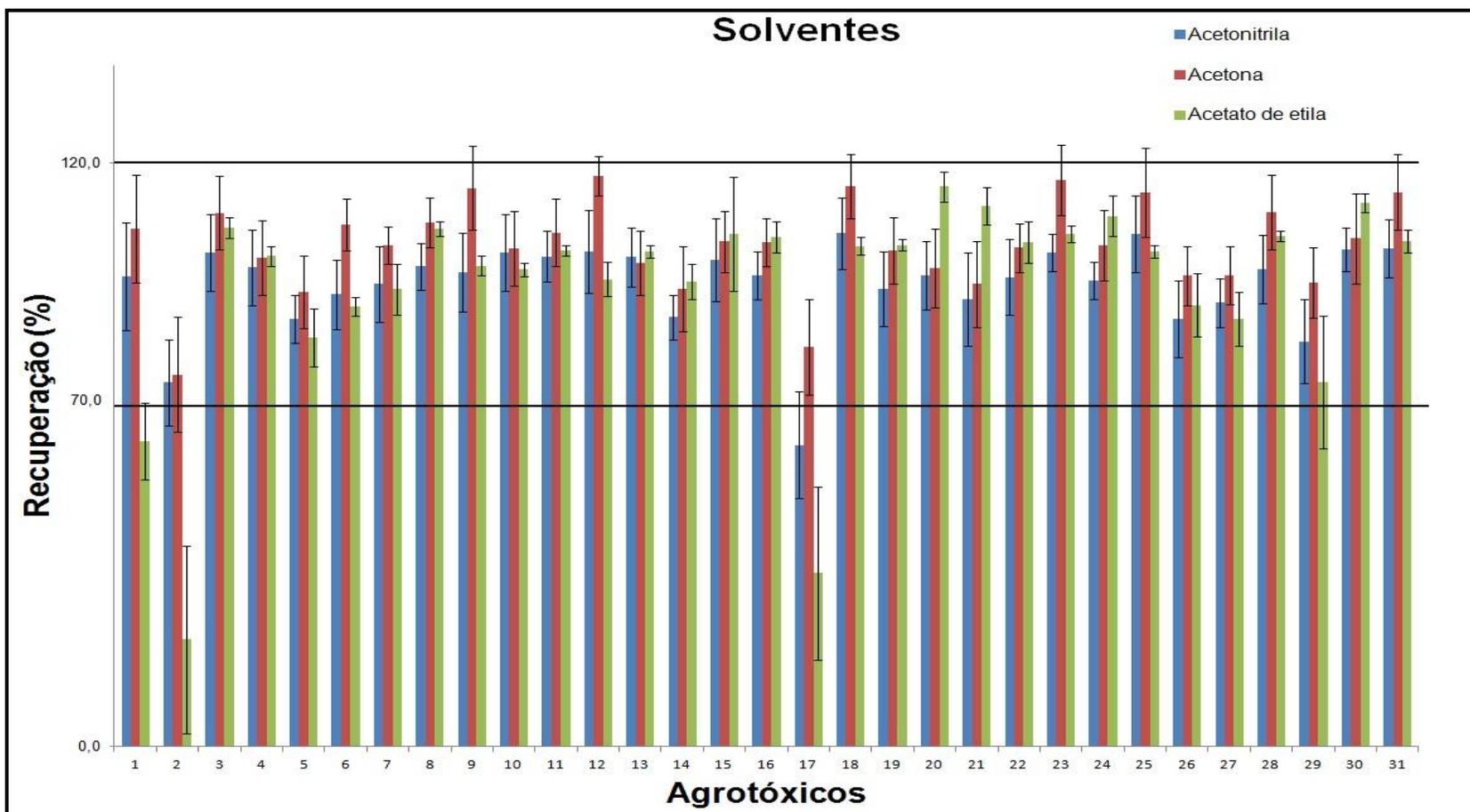


Figura 10: Recuperações (%) dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g^{-1} , extraídos do morango com os solventes acetonitrila, acetona e acetato de etila, na versão modificada do método QuEChERS CEN 15662 e determinados por LC-MS/MS. ($n = 3$) Identificação dos agrotóxicos e padrões de controle no item 4.2.1. da página 71.

4.2.3. Recuperações usando diferentes massas de sulfato de magnésio na versão CEN 15662 modificada do método QuEChERS.

O sulfato de magnésio tem a função de remover a água residual e sua hidratação é uma reação exotérmica, conseqüentemente, ocorre liberação de calor (40 - 45 °C) no extrato orgânico, o que pode favorecer a extração de compostos com caráter apolar.^{79, 80}

As quantidades de 4, 6 e 8 g de sulfato de magnésio anidro foram testadas, e verificou-se que todas as massas forneceram recuperações acima de 70% e CV < 20%, como mostrado na Figura 11, que apresenta a média de recuperação de todos os agrotóxicos analisados, denominada de recuperação total.

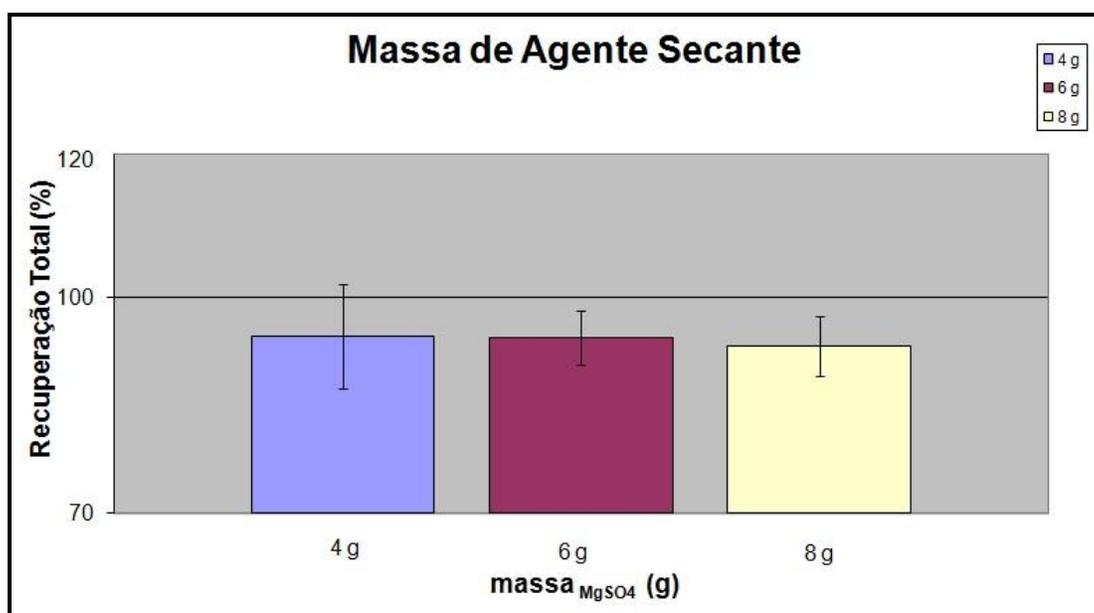


Figura 11: Recuperação total (%) e CV (%) dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g⁻¹, utilizando 3 diferentes massas de sulfato de magnésio 4, 6 e 8 g na versão CEN 15662 modificada em morangos determinados por LC-MS/MS. (n = 3)

Analisando a Figura 11 observa-se que as recuperações totais apresentaram valores muito semelhantes quando se usaram as massas de 4 e 6 g de MgSO₄ e ligeiramente inferior para 8 g. Esta diminuição na recuperação ocorreu principalmente

para os agrotóxicos, abamectina, acefato e metamidofós que apresentaram valores de recuperação bem mais baixos que as obtidas usando outras massas de agente secante, ou seja, 90,4%, 64,7% e 43,7%, respectivamente. Para metamidofós verificou-se uma queda de aproximadamente 20% ao se alterar a massa de 4 g para 8 g. Provavelmente esta redução de recuperação está relacionada à homogeneização, que poderia ser melhorada empregando maior velocidade de agitação ou maior tempo de centrifugação, porém seriam fatores negativos para o tempo total de análise. Optou-se em usar a massa de 4 g nas análises de morango, devido aos valores bons de recuperação e menor quantidade de agente secante que reduz o custo total das análises.

4.2.4. Aplicação dos sorventes na etapa de *clean-up*

4.2.4.1. Caracterização química dos sorventes por CHN

A Tabela 7 apresenta os resultados das análises elementares (CHN) realizadas com os sorventes preparados no laboratório à base de polímeros de siloxano, C18, C8, amino e fenil, e com o PSA comercial, empregados na etapa de *clean-up* por d-SPE do preparo de amostra QuEChERS na versão CEN 15662 modificada.

Tabela 7: Resultados de análise elementar dos sorventes preparados e comercial

Sorventes	% C	% N
C8	9,04	0,22
C18	21,06	0,14
Amino	11,40	0,14
Fenil	7,33	0,08
PSA	6,51	2,72

Analisando a Tabela 7, verificou-se que os sorventes possuem características de polaridade diferentes, sendo mais apolar o C18, seguido do C8 e fenil, cujo grau de apolaridade aumenta com o tamanho da cadeia alquil. Em termos de estrutura química, o sorvente PSA e aminopropil são semelhantes por possuírem o grupo amino, porém o

caráter polar, que é atribuído à maior porcentagem de nitrogênio, é maior para o sorvente comercial. Estes resultados dependem da imobilização que pode promover uma maior ou menor cobertura do suporte de sílica pelo polímero e do tipo de cadeia do polímero.

4.2.4.2. Recuperação dos agrotóxicos utilizando os sorventes preparados e comercial na etapa de *clean-up*

Primeiramente estudou-se a massa mais adequada de PSA para ser empregada na etapa de d-SPE para o *clean-up* de extratos de morango. Na Figura 12 encontram-se as diferenças % R, quando se alterou a massa de 25 mg para 50 mg de PSA por mL de extrato de morango, no preparo de amostra QuEChERS na versão CEN 15662 modificada.

Analisando a Figura 12, observa-se que houve perda nos valores de recuperação para maioria dos analitos, exceto para a abamectina, quando aumentou a massa de 25 mg para 50 mg do sorvente PSA na etapa de *clean-up* dos extratos de morango.

Visualmente, foi verificado que a coloração do extrato de morango ficou um pouco mais clara com o aumento de massa, porém não conseguiu um extrato sem coloração e totalmente límpido. Essa perda de recuperação pode ser considerada como fator negativo importante por influenciar nos valores de LOQ, como também, no maior custo das análises, devido ao acréscimo na quantidade de sorvente para o *clean-up* das amostras. Portanto, optou-se pela massa de 25 mg de sorvente por mL de extrato de morango fortificados com os agrotóxicos estudados.

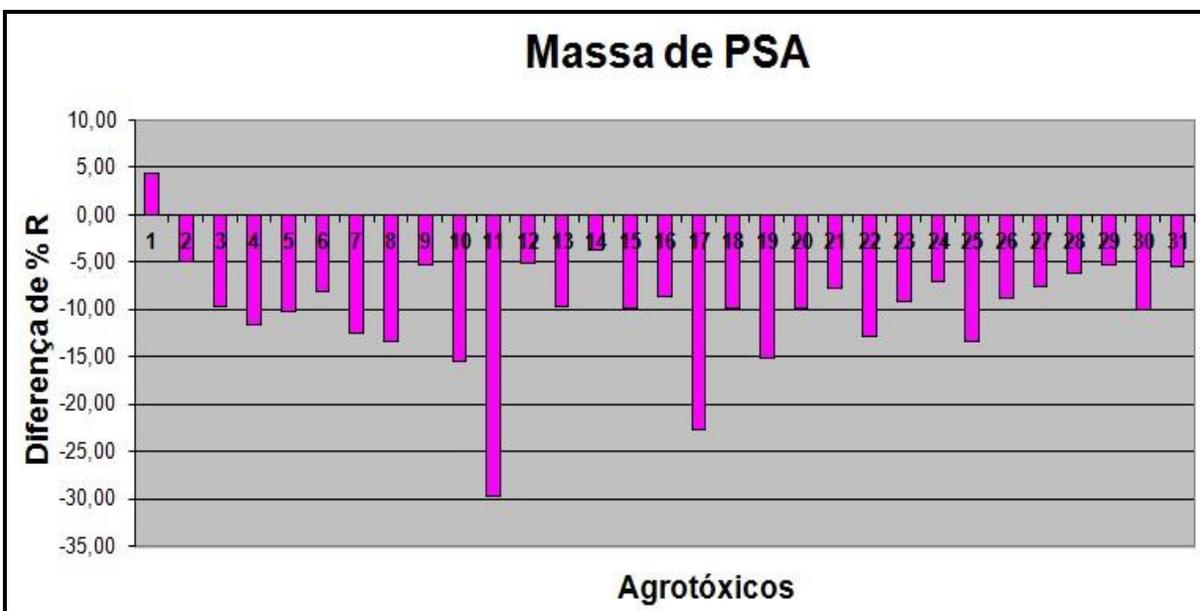


Figura 12: Diferenças de recuperação dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g^{-1} , submetidos a etapa de *clean-up* com alteração de massa de PSA de 25 para 50 mg por mL de extrato de morango no método QuEChERS, na versão modificada CEN 15662, determinadas por LC-MS/MS.

Definida a massa de sorvente a ser empregada foi estudada a influência dos quatro sorventes preparados no laboratório (C18, C8, fenil e amino) e um comercial (PSA) para avaliar as recuperações.

As etapas de extração como também de *clean-up* são influenciadas enormemente pelas interações entre sorventes e analitos. As análises de multirresíduos de agrotóxicos englobam analitos com polaridades diversificadas, onde existem interações com um grau de hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, e somado a isto, encontram-se em baixas concentrações numa amostra complexa contendo vários compostos interferentes. Na tentativa de contemplar estas diversidades estudaram sorventes de composições químicas diferentes para avaliar a melhor atuação no preparo de amostra QuEChERS, discutidas a seguir:

- C18 e C8 são os mais empregados como sorventes no preparo de amostra e como fase estacionária em separações cromatográficas no modo reverso de eluição, que representa o mais aplicado nas análises de alimentos. Eles têm caráter hidrofóbico,

sendo que, o sorvente octadecil apresenta maior grau de hidrofobicidade que o octil e, conseqüentemente, interage mais fortemente com compostos apolares. A aplicação destes sorventes são ideais para remover lipídeos e compostos apolares.

- Fenil possui caráter mais polar e seletivo que as cadeias alquilas tradicionais, devido à sua capacidade de promover interações π - π com analitos aromáticos. Estas ligações π - π são formadas pelas interações intermoleculares que ocorrem entre um doador e um aceptor de elétrons, e é favorecida quando o sorvente empregado para o *clean-up* é rico em elétrons e os analitos são pobres em elétrons.¹⁶⁶ Na prática, não há estudos que avaliaram a regra da densidade do ligante fenil nas interações,¹⁶⁷ mas, de acordo com alguns artigos, o processo de retenção do fenil é muito complexo e envolve uma combinação de interações lipofílicas, π - π e dipolo-dipolo.^{168, 169} A complexidade do polímero fenil pode ser verificada pela sua cadeia que pode apresentar vários átomos de carbono ou cadeia de comprimento variado entre o átomo de silício e o grupo fenil, que é responsável, respectivamente, pela hidrofobicidade e aromaticidade, sendo que a última propriedade química contribui para a polaridade intermediária do sorvente.¹⁶¹

- Amino é um sorvente de modo misto porque possui tanto característica apolar, devido as cadeias de poli(dimetilsiloxano), como polar, pela terminação aminopropil do polímero que forma ligações de hidrogênio. Este sorvente tem comportamento de fase reversa, trocador aniônico fraco e fase normal e as interações entre o sorvente e os analitos dependerão do meio de extração.^{157, 158}

- PSA é um material à base de sílica ligado por etilenodiamino-N-propil (*ethylenediamine-N-propyl*). A estrutura bidentada do PSA (Figura 4) tem um elevado efeito quelante, e também pode atuar como um trocador aniônico fraco pela presença da amina primária e secundária que interage com outros compostos por ligações de hidrogênio. O sorvente é capaz de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos de antocianinas.^{76, 170, 171, 172}

Na Figura 13 podem ser visualizados os gráficos de porcentagem de recuperação e seus respectivos CV (%), que estão indicados pelas barras de erros, referentes ao preparo de amostra de resíduos de agrotóxicos em morangos, empregando na etapa de d-SPE para o *clean-up* os sorventes preparados no

laboratório e o comercial. A identificação dos agrotóxicos e padrões de controle no item 4.2.1. da página 69.

Considerando o critério de aceitabilidade de recuperação e CV, conforme recomendações do guia da Sanco, ¹³² pelas análises dos gráficos da Figura 13, verifica-se que todas as recuperações apresentaram-se no intervalo adequado, exceto para o metamidofós, na extração usando o PSA, e a abamectina com C18 e fenil, com recuperações inferiores a 70%, porém ambos os agrotóxicos apresentaram CV < 20%, demonstrando que o método é preciso.

Normalmente, os valores de recuperação mais baixos estão relacionados com algumas características dos analitos, como forte sorção no sorvente, degradação ou evaporação, partição não satisfatória entre a fase aquosa e orgânica, entre outros fatores. Para o metamidofós, pode ter ocorrido o problema discutido no item (4.2.1.) relacionado à sua polaridade e à sua alta solubilidade em água. A abamectina, que é da classe da avermectina e possui caráter lipofílico alto, pode ter ficado mais retida tanto na fase C18, que têm um elevado caráter hidrofóbico como no sorvente fenil, que também apresenta caráter apolar, já o PSA, que é mais polar, não reteve este analito e não influenciando negativamente nos valores de recuperação.

Importante destacar que, os valores inferiores a 70% obtidos para abamectina não prejudicam a confiabilidade do método porque o seu LOQ estava abaixo do LMR estabelecido pela ANVISA. No caso do metamidofós, que não possui valor de LMR por ser um agrotóxico não autorizado para a cultura do morango no Brasil, não existe um valor limite de concentração para o desenvolvimento do estudo, e idealmente, este analito não deve ser encontrado em nenhuma amostra de morango analisada.

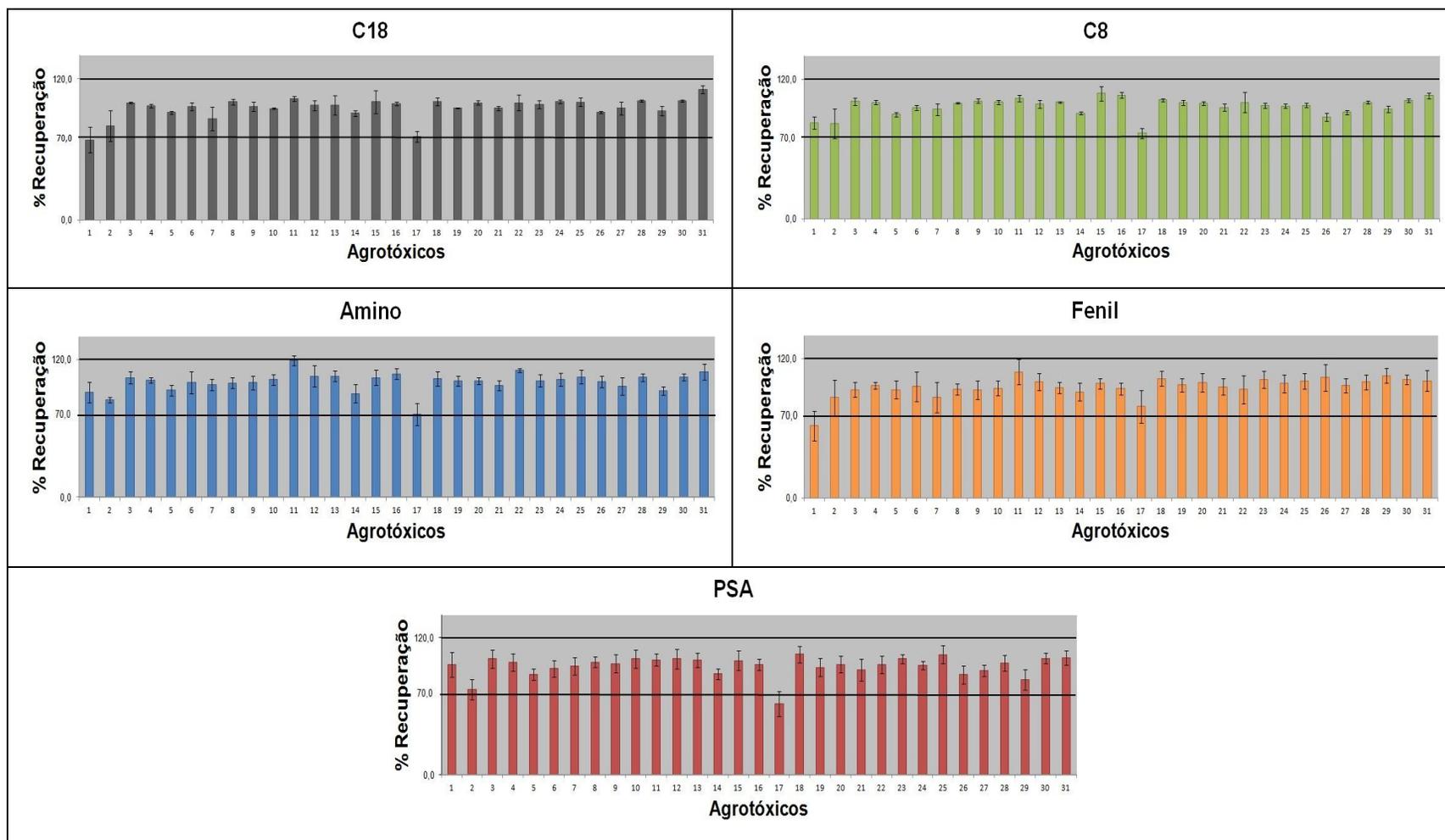


Figura 13: Recuperação (%) e CV (%) obtidas nas extrações de agrotóxicos de morango, na concentração de 100 ng g⁻¹, usando sorventes diferentes na etapa de limpeza do método QuEChERS e determinação por LC-MS/MS. (n = 3).

Para uma avaliação mais detalhada sobre o emprego dos diferentes sorventes, foi realizado um estudo usando mistura dos sorventes PSA e C18, na proporção (1:1 m:m), mas com diferentes massas, 25 mg (mistura 1) e 12,5 mg (mistura 2) de cada sorvente por mL de extrato de morango. Este experimento teve como objetivo avaliar se a combinação de dois sorventes, com interações diferentes, poderia ser mais eficiente na limpeza do extrato orgânico.

Na Figura 14 podem ser visualizados os gráficos de porcentagem de recuperação e seus respectivos CV (%), que estão indicados pelas barras de erros, com o emprego das duas misturas de sorventes, PSA e C18, em extratos de morango.

Teoricamente, a mistura de sorventes com diferentes interações poderia ser mais eficaz na limpeza, pela remoção de coextratos de diferentes polaridades presentes na matriz, conseqüentemente, a razão S/N aumentaria de forma mais significativa do que usando apenas um sorvente. Entretanto, deve-se avaliar cuidadosamente alguma perda significativa nas recuperações dos agrotóxicos por representar um fator preocupante no desenvolvimento de um método analítico. Foi verificado que as misturas também apresentaram resultados aceitáveis de recuperação e CV para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Analisando os resultados, todos os sorventes avaliados apresentaram bons resultados de recuperações e de CV, podendo ser aplicados na etapa de limpeza do método selecionado. Entretanto, uma avaliação mais criteriosa é necessária para a seleção do sorvente mais adequado na etapa de limpeza do preparo de amostra de morango.

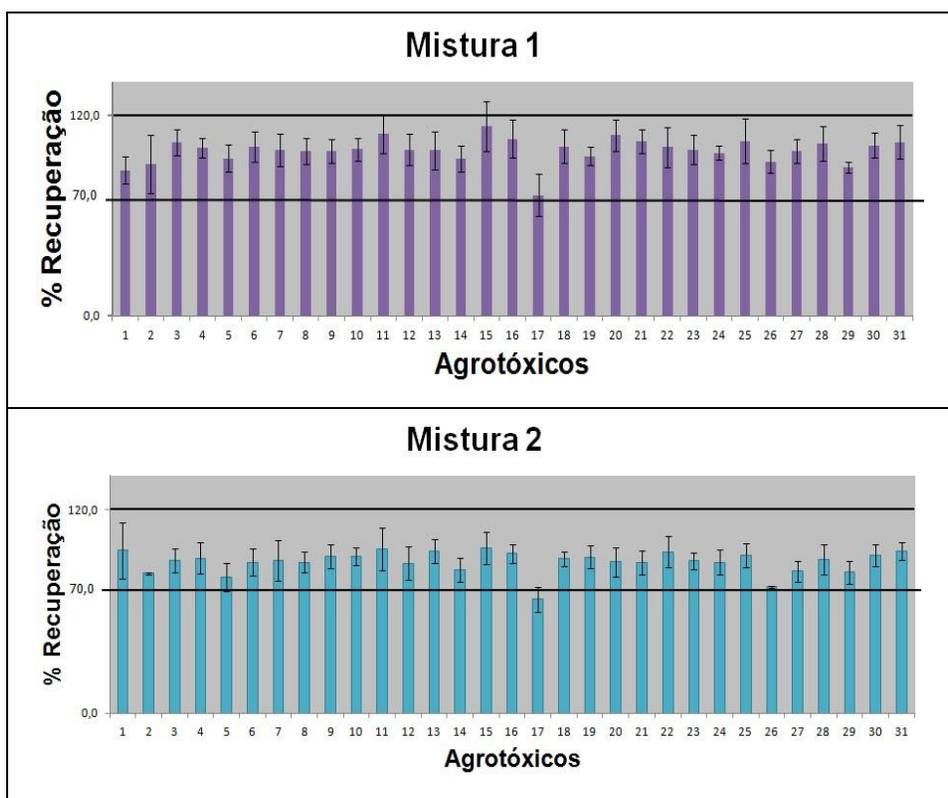


Figura 14: Recuperação (%) e CV (%) obtidas nas extrações de agrotóxicos de morango, na concentração de 100 ng g^{-1} , usando mistura de sorventes, PSA e C18, na etapa de limpeza do método QuEChERS e determinação por LC-MS/MS. (n = 3)

4.2.5. Avaliação de outros parâmetros para seleção dos sorventes

Para uma escolha mais confiável do sorvente a ser empregado na etapa de d-SPE, além do valor de recuperação, outros parâmetros foram utilizados na avaliação do grau de limpeza do extrato.

4.2.5.1. Aspecto físico do extrato final

Inicialmente fez-se a observação visual para avaliar o grau de limpeza, porém não se pode determinar com exatidão se um extrato é mais limpo em relação ao outro.

As colorações dos extratos finais de morango foram vermelho, laranja e amarelo, dependendo do sorvente utilizado na etapa de d-SPE como pode ser verificada na Tabela 8.

Tabela 8: Coloração do extrato final do morango após a etapa de *clean-up* empregando os diferentes sorventes.

Sorvente	Coloração do extrato final
C ₁₈	vermelho
C ₈	laranja
Amino	laranja *
Fenil	vermelho *
PSA	amarelo claro
Mistura 01	amarelo claro
Mistura 02	amarelo

* Extrato apresentou turbidez

Visualmente, o melhor *clean-up* foi obtido com a utilização do sorvente PSA e da mistura 01 de PSA e C18 com massa de 25 mg de cada sorvente por mL de extrato de morango, cujos extratos apresentaram coloração amarelo claro e mais lípidos. Os extratos obtidos usando os sorventes fenil e amino foram, aparentemente, os piores, porque apresentaram coloração mais escura e turbidez, devido à presença de pequenas partículas no extrato final.

4.2.5.2. Recuperação

Este parâmetro foi apresentado no item (4.2.4.2.).

4.2.5.3. Medidas gravimétricas dos interferentes da matriz

Por meio da avaliação das massas pelas medidas gravimétricas nos extratos, com e sem *clean-up*, avaliaram-se a quantidade de interferentes (%) que permaneceram após o uso de diferentes sorventes na etapa d-SPE. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Coextratos (%) em amostras de morango após etapa de *clean-up* utilizando diferentes sorventes

Sorventes	Coextratos (%)
C18	63
C8	54
Amino	83
Fenil	49
PSA	11
Mistura 1	15
Mistura 2	19

Pela análise da Tabela 9, o sorvente PSA apresentou a melhor eficiência de *clean-up* pela remoção dos interferentes, pois a porcentagem de interferentes que restaram no extrato final foi significativamente menor que as obtidas com o uso dos demais sorventes isolados. Analisando as propriedades dos sorventes no preparo de amostras para morango, dentre eles, o mais recomendando é o PSA por promover a remoção de pigmentos como antocianinas, responsáveis pela coloração avermelhada, açúcares e ácidos orgânicos, como o cítrico e o málico, que dão o sabor característico deste pseudofruto.^{172, 173}

As misturas 1 e 2 também apresentaram resultados relativamente positivos de remoção de interferentes na amostra. O sorvente amino praticamente não promoveu a limpeza da matriz, fornecendo um extrato que continha 83% de interferentes e os sorventes C18, C8 e fenil apresentaram, de um modo geral, limpezas similares. Provavelmente, no caso do sorvente amino, a grande quantidade de coextratos que não foi removida pelo sorvente, pode ser relacionada com a pouca quantidade de grupos aminos sobre a sílica, e esta não conseguiu reter os interferentes do morango,

principalmente, pelas interações de troca aniônica fraca dos grupos amino que interagem com outros compostos por ligações de hidrogênio.

Pelos resultados das medidas gravimétricas, verificou-se que o emprego de diferentes sorventes, apesar de afetar pouco os valores de recuperação dos agrotóxicos, que foram apresentados e discutidos no ítem (4.2.4.2.), exerce uma influência significativa no *clean-up* dos extratos. Dessa forma, este estudo foi importante para direcionar na escolha do sorvente mais adequado para o preparo de amostra, que influenciará positivamente nos aspectos envolvendo a cromatografia e a detecção dos agrotóxicos em morangos.

4.2.5.4. Efeito matriz

O efeito matriz é atribuído à variação da eficiência de ionização que pode causar alterações negativa ou positiva no sinal do detector, devido à supressão ou acréscimo de ionização (*ion suppression or enhancement*), conseqüentemente, a quantificação dos analitos deixa de ser confiável pela alteração causada na precisão, exatidão e detectabilidade do método. O mecanismo exato do efeito matriz ainda não é conhecido, mais é comum assumir que os compostos coeluídos competem com os analitos e a ionização será favorecida para as moléculas que são mais ionizáveis e estão em maiores quantidades na amostra.^{114, 174}

Em análises por LC-MS/MS empregando fonte de ionização do tipo *eletrospray* é muito comum a presença do efeito matriz. Uma mudança no modo de ionização, especialmente com a ESI-MS, é uma estratégia, geralmente, bem sucedida, para superar o ME, uma vez que, o modo negativo é mais específico e menos propenso ao ME.¹¹⁴ Normalmente, nas análises de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, a maioria dos analitos é ionizada no modo positivo por gerarem picos cromatográficos com maiores áreas, mas se deve analisar a possibilidade de ionização negativa, que pode resultar em menor valor de área, porém com menor ruído nos cromatogramas e, conseqüentemente, a razão S/N poderá ser maior e contribuir para que valores de LOQ menores que os obtidos no modo de ionização positivo sejam alcançados.

O efeito matriz depende da complexidade das amostras, porém o preparo de amostra, principalmente, a etapa de limpeza é essencial para reduzi-lo para uma menor intensidade. Outras alternativas para a diminuição do efeito matriz consistem em construir a curva analítica na própria matriz, diluir a amostra, utilizar padrão interno, otimizar a separação cromatográfica e as condições do detector, como modo de ionização, tipo de fonte ou utilizar transições MRM não interferentes.^{114, 115, 175}

Quando as variações nas respostas do detector entre o extrato fortificado e a solução dos padrões em solventes, ambos na mesma concentração, for $< \pm 20\%$ considera-se que não há efeito matriz. Valores superiores a $\pm 20\%$ apontam que o efeito matriz é significativo e ele pode ser causado por supressão de ionização, conduzindo a perda de sinal, ou acréscimo de ionização, que resulta em um ganho do sinal analítico.^{137, 164}

A Figura 15 apresenta os resultados da porcentagem de agrotóxicos que apresentaram efeito matriz, exceto dos padrões de controle, empregando os diferentes sorventes e as misturas 01 e 02 contendo PSA e C18.

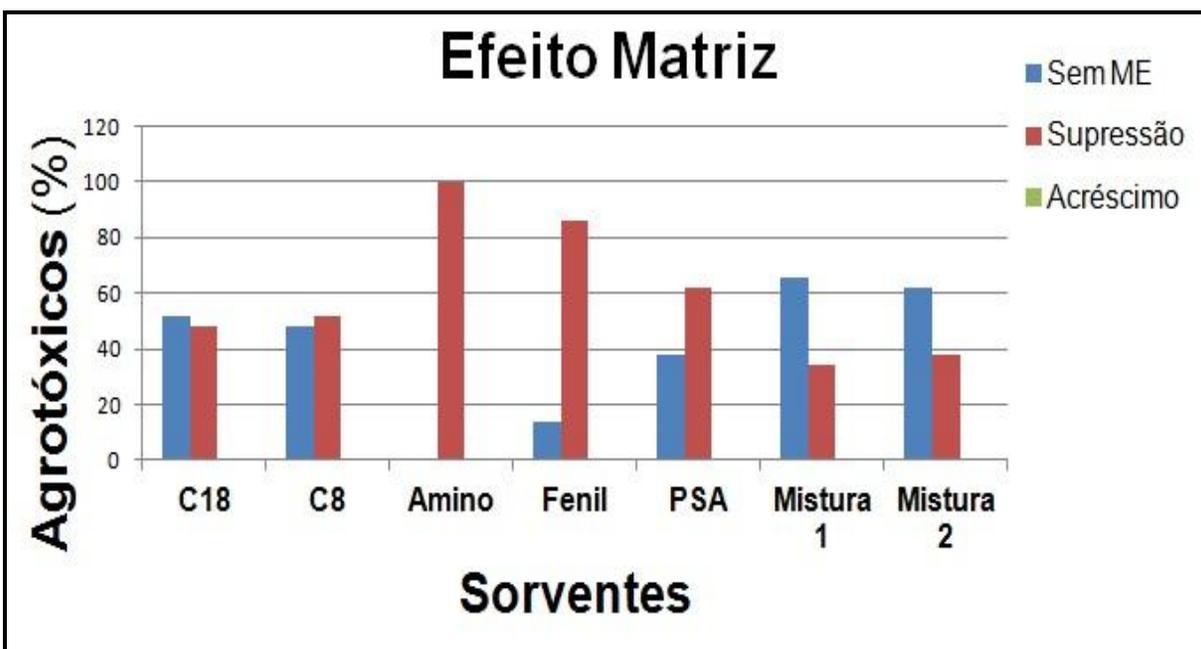


Figura 15: Porcentagem dos números de agrotóxicos que apresentaram efeito matriz, em amostras de morango, utilizando sorventes diferentes na etapa de *clean-up*.

Observa-se, pela Figura 15, que nenhum agrotóxico mostrou acréscimo de ionização no detector. A diferença marcante ocorreu com o sorvente amino e fenil, com os quais todos os analitos ou a grande maioria deles, apresentaram supressão de ionização, enquanto o comportamento dos sorventes C18, C8 e PSA foram semelhantes e as misturas 01 e 02 apresentaram maior porcentagem de agrotóxicos que não sofreram efeito matriz ou que apresentaram efeito matriz menor que $\pm 20\%$.

Para o sorvente amino, que tem grupos químicos semelhantes ao PSA, a diferença marcante em relação aos demais sorventes, resultando em efeito matriz significativo, pode ser atribuída a sua menor capacidade em reter os interferentes, o que pode ser confirmado analisando os resultados da Tabela 9, no qual se observa que foram extraídos apenas 17% de coextratos, provavelmente, causando a redução na eficiência de ionização dos agrotóxicos devido à competição entre os analitos e a grande quantidade de coextratos que permaneceram no extrato final, conduzindo a 100% de supressão no sinal do detector.

Os resultados dos estudos de efeito matriz apontaram as misturas dos sorventes PSA e C18 como os mais adequados, porém, considerando o caráter hidrofóbico do C18, que é mais indicado para amostras com teor de gordura alto, e uma vez que, a composição do morango possui grande quantidade de água, açúcares e pigmentos, optou-se pelo PSA isolado que promove, eficientemente, a remoção dos pigmentos de antocianinas e açúcares. Além disso, a utilização do sorvente PSA proporcionou um extrato com menor quantidade de coextratos e uma coloração clara e límpida nos extratos finais das amostras de morango.

A menor quantidade de interferentes colabora com a recuperação, obtenção de valores menores de LOQ, menor necessidade de manutenção do cromatógrafo a líquido e de limpeza do espectrômetro de massas e aumento do tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

4.3. Validação analítica

Os valores dos parâmetros analíticos obtidos na validação do método de determinação de agrotóxicos em amostras de morango estão apresentados abaixo.

4.3.1. Seletividade

A Figura 16 apresenta os cromatogramas do branco da amostra e da amostra fortificada, com um exemplo de agrotóxico para cada janela de aquisição, 01-04 e 05-08, respectivamente. Comparando os cromatogramas do branco da amostra com o da amostra fortificada, pode-se concluir que o método desenvolvido é seletivo, pois para a maioria dos agrotóxicos não se detectou nenhum sinal analítico no seu tempo de retenção, tanto para transição de quantificação como de confirmação, e quando foi detectado um pico cromatográfico, o mesmo estava abaixo de 30% do valor do LOQ, o que não é considerado interferência no método analítico.

4.3.2. LOD e LOQ

Os valores de LOD e LOQ apresentaram valores menores que o LMR dos agrotóxicos, que é essencial no desenvolvimento de um método analítico. Os valores de LOQ, para a maioria dos agrotóxicos estudados, apresentaram valores em torno de 10 ng g⁻¹, exceto para acefato e metamidofós, que mostraram valores de 25 ng g⁻¹. Para os agrotóxicos não autorizados no Brasil, foram considerados o LMR de outros órgãos, principalmente, do *Codex*⁶¹ e da União Européia¹⁵⁴ para verificar se a concentração estabelecida pelo método desenvolvido estava abaixo destes valores.

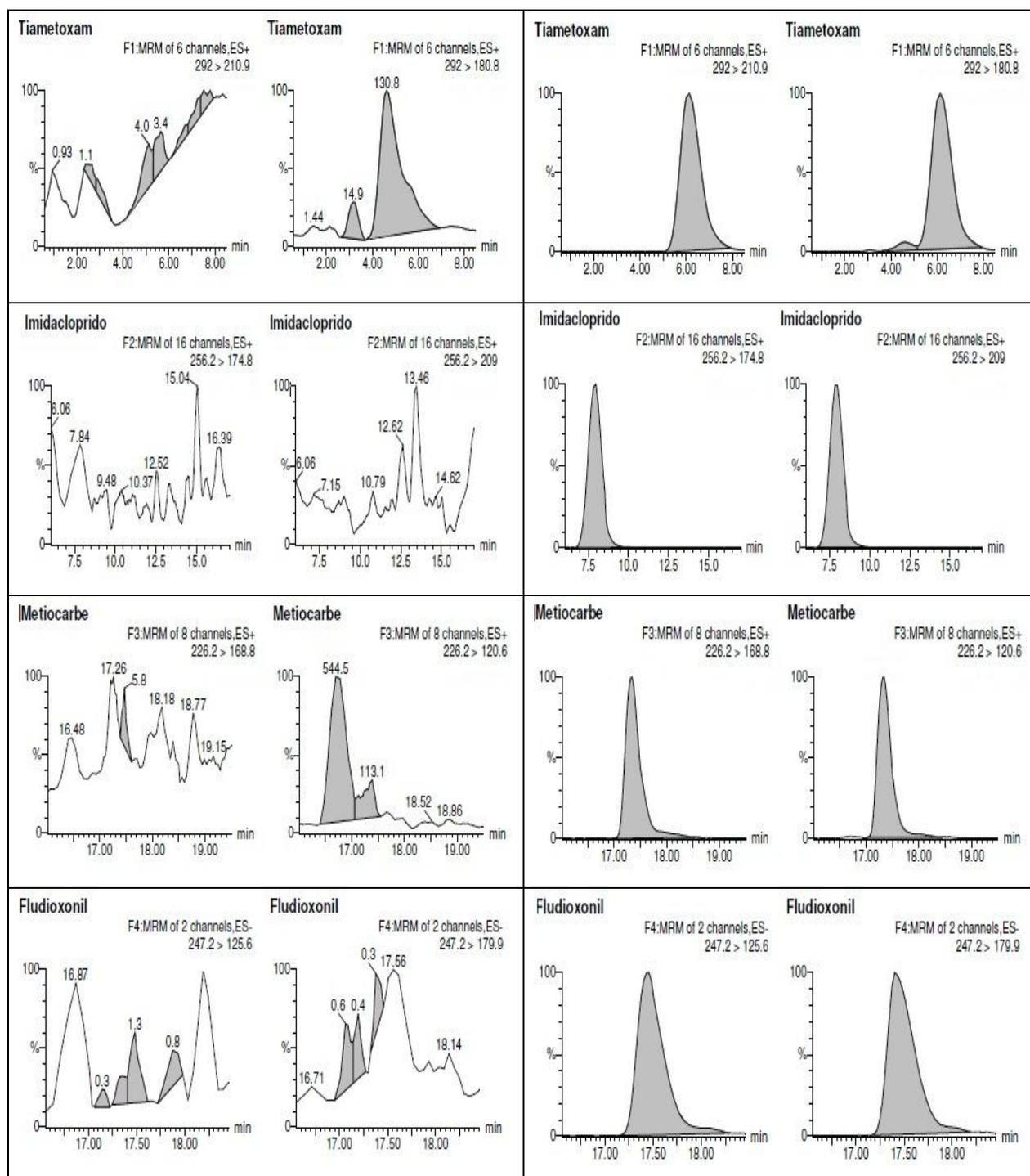


Figura 16: Cromatogramas para avaliar as seletividades de alguns agrotóxicos estudados em morango determinados por LC-MS/MS. Janelas de aquisição de 01 a 04, onde o lado esquerdo (branco da amostra) e lado direito (amostra fortificada).

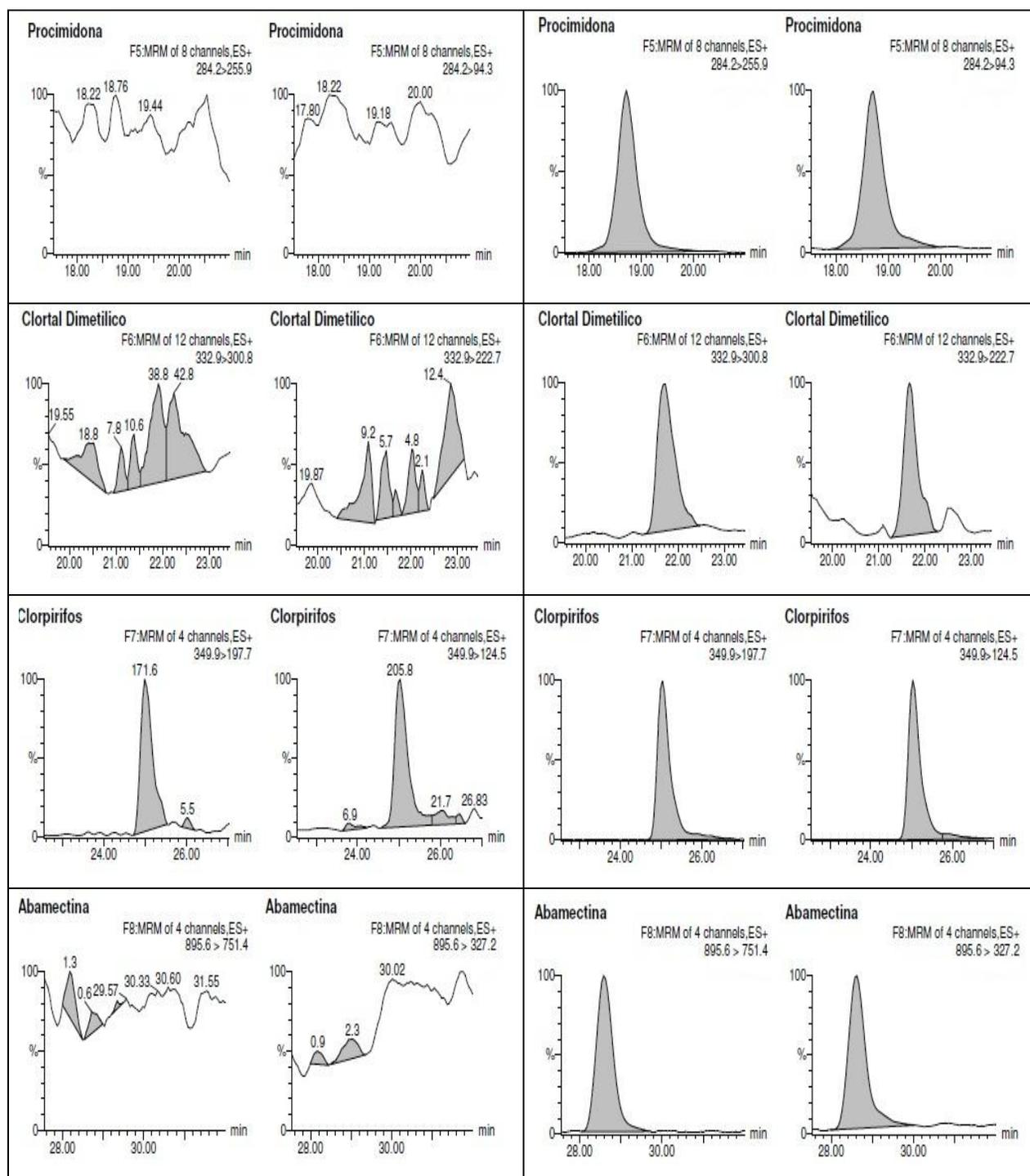


Figura 16: Cromatogramas para avaliar as seletividades de alguns agrotóxicos estudados em morango determinados por LC-MS/MS. Janelas de aquisição de 05 a 08, onde o lado esquerdo (branco da amostra) e lado direito (amostra fortificada).

4.3.3. Curva Analítica e Efeito Matriz

O preparo da curva analítica foi realizado pela avaliação da presença ou ausência do ME, que é gerado pelas interações entre analito e coextrativos da matriz. Esta seleção baseou-se na análise da sensibilidade do método ou inclinação da curva analítica obtida em solvente puro e fortificação dos agrotóxicos na matriz, tanto no branco da matriz (antes do preparo de amostra) como no extrato final (depois do preparo de amostra). Pela Figura 17 pode-se analisar os comportamentos dos agrotóxicos em amostras de morango.

Verificou-se três comportamentos distintos dos agrotóxicos selecionados que são aplicados na cultura do morango. Os analitos apresentaram grande efeito matriz (acefato e carbendazim) para os quais a curva preparada em solvente puro mostrou sensibilidade bem maior em relação às curvas preparadas na matriz de morango. Os agrotóxicos que apresentaram pequeno efeito matriz (diazinona e procloráz), uma vez que, a curva preparada em solvente puro e a preparada na matriz com fortificação no extrato final tiveram comportamentos semelhantes. Os agrotóxicos que praticamente não apresentaram efeito matriz (azoxistrobina e malationa), pois todas as curvas analíticas tiveram comportamentos semelhantes. Importante ressaltar que, a inexistência de efeito matriz pode ser comprovada pela sobreposição total das curvas, o que é muito difícil de ocorrer ou uma porcentagem de ME, de aproximadamente 100%, por meio da equação do efeito do matriz (Equação 6). O comportamento da curva analítica depende das características físico-químicas de cada agrotóxico e também do sistema de determinação analítica, que engloba a separação cromatográfica e os efeitos no detector por espectrometria de massas.

Para garantir um comportamento mais semelhante possível entre a curva e as amostras analisadas deve-se contruir a curva na matriz, e assim, optou-se pela curva com fortificação no branco do morango. A seleção do preparo da curva analítica vai depender do método analítico desenvolvido que deve ser avaliado em cada estudo realizado para poder selecionar cuidadosamente o preparo de curva mais adequado.

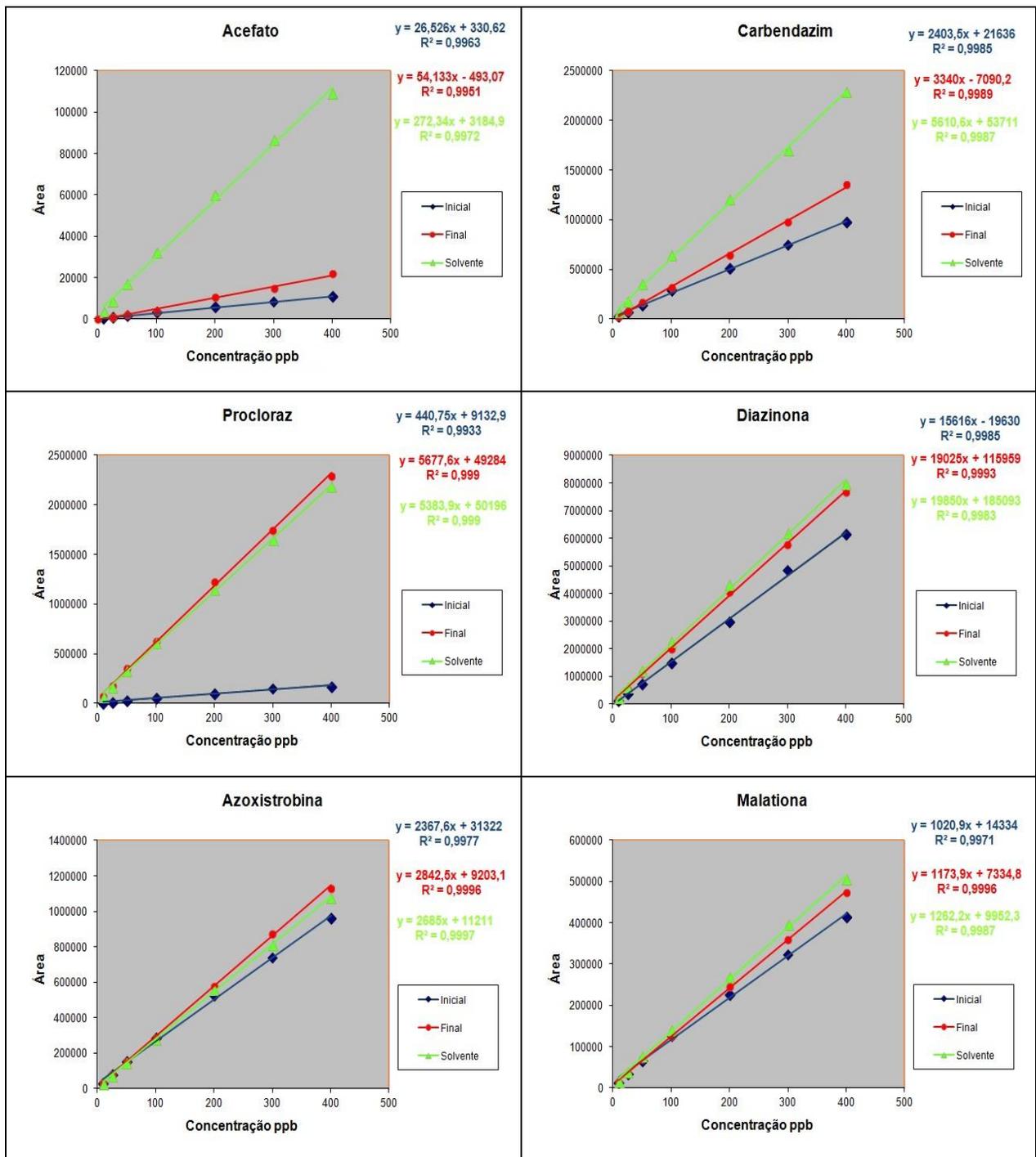


Figura 17: Curvas analíticas para alguns agrotóxicos determinados por LC-MS/MS: Curva em solvente (verde), Curva com fortificação no extrato final (vermelho) e Curva com fortificação no branco da matriz (azul).

As curvas analíticas para todos os analitos apresentaram, por meio da regressão linear, valores de coeficiente de correlação (r) $> 0,99$ e valores de resíduos $< \pm 20\%$ (Tabela 10). Portanto, as amostras devem ser quantificadas em curvas com superposição de matriz, utilizando calibração por padronização externa para quantificar os resíduos de agrotóxicos em morangos.

4.3.4. Recuperação

Todos os agrotóxicos apresentaram valores aceitáveis para recuperação, de 71,7-115,8 % com CV de 11,9 e 8,5 respectivamente, (Tabela 10), nos três níveis de concentração, exceto o metamidofós, que no nível de maior concentração mostrou recuperação de 63,7% e CV de 11,9%, mas garantindo a precisão do método analítico.

4.3.5. Precisão intra e inter

Para todos agrotóxicos obtiveram-se valores de CV menores que 20% nos três níveis de concentração. Os valores de repetibilidade variaram de 1,3-16,6 % (dados não apresentados na tabela) e os de precisão intermediária de 1,6-17,5% (Tabela 10). Portanto, o método analítico desenvolvido é preciso.

Por meio dos resultados gerados pela validação analítica, pode-se avaliar a presença de erros aleatórios pelos valores de precisão e de erros sistemáticos que afetam a exatidão no procedimento analítico. Neste estudo pode-se avaliar que erros aleatórios e sistemáticos não foram significativos para influenciar negativamente a determinação analítica de resíduos de agrotóxicos em morangos.

Os parâmetros analíticos de validação indicaram que, o método desenvolvido para extração de agrotóxicos empregando o método QuEChERS na versão CEN 15662 modificada, com acetonitrila como solvente extrator, $MgSO_4$ como agente secante, NaCl para efeito *salting out*, sais de citrato para efeito tamponante e PSA como sorvente na d-SPE para *clean-up* e determinação analítica por LC-MS/MS, pode ser aplicado em análises de amostras de morango.

Tabela 10: Parâmetros de validação do método desenvolvido para determinação de resíduos de agrotóxicos em morango por LC-MS/MS. Os níveis de fortificação são representados por F1, F2 e F3.

Agrotóxicos	Linearidade e Resíduos (%)			Precisão Inter CV (%)			Recuperação (%) CV (%)		
	r	<	>	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Abamectina	0,9968	-12,7	11,6	17,5	9,7	7,8	82,1 (14,9)	96,5 (7,3)	98,6 (5,0)
Acefato	0,9920	-9,8	12,8	XXX	13,3	15,3	XXX	75,8 (11,0)	72,3 (12,1)
Azoxistrobina	0,9970	-12,7	10,6	14,6	7,4	2,7	93,7 (3,3)	104,0 (4,4)	102,2 (2,7)
Carbaril	0,9984	-6,7	9,8	4,8	2,6	2,7	94,9 (2,1)	99,0 (6,3)	94,2 (4,8)
Carbendazim	0,9982	-8,3	8,9	5,1	2,6	3,5	88,0 (2,2)	92,7 (7,5)	86,2 (7,0)
Clorpirifos	0,9971	-7,9	17,5	6,6	4,1	3,0	96,8 (7,9)	100,1 (3,9)	94,5 (2,9)
Clortal- dimetílico	0,9957	-10,9	14,0	14,2	6,2	5,6	95,1 (6,8)	94,3 (9,1)	93,9 (4,3)

Agrotóxicos	Linearidade e Resíduos (%)			Precisão Inter CV (%)			Recuperação (%) CV (%)		
	r	<	>	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Diazinona	0,9962	-9,9	14,2	5,3	4,8	3,1	93,2 (3,5)	99,1 (4,8)	97,0 (4,5)
Difeconazol	0,9968	-8,5	16,2	7,3	2,0	3,4	93,6 (2,0)	99,4 (5,1)	104,0 (3,7)
Diflubenzurom	0,9976	-8,8	10,7	7,9	4,1	4,4	93,7 (4,0)	101,8 (4,9)	97,7 (3,9)
Fenarimol	0,9951	-13,6	14,2	15,9	12,2	10,6	97,2 (2,0)	104,0 (4,9)	99,5 (3,6)
Fenazaquin	0,9961	-11,0	12,8	13,1	9,0	6,2	102,2 (14,9)	104,5 (6,2)	97,6 (3,1)
Fludioxonil	0,9984	-11,1	14,2	15,3	6,2	6,5	102,7 (4,4)	107,6 (4,8)	92,9 (6,3)
Imidacloprido	0,9985	-8,5	7,1	6,8	4,7	4,6	92,4 (4,4)	94,3 (8,4)	89,2 (6,4)
Iprodiona	0,9980	-7,9	14,1	8,6	7,2	8,0	101,6 (5,6)	115,8 (8,5)	101,7 (7,7)

Agrotóxicos	Linearidade e Resíduos (%)			Precisão Inter CV (%)			Recuperação (%) CV (%)		
	r	<	>	F1	F2	F3	F1	F2	F3
	Malationa	0,9968	-11,3	11,6	4,8	3,6	2,0	98,8 (3,6)	102,5 (4,0)
Metamidofós	0,9956	-16,2	16,8	XXX	9,5	10,2	XXX	71,7 (11,9)	63,7 (11,9)
Metconazol	0,9968	-11,3	14,2	6,6	4,2	5,6	96,2 (2,2)	99,3 (6,9)	107,5 (3,8)
Metiocarbe	0,9945	-10,6	16,9	6,0	7,4	5,0	88,2 (5,7)	103,6 (5,2)	96,6 (2,6)
Mevinfos (E)	0,9973	-7,7	14,6	3,6	3,0	2,5	95,0 (2,2)	98,3 (6,9)	98,2 (5,9)
Mevinfos (Z)	0,9984	-7,0	9,5	6,1	4,3	3,2	92,4 (2,1)	96,5 (8,3)	93,0 (7,1)
Procimidona	0,9940	-13,5	16,6	13,0	10,6	6,5	96,1 (11,7)	100,8 (7,2)	92,7 (6,7)
Procloraz	0,9967	-7,9	16,1	9,7	5,4	3,1	94,0 (4,3)	103,0 (4,8)	102,8 (3,8)

Agrotóxicos	Linearidade e Resíduos (%)			Precisão Inter CV (%)			Recuperação (%) CV (%)		
	r	<	>	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Simazina	0,9958	-12,8	11,7	5,3	3,0	2,8	93,6 (2,1)	106,0 (2,6)	93,6 (3,1)
Tebuconazol	0,9957	-11,2	16,4	6,9	5,2	3,0	95,5 (3,4)	99,4 (5,0)	107,2 (4,8)
Tiabendazol	0,9988	-9,6	6,9	7,3	3,9	3,1	83,4 (2,9)	91,2 (7,9)	85,2 (6,9)
Tiametoxam	0,9972	-10,7	9,4	8,0	9,9	9,2	90,2 (3,1)	94,4 (9,4)	89,8 (6,6)
Triadimefom	0,9952	-13,1	14,3	7,1	3,6	1,6	95,6 (3,7)	105,7 (5,0)	101,9 (4,2)
Triclorfom	0,9971	-10,8	9,0	12,0	5,1	4,6	89,6 (0,8)	99,2 (2,2)	82,2 (4,4)

4.4. Determinação de agrotóxicos em morangos

Após a validação do método analítico, amostras de morango obtidas em supermercados ou feiras de Campinas e região foram analisadas para verificar se as mesmas estavam contaminadas com os agrotóxicos estudados e em que concentração.

Das doze amostras analisadas, nove continham pelo menos um dos agrotóxicos estudados como, acefato, azoxistrobina, carbendazim, difeconazol, imidacloprido, iprodiona, metamidofós, procimidona, procloráz, tebuconazol ou tiametoxam, sendo que, algumas delas tiveram que ser reanalisadas, pois os agrotóxicos estavam em concentrações maiores que os valores da curva analítica. As concentrações dos agrotóxicos encontrados nas amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 11 e um exemplo do cromatograma obtido com a amostra 9, que continha vários agrotóxicos, pode ser visualizado na Figura 18.

Tabela 11: Concentrações de agrotóxicos em morangos, adquiridos no comércio de Campinas e região, empregando o método desenvolvido e validado.

Amostra de Morango	Agrotóxicos (ng g⁻¹) *	
1(Orgânica 1)	-----	-----
2	Azoxistrobina (<LMR)	Carbendazim (<LMR)
	Difeconazol (<LMR)	Iprodiona (<LMR)
	Procimidona (<LMR)	-----
3	Carbendazim (<LMR)	-----
4 (Orgânica 2)	-----	-----
5 (Gigante)	Acefato (16273) ^a	Carbendazim (<LMR)
	Metamidofós (1334) ^a	Procloráz (41) ^a
6	Azoxistrobina (<LMR)	Difeconazol (<LMR)
7	Azoxistrobina (<LMR)	Carbendazim (<LMR)
	Difeconazol (<LMR)	Procimidona (<LMR)
	Procloráz (242) ^a	Tiametoxam (<LMR)
8	Carbendazim (<LMR)	Iprodiona (<LMR)
	Tiametoxam (<LMR)	Tebuconazol (<LOQ)
9	Acefato (20560) ^a	Carbendazim (1032) ^b
	Imidacloprido (16) ^a	Metamidofós (3794) ^a
	Procloráz (181) ^a	Tebuconazol (<LOQ)
10	-----	-----
11	Carbendazim (<LMR)	Procloráz (237) ^a
12	Procimidona (<LMR)	Imidacloprido (<LOQ) ^a

* LMR estabelecido pela Anvisa

a Agrotóxicos não autorizados pela Anvisa

b Concentração maior que LMR estabelecido pela Anvisa

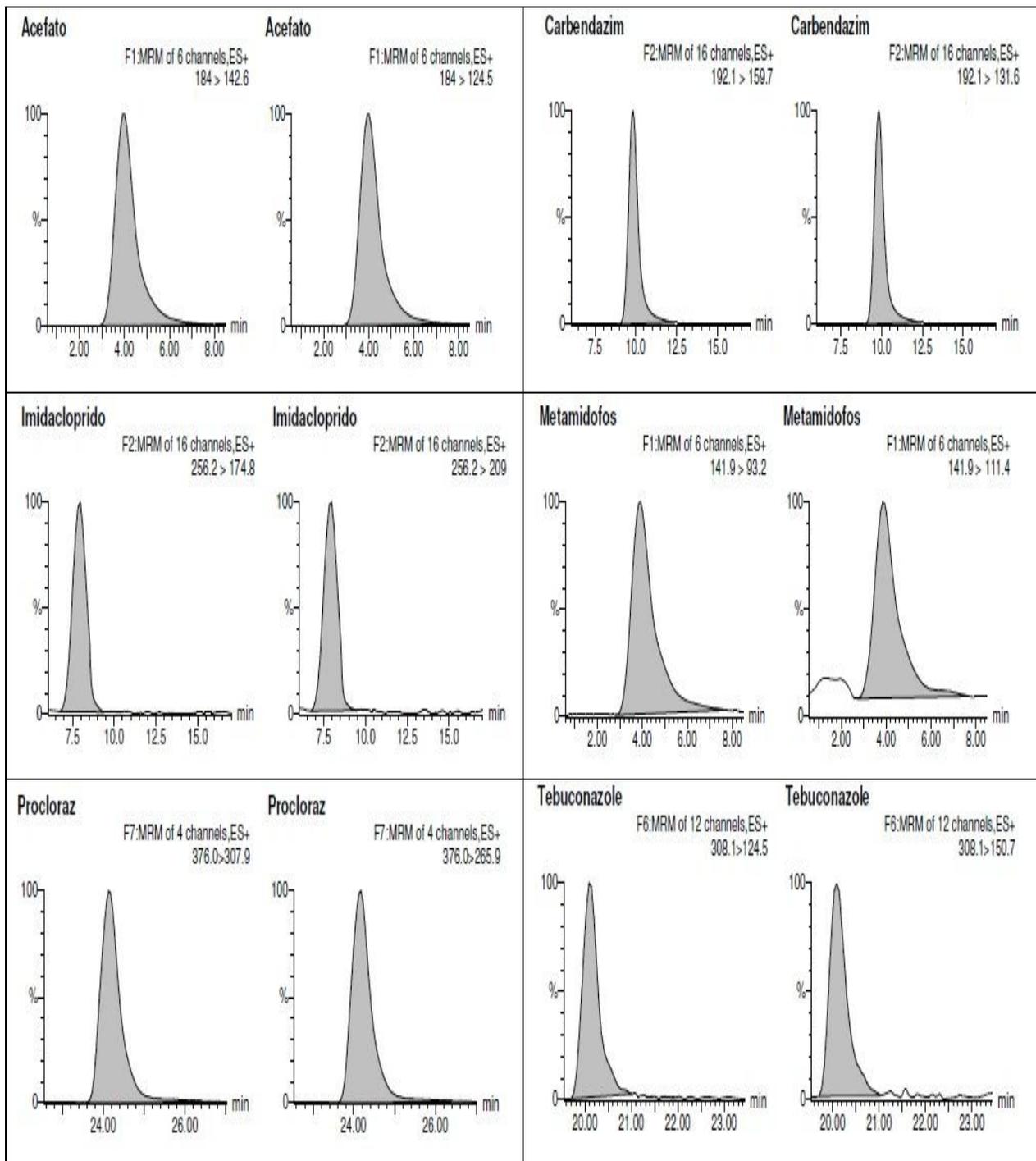


Figura 18: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes na amostra nove de morango determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.

É importante destacar que se devem analisar cuidadosamente os valores de concentração dos agrotóxicos encontrados em amostras de alimentos, pois os valores de LMR disponibilizados pela legislação nacional ou pela internacional podem variar muito, dependendo do país considerado. Dessa forma, uma concentração pode ser considerada problemática em um país, porém não em outro, necessitando que mais estudos sejam realizados neste campo, a fim de que haja uma globalização nos valores de concentração dos LMR. A avaliação de agrotóxicos não autorizados no Brasil é outro cuidado que deve ser tomado no monitoramento de resíduos, por ter valores de LMR estabelecidos em determinados países e sua aplicação proibida em outros países ou, até mesmo, o seu uso banido na agricultura.

Outra grande preocupação que deve ser considerada na determinação de resíduos de agrotóxicos é a presença dos metabólitos ou produtos de degradação, juntamente com a molécula original, na composição das amostras analisadas. A toxicidade geralmente maior dos produtos de degradação do agrotóxico, em relação a molécula original, pode ter consequências mais drásticas tanto no meio ambiente como no organismo dos consumidores. Em relação aos agrotóxicos estudados neste trabalho, metamidofós é um produto de degradação do acefato; carbendazim é um produto de degradação do benomil e tiofanato metílico que foram removidos nos estudos iniciais do preparo de amostra devido às suas baixas estabilidades no meio. Segundo informações da ANVISA,⁶⁵ para fins de monitoramento de resíduos, quando ocorrer presença de produtos de degradação ou metabólitos na mesma amostra e estes não forem autorizados na cultura, deverá ser acrescentada uma observação no final do laudo que: "Apesar de não ser autorizado o uso do metabólito, o resultado desta amostra não foi considerado insatisfatório, porque este pode ser proveniente da degradação da molécula original".

Este estudo confirmou a grande preocupação com a presença de resíduos de agrotóxicos aplicados nas culturas de morango, principalmente, quando estão acima dos valores de LMR ou são encontrados agrotóxicos não autorizados para a cultura analisada. As amostras de morangos orgânicos que foram analisadas não apresentaram os agrotóxicos estudados, o que demonstra que nenhum controle químico foi aplicado na produção do morango.

4.5. Transferência do método de análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango por HPLC para UHPLC

Na Figura 19 podem ser visualizados os cromatogramas de íon total, para uma solução de agrotóxicos estudados, apresentados em seis janelas de aquisição, no modo MRM, determinados por UPLC-MS/MS com tempo de corrida analítica de dez minutos.

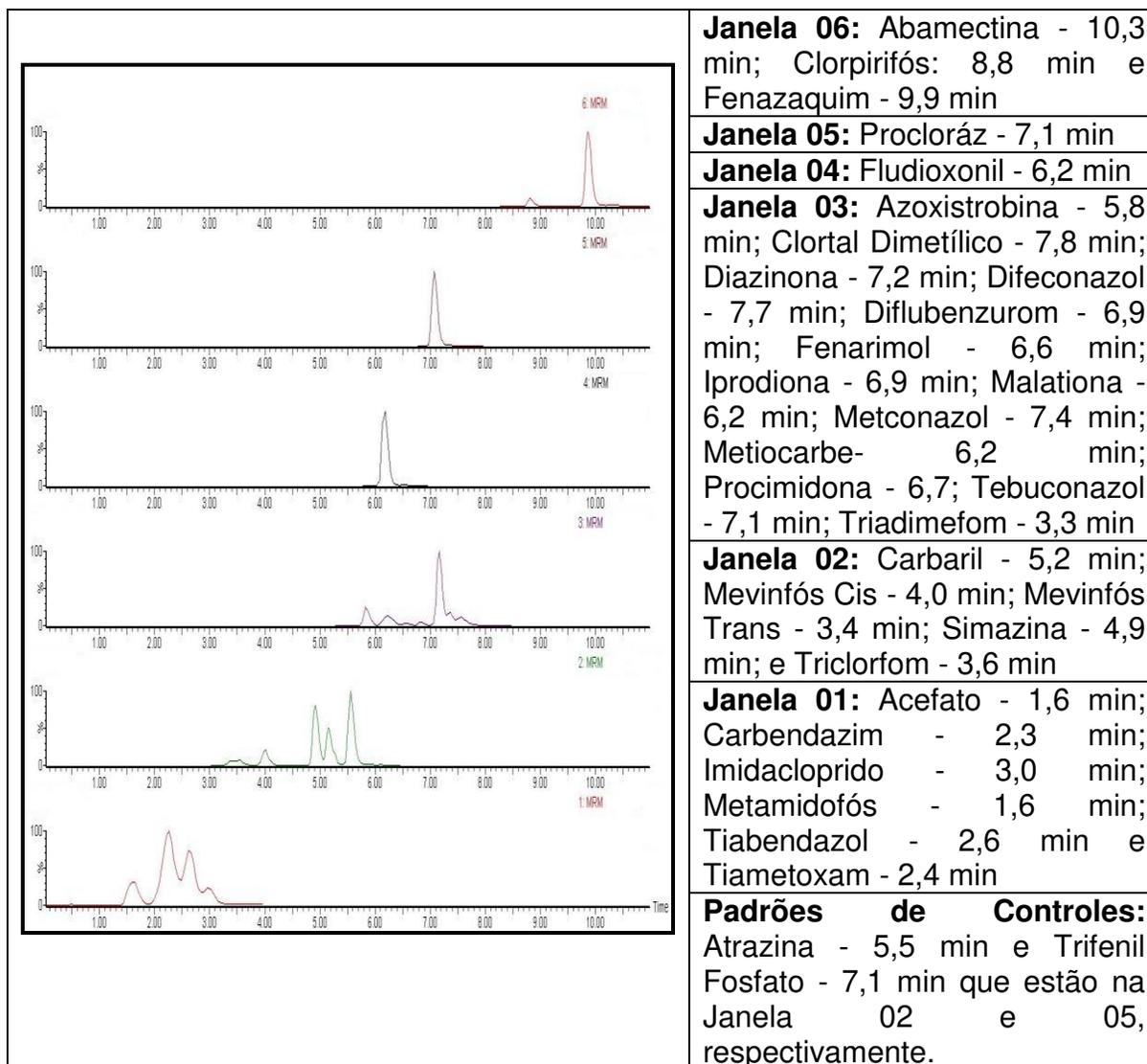


Figura 19: TIC dos agrotóxicos presentes numa solução de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e determinação por UPLC-MS/MS em seis janelas de aquisição, no modo MRM.

Na Tabela 12 estão apresentados os parâmetros cromatográficos de volume de injeção e de MP, vazão de MP e tempo de corrida, que permitem comparar o desempenho das duas técnicas, LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS.

Tabela 12: Parâmetros cromatográficos obtidos nas análises de agrotóxicos em morango por LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS.

Parâmetros	LC-MS/MS	UHPLC-MS/MS
Tempo de corrida (min)	30	10
Vazão da MP (mL min ⁻¹)	0,4	0,12
Volume de Injeção (µL)	20	1,9
Volume de MP (mL)	12	1,2

Analisando a Tabela 12 verifica-se que as vantagens mais marcantes do método utilizando a UHPLC foram o tempo de análise de aproximadamente três vezes mais rápido que por LC, o volume de injeção de amostra e o consumo de solvente orgânico na MP de cerca de dez vezes menor em relação à LC, o que contribui favoravelmente para determinações analíticas de rotina e está em acordo com os requisitos da Química Verde, fazendo com que possa ser considerada uma técnica promissora a ser estabelecida, por atender as exigências da química moderna.

Na Figura 20 estão mostradas as detectabilidades de cada técnica empregada, por meio da porcentagem de agrotóxicos, em função da sua concentração de LOQ.

Analisando o gráfico da Figura 20, verifica-se que tanto para os agrotóxicos que apresentam LOQ < 1 ng g⁻¹ como 1-10 ng g⁻¹, a porcentagem dos mesmos quantificados no LC-MS/MS é superior aos analisados por UHPLC-MS/MS, o que constitui em uma desvantagem da técnica UHPLC, que se mostrou menos indicada para determinações de analitos em concentrações mais baixas que LC, ocorrendo o contrário em concentrações superiores a 10 ng g⁻¹.

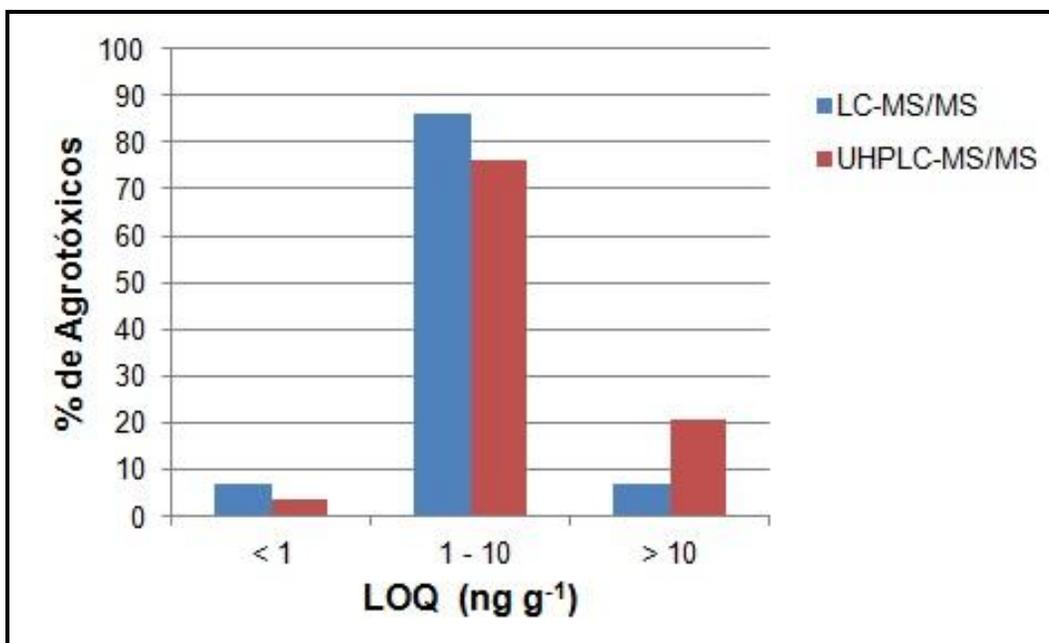


Figura 20: Porcentagem dos agrotóxicos, distribuídos em função dos LOQ, em amostras de morango analisados por LC-MS/MS e UPLC-MS/MS.

No método desenvolvido verificou-se que a detectabilidade no UHPLC foi afetada negativamente, resultando em agrotóxicos com valores de LOQ semelhantes ou maiores dependendo da faixa de concentração que os observados nas análises realizadas por LC. Este fator está relacionado ao número maior de agrotóxicos que coeluíram em um intervalo de corrida menor, conseqüentemente, diminuindo a sensibilidade do método analítico. Além disso, os analitos coeluídos apresentarão maior número de transições de MRM que são monitoradas em cada janela de aquisição, implicando em menor tempo de aquisição (*dwell time*) para o monitoramento dos íons de cada transição. E com esta diminuição no *dwell time*, o número de pontos adquiridos poderá não ser suficiente para construção de um pico cromatográfico adequado e, poderá gerar um método analítico com menor precisão. A detectabilidade da técnica depende do analito que está sendo determinado e da eletrônica do espectrômetro de massas.

Como já foi discutido no ítem (1.6.), em muitos trabalhos publicados na literatura, para conseguirem melhores detectabilidades, com LOQ mais baixos usando UHPLC,

são injetados volumes de amostra iguais aos utilizados na LC ou aleatórios, porém maiores que os calculados pela transferência do método do LC para UHPLC. Isto é bastante preocupante, pois pode resultar em perda de eficiência cromatográfica e sobrecarga de amostra na coluna de UHPLC por ultrapassar a sua capacidade máxima, conseqüentemente, poderá diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica que é de custo elevado.

Dessa forma, comprovou-se que a técnica de UHPLC-MS/MS apresenta inúmeras vantagens, contudo ela possui desvantagem relacionada ao maior número de analitos que coeluem, podendo diminuir a detectabilidade, que muitas vezes, é compensada injetando um volume de amostra acima do recomendado. Estes aspectos negativos da técnica, que são de importância fundamental na cromatografia e na espectrometria, não são levados em considerações no desenvolvimento de um método analítico e não são relatados nos trabalhos publicados. Entretanto, o emprego do UHPLC neste trabalho mesmo fornecendo valores maiores de LOQ, atendeu os valores de concentração do LMR.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido para determinação por LC-MS/MS dos agrotóxicos Abamectina, Acefato, Azoxistrobina, Carbaril, Carbendazim, Clorpirifos, Clorthal-dimetílico, Diazinona, Difeconazol, Diflubenzurom, Fenarimol, Fenazaquin, Fludioxonil, Imidacloprido, Iprodiona, Malationa, Metamidofós, Metconazol, Metiocarbe, Mevinfos (E), Mevinfos (Z), Procimidona, Procloraz, Simazina, Tebuconazol, Tiabendazol, Tiametoxam, Triadimefom, Triclorfom e os padrões de controle Atrazina e TPP, em morango, obteve o melhor preparo de amostra utilizando a versão QuEChERS CEN 15662 modificada, o solvente de extração acetonitrila, 4 g de sulfato de magnésio por 10 g de amostra como agente secante e 25 mg do sorvente PSA por mL de extrato de amostra na d-SPE para a etapa de *clean-up*.

O estudo de diferentes sorventes a serem utilizados na d-SPE para o *clean-up* dos extratos de morango foi relevante, pois permitiu constatar que o sorvente exerce influência significativa na remoção de interferentes dos extratos e gera menor quantidade de resíduos ou compostos remanescentes. A presença dos interferentes prejudica uma análise, pois eles podem interferir na linha de base dos cromatogramas, diminuindo a razão sinal/ruído e afetando a detectabilidade; eluir no mesmo tempo de retenção dos analitos, gerando resultados falso-positivos; afetar a porcentagem de recuperação do analito e provocar supressão ou aumento de ionização na resposta do detector, que é comum nas análises por LC-MS/MS.

No preparo de amostra, que é de fundamental importância no desenvolvimento de um método analítico, foi estabelecido um método QuEChERS na versão CEN 15662 modificada que extraiu analitos com características físico-químicas diferenciadas (acidez, solubilidade, volatilidade, estado físico, entre outros) de uma matriz complexa, contendo açúcares, pigmentos, vitaminas, minerais, entre outros, e em concentrações baixas ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou ng g^{-1}), utilizou pouca vidraria e instrumentos, com tempo de preparo relativamente curto, uma vez que, várias amostras foram simultaneamente preparadas, gerou um volume de resíduo menor que a extração em fase sólida com cartucho e não utilizou solventes clorados, o que contribuiu com a Química Verde.

O método desenvolvido e validado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango por determinação LC-MS/MS apresentou-se seletivo, exato e preciso, com valores de recuperação e CV nos intervalos recomendados pelos guias de validações, e permitiu detectar e quantificar analitos em concentrações inferiores aos LMR impostos pelas agências reguladoras.

Após a validação do método analítico, amostras de morango disponíveis no comércio puderam ser analisadas para verificar a presença de resíduos dos agrotóxicos estudados, permitindo que a qualidade do alimento fosse avaliada. As concentrações de resíduos dos agrotóxicos em morangos dependem da adoção das Boas Práticas Agrícolas, como quantidade e número de aplicações de agrotóxicos autorizados e do intervalo de segurança para o consumo dos alimentos, que são de responsabilidades dos produtores rurais que cultivam os alimentos. Outra grande preocupação nas análises de resíduos de agrotóxicos é a determinação de compostos que não são autorizados para o tipo específico de cultura, o que demonstra a falta de conscientização no momento do controle químico nas plantações, como também, ser um produto de degradação formado de uma aplicação de um agrotóxico autorizado. Estas irregularidades, concentrações de agrotóxicos acima dos seus LMR e presença de agrotóxicos não autorizados, foram constatadas nos morangos analisados.

Os resultados mostraram que o emprego das técnicas LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS é extremamente eficiente, devido as suas excelentes seletividades e detectabilidades nas análises de resíduos de agrotóxicos. As vantagens mais significativas do método desenvolvido utilizando a UHPLC foram a rapidez das análises, o menor volume de injeção de amostra e o consumo reduzido de solvente orgânico na MP, a detectabilidade ficou semelhante ou inferior a obtida por LC-MS/MS para agrotóxicos em baixas concentrações, porém atendeu os valores de LMR. Até o momento, a UHPLC-MS/MS possui muitas vantagens para cada vez mais se consolidar como uma técnica instrumental eficiente, rápida e ambientalmente correta para ser aplicada na área de determinação de resíduos de agrotóxicos, permitindo que os objetivos dos analistas sejam alcançados.

O método analítico desenvolvido e validado para análises de resíduos de agrotóxicos em morango pode ser empregado para monitorar a segurança alimentar, a conservação ambiental e a certificação na exportação de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 4, DE 18 de Janeiro de 2012. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html. Acessado em: Junho de 2013.

² Oshita, D.; Jardim, I.C.S.F. *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 52.

³ Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Revista Saúde Pública* 40(2) (2006) 361.

⁴ Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados que especifica. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1985 set. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/329_85.htm. Acessado em: Julho de 2013.

⁵ D'Amato C.; Torres J.P.M.; Malm, O. *Quím. Nova* 25(6) (2002) 995.

⁶ Stoppelli, I.M.B.S.; Magalhães, C.P. *Ciência & Saúde Coletiva* 10(91) (2005) 91.

⁷ Jardim, I.C.S.F.; Andrade, J.A.; Queiroz, S.C.N. *Quím. Nova* 32(4) (2009) 996.

⁸ Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, 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. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/LEIS/L7802.htm. Acessado em: Julho de 2013.

⁹ Brasil. Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que 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. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/decreto/2002/D4074.htm. Acessado em: Julho de 2013.

¹⁰ *United States Environmental Protection Agency - EPA. About pesticides.* Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>. Acessado em: Setembro de 2013.

¹¹ Sanches, S.M.; Silva, C.H.T.P.; Campos, S.X.; Vieira, E.M. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13 (2003) 53.

¹² Ribeiro, M.L.; Lourencetti, C.; Polese, L.; Navickiene, S.; Oliveira, L.C. *Holos Environment* 8(1) (2008) 53.

¹³ Planeta Orgânico. *Agrotóxicos.* Disponível em: <http://planetaorganico.com.br/site/index.php/agrotoxicos-2/>. Acessado em: Setembro de 2013.

¹⁴ Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Toxicologia de Praguicidas. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/arquivos-seguranca-do-trabalho/sequi5.pdf>. Acessado em: Setembro de 2013.

¹⁵ Embrapa. Sistema de produção. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acessado em: Julho de 2013.

¹⁶ Faria, N.M.X.; Fassa, A.G.; Facchini, L.A. *Ciência & Saúde Coletiva* 12(1) (2007) 25.

¹⁷ Velasco, L.O.M.; Capanema, L.X.L. *BNDES Setorial* 24 (2006) 69.

¹⁸ Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos - AENDA. Genéricos. Disponível em: <http://aenda.org.br>. Acessado em: Julho de 2013.

¹⁹ Kovalczuk, T.; Jech, M.; Poustka, J.; Hajslová, J. *Anal. Chim. Acta* 8 (2006) 577.

²⁰ Hiemstra, M.; Kok, A. *J. Chromatogr., A* 1154 (2007) 3.

²¹ Instituto Salus. *Uso de agrotóxicos no Brasil lidera ranking mundial.* Disponível em: <http://www.institutosalus.com/noticias/saude-publica/uso-de-agrotoxicos-no-brasil-lidera-ranking-mundial>. Acessado em: Julho de 2013.

-
- ²² Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 217.
- ²³ Agrosoft Brasil. *Brasil, maior consumidor de agrotóxicos do mundo*. Jornal Agrosoft, 2011. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/218371.htm>. Acessado em: Agosto de 2013.
- ²⁴ Clevo W.; Clem T. *Ecol. Econ.* 39 (2001) 449.
- ²⁵ Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A. *Pure and Appl. Chem.* 75(5) (2003) 631.
- ²⁶ McKinlay, R.; Plant, J.A.; Bell, J.N.B.; Voulvoulis, N. *Environ. Int.* 34 (2008) 168.
- ²⁷ Schwarzenbach, R.P.; Gschwend, P.M.; Imboden, D.M. *Environmental Organic Chemistry*. 2ª edição, USA, Wiley- Interscience, 1995.
- ²⁸ Ward, M.H.; Nuckols, J.R.; Weigel, S.J.; Maxwell, S.K.; Cantor, K.P.; Miller, R.S. *Environ. Health Persp.* 108(1) (2000) 5.
- ²⁹ Araújo, A.C.P.; Nogueira, D.P.; Augusto, L.G.S. *Rev. Saude Publ.* 34(3) (2000) 309.
- ³⁰ Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 9(1) (1999) 18.
- ³¹ Martínez, R.C.; Gonzalo, E.R.; Laespada, M.E.F.; Román, F.J.S.S. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 471.
- ³² Ribeiro, M.L.; Lourencetti, C.; Pereira, S.Y.; Marchi, M.R.R. *Quím. Nova* 30(3) (2007) 688.
- ³³ Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M. *Quím. Nova* 24(1) (2001) 27.
- ³⁴ Eichelberger J.W.; Lichtenberg, J.J. *Environ. Sci. Technol.* 5 (1971) 541.
- ³⁵ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas. Área técnica de saúde do trabalhador. Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada. Protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos. Brasília, 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/integra_agrotoxicos.pdf. Acessado em: Julho de 2013.
- ³⁶ Silva, J.J.O.; Alves, S.R.; Meyer, A.; Perez, F.; Sarcinelli, P.N.; Mattos, R.C.O.C.; Moreira, J.C. *Revista de Saúde Pública* 35(2) (2001) 130.
- ³⁷ Kato M.; Garcia E.G.; Wünsch Filho, V. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 32(116) (2007) 6.

-
- ³⁸ Fadini, M.A.M.; Pallini, A.; Venzon, M. *Cienc. Rural* 34(4) (2004) 1271.
- ³⁹ Farias, R. M.; Martins, C.R. *Revista da FZVA* 9(1) (2002) 33.
- ⁴⁰ Andrigueto, J.R.; Nasser, L.C.B.; Teixeira, J.M.A.; Simon, G.; Veras, M.C.V.; Medeiros, S.A.F. et al. *Produção Integrada de Frutas - PIF e Sistema Agropecuário de Produção Integrada - SAPI no Brasil*. Ministério da Agricultura; 2008.
- ⁴¹ Madail, J.C.M.; Antunes, L.E.C.; Reisser Junior, C.; Belarmino, L.C.; Neutzling, D.M.; Silva, B.A. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 53 (2007) 25.
- ⁴² Oliveira, R.P.; Scivittaro, W.B. *Rev. Bras. Frutic.* 28 (2006) 520.
- ⁴³ Françoso, I.L.T.; Couto, M.A.L.; Canniatti-Brazaca, S.G.; Arthur, V. *Ciência Tecnol. Alime.* 28(3) (2008) 614.
- ⁴⁴ Camargo Filho, W.P.; Camargo, F.P. *Informações Econômicas* 39(5) (2009) 42.
- ⁴⁵ Giménez, G.; Andriolo, J.; Godoi, R. *Cienc. Rural* 38 (2008) 273.
- ⁴⁶ Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Tabela de composição nutricional das hortaliças. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/util/tabelahortaliças.htm>. Acessado em: Julho de 2013.
- ⁴⁷ Bordignon Junior, C.L.; Francescato, V.; Nienow, A.A.; Calvete, E.; Reginatto, F.H. *Ciência Tecnol. Alime.* 29 (2009) 183.
- ⁴⁸ Hakkinen, S.H.; Torronen, A.R. *Food Res. Int.* 33 (2000) 517.
- ⁴⁹ Seeram, N.P.; Lee, R.; Scheuller, H.S.; Heber, D. *Food Chem.* 97 (2006) 1.
- ⁵⁰ Rocha, D.A.; Abreu, C.M.P.; Corrêa, A.D.; Santos, C.D.; Fonseca, E.W.N. *Rev. Bras. Frutic.* 30(4) (2008) 1124.
- ⁵¹ Andrigueto, J.R.; Kososki, A.R. *Desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil*. Brasília, Secretaria de Comércio Exterior, 2005. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/pin/pdf/p_01.pdf. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁵² Ciscato, C.H.P.; Gebara, A.B.; Monteiro, S.H. *Food Addit. Contam. B* 2(2) (2009) 140.
- ⁵³ Otto, R.F.; Morakami, R.K.; Reghin, M.Y.; Caíres, E.F. *Hortic. Bras.* 27(2) (2009) 217.
- ⁵⁴ Oliveira, R.P.; Scivittaro, W.B. *Hortic. Bras.* 27 (2009) 91.

-
- ⁵⁵ Oliveira, R.P.; Scivittaro, W.B. *Cienc. Rural* 38(9) (2008) 2613.
- ⁵⁶ Henz, G.P. *Hortic. Bras.* 28 (2010) 260.
- ⁵⁷ Tessarioli Neto, J.; Ortigoza, L.E.R.; Verdial, M.F. *Hortic. Bras.* 21(2) (2003) 231.
- ⁵⁸ Ferla, N.J.; Marchetti, M.M.; Gonçalves, D. *Biota Neotropica* 7(2) (2007) 1.
- ⁵⁹ Henrique, C.M.; Cereda, M.P. *Ciencia Tecnol. Alime.* 19(2) (1999) 1.
- ⁶⁰ Caldas, E.D.; Souza, L.C.K.R. *Revista de Saúde Pública* 34(5) (2000) 529.
- ⁶¹ FAO/WHO *Food Standards. Codex Alimentarius. Pesticide Residues in Food and Feed. Codex pesticides residues in food online database.* Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁶² Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Consulta Pública nº 43, de 2 de junho de 2005. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B10559-1-0%5D.PDF>. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁶³ Hu, R.; Hennion, B.; Urruty, L.; Montury, M. *Food Addit. Contam.* 16 (1999) 111.
- ⁶⁴ *Plan Departamental de Seguridad Alimentaria (MANA). Antioquia, Colombia.* Manual “Boas Práticas Agrícolas para a Agricultura Familiar” Disponível em: www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/pub45.pdf. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁶⁵ Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: Junho de 2013.
- ⁶⁶ Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Minuta de nota técnica para divulgação de relatório de atividades de 2010. Brasília, 05 de dezembro de 2011.
- ⁶⁷ Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Minuta de nota técnica para divulgação de relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília, 29 de outubro de 2013.
- ⁶⁸ Toassa, E.C.; Machado, E.H.S.; Szarfarc, S.C.; Philippi, S.T.; Leal, G.V;S. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition* 34(1) (2009) 175.
- ⁶⁹ Associação de Agricultura Orgânica – AAO. *Agricultura orgânica.* Disponível em: <http://aao.org.br/aao/>. Acessado em: Agosto de 2013.

-
- ⁷⁰ Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 6.323, de 27 de Dezembro de 2007 que regulamenta a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: http://http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁷¹ Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: http://http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm. Acessado em: Agosto de 2013.
- ⁷² Krolow, A.C.; Schwengber, J.; Ferri, N. *Revista Brasileira de Agroecologia* 2(2) (2007) 1732.
- ⁷³ Wan, H.B.; Wong, M.K. *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 43.
- ⁷⁴ Vidal, L.M.; Arrebola, F.J.; Sánche, M.M.; *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 203.
- ⁷⁵ Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S.J. *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281.
- ⁷⁶ Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R. *Quím. Nova* 32(6) (2009) 1620.
- ⁷⁷ Wilkowska, A.; Biziuk, M. *Food Chem.* 125 (2011) 803.
- ⁷⁸ LeDoux, M. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1021.
- ⁷⁹ Schenck, F.J.; Callery, P.; Gannett, P.M.; Daft, J.R.; Lehotay, S.J. *J. AOAC Int.* 85(5) (2002) 1177.
- ⁸⁰ Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. *J. AOAC Int.* 86(2) (2003) 412.
- ⁸¹ Taylor, M.J.; Hunter, K.B.; Lindsay, D.; Le Bouhellec, S. *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 225.
- ⁸² Jansson, C.; Pihlström, T.; Österdahl, B.G.; Markides, K.E. *J. Chromatogr., A* 1023 (2004) 93.
- ⁸³ Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C. *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 33.
- ⁸⁴ Zamora, T.; Pozo, O. J.; López, F. J.; Hernández, F. *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 137.

-
- ⁸⁵ Falqui-Gao, C.; Wang, Z.; Urruty, L.; Pommier, J.J.; Montury, M. *J. Agr. Food Chem.* 49 (2001) 5092.
- ⁸⁶ Papadakis, E. N.; Vryzas, Z.; Papadopoulou-Mourkidou, E. *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 6.
- ⁸⁷ Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 197.
- ⁸⁸ Sagratini, G.; Mañes, J.; Giardiná, D.; Damiani, P.; Picó, Y. *J. Chromatogr. A* 1147(2) (2007) 135.
- ⁸⁹ Chai, M.K.; Tan, G.H. *Food Chem.* 117 (2009) 561.
- ⁹⁰ Chai, M.K.; Tan, G.H. *Food Chem.* 123 (2010) 760.
- ⁹¹ Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L. *Talanta* 66 (2005) 917.
- ⁹² Topuz, S.; Özhan, G.; Alpertunga, B. *Food Control* 16(1) (2005) 87.
- ⁹³ Chen, L.; Ding, L.; Jin, H.; Song, D.; Zhang, H.; Li, J.; Zhang, K.; Wang, Y. *Anal. Chim. Acta* 589(2) (2007) 239.
- ⁹⁴ Sheu, C.; Chen, H.C. *J. Food Drug Anal.* 17(3) (2009) 198.
- ⁹⁵ Yang, X.; Zhang, H.; Liu, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.C.; Dong, A.J.; Zhao, H.T.; Sun, C.H.; Cui, J. *Food Chem.* 127(2) (2011) 855.
- ⁹⁶ Soler, C.; Mañes, J.; Pico, Y. *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 41.
- ⁹⁷ Radisc, M.; Grujic, S.; Vasiljevic, T.; Lausevic, M. *Food Chem.* 113 (2009) 712.
- ⁹⁸ Tanaka, T.; Hori, T.; Asada, T.; Oikawa, K.; Kawata, K. *J. Chromatogr. A* 1175(2) (2007) 181.
- ⁹⁹ Pat, S.; Bart, T.; Frank, D. *J. Chromatogr. A* 1000(1-2) (2003) 299.
- ¹⁰⁰ Juan-García, A.; Mañes, J.; Font, G.; Picó, Y. *J. Chromatogr. A* 1050(2) (2004) 119.
- ¹⁰¹ Picó, Y.; Fernández, M.; Ruiz, M.J.; Font, G. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 117.
- ¹⁰² Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Lightfield, A.R.; *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
- ¹⁰³ CVUA-STUTT GART. QuEChERS - A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf/> Acessado em: Julho de 2013.

-
- ¹⁰⁴ Lehotay, S.J.; Son, K.A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatpiboon, N. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548.
- ¹⁰⁵ Lehotay, S.J.; Anastassiades, M.; Majors, R.E. *LCGC North Am.* 28(7) (2010) 504.
- ¹⁰⁶ Lanças, F.M. *Extração em Fase Sólida - SPE*. São Carlos, Editora Rima, 2004.
- ¹⁰⁷ I.C.S.F. Jardim. *Sci. Chromatogr.* 2 (2010) 13.
- ¹⁰⁸ Prestes, O.D.; Adaime, M.B.; Zanella, R. *Sci. Chromatogr.* 3 (2011) 51.
- ¹⁰⁹ Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Yun, S.J. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630.
- ¹¹⁰ Koesukwiwat, U.; Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Dorweiler, K.J.; Leepipatpiboon, N. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5950.
- ¹¹¹ Koesukwiwat, U.; Lehotay, S.J.; Miao, S.; Leepipatpiboon, N. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6692.
- ¹¹² K. Mastovská, K.J. Dorweiler, S.J. Lehotay, J.S. Wegscheid, K.A. Szpylka, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5959.
- ¹¹³ Pizzutti, I.R.; Kok, A.; Cardoso, C.D.; Reichert, B.; Kroon, M.; Wind, W.; Righi, L.W.; Silva, R.C. *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 16.
- ¹¹⁴ Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglioni, G.; Cappiello, A. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491.
- ¹¹⁵ Krueve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58.
- ¹¹⁶ Fernandes, V.C; Domingues, V.F.; Mateus, N.; Delerue-Mato, C. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7582.
- ¹¹⁷ Lehotay, S.J.; Koesukwiwat, U.; Van der Kamp, K.; Hans, G.; Mol, J.; Leepipatpiboon, N. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7544.
- ¹¹⁸ Lanças, F.M. *Cromatografia Líquida Moderna*. Campinas, Editora Átomo, 2009.
- ¹¹⁹ Lanças, F.M. *Sci. Chromatogr.* 1(2) (2009) 35.
- ¹²⁰ Mühlen, C.; Lanças, F.M. *Quim. Nova* 27 (2004) 747.
- ¹²¹ Maldaner, L.; Jardim, I.C.S.F. *Quim. Nova* 32 (2009) 214.

-
- ¹²² Meyer, V.R. *Practical High Performance Liquid Chromatography*, 4th ed., New York, John Wiley & Sons, 2004.
- ¹²³ Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*, Campinas, Editora da UNICAMP, 2006.
- ¹²⁴ Holler, F.J.; Skoog, D.A.; Crouch, S.R. *Princípios de Análise Instrumental*, Porto Alegre, Editora Bookman, 2009. Traduzido por C. Pasquini e J.J.R. Rohwedder.
- ¹²⁵ Abad, A.; Moreno, M.J.; Pelegri, R.; Martinez, M.I.; Saez, A.; Gamon, M.; Montoya, A. *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 3.
- ¹²⁶ García-Reyes, J.F.; Ferrer, C.; Gómez-Ramos, M.J.; Molina-Díaz, A.; Fernández, A.A.R. *Trends Anal. Chem.* 26(3) (2007) 239.
- ¹²⁷ Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vekey, K. *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 74.
- ¹²⁸ Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. *Quim. Nova*, 31 (2008) 623.
- ¹²⁹ Harris, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6^a ed., Rio de Janeiro, LTC Editora, 2005. Traduzido por J.A.P. Bonapace e O.E. Barcia.
- ¹³⁰ Helen, V.; Botitsi, S.D.; Garbis, Economou, A.; Despina F.T. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 907.
- ¹³¹ Vessecchi, R.; Lopes, N.P.; Gozzo, F.C.; Dörr, F.A.; Murgu, M.; Lebre, D.T.; Abreu, R.; Bustillos, O.V.; Riveros, J.M. *Quim. Nova*, 34(10) (2011) 1875.
- ¹³² *Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. Document nº. SANCO/10684/2009. Supersedes Document nº SANCO/3131/2007. Implementado em: 01/01/2010.
- ¹³³ Gomez-Ramos, M.M.; Ferrer, C.; Malato, O.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A.R. *J. Chromatogr. A* 1287 (2013) 24.
- ¹³⁴ Soler, C.; James, K.J.; Pico, Y. *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 73.
- ¹³⁵ Sagratini, A.; Mañes, J.; Giardiná, D.; Damiani, P.; Pico, Y. *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 135.
- ¹³⁶ Peruga, A.; Grimalt, S.; López, F.J.; Sancho, J.V.; Hernández, F. *Food Chem.* 135 (2012) 186.
- ¹³⁷ Kmellár, B.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Fodor, P.; Fernández-Alba, A.R. *Talanta* 84 (2011) 262.

-
- ¹³⁸ Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M.; Pastor-Montoro E.; Romero-González, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 947.
- ¹³⁹ Queiroz, S.C.N.; Ferracini, V.L.; Rosa, M.A. *Quím. Nova* 35 (2012) 185.
- ¹⁴⁰ Van De Steene, J.C.; Lambert, W.E. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 19 (2008) 713.
- ¹⁴¹ Apollonio, L.G.; Pianca, D.J.; Whittall, I.R.; Maher, W.A.; Kyd, J.M. *J. Chromatogr. B* 836 (2006) 111.
- ¹⁴² Peters, F.T. *Clin. Biochem.* 44 (2011) 54.
- ¹⁴³ Roux, A.; Lison, D.; Junot, C.; Heilier, J.F. *Clin. Biochem.* 44 (2011) 119.
- ¹⁴⁴ Leandro, C.C.; Hancock, P.; Fussell, R.J.; Keely, B.J. *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94.
- ¹⁴⁵ Wang, J.; Chow, W.; Leung, D. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1513.
- ¹⁴⁶ Núñez, O.; Gallart-Ayala, H.; Martins, C.P.B.; Lucci, P. *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298.
- ¹⁴⁷ Lanças, F.M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. São Carlos, Editora RiMa, 2004.
- ¹⁴⁸ Ribani, M.; Bottoli, C.G.B.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. *Quím. Nova*, 27 (5) (2004) 771.
- ¹⁴⁹ ANVISA. Guia para o controle de qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA, Julho de 2007.
- ¹⁵⁰ *Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis*, CAC/GL 40-1993. *Codex Alimentarius Commission*. Revision 2003. Amendment 2010.
- ¹⁵¹ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO, Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03 – Fevereiro de 2010.
- ¹⁵² EURACHEM (*The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*). First English Edition 1.0 - 1998.
- ¹⁵³ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>. Acessado em: Junho de 2013.

-
- ¹⁵⁴ *EU Pesticides Database. Pesticide EU-MRLs. Regulation (EC) nº 396/2005. Acessado em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/. Acessado em: Julho de 2013.*
- ¹⁵⁵ Lehotay, J.; Mastovská, K.; Lightfield, A.R. *J. AOAC Int.* 88(2) (2005) 615.
- ¹⁵⁶ Mastovská, K.; Lehotay, S.J. *J. Chromatogr., A* 1040 (2004) 259.
- ¹⁵⁷ Melo, L.F.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 51.
- ¹⁵⁸ Melo, L.F.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 75.
- ¹⁵⁹ Vigna, C.R.M.; Morais, L.S.R.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 211.
- ¹⁶⁰ Jardim, I.C.S.F.; Maldaner, L.; Lourenço, J.; Fioravanti, L.M.A.; Collins, C.H. *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2917.
- ¹⁶¹ Segato, M.P. *Preparo, Caracterização e Aplicação de Fases Estacionárias de Poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) Sorvidas e Imobilizadas sobre Sílica e Sílica Zirconizada*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.
- ¹⁶² Cunha, S.C.; Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Fernandes, J.O.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620.
- ¹⁶³ Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.
- ¹⁶⁴ Pizzutti, I.R.; Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O.D. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4539.
- ¹⁶⁵ Lee, S.W.; Choi, J.; Cho, S.; Yu, H.; Abd El-Aty, A.M.; Shim, J. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4366.
- ¹⁶⁶ Euerby, M.R.; Petersson, P.; Campbell, W.; Roe, W. *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 138.
- ¹⁶⁷ Stevenson, P.G.; Soliven, A.; Dennis, G.R.; Gritti, F.; Guiochon, G.; Shalliker, R.A. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5377.
- ¹⁶⁸ Croes, K.; Steffens, A.; Marchand, D.H.; Snyder, L.R. *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 123.
- ¹⁶⁹ Markopoulou, C.; Tweedlie, T.; Watson, D.; Skellern, G.; Reda, H.; Petersson, P.; Bradstock, H.; Euerby, M. *Chromatographia* 70 (2009) 705.

¹⁷⁰ Plössl, F.; Giera, M.; Bracher, F. *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19.

¹⁷¹ Díez, C.; Traag, W.A.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J. *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 11.

¹⁷² Q-sep™ QuEChERS d-SPE Tubes for Extract Cleanup. Disponível em: www.restek.com/quechers. Acessado em: Julho de 2013.

¹⁷³ Rocha, D.A.; Abreu, C.M.P.; Corrêa, A.D.; Santos, C.D.; Fonseca, E.W.N. *Rev. Bras. Frutic.* 30(4) (2008) 1124.

¹⁷⁴ Marín, J.M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1410.

¹⁷⁵ Niessen, W.M.A.; Manini, P.; Andreoli, R. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881.

ANEXO

Avaliação da SPE Dispersiva e em Cartucho para *Clean-up* utilizando QuEChERS Modificado para Determinação de Multirresíduos de Agrotóxicos em Morango por UPLC-DAD.

RESUMO

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra tornou-se muito importante na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Um procedimento de *clean-up* adequado contribui para um tempo de vida mais longo do sistema cromatográfico e fornece uma melhor detectabilidade para o método analítico. O objetivo deste estudo foi avaliar a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) em temperatura ambiente e baixa, com gelo seco, e também, com utilização de cartucho (c-SPE), no *clean-up* de resíduos dos agrotóxicos, abamectina, atrazina, azoxistrobina, carbaril, clorpirifós, difeconazol, diflubenzurom, fenazaquin, fludioxonil, procimidona e simazina, em morango, usando o método QuEChERS CEN 15662 modificado, baseado na versão *European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN-15662*, e determinação por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (UPLC-DAD). O sorvente utilizado na etapa de limpeza foi o PSA (*primary-secondary amine*) que tem a função de remover principalmente açúcares e pigmentos. Para uma avaliação mais detalhada do preparo de amostra foram analisados a coloração do extrato final, a quantidade de coextratos da matriz, o efeito matriz (ME) e o perfil cromatográfico. Os resultados mostraram que todos os preparos de amostras foram eficientes para as análises de multirresíduos com diferentes características físico-químicas e presentes em concentrações baixas, numa matriz complexa, como o morango. Os resultados de recuperação, para a maioria dos agrotóxicos, estavam no intervalo de 70-120% e os coeficientes de variação (CV) foram $\leq 20\%$, conforme

recomendações dos guias para análises em alimentos. A limpeza dos extratos de morango foi mais eficiente, com a utilização de d-SPE à temperatura ambiente, considerando as maiores recuperações dos agrotóxicos, além de resultar em um método mais barato, rápido e de fácil manipulação.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de preparos de amostras tornou-se muito importante na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. O crescimento dessa área de pesquisa está relacionado com a preocupação com a saúde do consumidor e do agricultor, o impacto ambiental, bem como as exigências de certificados de exportação, devido à aplicação de agrotóxicos em alimentos. No Brasil, o morango é uma das culturas mais contaminadas com agrotóxicos não autorizados e acima dos limites máximos de resíduos (LMR).¹

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é feito empregando-se uma técnica de preparo de amostra associada a uma de determinação dos analitos, sendo que, a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC) são as mais utilizadas nas análises de alimentos.^{2, 3, 4}

Dentre as etapas analíticas no desenvolvimento de métodos de análises de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, o preparo de amostra é considerado uma das mais críticas e importantes, devido a necessidade de extrair de matrizes complexas, analitos de propriedades físico-químicas diferentes e presentes em concentrações baixas. Somado a isto, o preparo de amostra compreende etapas laboriosas, que demandam tempo, geram grandes quantidades de resíduos tóxicos e são de custo elevado.^{5, 6, 7}

Em 2003, *Anastassiades et al.*,⁸ com o objetivo de superar as limitações práticas das técnicas de preparo de amostra de multirresíduos de agrotóxicos utilizadas e disponíveis, introduziram um novo procedimento, denominado método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que consiste na extração com solvente orgânico, seguida por partição líquido-líquido com adição de sais, para efeito

salting out, tamponamento quando necessário, secagem e uma etapa de *clean-up* por d-SPE.^{5, 9, 10}

Dependendo das características físico-químicas dos analitos e da composição da matriz, foram introduzidas modificações no método QuEChERS, surgindo as diferentes versões como:^{11, 12}

- Original (*Anastassiades, Lehotay et al. - 2003*), não tamponado;
- AOAC *Official Method (Lehotay - 2007)*, utiliza o tampão acetato;
- *European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662 (Anastassiades - 2008)*, utiliza o tampão citrato.

Estas diferentes versões têm a finalidade de aumentar a eficiência de extração e minimizar a degradação de alguns agrotóxicos que são sensíveis em soluções com valores de pH elevados. Outras modificações podem ocorrer, em função da composição da amostra como, o emprego de diferentes solventes orgânicos na etapa de extração, pela substituição da acetonitrila por acetona ou acetato de etila;⁸ a utilização de sorventes diversificados na etapa de *clean-up*, sendo o octadecilsiloxano C18 e carbono grafitizado (*Graphitized Carbon Black - GCB*) os mais empregados nas extrações de resíduos de agrotóxicos em alimentos,^{13, 14, 15, 16, 17} para minimizar a quantidade dos interferentes da matriz; e a aplicação de temperatura baixa, com o objetivo de diminuir os coextratos lipídicos e outros que são congelados com a água.^{11, 14, 18}

O procedimento de d-SPE do método QuEChERS é simples, uma vez que, o extrato da amostra e o sorvente são agitados para distribuição uniforme e favorecimento do *clean-up*, em seguida, centrifugados para separar as fases e removido o sobrenadante, que é o extrato final da amostra. Neste procedimento, o *clean-up* dos interferentes e a redução de água residual ocorrem simultaneamente sem consumir tempo com outras etapas experimentais. A remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, o que facilita a precipitação de coextrativos ou interferentes polares e permite a injeção direta do extrato final nos equipamentos de GC ou LC.^{5, 8, 19} No *clean-up* empregando c-SPE, utiliza-se cartucho, coluna ou disco. O procedimento de extração, em contraposição à d-SPE, engloba várias etapas como, condicionamento do cartucho, aplicação da amostra, lavagem com solvente ou *clean-up* e eluição dos analitos.^{20, 21}

Na Tabela 1 estão apresentadas as vantagens e desvantagens da SPE que empregam cartuchos e a fase dispersiva.

Tabela 1: Comparação entre c-SPE *versus* d-SPE. Adaptado de *Wilkowska e Biziuk*.⁶

	c-SPE	d-SPE
Vantagens	- Garante melhor <i>clean-up</i>	- Apresenta melhor interação que contribui para recuperação e <i>clean-up</i> - Exige menor quantidade de sorventes - Gera menor volume de resíduo
Desvantagens	- Exige aparatos (cartuchos e <i>vacuum manifolds</i>) - Exige várias etapas do condicionamento até eluição - Gera grande volume de resíduo	- Uso do sorvente apenas para remover os coextratos da matriz e não analitos

O preparo de amostra, principalmente, a etapa de *clean-up* pode contribuir favoravelmente na determinação analítica, tanto na parte instrumental, por fornecer extratos com menor quantidade de interferentes evitando danos ou diminuindo a manutenção do sistema cromatográfico e aumentando o tempo de vida útil das colunas, como também na detecção, com melhor detectabilidade, pela maior razão sinal/ruído que permite alcançar limites de detecção (LOD) menores e menor possibilidade de falso-positivos que são atribuídos ao efeito matriz.^{2, 22, 23}

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar na d-SPE, a variação da temperatura, ambiente e baixa utilizando gelo seco, e também, comparar o *clean-up* dispersivo com o emprego de cartucho no preparo de amostra QuEChERS modificado, baseado na versão CEN-15662, para multirresíduos de agrotóxicos em morango por UPLC-DAD. O sorvente utilizado na etapa de *clean-up* foi o PSA e para avaliação do preparo de amostra foram comparados a coloração do extrato final, a quantidade de interferentes

determinada por medidas gravimétricas, o efeito matriz e o perfil cromatográfico, concomitantemente, com os valores de recuperação dos agrotóxicos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados e os solventes aplicados no preparo de amostra e nas análises cromatográficas foram de grau analítico e HPLC, respectivamente. Acetonitrila e metanol foram obtidos da Tedia (*California, USA*), tolueno da *J.T. Baker (Mexico State, Mexico)*, ácido fórmico foi adquirido da *Synth (São Paulo, Brasil)*, sulfato de magnésio anidro da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), citrato de sódio tribásico diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquidratado da *Sigma-Aldrich (Missouri, USA)*, cloreto de sódio da Ecibra (São Paulo, Brazil), Bondesil PSA (40 μm) da Varian (*California, USA*) e Supelclean™ PSA SPE Tube (200mg/3mL) da *Supelco (Pennsylvania, USA)*. A água ultrapura foi obtida no sistema *Milli-Q Plus system da Millipore (Massachusetts, USA)* com 18,2 M Ω cm de resistividade e foi usada para preparar todas as soluções e as FM.

Os agrotóxicos empregados neste trabalho foram selecionados por constarem nas listas dos órgãos reguladores nacionais e internacionais e apresentarem valores de LMR definidos para cultura do morango. Também foram selecionados alguns agrotóxicos que não são permitidos para serem aplicados na cultura do morango, porém são encontrados com grande frequência nas análises realizadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), sob responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A seleção dos agrotóxicos também foi realizada em função dos mesmos possuírem grupos cromóforos que permitissem a sua detecção na região do UV, devido ao emprego do detector de DAD.

Os agrotóxicos que foram utilizados pertencem à diversas classes químicas como: avermectina, benzoiluréia, estrobilurina, fenilpirrol, metilcarbamato de naftila, organofosforado, quinazolina, triazina e triazol, e foram adquiridos das empresas *Chem Service (Pennsylvania, USA)*, *Dr. Ehrenstorfen GmbH (Bavaria, Germany)*, *Fluka* ou *Sigma-Aldrich Chemie GmbH (North Rhine-Westphalia, Germany)* e *Pestanal (Lower*

Saxony, Germany), todos com pureza maior que 97%. Na Figura 1 estão disponíveis as estruturas químicas dos agrotóxicos selecionados neste estudo.

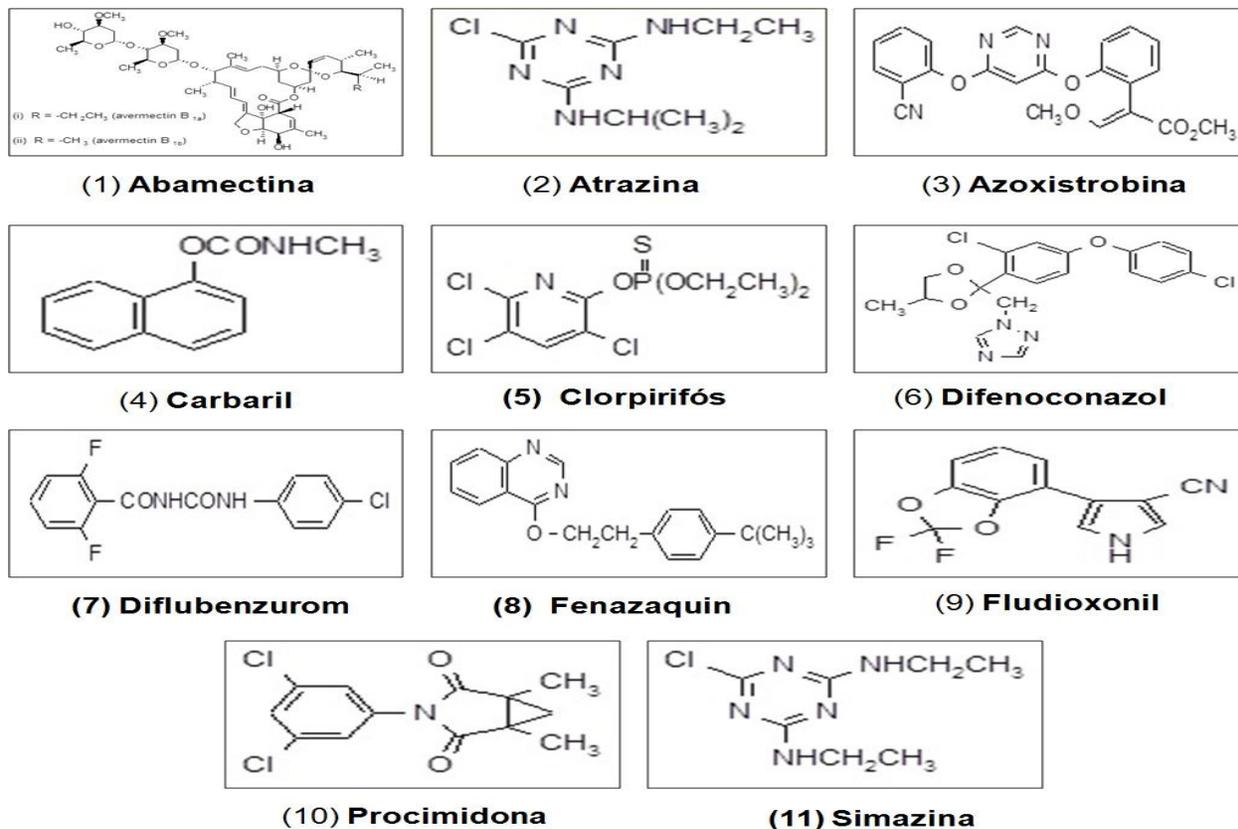


Figura 1: Estruturas dos agrotóxicos estudados em amostras de morango determinados por UPLC-DAD.

3.2. Equipamentos

Na análise cromatográfica foi utilizado o cromatógrafo a líquido de ultra eficiência *Acquity*, acoplado ao detector por arranjo de diodos (UPLC-DAD) da *Waters* (*Manchester, UK*). O sistema de aquisição de dados foi o *software Empower 2.0*. A coluna cromatográfica foi *Acquity UPLC*® BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula) precedida da coluna de guarda *Van Guard*™ BEH C18 (5 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm diâmetro de partícula), todas da *Waters*.

Os equipamentos e materiais utilizados foram: agitador Vórtex, *Phoenix*, modelo AP 56; balança analítica, *Sartorius*, modelo CP 225 D; balança analítica, *Fisher Scientific*, A-250; banho ultrassom, *Thornton*, modelo T14; banho ultrassom, *Thornton*, modelo T50; bomba de vácuo, *Millipore*; bomba de vácuo, WP, 6111560; bomba KNF *Laboport Neuberger* acoplado a *manifold Supelco Visiprep*TM (12 amostras); centrífuga *Hettich*, modelo *Rotofix 32A*; estufa, EDG Equipamentos, 10 P-S; estufa, *Soc Fabbe LTDA*; micropipetas de (0,5-10 ; 10-100 ; 100-1000 ; 500-5000) μL , *Eppendorf Research*.

3.3. Preparo das soluções de agrotóxicos

A solução estoque de cada agrotóxico foi preparada em metanol, na concentração de 1 mg mL^{-1} , exceto para a simazina que foi preparada em $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, devido a sua baixa solubilidade neste solvente. A partir da solução estoque foram realizadas diluições adequadas para preparar as soluções de trabalho que consistiram de mistura de todos os agrotóxicos em metanol. As soluções foram estocadas em freezer a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que as soluções estoque foram armazenadas por até quatro meses e as soluções de trabalho foram preparadas semanalmente.

3.4. Preparo de amostra

O desenvolvimento do preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e laboriosas na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Foi utilizado o método QuEChERS modificado na versão CEN 15662, com extrato final acidificado com ácido fórmico. A acidificação tem como finalidade fornecer maior estabilidade para alguns agrotóxicos que são sensíveis ou degradam em valores de pH mais altos, e deve-se considerar que na etapa de *clean-up*, com a utilização do sorvente PSA, ocorre um aumento no pH da solução da amostra.²⁴ Para avaliação dos preparos de amostra foi utilizada a concentração de 250 ng g^{-1} dos agrotóxicos, que foram adicionados em brancos de morango, segundo o procedimento geral mostrado na Figura 2.

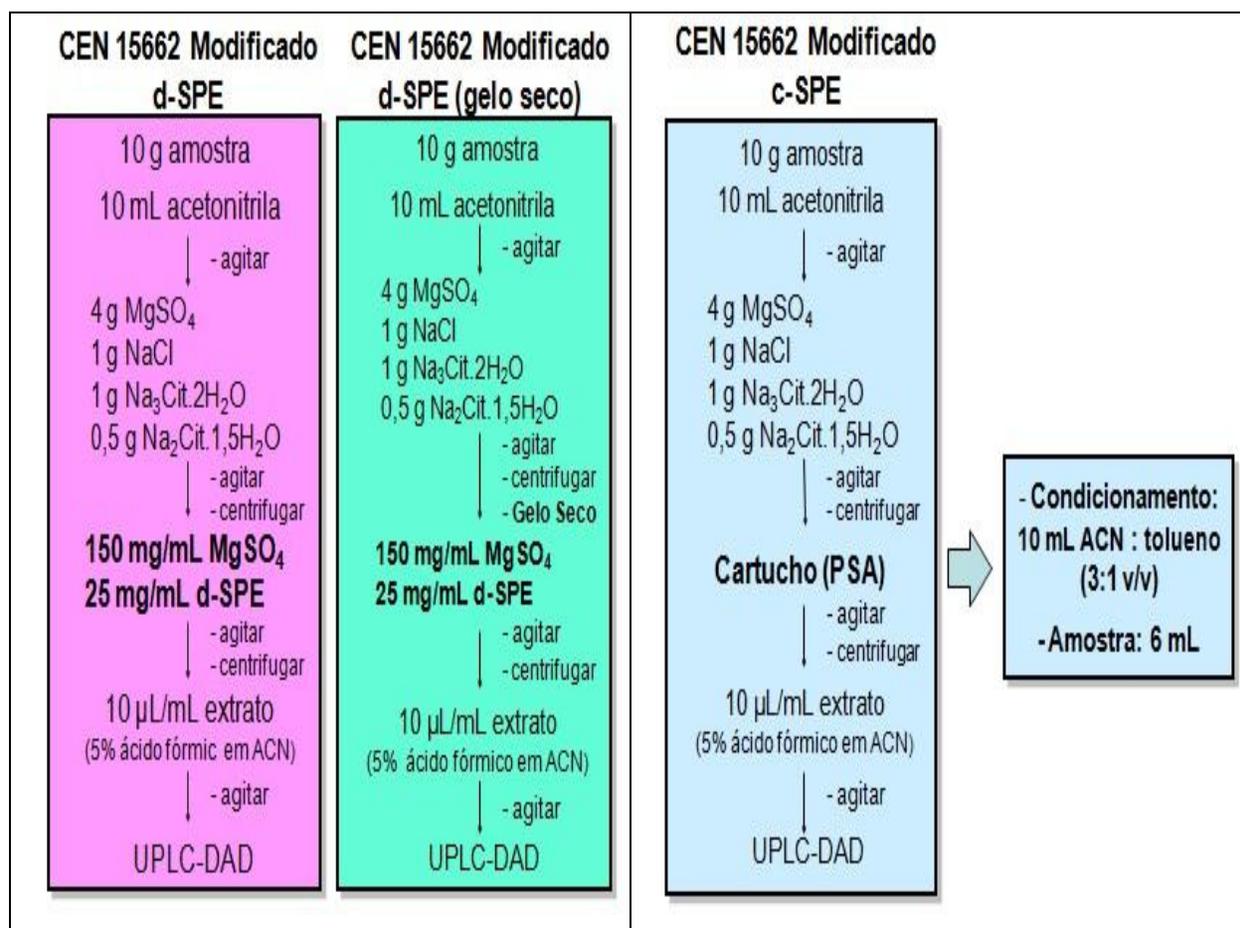


Figura 2: Fluxograma do método QuEChERS, na forma d-SPE e c-SPE, empregado no preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos de morango determinados por UPLC-DAD.

No preparo de amostra à baixa temperatura, uma grande desvantagem é que para obter o congelamento da amostra, o tempo de preparo torna-se mais longo, porém, com o auxílio do gelo seco, em poucos minutos pode obter o congelamento da amostra.

3.4.1. Avaliação do preparo de amostra

A etapa de *clean-up* tem influência em diversos parâmetros como recuperação, seletividade e efeito matriz que influenciam tanto no desempenho do sistema cromatográfico como no de detecção.

O sorvente PSA é um material à base de sílica, na qual se encontra quimicamente ligado o etilenodiamino-N-propil (*ethylenediamine-N-propyl*). O PSA tem na estrutura uma amina primária e secundária, que atua como um trocador aniônico fraco.^{5, 25, 26} Este sorvente é capaz de remover açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos de antocianinas que estão contidos no morango.

Os desempenhos dos três procedimentos de preparos de amostra foram avaliados em função do grau de limpeza dos extratos obtidos das amostras de morango, fortificadas com 250 ng g⁻¹ dos agrotóxicos estudados, segundo alguns parâmetros discutidos a seguir:^{11, 27, 28, 29}

3.4.1.1. Coloração do extrato final

Avaliação visual da cor, intensidade e transparência do extrato final. Estas características estão relacionadas com a presença de coextratos da matriz que não foram removidos na etapa de *clean-up*.

3.4.1.2. Recuperação

A recuperação da extração foi determinada por comparação da resposta analítica das amostras fortificadas com os agrotóxicos estudados, em concentração de 250 ng g⁻¹, antes (branco da amostra) e depois (extrato final) do preparo de amostra, usando o método QuEChERS modificado. A recuperação pode ser calculada utilizando-se a Equação 1.

$$R (\%) = \frac{\textit{área (fortificação branco da matriz)}}{\textit{área (fortificação extrato final)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

3.4.1.3. Medidas gravimétricas

Os extratos das amostras foram divididos em duas partes, sem *clean-up* e com *clean-up*, em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo foi pesado para avaliar a porcentagem de interferentes que permaneceram no extrato após a etapa de limpeza dos extratos de morango.^{11, 14, 27, 28} O experimento teve a finalidade de estimar a eficiência do *clean-up* no preparo de amostra usando d-SPE e c-SPE.

3.4.1.4. Efeito matriz

O efeito matriz foi utilizado para avaliar a presença de interferentes que coeluíram com o analito na corrida cromatográfica e podem influenciar na recuperação e seletividade da análise. Foi calculado pela razão da resposta analítica do extrato final da amostra, que foi fortificado com a solução dos agrotóxicos, pela solução dos padrões em solvente, na mesma concentração.^{30, 31}

O ME pode ser calculado pela Equação 2.

$$ME (\%) = \frac{\text{área (fortificação extrato final)}}{\text{área (padrão em solvente)}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Resultados abaixo de 100% indicam que houve supressão de sinal, aproximadamente 100% representa que não tem efeito de matriz e acima de 100% a análise demonstrou acréscimo de sinal no detector.²²

Após a avaliação dos parâmetros citados, pode-se selecionar o melhor preparo de amostra, principalmente em função da recuperação e eficiência do *clean-up* para multirresíduos de agrotóxicos em morango, determinados por UPLC-DAD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação das condições cromatográficas

Por meio da utilização do conversor *Acquity UPLC Columns Calculator* foram obtidas as condições cromatográficas de transferência do LC para o UPLC: volume de injeção: 1,9 μL ; vazão: 0,12 mL min^{-1} ; temperatura do forno de 30 $^{\circ}\text{C}$, eluição por gradiente: fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase móvel B: (metanol), variando de 70% A a 95 % B em 10 min.

Na Figura 3 pode ser visualizado o cromatograma da separação dos agrotóxicos aplicados em amostras de morango obtido nas condições cromatográficas acima.

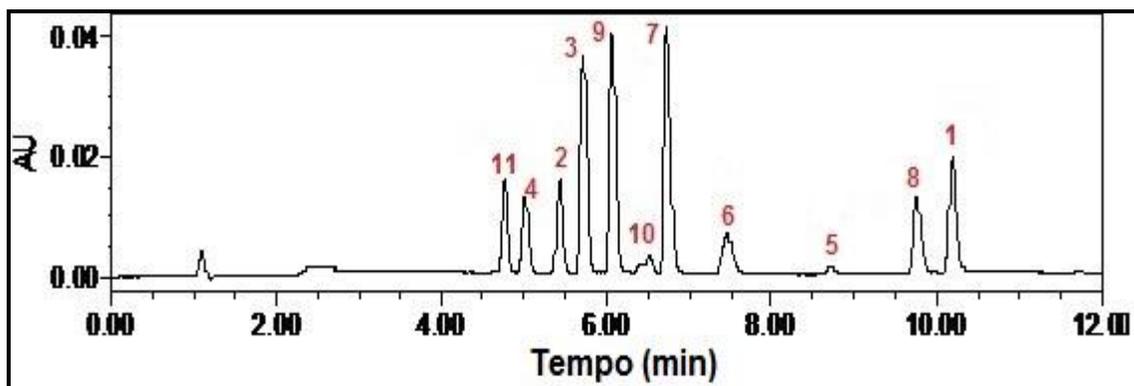


Figura 3: Cromatograma de separação dos agrotóxicos aplicados em morangos, na concentração de 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtido no comprimento de onda de 254 nm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 1,9 μL ; vazão: 0,12 mL min^{-1} ; temperatura do forno de 30 $^{\circ}\text{C}$, eluição por gradiente: fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase móvel B: (metanol), variando de 70% A a 95 % B em 10 min. A identificação dos picos em ordem alfabética: (1) Abamectina, (2) Atrazina, (3) Azoxistrobina, (4) Carbaril, (5) Clorpirifos, (6) Difeconazol, (7) Diflubenzurom, (8) Fenazaquin, (9) Fludioxonil, (10) Procimidona e (11) Simazina.

4.2. Avaliação do preparo de amostra

Para selecionar um dos três procedimentos utilizando o QuEChERS modificado, baseado na versão CEN-15662, foram testados vários parâmetros para uma avaliação

mais detalhada em função da extração dos agrotóxicos e do grau de limpeza do extrato de morango. Os resultados estão descritos a seguir:

4.2.1 Coloração do extrato final

Inicialmente, fez-se uma observação visual para avaliar o grau de limpeza, porém não se pode determinar com exatidão se um extrato encontra-se mais limpo que o outro, dependendo do procedimento aplicado. As colorações dos extratos finais de morango não apresentaram grandes variações, sendo amarelo claro para d-SPE e d-SPE com gelo seco, e amarelo mais escuro para c-SPE.

Visualmente, não houve significativa diferença nas colorações dos extratos após o *clean-up*, não sendo possível selecionar o melhor procedimento de preparo de amostra em morango.

4.2.2. Perfil cromatográfico

A LC permite análises qualitativas e/ou quantitativas. As análises do perfil cromatográfico, no mesmo comprimento de onda, obtidas pelas injeções dos brancos de amostra com preparos de amostras diferentes, podem fornecer um indicativo da quantidade de coextratos não removidos pela etapa de *clean-up*. Ressaltando que, um comprimento de onda pode favorecer a detectabilidade dos analitos, no entanto, pode não ser seletivo e fornecer grande absorção para os interferentes da amostra. Na análise de multirresíduos que engloba vários agrotóxicos em concentrações baixas, deve-se preocupar com a seletividade do método para não resultar em resultados falso-positivos, desde que, o método desenvolvido também consiga atingir os limites de concentrações requeridos para as análises.

Na Figura 4 podem ser visualizados os perfis cromatográficos obtidos de brancos de amostra de morango empregando o método QuEChERS modificado, com *clean-up* d-SPE, em temperatura ambiente e baixa, e c-SPE.

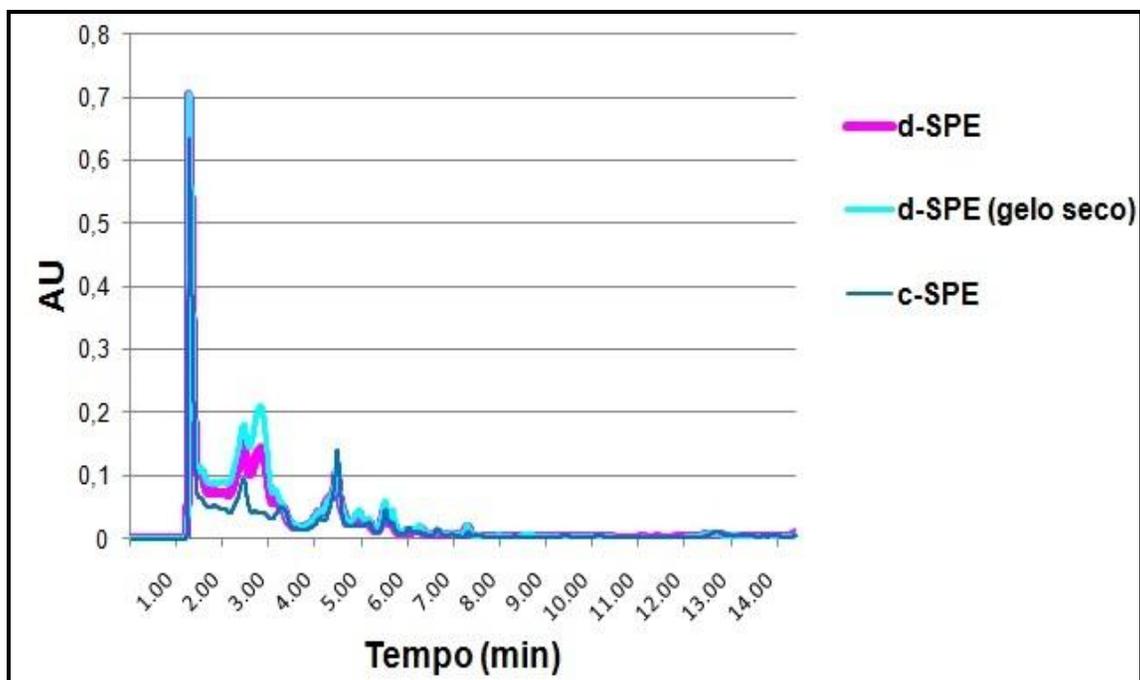


Figura 4: Cromatogramas dos brancos da amostra obtidos nos diferentes preparos de amostras. Condições cromatográficas similares à Figura 3.

Analisando os picos majoritários que estão entre os tempos de retenção de 1 a 5 minutos, nos cromatogramas da Figura 4, verifica-se que o emprego da temperatura baixa, com o auxílio de gelo seco, não contribuiu para uma remoção maior de interferentes e o *clean-up* com emprego de cartucho apresentou menor intensidade de sinal analítico neste intervalo, apontando para uma melhor limpeza do extrato de morango. Para o intervalo de 5 a 14 minutos, verifica-se que os três procedimentos extraíram praticamente as mesmas quantidades de interferentes. Portanto, analisando o perfil cromatográfico pode-se concluir que houve uma maior remoção de interferentes com emprego de cartucho de PSA.

4.2.3. Recuperação

Na Figura 5 encontram-se os valores de porcentagens de recuperação (%) com seus respectivos CV (%), indicados pelas barras de erros, obtidos na extração dos agrotóxicos, na concentração de 250 ng g⁻¹, em amostras de morango.

Observou-se, pelos resultados obtidos, que todos os agrotóxicos, exceto o clorpirifós no preparo de amostra empregando c-SPE, apresentaram valores de recuperação entre 70-120 % e CV < 20%, conforme recomendações dos guias de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos.^{32, 33} O clorpirifós pertence a classe dos organofosforados e possui um coeficiente de partição (Kow= 4,7), razão da concentração do analito no octanol pela concentração do analito na água, com valor grande. Quando o analito possui um valor de coeficiente de partição alto demonstra que existe uma grande concentração do clorpirifós na fase orgânica em relação à fase aquosa, ou maior transferência do analito na fase apolar que em relação à fase polar. No procedimento do preparo de amostra empregando c-SPE, o cartucho foi condicionado com acetonitrila:tolueno (3:1 v:v) que diminui a polaridade da solução pelo caráter apolar do solvente tolueno, conseqüentemente, este analito pode ter ficado retido no cartucho na etapa de aplicação da amostra, e seus valores de recuperação foram menores devido à perda do analito. Entretanto, como valores de recuperação fora do intervalo de 70-120%, podem ser aceitos, desde que o CV seja < 20%,³² e uma vez que, o valor de CV do clorpirifós foi 1,9%, indicando que está na faixa aceitável e que o método é preciso.

Analisando a Figura 5, observa-se que o preparo de amostra empregando d-SPE, em temperatura ambiente e baixa, apresentaram maiores valores de recuperação que em relação ao método c-SPE, contudo, os três procedimentos de preparo de amostra poderiam ser aplicados em morangos. Os valores de recuperação demonstram a grande versatilidade do QuEChERS, numa amostra complexa, com agrotóxicos de características físico-química diversificadas, em concentrações baixas, que permite variações no método sem afetar a eficiência do preparo de amostra.

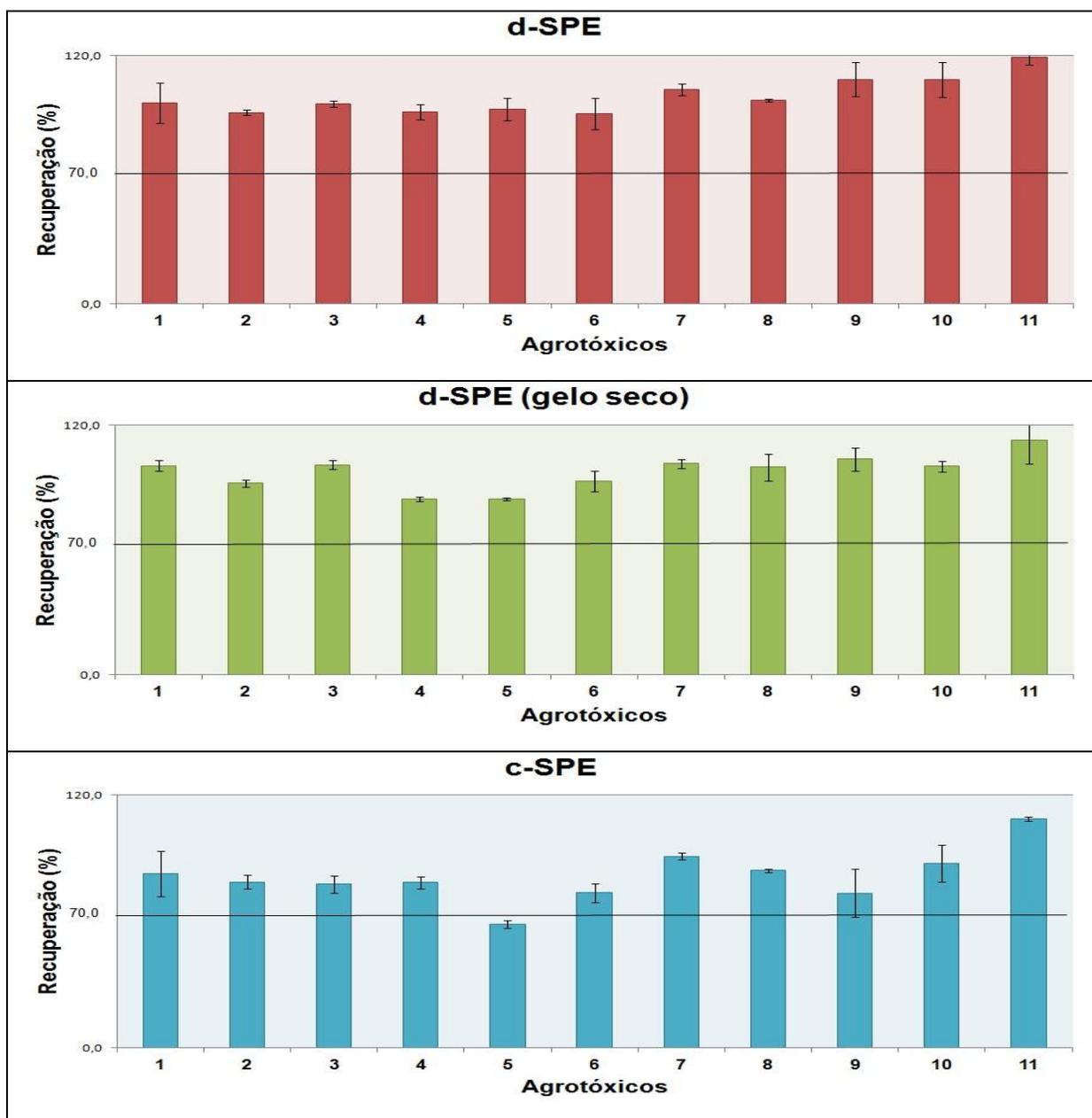


Figura 5: Recuperação (%) e CV (%) dos agrotóxicos, na concentração de 250 ng g⁻¹, em morango empregando UPLC-DAD, com diferentes procedimentos de limpeza do método QuEChERS modificado na versão CEN-15662. A identificação dos picos em ordem alfabética: (1) Abamectina, (2) Atrazina, (3) Azoxistrobina, (4) Carbaril, (5) Clorpirifos, (6) Difeconazol, (7) Diflubenzurom, (8) Fenazaquin, (9) Fludioxonil, (10) Procimidona e (11) Simazina.

4.2.4. Coextratos por medidas gravimétricas

Pela análises das massas dos extratos, com e sem *clean-up*, avaliaram-se a quantidade de interferentes que restaram após o emprego dos diferentes procedimentos de *clean-up* em amostras de morango. Os resultados são mostrados na Figura 6.

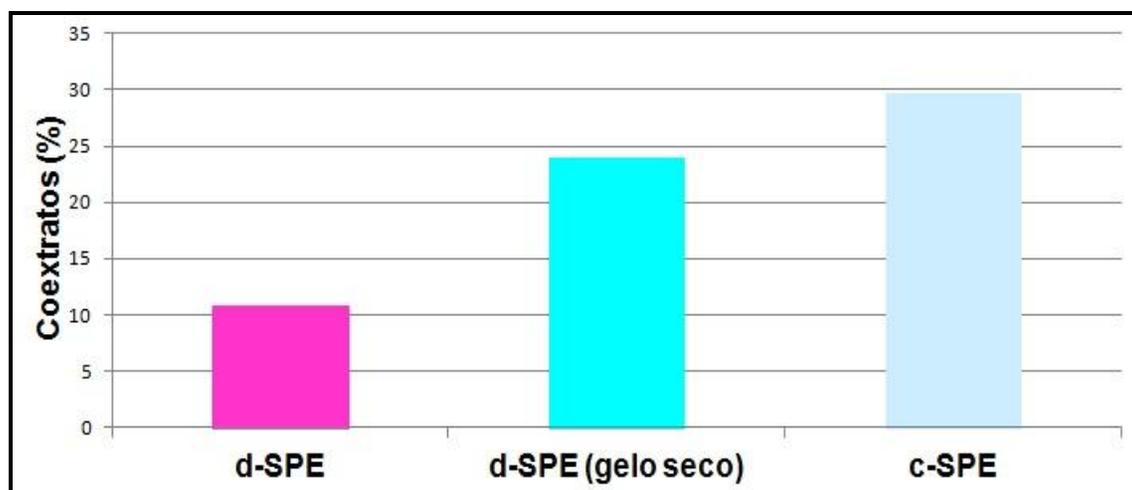


Figura 6: Coextratos (%) em amostras de morango após a etapa de *clean-up* em diferentes preparos de amostras.

Pela análise da Figura 6, o preparo de amostra d-SPE em temperatura ambiente apresentou a melhor eficiência de *clean-up*, pois a porcentagem de coextratos no extrato final foi significativamente menor que as obtidas em relação ao d-SPE com gelo seco e c-SPE. Foi verificado que os três procedimentos de preparos de amostras não afetaram significativamente os valores de recuperação dos agrotóxicos, que foram apresentados e discutidos no item (4.2.3.), porém, pelos resultados de coextratos (%) que permaneceram após *clean-up* das amostras de morango, verificou-se que eles exercem grande influência na limpeza dos extratos, uma vez que, o *clean-up* empregando cartucho apresentou, aproximadamente, o triplo de quantidade de interferentes que não foram removidos pela etapa de limpeza em relação a extração d-

SPE em temperatura ambiente. A menor porcentagem de coextratos não removidos pode contribuir positivamente em aspectos envolvendo a dectabilidade do método desenvolvido, por fornecer uma razão sinal/ruído maior, além de reduzir a necessidade de manutenção do cromatógrafo por injetar menos interferentes na corrida analítica.

4.2.5 Efeito matriz

O efeito matriz deve ser avaliado em todo desenvolvimento de método, pois pode gerar erros na determinação analítica devido a presença de interferentes da matriz.³⁴

A Figura 7 apresenta o efeito de matriz de todos os agrotóxicos selecionados neste estudo, com determinação por UPLC-DAD, em morangos.

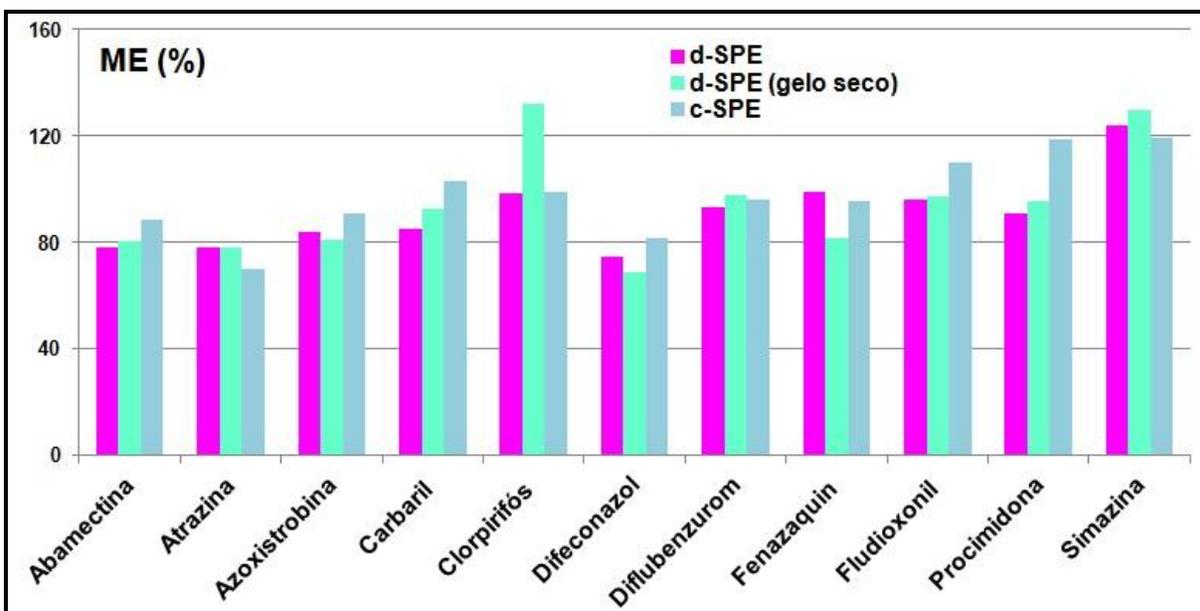


Figura 7: Efeito Matriz (%) dos agrotóxicos, na concentração de 250 ng g⁻¹, em amostras de morango por UPLC-DAD, com diferentes procedimentos de limpeza do método QuEChERS modificado na versão CEN-15662.

Analisando a Figura 7, o preparo de amostra utilizando cartucho apresentou-se como o mais adequado para a maioria dos agrotóxicos, exceto a atrazina, por não

apresentarem efeito matriz, ou seja, forneceram valores de ME (%) menores que $\pm 20\%$ de variação do sinal analítico do extrato final fortificado em relação ao solvente puro na mesma concentração. O preparo de amostra dispersivo em temperatura ambiente e à baixa temperatura (gelo seco) apresentaram comportamentos semelhantes de efeito matriz em que aproximadamente 64% dos agrotóxicos analisados não apresentaram efeito matriz, e a baixa temperatura não auxiliou na remoção de outros interferentes que não foram removidos em temperatura ambiente.

Analisando a Figura 7 verificou-se que a simazina apresentou acréscimo de sinal em todos os preparos de amostras, e este comportamento pode estar relacionado com a grande quantidade de interferentes que é coeluída no início da corrida cromatográfica. Nas análises empregando o detector DAD existe a obrigatoriedade de realizar a separação analítica para fazer a identificação como quantificação, conseqüentemente, os analitos terão a possibilidade de serem separados mais facilmente dos interferentes que numa análise utilizando o detector de espectrômetro de massas (MS). Neste aspecto, o MS apresenta maior vantagem, pois permite uma boa quantificação e confiabilidade na identificação, mesmo ocorrendo coeluições no tempo de retenção do analito de interesse devido ao uso do monitoramento de reações múltiplas (MRM). Isto torna o desenvolvimento do método mais rápido, pois o tempo de preparo de amostra requerido é menor pela alta seletividade do detector.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os três procedimentos de preparo de amostra foram eficientes para análises de multiresíduos de agrotóxicos, com diferentes características físico-químicas, em concentrações baixas, numa matriz complexa como o morango.

Os resultados de recuperação ficaram na faixa de 70-120% e o CV < 20% para a maioria dos agrotóxicos, como recomendado para as análises em alimentos. O preparo de amostra d-SPE a temperatura ambiente foi mais eficiente, por fornecer recuperações mais altas; extrato com aspecto físico mais límpido; melhor *clean-up* pela maior quantidade de interferentes removidos, que foi verificado pela menor porcentagem de resíduos no extrato final. Além disso, ser mais barato, rápido e fácil que os outros

procedimentos estudados. Entretanto, a c-SPE apresentou melhores resultados no efeito matriz e perfil cromatográfico ligeiramente melhor, confirmando a menor quantidade de interferentes. Analisando estes parâmetros para o preparo de amostra empregando cartucho, pode-se concluir que, neste comprimento de onda em que foram analisadas as amostras, os interferentes de maior detectabilidade ou que estão em maior quantidade na composição da amostra foram removidos, restando os outros compostos como, pigmentos de antocianinas, açúcares ou ácidos orgânicos do morango que ainda restaram no extrato e puderam ser comprovadas pela quantidade de coextratos após o *clean-up* nas análises gravimétricas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Oshita, D.; Jardim, I.C.S.F. *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 52.
- ² Vidal, L.M.; Arrebola, F.J.; Sánche, M.M.; *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 203.
- ³ Hiemstra, M.; Kok, A. *J. Chromatogr., A* 1154 (2007) 3.
- ⁴ Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S.J. *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281.
- ⁵ Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R. *Quím. Nova* 32(6) (2009) 1620.
- ⁶ Wilkowska, A.; Biziuk, M. *Food Chem.* 125 (2011) 803.
- ⁷ LeDoux, M. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1021.
- ⁸ Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. *J. AOAC Int.* 86(2) (2003) 412.
- ⁹ Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Lightfield, A.R.; *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
- ¹⁰ CVUA-STUTTGART. QuEChERS - *A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products*. Disponível em: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>. Acesso em: Julho de 2013.
- ¹¹ Lehotay, S.J.; Son, K.A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatiboon, N. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548.

-
- ¹² Lehotay, S.J.; Anastassiades, M.; Majors, R.E. *LCGC North Am.* 28(7) (2010) 504.
- ¹³ Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Yun, S.J. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630.
- ¹⁴ Koesukwiwat, U.; Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Dorweiler, K.J.; Leepipatpiboon, N. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5950.
- ¹⁵ Koesukwiwat, U.; Lehotay, S.J.; Miao, S.; Leepipatpiboon, N. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6692.
- ¹⁶ K. Mastovská, K.J. Dorweiler, S.J. Lehotay, J.S. Wegscheid, K.A. Szpylka, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5959.
- ¹⁷ Pizzutti, I.R.; Kok, A.; Cardoso, C.D.; Reichert, B.; Kroon, M.; Wind, W.; Righi, L.W.; Silva, R.C. *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 16.
- ¹⁸ Cabrera, L.C.; Martins, M.L.; Primel, E.G.; Prestes, O.D.; Adaime, M.B.; Zanella, R. *Sci. Chromatogr.* 4(3) (2012) 227.
- ¹⁹ Prestes, O.D.; Adaime, M.B.; Zanella, R. *Sci. Chromatogr.* 3 (2011) 51.
- ²⁰ Lanças, F.M. *Extração em Fase Sólida - SPE*. São Carlos, Editora Rima, 2004.
- ²¹ Jardim, I.C.S.F. *Sci. Chromatogr.* 2(1) (2010) 13.
- ²² Kruve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58.
- ²³ Marín, J.M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1410.
- ²⁴ J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
- ²⁵ Plössl, F.; Giera, M.; Bracher, F. *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19.
- ²⁶ Díez, C.; Traag, W.A.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J. *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 11.
- ²⁷ Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.
- ²⁸ Cunha, S.C.; Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Fernandes, J.O.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620.
- ²⁹ Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglioni, G.; Cappiello, A. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491.

³⁰ Pizzutti, I.R.; Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O.D. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4539.

³¹ Lee, S.W.; Choi, J.; Cho, S.; Yu, H.; Abd El-Aty, A.M.; Shim, J. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4366.

³² ANVISA. Guia para o controle de qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA, Julho de 2007.

³³ *Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. Document nº. SANCO/10684/2009. Supersedes Document nº SANCO/3131/2007. Implementado em: 01/01/2010.

³⁴ Niessen, W.M.A.; Manini, P.; Andreoli, R. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881.