



UNICAMP

Instituto de Química
Departamento de Química Analítica

Tese de Doutorado

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM UVA *IN NATURA*

Louise Lee da Silva Magalhães

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Co-orientadora: Dr^ª. Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz

Fevereiro de 2011
Campinas – SP

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M27d	Magalhães, Louise Lee da Silva. Desenvolvimento e validação de método para determinação multirresíduo de agrotóxicos por cromatografia líquida de alta eficiência em uva in natura / Louise Lee da Silva Magalhães. – Campinas, SP: [s.n], 2011. Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Coorientadora: Profa. Dra. Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Cromatografia líquida. 2. Agrotóxico. 3. Espectrometria de massas. 4. Método QuECHERS . I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Queiroz, Sonia Cláudia do Nascimento. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.
-------------	---

Título em inglês: Development and validation of methods for determination of multiresidue pesticides for high performance liquid chromatography in grape in nature

Palavras-chaves em inglês: Liquid chromatography, Pesticides, Mass spectrometric, QuECHERS method

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Prof. Dr. Anízio Marcio de Faria (FACIP-UFU), Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime (DQ-UFSM), Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 04/02/2011

Aos meus pais, Aluisio (*in memorian*) e Edna, que foram desde sempre os meu maiores mestres, meus eternos amores e exemplos de vida, pelo amor, dedicação, carinho, respeito, por acreditarem nos meus ideais e me incentivarem a alcançá-los e por tudo o que me ensinaram e ainda me ensinam

Aos meus queridos irmãos, Écia Jane, Aluisio Walcones, Welcon Dawis e Fernando Luis, por todo incentivo, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida

À essa minha linda família, que em muitos momentos acreditaram mais em mim do que eu mesma, que, apesar da distância, sustentaram comigo cada momento de dificuldade, dedico este trabalho e todo o meu amor.

Muito obrigada! Muito do que sou hoje eu devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado o dom da vida, pela sua imensa proteção e por ter permitido que eu nascesse no meio de uma família maravilhosa.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, confiança e apoio constante. Por entenderem e aceitarem o tempo e a distância.

Ao meu noivo Marcelo, que fez parte da última etapa no desenvolvimento desse trabalho e me acompanhou durante momentos alegres ou difíceis, sempre com muita paciência e amor. Obrigada por fazer parte da minha vida. Eu te amo!

À Prof^a. Dr^a. Isabel Jardim, pela humildade e sabedoria com que me conduziu durante a realização deste trabalho. Pela oportunidade, incentivo, amizade, cobrança, confiança, respeito e pelos muitos ensinamentos que permitiram que eu evoluísse como pessoa e profissional nestes anos de doutorado. Muito obrigada!

À Dr^a Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz, por todo carinho, amizade e atenção, pela sua participação e valiosas sugestões ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Carol pela disponibilidade, contribuições, ensinamentos e importantes sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos do LabCrom, Anizio (S.), Daniel (Dani Boy), Lais (Nipônica S.), Mariza, Milena (Milex), Lucília, Liane, Rafael (Rafinha), Camila, Rose, Priscila (Pri), Marcel, Elias, Carla, Karen, Vanessa, Patricia (Patilene) e Juliano, pelas conversas, momentos alegres, companheirismo, respeito e agradável convívio.

Em especial, ao “meu amigo Ani”, pela amizade, carinho, atenção, companheirismo, sugestões, ajudas, pelos bons momentos de conversa, gargalhadas e diversão. Muito obrigada por sua amizade! Ao Daniel, pelos momentos maravilhosos que passamos

sempre divertidos. À Laís, pela companhia, pelos momentos de descontração sempre regadas a boas e muitas gargalhadas, durante todos estes anos de doutorado, seja na UNICAMP ou na EMBRAPA. À Mariza, pela amizade, carinho, pelo companheirismo nos momentos de trabalho, fossem eles favoráveis ou desfavoráveis, mas sempre acreditando que daria certo. À Lucília, por me ajudar sempre que pedi socorro, pelo carinho e atenção. Adoro todos vocês!

Ao pessoal do Laboratório de Resíduos e Contaminantes, EMBRAPA Meio Ambiente: Márcia, Débora, Maria, Godoi, Marley, Geane e Vera Ferracine. Em especial à Márcia, Débora e Maria pela amizade, pelas inúmeras ajudas, sugestões e ensinamentos. A ajuda de vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. À Godoi, pelo grande carinho por mim e amizade. A Simone que transformava qualquer simples reunião em uma festa, sempre sorrindo e de bem com a vida. Vocês foram responsáveis por momentos maravilhosos que tive durante o período em que passei na EMBRAPA. Obrigada pelo grande aprendizado.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

CURRICULUM VITAE

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química analítica, na Universidade Federal do Maranhão - UFMA, São Luís – MA, Julho de 2003. Título da dissertação: **Estudo do potencial de contaminação de alguns agrotóxicos em ecossistemas aquáticos, seguido de sua determinação multirresidual utilizando extração em fase sólida (EFS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD)**, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Gilvanda Silva Nunes.

Graduação em Química Industrial, na Universidade Federal do Maranhão - UFMA, São Luís – MA, março de 2000. Título da monografia: **Estudo comparativo da extração de metais potencialmente biodisponíveis em sedimentos superficiais de ambientes aquáticos**, sob orientação do Prof. Dr. Bruno de Brito Gueiros.

2. EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

Programa de Estágio de Docência II (PED II)
Disciplina: QA-581 (Métodos em Química Analítica Instrumental)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Programa de Estágio de Docência II (PED II)
Disciplina: QA-313 (Química III)
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Programa de Estágio de Docência
Disciplina: Química Analítica III.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA.

3. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Fersol Indústria e Comércio S.A. (Jun/2009 a Mai/2010) – Indústria Química de Médio Porte – Nacional. Cargo: Químico Pleno. Contrato em regime CLT. Período de 13 de março de 2009 a 11 de maio de 2010.

4. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos apresentados em eventos nacionais: 12

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM UVA *IN NATURA*. Nos últimos anos, uma das considerações mais importantes no sistema produtivo de frutas é a capacidade de gerar produtos de qualidade e saudáveis, atendendo os requisitos de sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e a viabilidade econômica, mediante a utilização de tecnologias não agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. Métodos multirresíduos para determinação de agrotóxicos em frutas frescas são cada vez mais necessários, devido a sua importância em análises de rotina que envolve a saúde pública, o monitoramento ambiental e o comércio internacional. Os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos compreendem, basicamente, três etapas: a amostragem, o preparo de amostra e a separação e determinação dos analitos. O objetivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de um método compreendendo o preparo de amostra, no qual foram empregadas as técnicas de extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) ou o método QuEChERS, a definição da separação, identificação e quantificação, rápida e eficiente, de alguns agrotóxicos aplicados em uva *in natura*, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por arranjo de diodos (DAD) ou por espectrometria de massas em série (EM/EM). O melhor método foi validado por meio do estudo dos parâmetros: precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), curva analítica, intervalo de linearidade, detectabilidade (limite de detecção, LD, e limite de quantificação, LQ), seletividade e robustez. O método de EFS seguido por CL-EM/EM mostrou-se linear em uma ampla faixa de concentração e os LQ obtidos, em nível de ng mL^{-1} , permitiram que os limites máximos de resíduos (LMR) impostos pelas agências reguladoras fossem atingidos. Porém, o método que resultou em melhores recuperações, menor tempo de análise, identificações confiáveis e menor concentração detectável foi a extração pelo método QuEChERS seguida da determinação por CL-EM/EM.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINATION OF MULTIRESIDUES OF PESTICIDES IN FRESH GRAPES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY In recent years, one of the most important considerations in fruit production is the ability to generate healthy products with high quality within the requirements of environmental sustainability, food security and economic viability, through the use of technologies that are not harmful to either the environment or health human. Methods for multiresidue determination of pesticides in fresh fruits are increasingly required due to their importance in routine analysis involving public health, environmental monitoring and international trade. The methods for analysis of pesticide residues in foods include three basic steps: sampling, sample preparation, and separation and determination of the analytes. The aim of this study was to develop a method of sample preparation using techniques such as liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE), and the QuEChERS method, followed by separation, identification and quantification using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (DAD) or tandem mass spectrometry (MS/MS), for a fast and efficient multiresidue method of some pesticides used in grape cultivation. The best methodology was validated through determination of the parameters: precision (repeatability and intermediate precision), accuracy (recovery), calibration curve, linearity range, detectability (detection limit (LOD) and limit of quantification (LOQ)), selectivity and robustness. The method using SPE and LC-MS/MS showed linearity over a wide concentration range and LQ at the level of ng mL^{-1} , within the maximum residue limits (MRL) set by regulatory agencies. However, the method that resulted in improved recoveries, reduced analysis time, good detectability and reliable identifications was the QuEChERS method for extraction followed by LC-MS/MS.

ÍNDICE

	Lista de Abreviaturas-----	xix
	Lista de Tabelas-----	xxi
	Lista de Figuras-----	xxiii
1	INTRODUÇÃO-----	1
	1.1 Uva – origem, características e propriedades-----	3
	1.2 Agrotóxicos-----	5
	1.3 Métodos de análise-----	7
	1.3.1 Técnicas de Preparo de amostra-----	7
	1.3.1.1 Extração líquido-líquido (ELL)-----	8
	1.3.1.2 Extração em fase sólida (EFS)-----	8
	1.3.1.3 Método QuEChERS-----	11
	1.3.2 Técnicas de separação e determinação dos analitos -----	15
	1.3.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (CL-EM/EM)-----	17
	1.3.2.1.1 Fontes de ionização (ou interfaces)-----	18
	1.3.2.1.2 Analisador de massa-----	20
	1.4 Validação de métodos-----	25
	1.4.1 Seletividade-----	27
	1.4.2 Linearidade e Faixa Linear de Trabalho-----	27
	1.4.3 Precisão-----	29
	1.4.4 Exatidão-----	31
	1.4.5 Limite de Detecção (LD)-----	32
	1.4.6 Limite de Quantificação (LQ)-----	33
	1.4.7 Robustez-----	34
2	OBJETIVOS-----	35
3	PARTE EXPERIMENTAL-----	36
	3.1 Materiais e reagentes-----	36
	3.1.1 Reagente, solventes e cartuchos-----	36
	3.1.2 Padrões de agrotóxicos-----	37
	3.2 Equipamentos e Materiais-----	37
	3.3 Sistemas cromatográficos-----	38
	3.4 Seleção dos agrotóxicos estudados-----	39
	3.5 Soluções estoque e de trabalho-----	44
	3.6 Amostras de uva niágara rosada-----	44
	3.7 Otimização das condições cromatográficas e identificação dos compostos estudados -----	45

3.7.1	Empregando CLAE-DAD-----	45
3.7.2	Empregando CL-EM/EM-----	46
3.8	Estudo de métodos de preparo de amostra -----	46
3.8.1	Extração Líquido-Líquido (ELL)-----	47
3.8.2	Extração em Fase Sólida (EFS)-----	49
3.8.3	Método QuEChERS-----	51
3.9	Validação da metodologia-----	53
3.9.1	Seletividade-----	53
3.9.2	Linearidade e Faixa Linear de Trabalho-----	53
3.9.3	Precisão-----	54
3.9.4	Exatidão-----	54
3.9.5	Limite de Detecção (LD)-----	54
3.9.6	Limite de Quantificação (LQ)-----	54
3.9.7	Robustez-----	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	56
4.1	Desenvolvimento de Método Empregando CLAE-DAD-----	56
4.1.1	Método de separação 1-ELL-CLAE-DAD -----	56
4.1.2	Método de separação 2-ELL-CLAE-DAD -----	60
4.1.3	Método de separação 3: EFS-CLAE-DAD-----	62
4.2	Desenvolvimento e validação do método empregando CL-EM/EM-----	68
4.2.1	Determinação das condições cromatográficas de separação por CL-EM/EM-----	68
4.2.2	Otimização do método de preparo de amostra para CL-EM/EM-----	72
4.2.2.1	Extração em fase sólida (EFS)-----	72
4.2.2.2	Método QuEChERS-----	78
4.2.3	Validação do método por EFS e QuEChERS seguido por CL-EM/EM-----	81
4.2.3.1	Seletividade-----	81
4.2.3.2	Linearidade e faixa linear de trabalho-----	81
4.2.3.3	Limite de detecção e quantificação-----	85
4.2.3.4	Exatidão e precisão-----	87
4.2.3.5	Robustez-----	90
4.2.4	Análise de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e do Distrito de Barão Geraldo -----	90
4.3	Comparações entre as técnicas cromatográficas CLAE-DAD x CL-EM/EM e entre os métodos de preparo de amostras ELL, EFS e o método QuEChERS-----	94
4.3.1	Comparações entre as técnicas cromatográficas CLAE-DAD x CL-EM/EM empregadas-----	94
4.3.2	Comparações entre as técnicas de preparo de amostra ELL x EFS x Método QuEChERS-----	95

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	97
6	CONCLUSÕES-----	98
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
API	ionização à pressão atmosférica (do inglês Atmospheric Pressure Ionization)
APCI	ionização química a pressão atmosférica (do inglês Atmospheric Pressure chemical Ionization)
CID	dissociação induzida por colisão (do inglês Collision-Induced Dissociation)
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-EM/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-DAD	cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos
CL-EM	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CL-EM/EM	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série
CLUE-EM	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas
CV	coeficiente de variação
DAD	detector por arranjo de diodos
ELL	extração líquido-líquido
EM	detecção por espectrometria de massas
EM/EM	detecção por espectrometria de massas em série
ESF	extração em fase sólida
EFS-D	extração em fase sólida dispersiva
ESI	ionização por eletrosbulização (do inglês Electrospray Ionization)
EU	Comunidade Européia
FAO	Food and Agriculture Organization
FM	fase móvel
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
HAc	ácido acético
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	limite de detecção
LDi	limite de detecção do instrumento

LDm	limite de detecção do método
LMR	limites máximos de resíduos
LQ	limite de quantificação
LQi	limite de quantificação do instrumento
LQm	limite de quantificação do método
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	monitoramento de reações múltiplas (do inglês multiple reaction monitoring)
OIE	Organização Internacional da Saúde Animal
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PIF	Produção Integrada de Frutas
PNRV	Programa Nacional de Controle de Resíduos Químicos e Biológicos em Vegetais
PNSQV	Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal
PSA	amina primária-secundária (do inglês Primary Secondary amine)
QuEChERS	do inglês “quick, easy, cheap, effective, rugged and safe”
RSD	desvio padrão relativo
SANCO	Direção-Geral para Saúde e Consumidores (do inglês Directorate General for Health and Consumer Affairs - European Commission)
SIM	monitoramento dos íons seleccionados (do inglês Selected Ion Monitoring)
TIC	cromatograma de íons totais (do inglês Total Ion Chromatogram)
UE	União Européia
UV	Ultra-violeta
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization)

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Modos de análise em EM/EM-----	22
Tabela 02	Níveis de recuperação e faixa de coeficiente de variação -----	30
Tabela 03	Agrotóxicos estudados, suas características e estruturas químicas-----	41
Tabela 04	Recuperações e coeficientes de variação obtidos empregando o método de ELL-CLAE-DAD (método de separação 1)-----	59
Tabela 05	Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados determinados por ELL-CLAE-DAD (método de separação 2)-----	62
Tabela 06	Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados por EFS-CLAE-DAD (método de separação 2)-----	64
Tabela 07	Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados por EFS-CLAE-DAD (método de separação 3)-----	67
Tabela 08	Parâmetros do CL-EM/EM otimizados para os 13 agrotóxicos estudados -----	69
Tabela 09	Equações da reta e coeficientes de correlação das curvas analíticas, na matriz uva, obtidas para os compostos estudados empregando EFS- CL-EM/EM-----	82
Tabela 10	Equações da reta e coeficientes de correlação das curvas analíticas, na matriz uva, obtidas para os compostos estudados empregando o método QuEChERS seguido de CL-EM/EM-----	83
Tabela 11	Faixas lineares obtidas por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados, empregando EFS seguida de CL-EM/EM-----	84
Tabela 12	Faixas lineares obtidas por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados, empregando o método QuEChERS seguido de CL-EM/EM-----	84
Tabela 13	Limites de detecção e quantificação do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados empregando EFS seguida por CL-EM/EM-----	85
Tabela 14	Limites de quantificação do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados para o método QuEChERS seguido por CL-EM/EM -----	86
Tabela 15	Recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método EFS seguido por CL-EM/EM-----	88
Tabela 16	Recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método QuEChERS seguido por CL-EM/EM-----	89
Tabela 17	Concentração de tebuconazol e difenoconazol nas amostras de uva adquiridas no comércio empregando a EFS-CL-EM/EM-----	91
Tabela 18	Concentração de tebuconazol e difenoconazol nas amostras de uva adquiridas no comércio empregando o método QuEChERS-CL-EM/EM-----	92
Tabela 19	Comparação entre as técnicas de preparo de amostra ELL x EFS x Método QuEChERS-----	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do processo de EFS-----	10
Figura 2	Estrutura do sorvente PSA-----	12
Figura 3	Esquema representativo do procedimento original do método QuEChERS-----	14
Figura 4	Esquema do instrumento triplo quadrupolo-----	21
Figura 5	Esquema do espectrômetro de massas em série triploquadruplo API 1200 MS VARIAN com fonte de ionização ESI-----	24
Figura 6	Fluxograma do procedimento de extração empregando ELL -----	48
Figura 7	Fluxograma referente ao procedimento de extração usando a EFS-----	50
Figura 8	Fluxograma referente ao procedimento do Método QuEChERS-----	52
Figura 9	Cromatograma obtido por CLAE-DAD para os padrões dos agrotóxicos estudados (5 mg kg ⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; FM: ACN:H ₂ O; eluição por gradiente, programação linear (inicia com ACN: H ₂ O (20:80, v/v), em 12 min ACN: H ₂ O (47:53, v/v) e aumenta linearmente até 100% de ACN); vazão: 1 mL min ⁻¹ ; coluna: Chromsip C18; coluna de guarda: Nova Pack C18; detecção em 225 nm. Identificação dos picos: A: Ftalimida; B: Tiofanato metílico; C: Ciproconazol; D: Fenarimol; E: Captam; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol-----	57
Figura 10	Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas idênticas a Figura 9-----	57
Figura 11	Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra fortificada com os agrotóxicos na concentração de 3 mg kg ⁻¹ . Condições cromatográficas idênticas a Figura 9. A: Ftalimida; B: Tiofanato metílico; C: Ciproconazol; D: Fenarimol; E: Captam; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol-----	58
Figura 12	Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para a separação da mistura dos padrões dos agrotóxicos estudados (10 mg kg ⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; FM: ACN:H ₂ O; eluição por gradiente, programação linear (ACN: H ₂ O (20:80, v/v) até ACN: H ₂ O (70:30, v/v) em 28 min, voltando às condições iniciais em 7 min, permanecendo nesta condição por 5 min, num total de 40 min); vazão: 1 mL min ⁻¹ ; coluna analítica e de guarda: Nova Pack C18; detecção em 205 nm;. Identificação dos picos: A: Simazina; B: Tiofanato metílico; C: Carbaril; D: Diurom; E: Fenarimol; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol-----	60
Figura 13	Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas similares as da Figura 12-----	61
Figura 14	Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra de uva fortificada com os agrotóxicos (5 mg kg ⁻¹). Condições cromatográficas similares as da Figura 13. Identificação dos picos: A: Simazina; B: Tiofanato Metílico; C: Carbaril; D: Diurom; E: Fenarimol; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol.-----	61
Figura 15	Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; FM: ACN:H ₂ O; eluição por gradiente, programação linear (inicia com 80% de H ₂ O e 20% de ACN, aumenta linearmente até 70% de ACN em 28 min e retorna as condições iniciais em 40 min); vazão: 1 mL min ⁻¹ ; coluna analítica e de guarda: Nova Pack C18; detecção UV em	

	205 nm-----	63
Figura 16	Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD para amostra fortificada com 5 mg kg ⁻¹ dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas similares as da Figura 15. Identificação dos picos: A- Simazina; B- Tiofanato Metílico; C- Carbaril; D- Diurom; E- Fenarimol; F- Triadimefom; G- Tebuconazol; H- Difenconazol-----	64
Figura 17	Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD na separação da mistura dos agrotóxicos com os novos compostos (20 mg kg ⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL; FM: ACN:H ₂ O; eluição por gradiente, programação linear (0 min com 20 % de ACN e 80 % de H ₂ O para 70 % de ACN e 30 % de H ₂ O em 28 min, voltando as condições iniciais em 7 min, permanecendo nessas condições por 5 min, num total de 40 min); vazão: 1 mL min ⁻¹ ; coluna analítica e de guarda: Nova Pack C18; detecção em 225 nm. Identificação dos picos: A: Aldicarbe; B: Simazina; C: Carbaril; D: Diurom; E: Ametrina; F: Fenarimol; G: Triadimefom; H: Tebuconazol; I: Difenconazol-----	66
Figura 18	Cromatograma obtidos por EFS- CLAE-DAD para amostra fortificada com 5 mg kg ⁻¹ dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas similares as da Figura 17. Identificação dos picos: A- Aldicarbe; B- Simazina; C- Carbaril; D- Diurom; E- Ametrina; F- Fenarimol; G- Triadimefom; H- Tebuconazol; I- Difenconazol-----	66
Figura 19	Cromatograma de íons totais obtido por CL-EM/EM para separação da mistura de padrão dos agrotóxicos estudados (50 µg kg ⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção: 20 µL; FM: ACN:HAc 0,1%; eluição por gradiente, programação linear (0 min com ACN:HAc 0,1%, 20:80, v/v, aumentando linearmente até 63% de ACN voltando as condições iniciais, tempo total de 45 min); vazão = 0,25 mL/min; coluna: Polaris C18. Identificação dos picos: A: Cimoxanil; B: Aldicarbe; C: Simazina; D: Ametrina; E: Carbaril; F: Diurom; G: Ciproconazol; H: Fenarimol, I: Miclobutanil J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenconazol-----	70
Figura 20	Cromatograma obtido por CL-EM/EM para separação da mistura de padrões dos agrotóxicos estudados (50 µg kg ⁻¹). Condições cromatográficas similares as da Figura 19.-----	71
Figura 21	Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra branco. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19-----	74
Figura 22	Cromatogramas obtidos por EFS-CL-EM/EM para amostra branco, em todos os canais dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19-----	75
Figura 23	Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos em concentração de 50 µg kg ⁻¹ . Condições cromatográficas idênticas a Figura 19. Identificação dos picos: A: Cimoxanil, B: Aldicarbe, C: Simazina, D: Ametrina, E: Carbaril, F Diurom, G: Ciproconazol, H: Fenarimol, I: Miclobutanil, J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenconazol-----	76
Figura 24	Cromatograma obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos estudados (50 µg kg ⁻¹). Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19-----	77
Figura 25	Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por QuEChERS-CL-EM/EM para amostra	

	fortificada com os agrotóxicos em concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19. Identificação dos picos: A: Cimoxanil, B: Aldicarbe, C: Simazina, D: Ametrina, E: Carbaril, F Diurom, G: Ciproconazol, H: Fenarimol, I: Miclobutanil, J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenconazol-----	79
Figura 26	Cromatogramas obtidos por QuEChERS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos em concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas a Figura 19-----	81
Figura 30	Cromatogramas obtidos por QuEChERS seguido por CL-EM/EM para amostra comercial fortificada com os agrotóxicos em concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas a Figura 19. A: Cimoxanil; B: Aldicarbe; C: Simazina; D: Ametrina; E: Carbaril; F: Diurom; G: Ciproconazol; H: Fenarimol; I: Miclobutanil; J: Azoxistrobina; L: Triadimefom; M: Tebuconazol; N: Difenconazol-----	93

1 -INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a demanda crescente por alimentos é uma das grandes preocupações atuais. Visando assegurar produtividade e qualidade têm sido empregados agrotóxicos em diversas etapas da produção agrícola: no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita [1]. Entretanto, o seu emprego deve ser controlado devido à alta toxicidade de alguns deles [2].

Os agrotóxicos ao serem aplicados nas frutas para proteção ou mesmo durante o cultivo podem deixar resíduos, constituindo em uma rota relevante para a exposição humana [3], visto que muitos agrotóxicos adsorvem nas cascas das frutas e legumes. A grande maioria, no entanto, age sistemicamente por toda a planta, inclusive nos frutos [4]. Com a finalidade de assegurar a saúde da população quanto à contaminação por agrotóxicos, são estabelecidos pelas agências reguladoras, que podem ser internacionais ou nacionais [5], limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos [6].

O LMR para resíduos de agrotóxicos representa a concentração máxima dos resíduos (expressa em mg/kg) que é legalmente permitida em itens alimentícios específicos, sem trazer danos à saúde do consumidor. Os LMR não são limites toxicológicos, mas são toxicologicamente aceitáveis. Os LMR excedidos são fortes indicadores da violação das boas práticas agrícolas [2]. A comissão do CODEX Alimentarius das Nações Unidas para a Agricultura e Alimento (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecem os LMR em diversos alimentos [4]. Legislações foram aprovadas nos Estados Unidos, na Comissão Européia (EU) e em outros países estabelecendo limites máximos de resíduos (LMR) mais restritos para resíduos de agrotóxicos em alimentos [7].

Como a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos pode oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente, nos últimos anos, países de todo o mundo tornaram-se mais exigentes em relação à qualidade dos alimentos que consomem, quer produzidos internamente ou importados. Para garantir tal qualidade, têm sido estabelecidas regras e controles cada vez mais rigorosos ao que se refere às determinações de resíduos de agrotóxicos. Muitos obstáculos comerciais hoje existentes, como barreiras alfandegárias,

prejudicam os avanços da exportação, principalmente para a União Européia, que é o principal mercado agrícola dos produtos brasileiros. Este mercado passa por frequentes ajustes internos relacionados ao estabelecimento de normas de qualidade e de comercialização de produtos alimentares. As cadeias de distribuidores e de redes varejistas têm exigido dos exportadores o cumprimento de LMR de agrotóxicos, muitas vezes inferiores aos acordados no CODEX Alimentarius [8].

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em conjunto com os produtores estão investindo em cadeias de ações como, por exemplo, o Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resíduos Químicos e Biológicos em Vegetais (PNCRV), instituído pela portaria nº 709 de 13/12/1996, que após revogações, dá seguimento e integra o Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal (PNSQV), instituído pela Instrução Normativa nº10 de 31/07/2003. Faz parte dos objetivos do PNSQV, o controle dos níveis de contaminantes e resíduos químicos e biológicos, conforme os limites estabelecidos nas legislações pertinentes, além de evitar perdas e agregar valores aos produtos de origem vegetal na cadeia produtiva [9].

Com a finalidade de padronizar, da produção à comercialização, o agronegócio de frutas, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares como a Food and Agriculture Organization (FAO), Organização Internacional da Saúde Animal (OIE) e Organização Mundial de Saúde (WHO), o MAPA criou o programa de Produção Integrada de Frutas (PIF), através da Instrução normativa nº20 de 27/09/2001 publicado no Diário Oficial da União de 15/10/2001, o qual consiste em um sistema de cultivo de frutas de alto padrão de qualidade e de sanidade. Através da PIF, o MAPA prevê o emprego de normas de sustentabilidade ambiental, segurança alimentar, viabilidade econômica e socialmente justa, mediante o uso de tecnologias não agressivas ao meio ambiente e ao homem [10].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). O PARA tem como um dos seus principais objetivos avaliar a segurança para o consumo do alimento tratado; detectar resíduos devido ao uso impróprio do agrotóxico ou de agrotóxicos de uso não autorizado para determinada cultura; fornecer a credibilidade de exportadores perante seus clientes e melhorar ações contra o uso impróprio destes

produtos [11].

Apesar da cultura de uva não ter sido selecionada para monitoramento na primeira etapa do PARA, escolheu-a como matriz neste estudo, pois o Estado de São Paulo, com cerca de duas mil propriedades vinícolas, destaca-se como maior produtor nacional de uva de mesa, com aproximadamente 39 milhões de plantas e produção de 189 mil toneladas. Os cultivares de uva comum, representados principalmente pela “Niágara Rosada”, correspondem a 89% do total de plantas e 49% da produção de uva no Estado [12]. Este cenário demonstra a necessidade de se desenvolver métodos devidamente validados que permitam avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nas uvas *in natura* que chegam a mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do governo em atender a segurança alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população.

1.1 -Uva - origem, características e propriedades

A cultura da uva tem grande valor, não apenas por representar a maior produção mundial de horticultura, mas também por trazer conexões históricas com o desenvolvimento da humanidade [13].

Desde a antiguidade, a uva é uma das frutas mais apreciadas pela humanidade. Originou-se no Cáucaso, Ásia, de onde foi levada para a Europa. No Brasil, as primeiras mudas desembarcaram com o colonizador Martin Afonso de Sousa, em 1532. Mas, coube ao cavaleiro-fidalgo português Brás Cubas o título de viticultor pioneiro. “Fiel às tradições de seu povo, plantou as primeiras videiras na Capitânia de São Vicente, reconhecida como o berço da viticultura brasileira. A imigração italiana em São Paulo e no Rio Grande do Sul, no final do século XIX proporcionou um grande impulso à cultura [14-16].

A videira é uma planta sarmentosa, de hábito trepador, sendo a principal fruteira cultivada no mundo. Pertence à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, se apresentando em espécies diversas, destacando-se a *Vitis vinífera* – produz frutos apropriados à produção de vinho, de origem européia – e a *Vitis labrusca* e outras, adequadas para servir de porta-enxerto ou para produzir uvas de mesa, sendo originárias da América do Norte [14].

As uvas podem ser classificadas em quatro grupos: [14-16]:

- Uvas rústicas de mesa: são também chamadas de uvas comuns. São rústicas pela maior resistência a determinadas doenças e maior facilidade em alguns tratos culturais. Seus frutos apresentam polpa que se desprende facilmente da película (casca), sendo muito apreciados para o consumo ao natural. Também são utilizadas para fins industriais, para a produção de vinhos, sucos, destilados, vinagre e geléia. Geralmente são de espécies americanas ou híbridas. As principais variedades são: Niágara Rosada, Niágara Branca, Madalena, Isabel, dentre outras.

- Uvas finas de mesa: São chamadas de finas pela alta qualidade de seus frutos, favorecendo o consumo ao natural. São da espécie *Vitis vinifera*; sendo extremamente sensíveis às doenças fúngicas. As principais variedades são: Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Red Globe, Piratininga, Ribier, dentre outras.

- Uvas sem sementes: São chamadas de apirenas ou sem sementes pela ausência completa ou presença apenas de vestígios de sementes. Seus frutos são muito apreciados para o consumo ao natural. Geralmente são da espécie *Vitis vinifera*, ou híbridos desta espécie com outras. As principais variedades são: Perlette, Centennial e Thompson Seedless.

- Uvas para vinho: Seus frutos são utilizados como matéria-prima para produção de vinhos finos de excelência, devido ao elevado potencial de acúmulo de açúcar nas bagas. São sensíveis às doenças fúngicas e altamente exigentes em tratos culturais. Englobam variedades da espécie *Vitis vinifera* L. de origem européia.

Dentre as diversas espécies de uva, as mais conhecidas no Brasil são: uva Itália, niágara branca e rosada [16]. A uva niágara rosada é a mais aceita pelo consumidor brasileiro. Seu gosto perfumado e doce faz com que seja considerada a uva de mesa mais vendida no país, sendo que a região de Campinas é uma das principais produtoras [17]. Pode ser cultivada para fins comerciais em quase todas as regiões do Estado de São Paulo, à exceção do litoral, devido às condições de alta umidade e temperatura [14].

A uva niágara rosada é o resultado de uma mutação somática ocorrida na variedade niágara branca (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.), em 1933, em Louveira-SP, que rapidamente predominou sobre a forma original [18-19]. A uva niágara rosada apresenta bagas com um revestimento branco sobre a casca denominada "Pruina". Trata-se de uma cera que protege a epiderme da fruta e que melhora sua aparência. [19].

O sabor da uva varia muito de acordo com o tipo de solo, podendo ser doce, cítrico ou ácido. A uva além de ser altamente apreciada para consumo “in natura” e ser utilizada na fabricação de diversos produtos, como passa, suco, doce, geléia, vinho e vinagre, fornece, também, outros subprodutos, como corantes naturais, ácido tartárico, óleo de semente e taninos. É rica em carboidratos e vitaminas, como tiamina, riboflavina e vitamina C. Os minerais presentes são cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre e, em maior quantidade, potássio. É uma fruta altamente energética por ser rica em carboidratos, apresentando também pequenas quantidades de vitamina do complexo B. Não é muito calórica, pois 100 gramas de uva possuem, aproximadamente, 50 calorias [16,20].

Devido à presença de compostos fenólicos na casca, especialmente o resveratrol, as catequinas e flavonóides, o consumo da uva e de seus derivados tem sido indicado como fator de proteção ao sistema circulatório e ao coração. Os compostos fenólicos agiriam como antioxidantes, impedindo a ação de radicais livres no organismo, e teriam também, atividade anti-inflamatória, impedindo a aglomeração das plaquetas sanguíneas, reduzindo assim os riscos de ocorrência de infartos e derrames. Outra forma de ação seria como agente protetor de moléculas essenciais como o DNA, impedindo alguns processos desencadeadores do câncer [21].

1.2 Agrotóxicos

O Decreto Federal 5981/2006 dá uma nova redação e inclui dispositivos ao Decreto nº 4074 de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre o uso de agrotóxicos e afins e define-os como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinado ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa dos seres vivos considerados nocivos, substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento [22].

Os efeitos tóxicos dos agrotóxicos são seletivos uma vez que eles agem contra

determinados organismos sem adversamente afetar a outros. Contudo, a seletividade absoluta é difícil de ser alcançada e, dessa forma, a maioria dos agrotóxicos produz algum risco à saúde humana. Os resíduos oriundos do tratamento com agrotóxicos podem penetrar nos tecidos das plantas, na polpa, nos sucos das frutas e nos vegetais, o que torna de particular importância determiná-los [23].

Os agrotóxicos podem ser divididos quanto ao modo de ação entre sistêmicos e de contato. Os sistêmicos são aqueles que, quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva, por todos os tecidos vegetais, de forma a distribuírem-se uniformemente e ampliarem o seu tempo de ação. Os de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrarem em contato com o alvo biológico. Os agrotóxicos de contato são também, em boa parte, absorvidos pela planta, penetrando em seu interior através de suas porosidades. Uma lavagem dos alimentos somente em água corrente poderia remover parte dos resíduos de agrotóxicos presentes na superfície dos mesmos. Os agrotóxicos sistêmicos e uma parte dos de contato, por terem sido absorvidos por tecidos internos da planta, caso ainda não tenham sido degradados pelo próprio metabolismo do vegetal, permanecerão nos alimentos mesmo que esses sejam lavados. Neste caso, uma vez contaminados com agrotóxicos, estes alimentos levarão o consumidor a ingerir seus resíduos [24].

A viticultura e a produção de vinho possuem um papel fundamental no mundo, e o uso de agrotóxicos, para controle de pestes e de doenças, é uma prática comum em vinhedos para aumentar a colheita. Contudo, esses produtos químicos podem atingir os tecidos das plantas, carregando resíduos que podem ser detectados em uvas e em produtos processados como vinho e suco. Isto pode tornar uma rota significativa para a exposição humana a estes compostos tóxicos [25].

O nível de resíduos de agrotóxicos em alimentos depende de fatores agrícolas e climáticos e, muitos países estabelecem seus próprios limites baseados nas boas práticas agrícolas exercidas localmente [6]. Em tese, o cumprimento destes limites máximos de resíduos permite preservar a saúde do consumidor da ação tóxica destes produtos.

De acordo com o status de todos os princípios ativos marcados pela União Européia (UE), mais de 1100 agrotóxicos estão registrados atualmente. Mais de 17000 LMR têm sido fixados para vários produtos e agrotóxicos [26].

Atualmente, um número cada vez maior de agrotóxicos deve ser monitorado e em concentrações inferiores aos LMR, o que requer métodos altamente sensíveis e seletivos. Consequentemente, o preparo da amostra torna-se uma etapa chave no procedimento analítico [25].

1.3 Métodos de análise

Os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos compreendem, basicamente, quatro etapas: a amostragem, o preparo da amostra, a separação e determinação dos analitos e o tratamento de dados [27]. O preparo da amostra é uma etapa que requer uma atenção especial do analista em qualquer desenvolvimento de método analítico.

1.3.1 Técnicas de preparo de amostra

Nos últimos anos, extensos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra que reduzam tempo, trabalho, consumo de solvente e, consequentemente, aumentam o desempenho analítico do processo [25].

O preparo da amostra é, frequentemente, a fase crítica de um método multirresíduo, devido a diversidade de substâncias que podem ser extraídas em matrizes com características e composições próprias [28].

O objetivo do preparo de amostra reside no isolamento dos analitos de interesse de matrizes, tentando reduzir ou mesmo eliminar simultaneamente os interferentes da matriz, para facilitar suas determinações em baixas concentrações e concentrá-los [29].

Um método multirresíduo de preparo de amostras para a análise de agrotóxicos deve apresentar as seguintes propriedades: abranger, em um único procedimento, uma ampla faixa de agrotóxicos com propriedades distintas e de diversas classes, atingir recuperações próximas a 100%, remover os possíveis compostos interferentes da amostra, proporcionar boa precisão, robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança, além de utilizar volumes reduzidos de solventes que sejam de baixa toxicidade [29].

A seguir, encontram-se descritas as técnicas de preparo de amostras empregadas neste estudo.

1.3.1.1 Extração líquido-líquido (ELL)

A ELL é uma das técnicas de preparo de amostras mais tradicional. Na ELL transferem-se os analitos de interesse presentes em uma matriz líquida para outro líquido imiscível. A extração mais comum é realizada separando os analitos de uma solução aquosa, biológica ou ambiental, para solventes orgânicos apolares ou com polaridade menor que o solvente da matriz. A ELL clássica é trabalhosa, exige manipulações repetitivas e a separação de fases pode ser muito lenta quando se forma emulsão e também gera um grande volume de resíduos orgânicos [30, 31]. Apresenta como vantagem o fato de não necessitar de equipamentos caros e os solventes orgânicos de alta pureza são facilmente encontrados, mesmo que com preços elevados. Na Figura 1 está apresentado o sistema utilizado para a extração líquido-líquido.

Atualmente, os solventes mais comumente utilizados em ELL para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais são: acetona, acetonitrila e acetato de etila, a partir dos quais os analitos de interesse são transferidos para camada orgânica, deixando na fase aquosa os coextrativos indesejáveis e alguns agrotóxicos altamente polares.

1.3.1.2 Extração em fase sólida (EFS)

Dentre as técnicas de extração desenvolvidas como alternativa à ELL destaca-se a EFS [32]. A EFS é uma técnica bem estabelecida em métodos multirresiduais, sendo empregada, com frequência, na extração de agrotóxicos em amostras de alimento [29] e, muitas vezes, em conjunto com a ELL, como etapa de “*clean-up*” [33]. Ela requer pequenos volumes de solvente e é de fácil operação e automação [23, 34].

A EFS é uma técnica de preparo de amostra na qual, na sua forma mais simples, pode ser descrita como uma cromatografia líquida clássica, na qual se usa uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém a fase sólida, também

chamada de sorvente. Utilizam-se cartuchos contendo um sorvente sólido que isola o analito de interesse dos interferentes da matriz. Os sorventes utilizados nos cartuchos são semelhantes aos materiais empregados como fases estacionárias na cromatografia líquida de alta eficiência, com dimensões de partículas diferentes. Porém, os cartuchos apresentam um custo considerável, devido ao fato de serem importados e utilizados uma única vez, e uma baixa reprodutibilidade entre os lotes.

As etapas da EFS consistem no condicionamento dos cartuchos, na aplicação da amostra, na lavagem do sorvente e na eluição dos analitos. O condicionamento é feito para ativar o sorvente através da passagem de um solvente compatível com o sorvente a ser ativado. Um dos fatores importantes nesta etapa é não deixar que o material contido no cartucho seque, para que não sejam formados caminhos preferenciais, comprometendo a separação. A ativação do material existente dentro do cartucho se dá através do emprego de um solvente que condicione a superfície do sólido, cujo tipo depende do material a ser ativado. A adição da amostra ao cartucho, já condicionado, deve ser lenta, com vazão inferior a 2 mL min^{-1} , por meio de vácuo ou pressão. Idealmente, nesta etapa, o analito de interesse fica retido na fase sólida e os interferentes passam pelo cartucho. A fase sólida é lavada com um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte deles, sem eliminar os analitos de interesse. A seguir, ocorre a eluição do analito de interesse do sorvente com um solvente apropriado [35-37]. A Figura 2 apresenta um esquema do processo de extração em fase sólida.

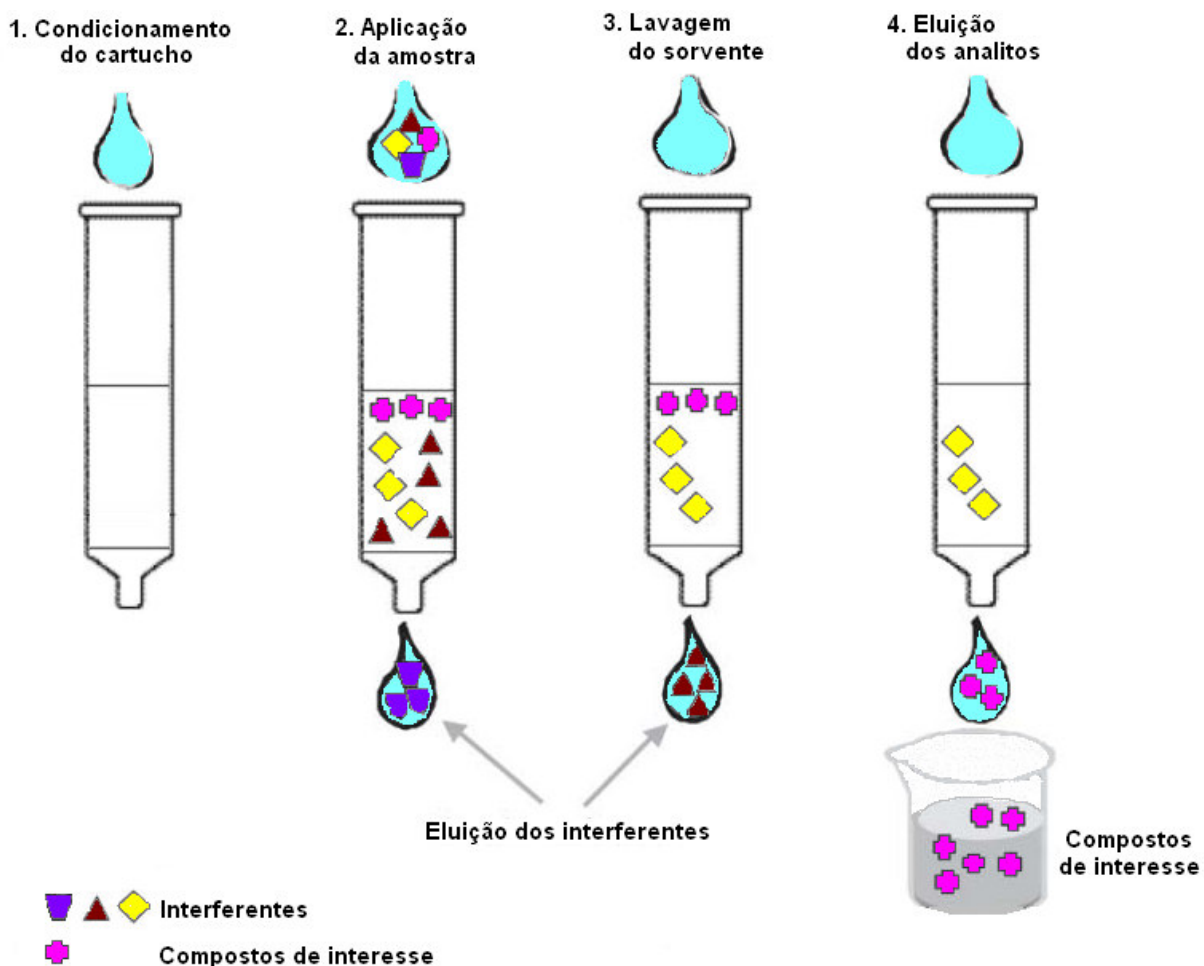


Figura 1: Esquema representativo do processo de EFS

Existem vários procedimentos de tratamento de amostra por EFS, que variam no tipo de sorventes e solventes, no volume de amostra, assim como nos volumes de solventes para ativação dos cartuchos e para eluição dos analitos.

Em 2003, Otero *et al.* [38] desenvolveram um método multirresíduo para análise de 14 fungicidas em uvas. O método proposto baseou-se em extração líquido-líquido e extração em fase sólida, seguida por análise por CLAE-DAD. O método apresentou recuperações acima de 85% para a maioria dos compostos e precisão entre 1,5 e 16%.

Teixeira *et al.* [39], em 2004, estudaram a mobilidade de agrotóxicos em uvas, pela comparação de seus resíduos. As uvas foram analisadas por uma metodologia validada empregando CLAE-DAD. Eles utilizaram no preparo de amostra duas técnicas de

extração, extração líquido-líquido seguida por extração em fase sólida. O LD obtido foi de $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ e as recuperações ficaram entre 56,7 e 79,4%.

Em 2005, Topuz *et al.* [6] desenvolveram um método para a determinação simultânea de cinco agrotóxicos em sucos de frutas utilizando EFS empregando cartuchos C18 e CL-DAD e obtiveram recuperações entre 93,8 a 99,5% e coeficientes de variação (CV) inferiores a 3,4%. O limite de detecção alcançado foi de 0,5 a $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e a linearidade foi maior que 0,9988.

Watanabe *et al.* [34], em 2007, desenvolveram um método de preparo de amostra baseado em ELL seguida de EFS para determinação multirresíduo de sete inseticidas neonicotinóides em maçã, uva, pêssego, tomate, cenoura, pepino, pimentão e espinafre, sendo analisados por CLAE-DAD. Depois de extração em acetona, os extratos foram transferidos para cartuchos Chem Elut e, em seguida, Envi-Carb/ NH_2 , obtendo assim uma maior eficiência de limpeza. As recuperações obtidas ficaram entre 80 e 115%, alcançando LD na faixa de 0,01 a $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$.

1.3.1.3 Método QuEChERS

QuEChERS é um novo método de extração voltado para análise multirresidual de agrotóxicos que foi desenvolvido entre 2000 e 2002, sendo publicado pela primeira vez em 2003 por Anastassiades *et al.* [40]. Apesar de ser um método relativamente novo, QuEChERS tem sido amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de agrotóxicos, uma vez que muitos trabalhos têm sido publicados empregando sua forma original ou com variações [26].

O procedimento do método QuEChERS envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguida de uma etapa de partição realizada pela adição de uma mistura de sais composta por sulfato de magnésio anidro, que tem a função de remover o excesso de água da amostra; cloreto de sódio, para o ajuste da força iônica; hidrogenocitrato de sódio e citrato de sódio, para constituição do tampão citrato e ajuste do pH do meio em, aproximadamente, 5. Uma porção do extrato é então submetida à uma etapa de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (EFS-D), na qual é empregado um sorvente trocador aniônico composto por grupos etilenodiamina-N-propil ligados à sílica, PSA (do

inglês Primary – Secondary Amine). Este sorvente tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos, água e pigmentos [41]. O sorvente retém os interferentes da matriz, sendo que o extrato final, em acetonitrila, obtido pelo método QuEChERS, pode ser diretamente analisado empregando-se técnicas cromatográficas. A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante devido a presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Um *clean up* eficiente garante uma vida útil mais longa para o sistema cromatográfico e colunas [41, 42]. A estrutura do PSA está apresentada na Figura 2.

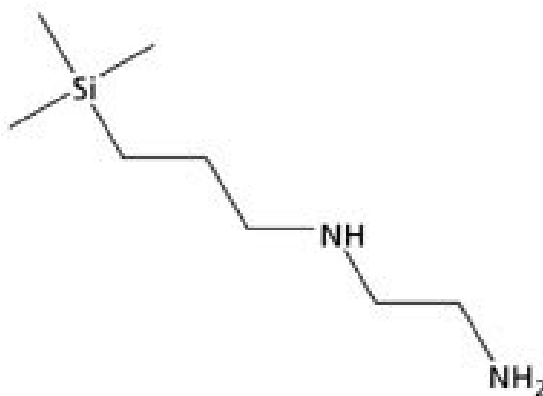


Figura 2: Estrutura do sorvente PSA

As vantagens do método QuEChERS estão inseridas no próprio nome (do inglês “quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), ou seja, incluem a rapidez, simplicidade, baixo custo, eficiência, robustez e confiabilidade. O método QuEChERS é aplicado a um amplo número de agrotóxicos, incluindo agrotóxicos com caráter ácido, básico e aqueles muito polares. Ele fornece recuperações adequadas para um grande número de agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas. Devido a estas vantagens, o método QuEChERS tem sido amplamente aceito, e está sendo aplicado nos métodos oficiais da AOAC para análises de resíduos de agrotóxicos em frutas e outros vegetais que podem ser determinados tanto por cromatografia gasosa (CG) como por cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE) [42]. Também este método tem sido sugerido pelas Normas Europeias [25, 3]. A Figura 3 apresenta um esquema do método QuEChERS original.

Payá *et al.* [43], em 2007, desenvolveram e validaram um método multirresíduo empregando o método QuEChERS para a extração de 80 agrotóxicos. Trinta e oito agrotóxicos foram quantitativamente recuperados das matrizes limão, uva passa e pepino e determinados usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (CG-EM/EM). Quarenta e dois agrotóxicos foram determinados nas matrizes estudadas, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (CL-EM/EM). A maioria das recuperações obtidas ficou entre 70 e 110% e CV abaixo de 10%.

Lesueur *et al.* [44], em 2008, analisaram 140 agrotóxicos, onde 105 agrotóxicos foram analisados por CG-EM e 46 agrotóxicos analisados por CL-EM nas matrizes uva, limão, cebola e tomate, empregando como técnica de extração o método QuEChERS. Utilizando CG-EM, eles obtiveram limite de detecção (LD) de 0,4 a 48,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de quantificação (LQ) de 1,2 a 161 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para a maioria dos agrotóxicos obtiveram recuperações de 70 a 110%. Por CL-EM, o LD obtido foi de 1,0 a 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LQ de 3,3 a 380 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações obtidas, para a maioria dos agrotóxicos estudados, foram de 70 a 110%, com CV abaixo dos 20%.

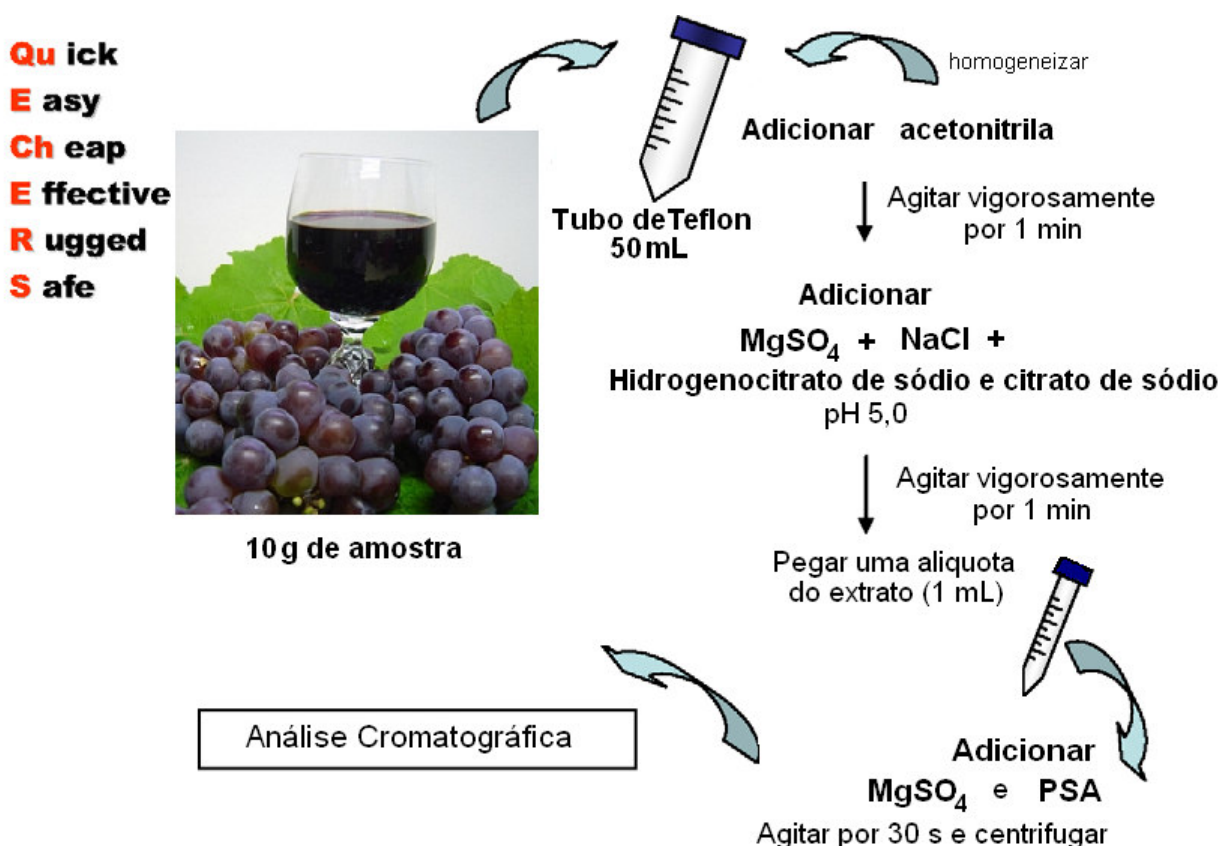


Figura 3: Esquema representativo do procedimento original do método QuEChERS

Banerjee *et al.* [45], em 2007, validaram um método multirresíduo para análise de 82 agrotóxicos em uva. Eles empregaram o método de extração QuEChERS usando acetato de etila como solvente de extração e determinação por CL-EM/EM. Eles obtiveram LQ menores que $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, com recuperações de 70 a 120% para a maioria dos agrotóxicos estudados.

Em 2008, Romero-González *et al.* [3] desenvolveram e validaram um método analítico para determinação simultânea de 90 agrotóxicos em sucos de frutas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massa em série (CLUE-EM/EM). A extração foi efetuada com ACN, aplicando o método QuEChERS e os extratos foram analisados sem *clean-up* obtendo resultados melhores que por EFS. A quantificação dos compostos foi feita no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM), obtendo uma corrida cromatográfica em 11 min. Eles obtiveram recuperações entre 70,4 e 108,5% e CV inferiores a 20%. Os LQ obtidos foram menores que $5 \mu\text{g L}^{-1}$. O

método desenvolvido foi aplicado em amostras comerciais sendo que em algumas delas foram encontrados agrotóxicos, como o tiabendazol.

1.3.2 Técnicas de separação e determinação dos analitos

Muitos estudos abordando métodos multirresiduais desenvolvidos por vários grupos têm sido descritos empregando diferentes técnicas de extração, utilizando diferentes sorventes ou mistura de sorventes. A quantificação destes resíduos, nos mais diferentes meios e matrizes, é tradicionalmente realizada usando-se as técnicas cromatográficas. Estas técnicas têm sua importância em função de sua facilidade em efetuar separações, identificar, quantificar e confirmar as espécies presentes na amostra, por meio de detectores específicos [1, 46, 47].

O método analítico empregado deve ser capaz de detectar o resíduo em níveis muito baixos e deve igualmente fornecer evidências para confirmar a sua identidade [46]. A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diferentes detectores são técnicas amplamente usadas como ferramentas analíticas na determinação de resíduos de agrotóxicos [47].

No entanto, o número de compostos que não pode ser determinado por CG sem derivatização, devido à baixa volatilidade, alta polaridade e instabilidade térmica, tem crescido bastante nos últimos anos [46]. Nestes casos, estes compostos podem ser mais facilmente analisados por CLAE, sendo, portanto estas duas técnicas complementares.

A CLAE trata-se de uma técnica mais versátil. Têm sido desenvolvidos vários métodos de análise de agrotóxicos em alimentos empregando a CLAE com detecção por absorção no UV [48], por fluorescência [49] ou por arranjo de diodos (DAD) [50], sendo que este último realiza tanto a detecção qualitativa como quantitativa, porém, ele é de aplicação limitada à amostras relativamente limpas, uma vez que muitos dos interferentes presentes na matriz absorvem na mesma região do UV que diversos agrotóxicos. Consequentemente, o DAD pode não ser suficientemente específico para as análises nas quais as diferenças espectrais são pequenas.

Na busca por métodos de análise de agrotóxicos em matrizes complexas, cada vez mais rápidos, seletivos e sensíveis, vários avanços têm sido obtidos no desenvolvimento

das técnicas analíticas de separação e detecção [26]. Um avanço que merece destaque é o emprego da detecção por espectrometria de massas (EM) [51, 52] e por espectrometria de massas em série (EM/EM) [53,54] que gerou um aumento significativo na seletividade e detectabilidade dos métodos cromatográficos, possibilitando a análise de um grande número de agrotóxicos simultaneamente e a sua detecção em concentrações muito baixas.

Nos anos recentes, muitos estudos de quantificação e confirmação de resíduos de agrotóxicos em alimentos têm empregado a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com diferentes tipos de ionização e analisadores e sistemas de detecção.

Em 2006, Hernandez *et al.* [55] estudaram 52 agrotóxicos por CL-EM/EM com ionização por eletronebulização (ESI), em frutas como tomate, limão, uva seca e abacate e obtiveram recuperações na faixa de 70 a 110%, com precisão satisfatória, com coeficiente de variação $\leq 15\%$. Três agrotóxicos, metamidofós, aldicarbe e etiofencarbe, apresentaram em todas as matrizes, baixas porcentagens de recuperação, possivelmente por degradação parcial durante o tratamento da amostra. O LQ do método estabelecido foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, para todos os princípios ativos.

Goto *et al.*, em 2006 [56], desenvolveram um método para a análise de carbamatos em frutas, utilizando CL-EM/EM com ionização por eletronebulização. O estudo de recuperação mostrou-se insatisfatório para o aldicarbe, metiocarbe e pirimicarbe. O limite de quantificação estimado foi de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Em 2007, Hiemstra e Kok [57] propuseram um método multirresíduo para frutas, hortaliças e cereais utilizando a técnica de CL-EM/EM, com triplo quadrupolo e com ionização por eletronebulização (ESI). Foram detectados 171 agrotóxicos e seus metabólitos em diferentes matrizes de grãos. Os resultados de recuperação obtidos foram de 70 a 110%, com estimativa de desvio padrão relativo de até 15%. O limite de quantificação de todos os analitos estudados foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Pizzutti *et al.* [58] desenvolveram um método multirresíduo em grãos de soja utilizando a técnica CL-EM/EM com ionização por ESI. Dos 169 agrotóxicos estudados, mais de 70% deles apresentaram recuperação variando de 70 a 120%, com coeficiente de variação $\leq 20\%$. O limite de quantificação do método variou de 10 a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

1.3.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (CL-EM/EM)

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) é a mais poderosa técnica para análise de agrotóxicos em frutas e demais vegetais [7], além de ser uma técnica preferida para análises de compostos que são pouco voláteis, apresentam uma alta polaridade e são termicamente instáveis na natureza [54]. Porém, a CL em combinação com a espectrometria de massas em série (EM/EM) é capaz de discriminar o analito e o sinal da matriz mais eficientemente que a CL-EM [34,59] por apresentar caracterização da estrutura molecular e uma maior confiabilidade na quantificação.

A CL-EM/EM é uma poderosa ferramenta para a análise de resíduos de agrotóxicos em uma variedade de matrizes complexas, devido ao fato que a seletividade e a detectabilidade são notavelmente melhoradas, as etapas de pré-tratamentos de amostra podem ser minimizadas e quantificações e confirmações confiáveis podem ser facilmente conseguidas em baixos níveis de concentrações [54], para diversos tipos de amostras, como ambientais e alimentos. Para esse propósito, são indicadas a ionização por eletronebulização (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI), sendo que a seleção da fonte de ionização depende do composto, e analisadores triplo quadrupolo, que são amplamente usados para fins de quantificação [60,3].

O ponto crítico da técnica CL-EM é a transferência dos constituintes do eluato da coluna cromatográfica que se encontra em uma fase líquida para uma fase gasosa na forma de íons, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (10^{-4} a 10^{-8} torr) [61].

No caso da CL-EM existem diferentes métodos para introduzir o eluato na coluna no espectrômetro de massas, sendo que os íons já podem estar presentes na solução ou serem formados no processo de transferência [62]. As moléculas da amostra podem ser submetidas a dois modos de ionização: eletronebulização (ESI, do inglês Electrospray Ionization) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

As diferentes fontes de ionização (ou interfaces) empregadas em CL-EM têm em comum o fato de promoverem uma ionização suave da molécula, isto é, são formados

íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M+H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito [63].

A detectabilidade da resposta em espectrometria de massas é claramente dependente da tecnologia da interface empregada. A interface ionização à pressão atmosférica (API, do inglês Atmospheric Pressure Ionization) utiliza como fonte de ionização: a ionização química a pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização (ESI). No geral, APCI e ESI permitem uma melhor calibração linear com várias ordens de grandeza e uma eficiente ionização para compostos de diferentes polaridades [64]. A seleção da fonte de ionização mais apropriada para análise de agrotóxicos depende muito das classes dos compostos investigados.

Análises empregando ionização a pressão atmosférica (API) fornecem excelentes detectabilidade e seletividade permitindo determinação dos analitos de interesse em baixos níveis de concentração [34, 59].

1.3.2.1.1 Fontes de ionização (ou interfaces)

A Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) é uma técnica apropriada para análise de compostos de baixa a média polaridade [65].

No modo APCI, o eluato do cromatógrafo é nebulizado através de um vaporizador aquecido (normalmente 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir de uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química). Os íons do analito passam através de um capilar de vidro dielétrico e do orifício de amostragem para dentro do analisador de massas, como em ESI.

A ionização por eletronebulização (*electrospray*, ESI) é uma técnica apropriada para a determinação da massa molar. É preferencialmente aplicada para a análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo.

Na ESI, a FM na qual o analito de interesse se encontra dissolvido passa através de

um capilar, a pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2) na região do *spray*. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre a chamada "explosão coulômbica" que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos os íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do EM por uma série de dispositivos de focalização [66].

Devido ao modo de obtenção dos íons nesta fonte de ionização, a ESI pode ser utilizada na análise de compostos sensíveis à temperatura e com elevadas massas molares [67]. Em ESI, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação, já que a ionização ocorre diretamente na solução. Já os compostos com massas molares relativamente grandes podem ser analisados utilizando-se ESI, porque esta fonte de ionização é capaz de gerar íons com múltiplas cargas [65].

Na ESI é necessário fazer uma otimização significativa dos parâmetros da interface. É necessário otimizar a posição e o potencial da agulha do spray. ESI apresenta maior sensibilidade a composição da FM a aos aditivos utilizados. A vazão da fase móvel influencia na resposta do analito, pois afeta a eficiência da ionização. Gotas maiores são geradas em vazões altas, demandando um maior tempo de evaporação destas gotas. Íons presentes na solução são transferidos para a fase gasosa mais rapidamente quando se encontram na forma de gotas pequenas. Desta forma a eficiência da ionização é maior em vazões mais baixas [68].

A ionização por ESI é uma ionização branda, pois a energia empregada nesta fonte de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito, de maneira que são formados íons pseudo-moleculares intactos, do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo. O modo de operação positivo ou negativo, é estabelecido, na ESI, pelos modificadores adicionados à FM. No modo de ionização positivo é adicionado à FM um ácido orgânico, geralmente ácido fórmico. Já no modo

negativo, adiciona-se à FM uma base orgânica, geralmente trietilamina [35]. Nesta fonte de ionização pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na^+ , K^+ , NH_4^+ , HCOO^- e CH_3COO^- . A formação de adutos pode ser controlada através da adição de modificadores à FM que disponibilizam estas espécies iônicas.

Na análise de compostos que apresentam grupos ionizáveis, a adição de tampões é importante para aumentar a ionização e evitar perdas na resolução, retenção e repetitividade. Entretanto, em CL-EM, é necessário que o tampão utilizado seja volátil, pois do contrário pode ocasionar a supressão do sinal, formação de adutos e ruído alto. Além disso, a concentração do tampão deve ser a menor possível, em ESI utilizam-se concentrações de 10 mmol L^{-1} ou menores [68].

A seleção da composição da FM no desenvolvimento de um método deve, na medida do possível, objetivar a formação de íons pré-formados na solução, isto é, a protonação de analitos básicos ou desprotonação de analitos ácidos. Desta forma, para analitos básicos, podem ser utilizados, por exemplo, misturas de sais de amônia e ácidos voláteis como ácido fórmico ou ácido acético. Estes ácidos podem ser utilizados também para diminuir o pH, auxiliar na geração de íons e, dessa forma, aumentar a detectabilidade. A utilização de aditivos na fase móvel também influencia na extensão da supressão da matriz

1.3.2.1.2 Analisador de massas

O analisador de massas separa os íons que vêm da fonte de ionização de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Existem vários tipos de analisadores de massas utilizados na espectrometria de massas, entretanto, especificamente em CL-MS, o analisador quadrupolo possui alta relevância atualmente [68] por apresentar como vantagem uma boa reprodutibilidade, ser de fácil operação e manutenção, tornando-se uma técnica eficaz para análise de rotina em laboratório.

Os analisadores de massas tipo quadrupolo usam quatro eletrodos em forma de bastão paralelos, organizados em um quadrado para gerar campos elétricos que filtram os íons com base na razão m/z , enquanto se deslocam pelos eletrodos. Em determinadas magnitudes e frequências, apenas os íons com a massa selecionada atingem o detector.

Alterando os campos elétricos, as massas de todos os íons podem ser varridas sequencialmente [69]. Trata-se de um instrumento de baixa resolução, adequado apenas para varreduras de compostos, pois sua detectabilidade é baixa [70].

Na EM/EM, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, como na EM, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (Q1 e Q3), sendo que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é empregado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida [66]. Esta configuração permite a obtenção de informações estruturais sobre as moléculas com o uso de múltiplos estágios de seleção e separação de massas.

A configuração de EM/EM mais utilizada é a do triplo quadrupolo. Neste instrumento, a análise de massas é feita no primeiro e no último quadrupolo, enquanto que o segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão, como é mostrado na Figura 4. Desta forma, no primeiro analisador (Q1) ocorre a seleção do íon precursor, o qual é dissociado (fragmentado) na cela de colisão (Q2) e os íons produtos correspondentes são analisados no segundo analisador (Q3) [68].

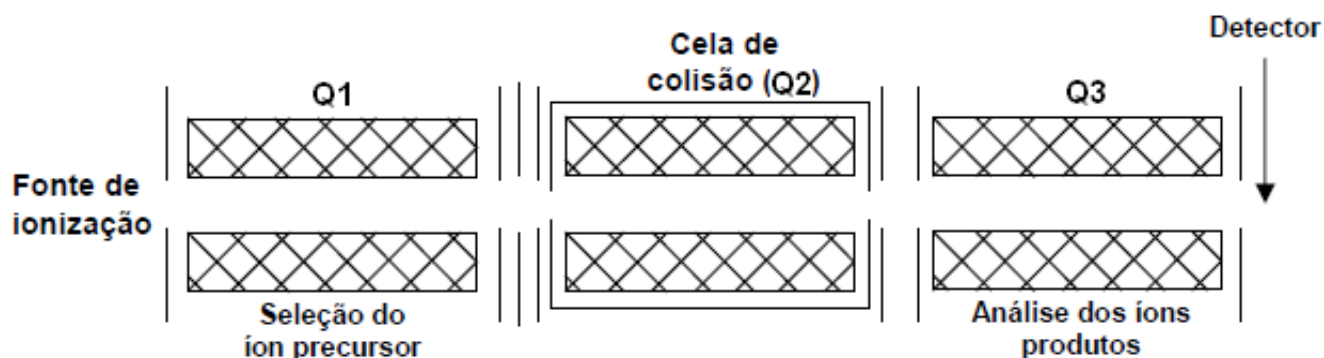


Figura 4: Esquema do instrumento triplo quadrupolo

Na cela de colisão ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo por dissociação induzida (collision-induced dissociation, CID) através da colisão com um gás inerte. O íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia

(geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar a sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando a CID é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂, etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando a colisão é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que podem levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada [66].

Na literatura são descritos vários tipos de monitoramento em EM/EM, mas os mais comuns são a varredura do íon precursor, varredura do íon produto, varredura da constante perda de fragmentos neutros e o monitoramento seletivo de reações. Na Tabela 1 estão mostrados os modos de análise empregados em EM/EM.

Tabela 1: Modos de análise em EM/EM

Modo	Experimento	Aplicação
Íon produto	Q1 seleciona um íon precursor Q3 adquire um espectro de massas com todos os fragmentos produzidos	Obter informações estruturais dos íons produzidos na fonte de ionização
Íon precursor	Q1 faz uma varredura de todos os íons precursores Q3 seleciona um fragmento	Monitorar compostos que apresentam fragmentos idênticos
Perda de fragmentos neutros	Q1 e Q3 faz uma varredura de diferença fixa de m/z	Monitorar compostos que perdem a mesma espécie neutra
Monitoramento Seletivo de Reações	Q1 seleciona um íon precursor Q3 seleciona um fragmento	Monitorar uma reação selecionada

A varredura do íon produto é o modo mais tipicamente utilizado para se obterem informações estruturais das moléculas. Nos modos de varredura do íon produto e varredura da constante perda de fragmentos neutros, o objetivo é detectar certa classe de moléculas que apresentam um grupo funcional em comum. Estes dois últimos modos são particularmente úteis em análises qualitativas e em varreduras de amostras ambientais ou de alimentos. O monitoramento seletivo de reações é universalmente utilizado em combinação com a separação por CL para quantificar um composto específico em matrizes complexas. O monitoramento seletivo de uma fragmentação induzida por colisão promove boa seletividade e detectabilidade. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado monitoramento de reações múltiplas (multiple-reaction monitoring, MRM).

Assim sendo, o emprego da técnica CL-EM/EM fornece informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir altos níveis de confiabilidade e detectabilidade [71]. Otimizando o detector para mais de uma transição (MRM) para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório, aumentando a sua seletividade.

Quando se faz o acoplamento da cromatografia líquida com a EM obtém-se o cromatograma de massas que é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este. O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado cromatograma de íons totais (total ion chromatogram, TIC). Já o cromatograma constituído apenas pelos íons de interesse pode ser obtido pelo monitoramento dos íons selecionados (selected ion monitoring, SIM), ajustando-se o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse ou selecionando-os a partir de um banco de dados que contenha os espectros de massas completos [66].

Para realização deste trabalho foi utilizado o analisador de massas triplo quadrupolo e a técnica de varredura empregada foi o modo de aquisição MRM, monitoramento de reações múltiplas.

A Figura 5 mostra o esquema do espectrômetro de massas em série empregado neste estudo: cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas em série triplo

quadruplo API 1200 MS VARIAN com fonte de ionização por ESI.

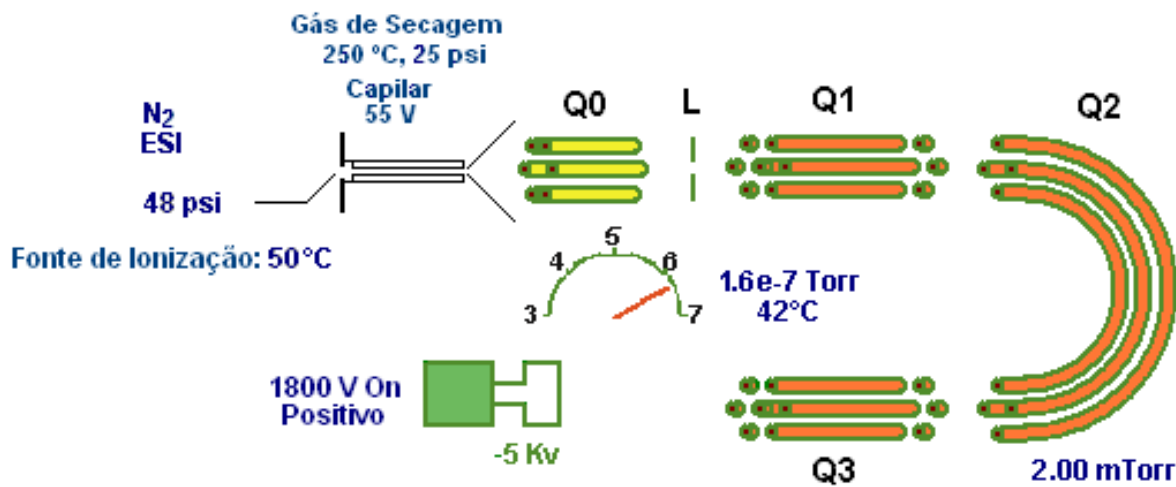


Figura 5- Esquema do espectrômetro de massas em série tripla quadruplo API 1200 MS VARIAN com fonte de ionização ESI.

1.4 Validação de métodos

Para garantir que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação [72-75, 76]. Em outras palavras, o método analítico deve ser exato, preciso, reprodutível e robusto.

A validação do método é o processo realizado para demonstrar que é aceitável para o propósito pretendido. Devem-se levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista, ambiente [76, 77].

Os parâmetros de validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalhos de organizações nacionais e internacionais e algumas definições são diferentes entre os diversos grupos.

As agências reguladoras do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia e Medidas (INMETRO), e de outros países, Codex Alimentarius, International Conference on Harmonization (ICH), Commission of the European Communities (SANCO), têm estabelecido documentos oficiais, guias, que

contêm as diretrizes a serem adotadas no processo de validação [72, 78] que possibilitem a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado.

Os guias do ICH [79] e da ANVISA [74] estabelecem parâmetros relativos especialmente à validação de métodos para determinação de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. O guia da ANVISA é uma versão, em português, do guia do ICH apresentando critérios para validação (definições, intervalos numéricos aceitáveis, números de ensaios, etc.) iguais aos da ICH.

Os guias da Eurachem [80] e da AOAC [81] podem ser aplicados a validação de métodos para análise de diversos compostos em vários tipos de matrizes. O protocolo da IUPAC [72] fornece uma síntese destes guias, em uma tentativa de harmonizar as diferenças que apresentam. O guia do INMETRO [73] apresenta diretrizes semelhantes às da Eurachem, com menor número de ensaios no procedimento de validação.

O Codex Alimentarius é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization, FAO) e da Organização Mundial da Saúde. Trata-se de um fórum internacional de normalização sobre alimentos, criado em 1963, e coordenado por comitês específicos que abordam assuntos como: resíduos de agrotóxicos, resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, nutrição e alimentos para dietas especiais, rotulagem de alimentos, métodos de análise e de amostragem, princípios gerais, aditivos e contaminantes alimentares, higiene de alimentos, dentre outros. Para as exportações, em que diversos países utilizam barreiras tecnológicas em substituição às barreiras tarifárias, como forma de protecionismo ao comércio internacional, a avaliação da conformidade atua como ferramenta estratégica nas relações econômicas, facilitando ou dificultando o livre comércio entre países e blocos econômicos. Desta forma, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional [82, 83]. Em resumo, Codex Alimentarius foi criado para a definição de normas e padrões a serem seguidos para garantir o fornecimento de alimentos seguros.

No Brasil não havia um guia específico relacionado à validação de métodos analíticos para agrotóxicos em amostras alimentícias e ambientais. Em 1999, um grupo de

pesquisadores ligados a órgãos públicos, indústrias e ao meio acadêmico, Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP), publicaram um manual com o objetivo de sugerir bases para a validação de métodos de análise de agrotóxicos em alimentos e também, como uma tentativa de normalizar este tipo de análise no Brasil [78]. Muitos laboratórios, principalmente os de pesquisa em universidades, utilizaram e alguns ainda utilizam algumas diretrizes deste manual para o direcionamento na análise de agrotóxicos [84, 85]. Algumas diretrizes sugeridas neste manual são as mesmas contidas no guia da ICH, apesar deste último ser voltado à determinação de fármacos.

Em 2001, a ANVISA iniciou o Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), visando avaliar no Brasil a qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos. O Projeto foi transformado em Programa, por meio da Resolução RDC 119, de 19 de maio de 2003 e atualmente foi ampliado, cobrindo 25 estados do país [86]. O PARA tem como objetivos específicos os seguintes itens: identificar e quantificar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos; fortalecer a rede de laboratórios de saúde; rastrear a fonte dos problemas e subsidiar ações de vigilância sanitária; avaliar o uso e mapear a distribuição dos agrotóxicos; disponibilizar informações relativas à contaminação de alimentos por agrotóxicos à sociedade [87]. Em 2007, a ANVISA, divulgou um guia delineando os requerimentos para a garantia da qualidade das análises realizadas pelos laboratórios integrantes do PARA (ANVISA-PARA) [88]. Este guia é uma união de trechos de dois guias internacionais: o da SANCO [89] e o do Codex Alimentarius [90]. A primeira parte contém uma versão em português do guia da SANCO e a segunda apresenta tabelas em inglês extraídas do guia do Codex Alimentarius.

Os guias da SANCO [89] e da ANVISA-PARA [88] apresentam uma diferença notável em relação aos outros guias comentados anteriormente. Por serem versões mais atuais, estes guias prevêm, descrevem e estabelecem parâmetros para a utilização da espectrometria de massas (empregados na cromatografia líquida ou gasosa) como meio de confirmação da presença do analito na amostra estudada, o que representa um avanço em relação aos outros guias.

As variáveis utilizadas na validação de métodos são conhecidas como parâmetros de desempenho analítico e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito. São elas: seletividade, linearidade, intervalo de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção,

limite de quantificação e robustez.

1.4.1 Seletividade

Um método analítico é considerado seletivo quando é capaz de produzir respostas para vários analitos, mas também é capaz de distinguir a resposta de um analito da dos outros [73]. É a habilidade de um método em quantificar o analito sem equívocos na presença de componentes que podem estar presentes como impurezas, produtos de degradação e excipientes [91].

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, como outro ingrediente ativo, substâncias endógenas, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que podem estar presentes na amostra [76, 92].

Na cromatografia líquida, a seletividade pode ser alcançada através da otimização das etapas de extração e de separação dos analitos. Em relação à extração, a seletividade do método é regida pelo tipo de técnica de extração selecionada e por todas as variáveis envolvidas no seu procedimento, como por exemplo, tipo de solventes e tempo de extração. A seletividade na etapa de separação cromatográfica pode variar de acordo com o tipo de recheio da coluna cromatográfica e composição da fase móvel [81].

A seletividade de um método analítico pode ser avaliada de duas formas [76]:

- comparando-se a matriz isenta dos agrotóxicos com a matriz adicionada com os padrões dos agrotóxicos, em quantidades conhecidas, para verificar a existência de coeluição destes compostos junto aos interferentes da matriz;
- utilizando-se detectores modernos (arranjo de diodos e espectrômetros de massas) que permitem comparar o espectro do pico obtido na amostra com o espectro do padrão puro.

1.4.2 Linearidade ou Faixa linear de trabalho

A linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de

concentração, denominada de faixa linear de trabalho ou intervalo de linearidade [75]. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação do método (LQm). No limite superior, o fator limitante depende do sistema de resposta do instrumento.

A faixa linear deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa linear. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa linear de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior que o limite de quantificação do método.

Em geral, são necessários vários pontos de calibração para determinar a faixa de trabalho. O INMETRO [73] e o Codex Alimentarius [90] sugerem sete ou mais pontos, a AOAC [81], de seis a oito pontos. Os guias da ICH [79], ANVISA [74], e GARP [78] sugerem cinco concentrações.

A maior parte dos guias citados recomenda que os pontos das curvas sejam preparados em extratos da matriz, com o objetivo de contabilizar os erros de preparo das amostras, dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras.

A linearidade do método pode ser determinada por meio da regressão linear aplicada a um conjunto de dados obtidos por padronização externa para a construção da curva analítica que pode ser expressa pela equação de reta [76] (equação I):

$$y = ax + b \quad (I)$$

onde: **y** = resposta medida (altura ou área do pico);

x = concentração do analito

a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

A partir dos coeficientes de regressão (*a* e *b*) calcula-se, também, o coeficiente de correlação, o qual permite obter uma estimativa qualitativa da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de dados experimentais e menor a

incerteza dos coeficientes de regressão estimados [76]. A ANVISA [74] recomenda um coeficiente de correlação de 0,99 e o INMETRO [73] um valor acima de 0,90. O valor do coeficiente linear, b , também deve ser observado, pois este deve ser menor que uma pequena porcentagem da resposta obtida para o analito no nível avaliado [93]. Caso isto não ocorra, deve-se demonstrar que este fator não afeta a exatidão do método [94]. Entretanto, nenhum dos guias sugere qual é a porcentagem aceitável.

A linearidade do método pode ser avaliada de duas formas. A primeira delas é através da construção do gráfico de resíduos. Os resíduos representam a diferença entre a concentração nominal (teórica) e a concentração média obtida, em porcentagem. Para cada uma das curvas dos analitos, constrói-se um gráfico dos resíduos versus a concentração nominal. Deve-se obter uma distribuição aleatória entre os valores residuais positivos e negativos, sem nenhuma tendência ou padrão, para confirmação da linearidade [72, 94-97].

Outra alternativa para estabelecer a linearidade é dividir a resposta pelas respectivas concentrações obtendo as respostas relativas. Constrói-se então um gráfico com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x . A linha obtida deve ser horizontal em toda faixa linear. Este gráfico deve mostrar também os desvios (geralmente ± 5). Os pontos que estiverem fora da faixa determinada denotam concentrações analíticas que se encontram fora da faixa linear [94, 95, 98].

1.4.3. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [73].

A precisão é determinada, através do cálculo da estimativa do desvio padrão absoluto (s) (equação II) e da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (equação III).

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra [76].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{II})$$

onde: $\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições

x_i é o valor individual de uma medição

n é o número de medições

$$\text{RSD ou CV} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{III})$$

Na Tabela 2, estão descritos os níveis de CV aceitáveis recomendados pela norma Council Directive (2002), Comunidade Européia [99].

Tabela 2 – Níveis de recuperação e faixa de coeficiente de variação [99].

Nível de recuperação	Coeficiente de variação – CV (%)
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$> 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	15
$\geq 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	10

Quanto menor a concentração avaliada, maiores são as chances da dispersão dos resultados das recuperações. A ANVISA [74] estabelece o coeficiente de variação aceitável de até 20%.

A precisão em validação de métodos é considerada em 3 níveis diferentes:

- ▲ **Repetitividade** é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, que compreendem um mesmo procedimento de extração, mesmo observador, mesmo instrumento, mesmo local e repetições em um curto espaço de tempo [73]. Segundo o INMETRO [73], para se determinar a repetitividade de um

método é necessário realizar sete ou mais repetições para o cálculo do CV (%). Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH) [79] e a ANVISA [74], para o cálculo do CV (%) são necessárias nove repetições (três níveis, três repetições em cada um).

- ▲ **Precisão Intermediária** refere-se a precisão avaliada da mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente as condições a variar (uma ou mais), como diferentes tempos, diferentes analistas ou diferentes equipamentos [73]. O número de ensaios necessários para o cálculo do CV (%), segundo a ICH [79] e a ANVISA [74], é o mesmo que o recomendado para a repetitividade.
- ▲ **Reprodutibilidade** é o grau de concordância entre medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição, como mudança de laboratórios, operadores e equipamentos [73].

1.4.4 Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro [73]. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: o uso de materiais de referência, a comparação de métodos ou realização de ensaios de recuperação [76].

A recuperação (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada [72]. Ela deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, pois a dispersão dos resultados tende a aumentar com a diminuição da concentração. Segundo a ICH [79] e a ANVISA [74] é necessário um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três níveis de concentração para a determinação da exatidão. O GARP [78] recomenda que se trabalhe nos níveis de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação.

O intervalo aceito para recuperação na análise de multirresíduos geralmente é de

70 a 120 %, com precisão de ± 20 %. Mas, dependendo da complexidade da amostra, esta faixa pode ser de 50 a 130 % com precisão de ± 15 % [78].

A recuperação foi calculada segundo a equação (IV):

$$R (\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (IV)$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = concentração adicionada à amostra

1.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato [74]. Outra definição relevante é dada pela IUPAC [72], de que o LD é a menor concentração do analito na amostra que pode ser distinguida de zero com confiança.

O LD pode ser determinado pelo método sinal/ruído ou baseado nos parâmetros da curva analítica.

No desenvolvimento de um método, quando ocorre concentração dos analitos na etapa de preparo da amostra é necessário fazer uma distinção entre dois tipos de LD que apresentam valores diferentes. O LD do instrumento (LDi) que é a concentração correspondente à área do pico verificada no cromatograma do analito. O LD do método (LDm) que é o valor da concentração do agrotóxico na matriz antes da sua extração e consequente concentração. O LDi e o LDm relacionam-se através da equação (V) [100].

$$LDm = \frac{LDi}{\text{fator de concentração}} \quad (V)$$

onde: fator de concentração = número de vezes no qual o analito foi concentrado no procedimento de extração.

O LDi pode ser determinado de formas diferentes sendo que as mais comuns são através do método da relação sinal-ruído e através dos parâmetros da curva analítica.

No método da relação sinal-ruído, o LDi é determinado através da injeção de extratos da matriz fortificada com baixas concentrações do analito. Nos cromatogramas obtidos, o LDi é a concentração que resulta em um sinal com altura três vezes maior que o ruído da linha de base [73].

O LDi pode ser obtido também através da inclinação da curva analítica [76], como mostrado na Equação (VI):

$$LDi = 3,3 \times \frac{s}{a} \quad (VI)$$

onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta

a: inclinação ou coeficiente angular da curva

O parâmetro “s” pode ser a estimativa do desvio padrão da equação da curva de regressão ou do coeficiente linear da equação [76].

1.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão [73].

Os mesmos critérios para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, ou seja, o LQ pode ser calculado pelo método sinal/ruído ou baseado na curva analítica [76]. Pelo método do sinal-ruído, o LQi é a concentração do analito que resulta em um sinal com altura dez vezes maior que o ruído da linha de base.

O LQi pode ser obtido também através da inclinação da curva analítica, como mostrado na Equação (VII).

$$LQi = 10 \times \frac{s}{S} \quad (VII)$$

onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta*

S : inclinação ou coeficiente angular da curva

1.4.7 Robustez

Um método é considerado robusto quando ele se revelar praticamente insensível às pequenas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado [73].

A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros como a proporção do solvente orgânico, pH ou força iônica da fase móvel em CLAE, colunas cromatográficas diferentes (variação de lotes ou fornecedor), variação entre marcas de reagentes, natureza do gás de arraste em CG, programação de temperatura, temperatura da coluna, bem como tempo de agitação, extração, etc. [76].

2 OBJETIVOS

- O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método multirresíduo, rápido e eficiente para separar, identificar e quantificar alguns agrotóxicos aplicados em uva *in natura*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por arranjo de diodos (DAD) ou por espectrometria de massas em série (EM/EM), empregando algumas técnicas de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (ELL), a extração em fase sólida (EFS) e o método QuEChERS.
- Realizar a validação do melhor método selecionado através da determinação das seguintes figuras de mérito: seletividade, curva analítica e intervalo de linearidade, detectabilidade (limite de detecção e limite de quantificação), precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação) e robustez.
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de uva *in natura*, adquiridas no comércio local, com casca, sem casca, com e sem sementes, para verificar os níveis de resíduos encontrados e as diferenças entre eles.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

3.1.1 Reagente, solventes e cartuchos

- ▲ Água deionizada, sistema Milli-Q, Milipore
- ▲ Sulfato de sódio p.a., E Tedia, Ecibra
- ▲ Cloreto de sódio p.a., Spectrum
- ▲ Hidrogenocitrato de dissódio sesquiidratado, Sigma
- ▲ Citrato de trissódio diidratado, Sigma
- ▲ Sulfato de magnésio, Synth
- ▲ Diclorometano, Tedia, grau resíduo
- ▲ Éter de petróleo, Tedia, grau resíduo
- ▲ Acetona, Tedia, grau resíduo
- ▲ Etanol, Tedia, grau resíduo
- ▲ Metanol, Tedia, grau resíduo
- ▲ Acetonitrila, Tedia, grau resíduo,
- ▲ Cartuchos Supelclean™ LC-18, 3 mL, SUPELCO
- ▲ Sorvente Bondesil-PSA, 40 µm, Varian

Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), etanol, acetona, éter de petróleo e diclorometano e os reagentes sulfato de sódio grau p.a., cloreto de sódio (NaCl) grau p.a., foram utilizados no preparo de amostra empregando ELL.

No preparo de amostras para o método de EFS, foram empregados os cartuchos para extração em fase sólida Supelclean™ LC-18 e os solventes acetonitrila e metanol.

Para o método QuEChERS foram utilizados os reagentes hidrogenocitrato de dissódio sesquiidratado, citrato de trissódio diidratado, sulfato de magnésio (MgSO₄) e o solvente acetonitrila. Foi utilizado, também, o sorvente Bondesil-PSA.

A água utilizada em todos os métodos de preparo de amostra foi ultrapurificada em um sistema Millipore (modelo Milli-Q), com resistividade de 18 MΩ cm a 25 °C.

3.1.2 Padrões de agrotóxicos

- ▲ Aldicarbe, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Ametrina, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Azoxistrobina, grau de pureza 98%, Riedel-de-Haen
- ▲ Carbaril, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Captan, grau de pureza 98%, Chem Service
- ▲ Cimoxanil, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen
- ▲ Ciproconazol, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen
- ▲ Difenconazol, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen
- ▲ Diuron, grau de pureza 98%, Chem Service
- ▲ Fenarimol, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen
- ▲ Flutimida, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Miclobutanil, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen
- ▲ Simazina, grau de pureza 98%, Chem Service
- ▲ Tebuconazol, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Tiofanato metílico, grau de pureza 99%, Chem Service
- ▲ Triadimefom, grau de pureza 99%, Riedel-de-Haen

3.2 Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados foram:

- ▲ Agitador vórtex (Phoenix, modelo AP 56)
- ▲ Balança analítica, com precisão de 5 casas decimais (Sartorius, modelo CP 225 D)
- ▲ Banho ultrassom (Thronton, modelo T14)
- ▲ Bomba de vácuo (Waters, modelo DOA – Y152 – AA),
- ▲ Centrífuga (Fisher Scientific, modelo 225)
- ▲ Manifold de extração em fase sólida (20 posições – Supelco)
- ▲ Balão volumétrico de 5, 10, 100 e 1000 mL
- ▲ Filtro Millex (Millipore) - membranas de polietileno com 0,45 µm de diâmetro

de poro

- ▲ Frascos de vidro com tampa revestida com teflon de 50 mL
- ▲ Micropipeta de 10 – 100 μ L (Eppendorf Research)
- ▲ Micropipeta de 100 – 1000 μ L (Eppendorf Research)
- ▲ Pipetas volumétricas de 10 mL
- ▲ Tubos de vidro para centrífuga, 35 mL, com tampa revestida com Teflon
- ▲ Funil de Büchner
- ▲ Kitassato de 250 mL e 1000 mL
- ▲ Funil de separação de 250 mL

3.3 Sistemas cromatográficos

Nas análises cromatográficas foram utilizados dois sistemas cromatográficos:

- Cromatógrafo a líquido com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD), WATERS, composto por:
 - ▲ Sistema controlador de solventes (bombas de alta pressão tipo pistão duplo), modelo 515;
 - ▲ Detector por Arranjo de Diodos (PDA), modelo 996 (cela de 8 μ L de volume, 10 mm de caminho ótico);
 - ▲ válvula de injeção manual, tipo *Rheodyne*[®], com volume de injeção de 10 μ L.
 - ▲ Coluna analítica Chromsip C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m de diâmetro de partícula), do fabricante VARIAN e coluna analítica Nova Pak C18 (150 x 3,9 mm d.i., 4 μ m de diâmetro de partícula), do fabricante WATERS.
 - ▲ Coluna de guarda Nova PaK C18 (20 x 3,9 mm d.i., 4 μ m de diâmetro de partícula) do fabricante WATERS.
 - ▲ Aquisição e tratamento dos dados através do programa computacional Millenium.
- Cromatógrafo a líquido com detecção por espectrometria de massas em série (CL-EM/EM), VARIAN, composto por:

- ▲ Um sistema controlador de solventes Pro Star modelo 210 (bombas de alta pressão tipo pistão duplo);
- ▲ Desgaseificador “on-line” Meta Chem Technologies Inc., para a desgaseificação dos solventes utilizados como FM;
- ▲ Injetor automático Modelo 410;
- ▲ Detector 1200L Triplo Quadrupolo MS/MS com fonte API;
- ▲ Interface por eletronebulização (*electrospray*, ESI), modo positivo;
- ▲ Gás de nebulização e gás de secagem: nitrogênio (N₂);
- ▲ Gás de colisão: argônio (Ar);
- ▲ Bomba de infusão Harvard Apparatus 11 Plus;
- ▲ Gerador de nitrogênio (N₂) G4510W.
- ▲ Coluna analítica Polaris C18 (50 x 2,0 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula), do fabricante VARIAN.
- ▲ Aquisição e tratamento dos dados através do programa computacional MS Workstation v 6.51.

3.4 Seleção dos agrotóxicos estudados

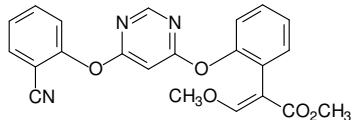
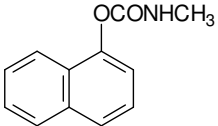
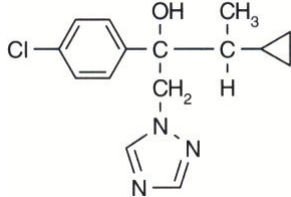
Os agrotóxicos selecionados para o estudo correspondem aos mais aplicados em culturas de uva, de acordo com a ANVISA.

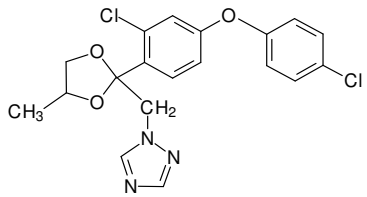
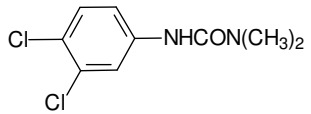
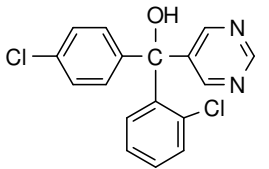
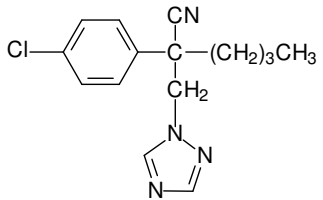
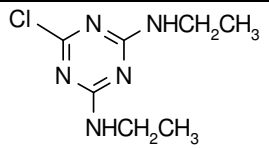
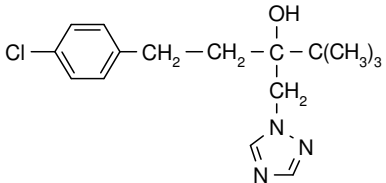
Inicialmente, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a extração líquido-líquido (ELL) ou a extração em fase sólida (EFS), estudaram-se os agrotóxicos captam, ciproconazol, difenoconazol, fenarimol, ftalimida, tebuconazol, tiofanato metílico e triadimefom. Devido a polaridade de alguns compostos não serem compatíveis com a coluna de fase reversa que estava sendo utilizada e a coeluição de alguns compostos, substituiu-se a ftalimida, o tiofanato metílico e o captam pela simazina, carbaril e diurom.

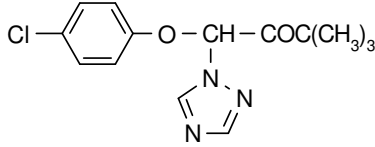
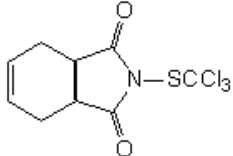
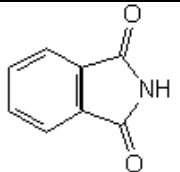
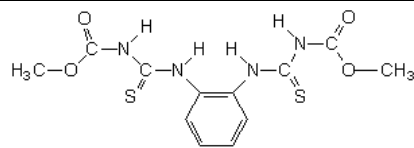
Ao empregar a CL-EM/EM, devido a sua melhor seletividade e detectabilidade incluíram-se novos agrotóxicos que totalizaram em 13, a saber, aldicarbe, ametrina, azoxistrobina, carbaril, cimoxanil, ciproconazol, difenoconazol, diurom, fenarimol, miclobutanil, simazina, tebuconazol e triadimefom.

As estruturas dos agrotóxicos estudados e algumas de suas características estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Agrotóxicos estudados, suas características e estruturas químicas [101, 102].

AGROTÓXICO	CLASSE	GRUPO QUÍMICO	CLASSIF. TOXICOL.	LMR (mg kg ⁻¹)		ESTRUTURA MOLECULAR
				CODEX	ANVISA	
Aldicarbe	Acaricida / Inseticida / Nematicida	Metílcabamato de oxima	I	0,2	-	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{S}-\text{C}-\text{CH}=\text{NOCONHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ametrina	Herbicida	Triazina	III	-	0,02	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{S} \quad \text{N} \quad \text{NHCH}_2\text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{NHCH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	III	-	0,5	
Carbaril	Inseticida	Metílcabamato de naftila	II	5,0	-	
Cimoxanil	Fungicida	Acetamida	III	-	0,2	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCONHCOC}(\text{CN})=\text{NOCH}_3$
Ciproconazol	Fungicida	Triazol	III	-	0,1	

Difenoconazol	Fungicida	Triazol	I	-	0,2	
Diuron	Herbicida	Uréia	III	-	0,1	
Fenarimol	Fungicida	Pirimidinil Carbinol	III	0,3	0,05	
Miclobutanil	Fungicida	Triazol	I	1,0	0,5	
Simazina	Herbicida	Triazina	III	-	0,02	
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	IV	2,0	2,0	

Triadimefom	Fungicida	Triazol	III	0,5	2,0	
Captam*	Fungicida	Dicarboximida	III	25	0,1	
Ftalimida*	Fungicida	Pirimidinil Carbinol	-	-	0,02	
Tiofanato Metílico*	Fungicida	Benzimidazol	IV	-	0,08	

Classes: I (extremamente tóxico), II (altamente tóxico), III (medianamente tóxico), IV (pouco ou muito pouco tóxico)

*Agrotóxicos substituídos

3.5 Soluções estoque e de trabalho

As soluções estoque dos agrotóxicos, na concentração $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram preparadas em acetonitrila, exceto para a simazina, que foi preparada em etanol, o que permitiu uma maior solubilidade. Estas soluções foram estocadas em um refrigerador a, aproximadamente, -4°C , mantendo-se estáveis por até 6 meses.

A partir das soluções estoque foram feitas diluições em concentrações adequadas para preparar as soluções de trabalho empregadas na construção das curvas analíticas e na fortificação das amostras branco. Estas soluções, inclusive as mais diluídas, permaneceram estáveis por um período de sete dias se armazenadas adequadamente e refrigeradas a -4°C .

A limpeza da vidraria consistiu em deixá-la de molho em solução de Extran, a 5%, por um período de, no mínimo, 2 h. Em seguida, lava-se várias vezes, a vidraria, com água de torneira e uma vez com água deionizada. Finalmente, passa-se um pouco de acetona e deixa-se secar à temperatura ambiente.

3.6 Amostras de uva niágara rosada

As amostras isentas de agrotóxicos, amostras branco, que foram empregadas no desenvolvimento e na validação do método, uva orgânica da espécie niágara rosada, foram obtidas, nas primeiras análises, de uma pequena plantação caseira, na cidade de Piumhi-MG. Em análises posteriores, as uvas orgânicas, da mesma espécie, foram obtidas em uma produção na cidade de Indaiatuba. As amostras para a aplicação dos métodos desenvolvidos e validados foram obtidas em frutarias e supermercados de Campinas-SP e do Distrito de Barão Geraldo para a determinação de possíveis resíduos de agrotóxicos. Três amostras foram analisadas no sistema CL-EM/EM empregando os métodos de preparo de amostra de EFS e o método QuEChERS. Uma das amostras foi dividida em três lotes: com casca e sem sementes, com casca e com sementes e sem casca e com sementes, para verificar possíveis influências.

O procedimento geral de tratamento das amostras consistiu em lavar as uvas e após a retirada das sementes, suas partes comestíveis juntamente com a casca foram

cortadas e homogeneizadas em um liquidificador doméstico. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, em porções de aproximadamente 30 g, que foram selados sob atmosfera de nitrogênio e mantidos em freezer a cerca de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de serem utilizadas.

Antes da amostra ser utilizada, o frasco foi mantido tampado sobre uma bancada do laboratório até que atingisse a temperatura ambiente.

3.7 Otimização das condições cromatográficas e identificação dos compostos estudados

3.7.1 Empregando CLAE-DAD

Após estudos nos quais se variaram o tipo de eluição, a composição de FM e a vazão, selecionaram-se as seguintes condições cromatográficas para efetuarem-se as análises: modo de eluição por gradiente, com programação linear, iniciando com 20% de ACN e 80% de água até 70% de ACN e 30% de H_2O em 28 min, voltando às condições iniciais em 7 min e permanecendo nessa condição por 5 min, com um tempo total de corrida cromatográfica de 40 min, vazão da FM: 1 mL min^{-1} e volume de injeção: $10\text{ }\mu\text{L}$.

Definidas as condições cromatográficas de separação, efetuou-se a identificação dos picos estudados injetando-se uma solução de $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, em acetonitrila, de cada um dos agrotóxicos estudados individualmente. O tempo de retenção e o espectro de absorção no UV de cada agrotóxico foram comparados aos obtidos quando se injetou uma mistura dos padrões desses compostos, nas mesmas condições cromatográficas.

Através do espectro de absorção no UV, determinou-se o comprimento de onda de absorção máxima para determinação de cada agrotóxico. Como o comprimento de onda de absorção máxima no UV dos agrotóxicos em estudo variou entre 210 e 280 nm, foi escolhido um comprimento de onda intermediário (225 nm), no qual todos os compostos absorvem, para a apresentação do cromatograma de separação. As demais medidas foram realizadas no comprimento de onda de absorção máxima de cada composto.

Todos os solventes foram previamente filtrados, empregando uma membrana de polietileno com $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de porosidade (Millipore), e desgaseificados por aplicação de

ultrassom e vácuo por 30 min.

3.7.2 Empregando CL-EM/EM

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados para que operasse em EM/EM, no modo de aquisição MRM e ionização por eletronebulização (ESI) no modo positivo. Usaram-se voltagem do capilar, 55 V; temperatura da fonte de ionização, 50 °C; temperatura de dessolvatação, 250 °C, pressão de 2,00 mTorr de argônio para colisão e fragmentação dos íons.

A Identificação dos picos foram otimizadas realizando-se a infusão dos compostos individualmente, no espectrômetro de massas, para seleção do íon precursor e dos íons produto para cada composto, de modo a se obterem a voltagem do cone, a energia de colisão e o monitoramento de duas transições por MRM. Foram injetadas soluções de 500 ng mL⁻¹ de cada agrotóxico em solução de acetonitrila: solução de ácido acético 0,1% (50:50, v/v).

A análise foi efetuada utilizando como FM uma solução de ácido acético 0,1% (HAc 0,1%) e acetonitrila (ACN). Empregou-se o modo de eluição por gradiente, com programação linear, iniciando com 20% de ACN e 80% da solução HAc 0,1% até 63% de ACN em 23 min, voltando às condições iniciais em 10 min e permanecendo nessas condições por 12 min, obtendo-se um tempo total de corrida cromatográfica de 45 min, usando uma vazão de 0,25 mL min⁻¹.

Todos os solventes foram previamente filtrados (0,45 µm) e desgaseificados por aplicação de ultrassom por 10 min.

3.8 Estudo de métodos de preparo de amostra

Para o desenvolvimento e a otimização dos procedimentos de extração foram avaliadas várias técnicas de extração, empregando-se amostras branco de uva, com o objetivo de se obterem resultados satisfatórios, tanto em termos de recuperação, como de precisão e de seletividade.

3.8.1 Extração Líquido-Líquido (ELL)

O procedimento de extração líquido-líquido foi baseado no método de Luke *et al.* [103] e consistiu no procedimento descrito a seguir:

- Fortificaram-se 5 g de amostra branco, homogeneizou-a em vórtex e deixou-a em repouso por 30 min.
- Adicionaram-se 75 mL de acetona e agitou-se, em agitador horizontal, por 1 h, a temperatura ambiente. Filtrou-se o extrato, em funil Büchner, o qual foi recolhido em kitassato conectado à bomba de vácuo.
- Transferiu-se o filtrado para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com acetona.
- Retirou-se uma alíquota de 50 mL deste extrato, transferiu-a para um funil de separação de 250 mL. Para favorecer a transferência dos compostos de interesse para a fase orgânica, acrescentaram-se 40 mL de uma solução saturada de NaCl e adicionaram-se 100 mL da mistura dos solventes éter de petróleo:diclorometano (50:50, v/v).
- Agitou-se o balão vigorosamente por 5 min e deixou-o em repouso para separação das fases aquosa e orgânica.
- A fase aquosa (inferior) foi transferida para outro funil de separação e a fase orgânica (A) foi reservada.
- À fase aquosa, acrescentaram-se 40 mL de diclorometano e agitou-se por 1 min. Deixou o funil em repouso até a separação das fases.
- Descartou-se a fase aquosa e a fase orgânica (B) foi recolhida.
- Misturaram-se as fases orgânicas A e B e, para garantir a eliminação de água dos extratos, filtrou-as com sulfato de sódio anidro, utilizando-se funil como suporte.
- Recolheu-se o filtrado em balão de fundo redondo e concentrou-o até aproximadamente 1 mL, em rotavapor, a temperatura de 40 °C.
- Em seguida, o balão foi lavado com 10 mL de acetonitrila. O extrato foi transferido para um tubo concentrador, evaporado com N₂ até secura total e redissolvido com 2 mL de acetonitrila, concentrando-o em até 1,25 vezes.
- O extrato foi injetado no sistema cromatográfico CLAE-DAD

O fluxograma referente ao procedimento de ELL está representado na Figura 6.

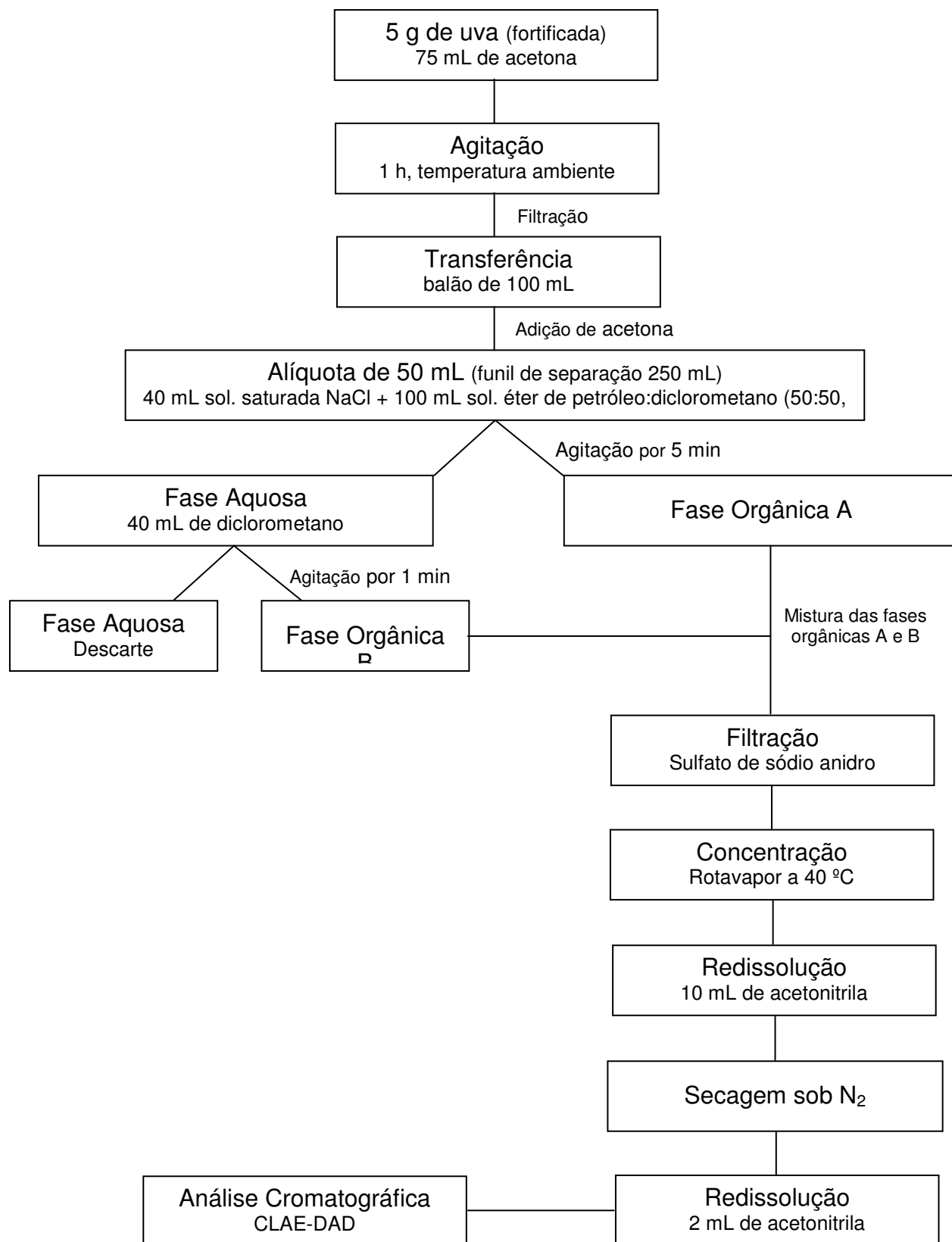


Figura 6: Fluxograma do procedimento de extração empregando ELL

3.8.2 Extração em fase sólida (EFS)

O procedimento de extração em fase sólida adotado baseou-se no trabalho de Teixeira *et al.* [39], descrito a seguir:

- Fortificaram-se 10 g de amostra de uva. Adicionaram-se 10 mL de metanol.
- Homogeneizou-se em vórtex por 2 min e deixou-se em repouso por 30 min.
- Centrifugou-se por 15 min a 3000 rpm.
- Transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada.
- Condicionaram-se os cartuchos Supelclean LC-18, em *manifold*, com 6 mL de metanol e 6 mL de uma mistura metanol:água (30:70, v/v), a uma vazão de aproximadamente 1 mL min⁻¹.
- Passou-se através dos cartuchos, sob a mesma vazão de aproximadamente 1 mL min⁻¹, o conteúdo do balão (100 mL).
- Os cartuchos foram secos pela passagem de um fluxo contínuo de ar, aplicando-se vácuo, ao manifold, por 60 min, para então, realizar a eluição dos compostos retidos em cada cartucho com 10 mL de acetonitrila.
- O eluato foi mantido sob fluxo de gás nitrogênio até a secura e redissolvido em 500 µL de acetonitrila e analisados por CLAE-DAD. O fator de concentração foi de 20 vezes.
- Nas análises por CL-EM/EM, o extrato foi ressuspendido com 1 mL de uma solução de acetonitrila:ácido acético 0,1%: (30:70, v/v). O fator de concentração foi de 10 vezes.
- Injetou-se no sistema cromatográfico.

O fluxograma referente ao procedimento de EFS está representado na Figura 7.

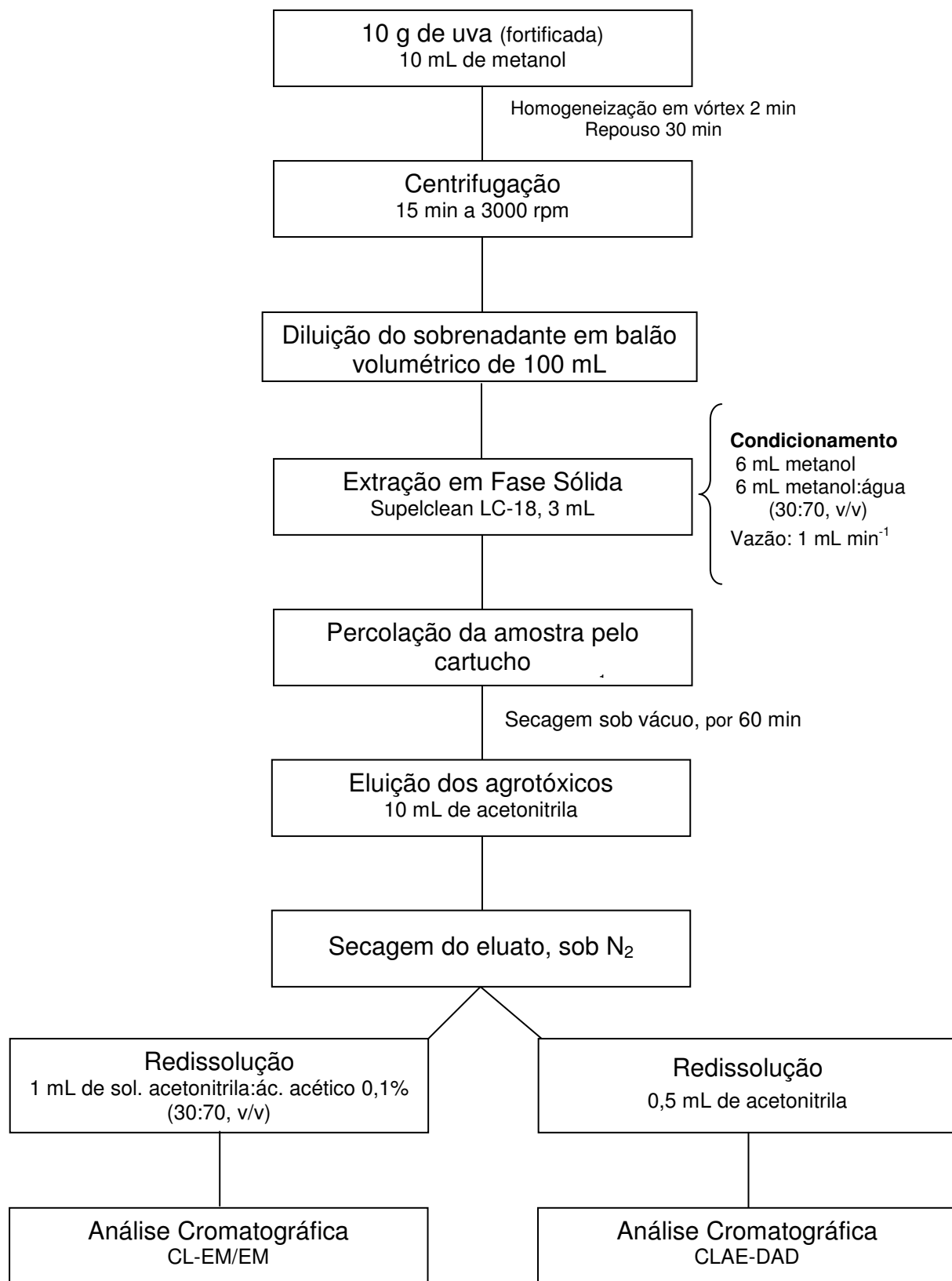


Figura 7: Fluxograma referente ao procedimento de extração usando a EFS

3.8.3 Método QuEChERS

O procedimento do método QuEChERS adotado baseou-se no trabalho de Anastassiades [40].

- Fortificaram-se 10 g de amostra de uva. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila.
- Homogeneizou-se, em vórtex, por 1 min.
- Adicionaram-se, em sequência:
 - ▲ 4 g de sulfato de magnésio,
 - ▲ 1 g de cloreto de sódio,
 - ▲ 1 g de sulfato de trissódio diidratado,
 - ▲ 0,5 g de hidrogenocitrato de dissódio sesquidratado.
- Agitou-se por mais 1 min em vórtex.
- Sonificou-se por 20 min.
- Centrifugou-se, a 3000 rpm a 10 °C, por 5 min.
- Retirou-se, da fase orgânica (fase superior), uma alíquota de 5 mL e transferiu-a para outro frasco.
- Adicionaram-se 125 mg de PSA e 750 mg de sulfato de magnésio.
- Agitou-se, por 30 segundos, em vórtex.
- Centrifugou-se, a 3000 rpm e 10 °C, por 5 min.
- Retirou-se uma alíquota de 2 mL do sobrenadante, filtrou-se em Miley e transferiu-a diretamente para um vial.
- Acrescentaram-se 20 µL de solução de ácido acético 0,1%.
- Injetou-se no cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas.

O fluxograma referente ao procedimento do método QuEChERS está mostrado na Figura 8.

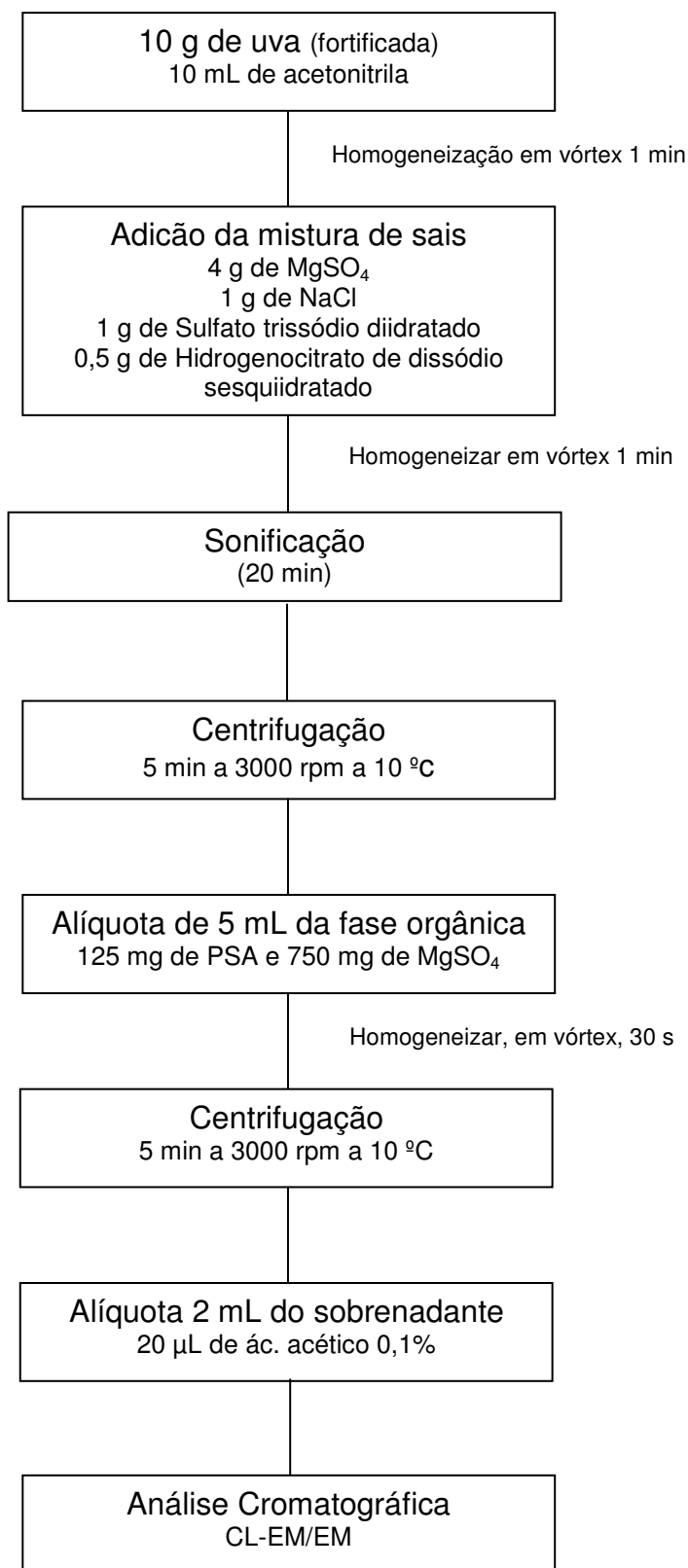


Figura 8 - Fluxograma referente ao procedimento do Método QuEChERS

3.9 Validação da metodologia

Definido o método de preparo de amostra baseado em EFS e em QuEChERS e estabelecidas as melhores condições de separação dos agrotóxicos nos sistemas cromatográficos estudados, foi feita a validação do método por meio da determinação das figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

3.9.1 Seletividade

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada comparando-se a matriz isenta dos agrotóxicos com a matriz adicionada com os padrões dos agrotóxicos para verificar se ocorria a coeluição destes compostos junto aos interferentes da matriz.

3.9.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho

A faixa de trabalho foi previamente avaliada, empregando-se a padronização externa com e sem superposição da matriz, sendo construídas curvas analíticas a partir de padrões puros dos agrotóxicos selecionados.

Injetaram-se, no sistema cromatográfico, diretamente 10 μL da mistura padrão dos agrotóxicos estudados, em acetonitrila, em concentrações variando entre 0,1 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para a CLAE-DAD e 20 μL da mistura padrão em concentrações variando entre 2 a 1000 ng mL^{-1} , para a CL-EM/EM. As injeções foram feitas em sete níveis de concentrações e em triplicatas. A partir destes resultados, foram construídas as curvas analíticas, para os compostos estudados, obtendo alguns parâmetros estatísticos para o desenvolvimento do trabalho analítico.

A linearidade do método desenvolvido foi determinada por meio da regressão linear aplicada ao conjunto de dados obtidos por padronização externa para a construção da curva analítica. A partir da curva analítica obtiveram os coeficientes de regressão (a e b) e o coeficiente de correlação. Também se construiu o gráfico de resíduos para verificar a

qualidade da linearidade.

3.9.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária:

- ▲ Repetitividade: cálculo do CV (%) para 9 ensaios (3 níveis de fortificação, 3 repetições cada um) realizados no mesmo dia.
- ▲ Precisão intermediária: cálculo do CV (%) para 9 ensaios (3 níveis de fortificação, 3 repetições cada um) realizados em dias diferentes e sequenciais.

3.9.4 Exatidão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi determinada por meio de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração (1 x LQ, 2 x LQ e 10 x LQ) e em triplicatas, resultando num total de nove determinações, conforme sugerido pela ICH [79] e ANVISA [74].

3.9.5 Limite de detecção (LD)

Neste trabalho, utilizou-se o método sinal/ruído, ou seja, determinou-se o limite de detecção através da comparação entre a medição dos sinais das amostras em baixas concentrações conhecidas e um branco dessas amostras para estabelecer a concentração mínima na qual o analito pode ser facilmente detectado [79]. A proporção entre sinal/ruído usada como estimativa do LD foi de 3:1. O estudo foi feito em triplicata.

3.9.6 Limite de quantificação (LQ)

Neste trabalho, utilizou-se o método sinal/ruído, determinando-se o limite de quantificação a uma proporção 10:1 sinal/ruído. O estudo foi feito em triplicata.

3.9.7 Robustez

Neste trabalho, a robustez foi avaliada pela variação das marcas dos reagentes empregados no preparo das amostras e da FM e pequenas variações na fonte de ionização e na vazão do gás de dessolvatação foram introduzidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de método empregando CLAE-DAD:

4.1.1 Método de separação 1 – ELL-CLAE-DAD

Para estabelecer os parâmetros mais adequados para a análise, foram realizados vários testes para a escolha da melhor composição da FM, proporção e modo de eluição para a separação dos compostos estudados. Buscou-se, inicialmente, utilizar condições mais simples e reprodutíveis, isto é, FM sem ajuste do pH e eluição isocrática. Porém, estas condições não foram suficientes para permitir uma separação com boa resolução entre todos os compostos estudados.

A composição da FM considerada mais adequada foi ACN:H₂O, em modo de eluição por gradiente, pois forneceu uma eluição com melhor resolução cromatográfica dos agrotóxicos estudados e em um menor tempo de análise.

O melhor programa de gradiente iniciava-se com 20% de ACN e 80% de H₂O passando para 47% de ACN e 53% de H₂O, em 12 min e aumentava linearmente até 100% de ACN, então voltava às condições iniciais em um tempo total de corrida cromatográfica de 32 min. Na Figura 9 pode ser visualizado o cromatograma obtido na condição otimizada. Analisando o cromatograma verifica-se que se obteve uma resolução satisfatória para todos os compostos estudados. Porém, os compostos ciproconazol, fenarimol, captam, triadimefom e tebuconazol eluíram muito próximos e não foi possível uma melhor separação sem comprometer o comportamento dos demais compostos.

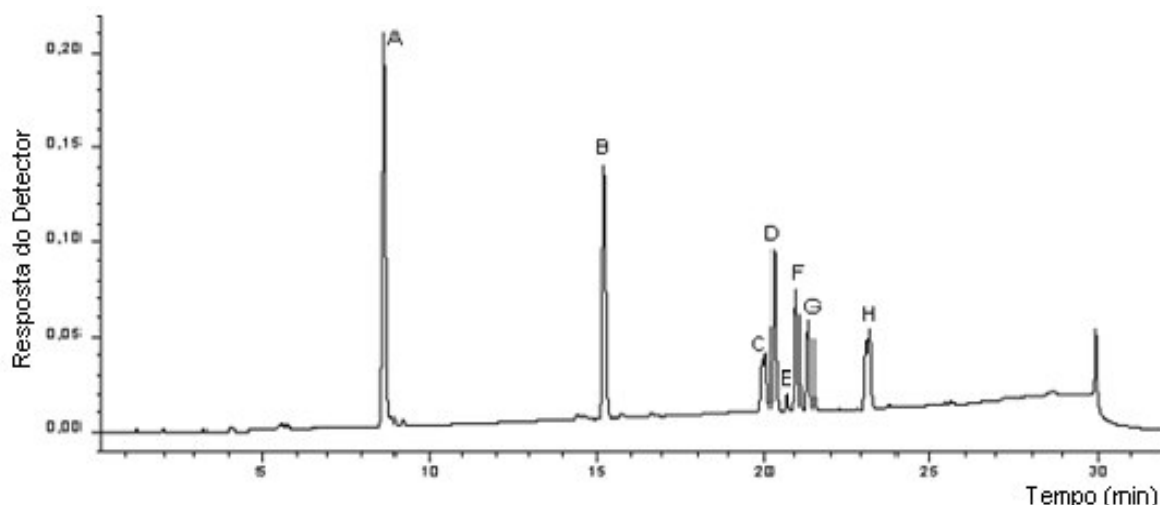


Figura 9- Cromatograma obtido por CLAE-DAD para os padrões dos agrotóxicos estudados ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; FM: ACN:H₂O; eluição por gradiente, programação linear (inicia com ACN: H₂O (20:80, v/v), em 12 min ACN: H₂O (47:53, v/v) e aumenta linearmente até 100% de ACN); vazão: 1 mL min^{-1} ; coluna: Chromsip C18; coluna de guarda: Nova Pak C18; detecção em 225 nm. Identificação dos picos: A: Ftalimida; B: Tiofanato metílico; C: Ciproconazol; D: Fenarimol; E: Captam; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol.

O cromatograma obtido por CLAE-DAD, para a análise da amostra branco, submetida ao procedimento de ELL pode ser visualizado na Figura 10.

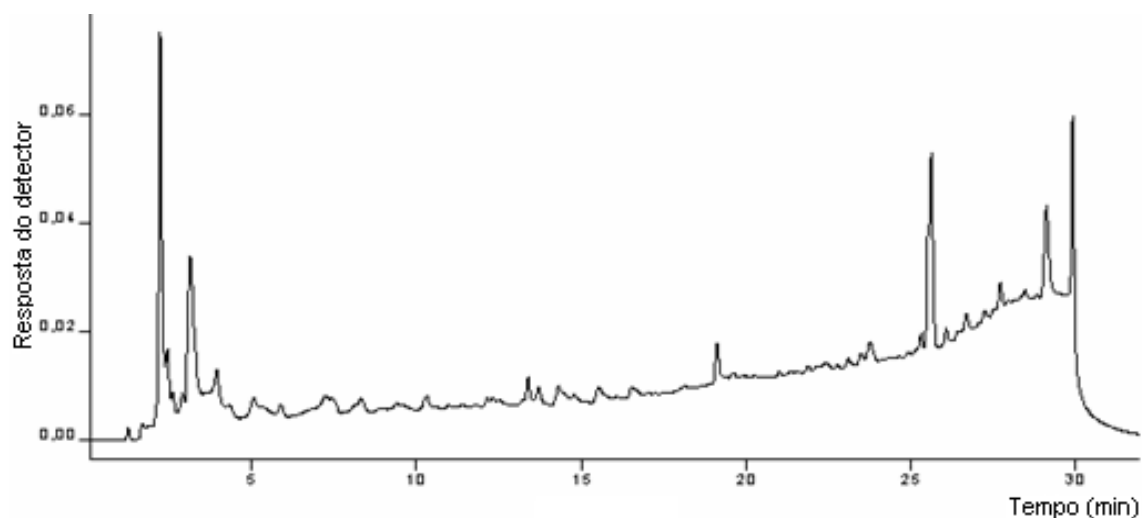


Figura 10 - Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas idênticas a Figura 9.

Na Figura 11 pode ser visualizado o cromatograma referente à amostra fortificada com os agrotóxicos na concentração de 3 mg kg^{-1} , submetida à ELL.

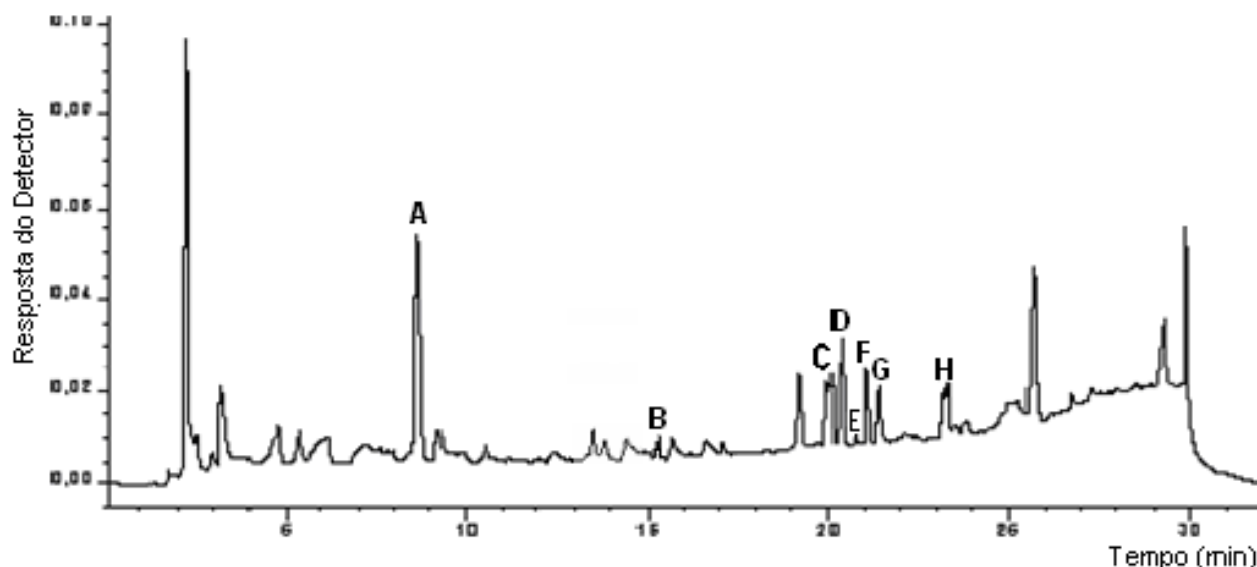


Figura 11 - Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra fortificada com os agrotóxicos na concentração de 3 mg kg^{-1} . Condições cromatográficas idênticas a Figura 9. A: Ftalimida; B: Tiofanato metílico; C: Ciproconazol; D: Fenarimol; E: Captam; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenconazol.

Analisando a Figura 10 verifica-se que os interferentes da matriz uva (flavonóides, carboidratos, açúcares, etc.) apareceram em toda a extensão do cromatograma, dificultando a quantificação de alguns compostos como o tiofanato metílico e difenoconazol, conforme pode ser visualizado na Figura 11.

Na Tabela 4 são apresentados os valores de recuperação e de coeficiente de variação obtidos nos três níveis de fortificação estudados.

Tabela 4: Recuperações e coeficientes de variação obtidos empregando o método de ELL-CLAE-DAD (método de separação 1)

Agrotóxicos	Nível de fortificação					
	1 mg kg ⁻¹		3 mg kg ⁻¹		6 mg kg ⁻¹	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Captam	92,0	0,3	83,0	0,6	92,0	5,0
Ciproconazol	107,0	1,0	119,0	8,0	113,0	0,3
Difenoconazol	112,0	6,0	85,0	2,0	87,0	5,0
Ftalimida	110,0	12,0	78,0	5,0	82,0	2,0
Fenarimol	77,0	11,0	108,0	6,0	90,0	5,0
Tebuconazol	86,0	0,7	73,0	5,0	79,0	2,0
Tiofanato Metílico	39,0	5,0	14,0	3,0	7,0	8,0
Triadimefom	96,0	6,0	90,0	11,0	95,0	8,0

A maioria dos fungicidas estudados apresentou valores de recuperação dentro do intervalo recomendado na literatura especializada consultada, que considera valores de recuperação entre 70 e 120% como sendo adequados [78]. Desta forma, o método desenvolvido pode ser considerado suficientemente exato, com exceção para o composto tiofanato metílico, para o qual se obtiveram valores abaixo do indicado na literatura em todos os níveis de fortificação estudados.

O coeficiente de variação, segundo a literatura especializada, deve ser inferior a 20%, o que foi obtido. O método foi considerado possuir precisão adequada para determinação multirresidual dos fungicidas investigados.

Como a resolução entre alguns compostos foi apenas satisfatória e não se conseguiu valores adequados de recuperação para o tiofanato metílico, um novo método foi estudado. Neste novo método substituiu o captam, o ciproconazol e a ftalimida pela simazina, carbaril e diurom, também empregados nos cultivares de uva.

4.1.2 Método de separação 2 – ELL-CLAE-DAD

No método de separação 2 foi utilizada uma coluna cromatográfica Nova Pak C18, do fabricante WATERS, precedida de coluna de guarda Nova Pak C18. A FM foi ACN: H₂O. A análise foi efetuada no modo de eluição por gradiente, com programação linear, iniciando com 20% de ACN e 80% de H₂O, aumentando linearmente até 70% de ACN e 30% de H₂O em 28 min, voltando às condições iniciais em 7 min e permanecendo nesta condição por 5 min, com um tempo total de corrida cromatográfica de 40 min. Foi empregada uma vazão de 1 mL/min.

A Figura 12 mostra o cromatograma obtido empregando este novo método de separação.

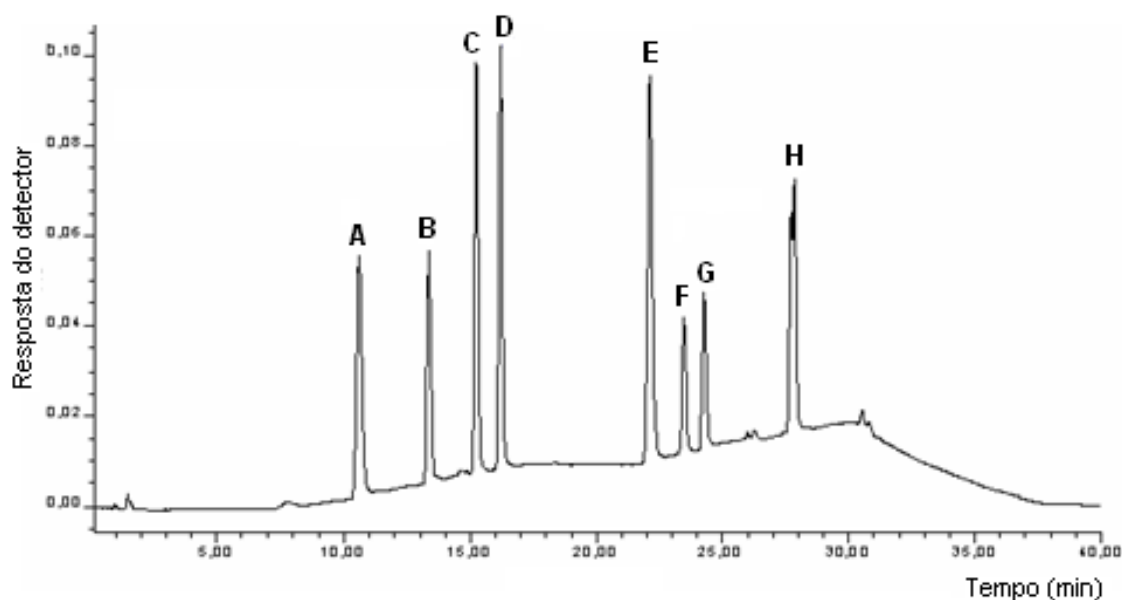


Figura 12 - Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para a separação da mistura dos padrões dos agrotóxicos estudados ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; FM: ACN:H₂O; eluição por gradiente, programação linear (ACN: H₂O (20:80, v/v) até ACN: H₂O (70:30, v/v) em 28 min, voltando às condições iniciais em 7 min, permanecendo nesta condição por 5 min, num total de 40 min); vazão: 1 mL min^{-1} ; coluna analítica e de guarda: Nova Pak C18; detecção em 205 nm;. Identificação dos picos: A: Simazina; B: Tiofanato metílico; C: Carbaril; D: Diuron; E: Fenarimol; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenoconazol.

O cromatograma obtido para amostra branco é mostrado na Figura 13.

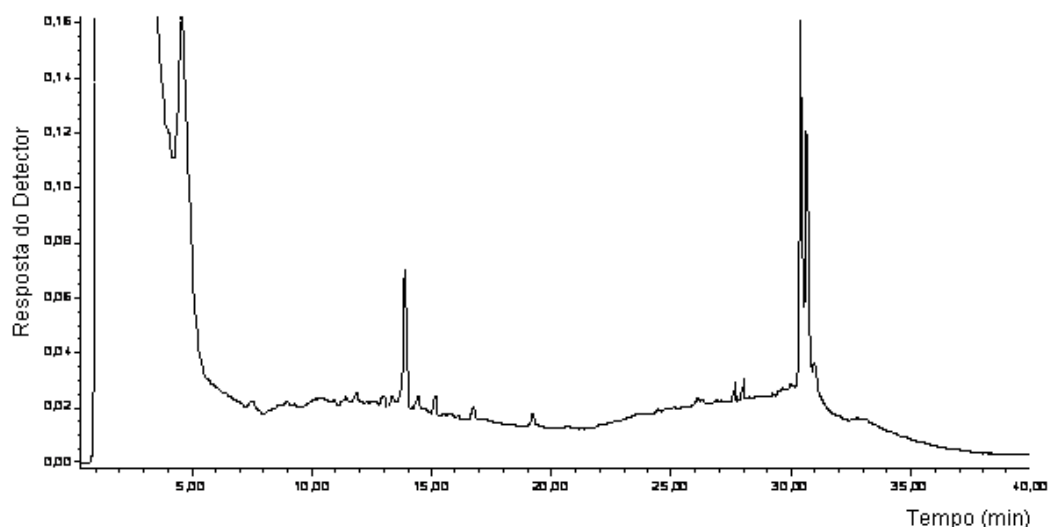


Figura 13- Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas similares as da Figura 12.

Nas condições cromatográficas estabelecidas, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 14 para amostra fortificada com os agrotóxicos estudados na concentração de 5 mg kg^{-1} .

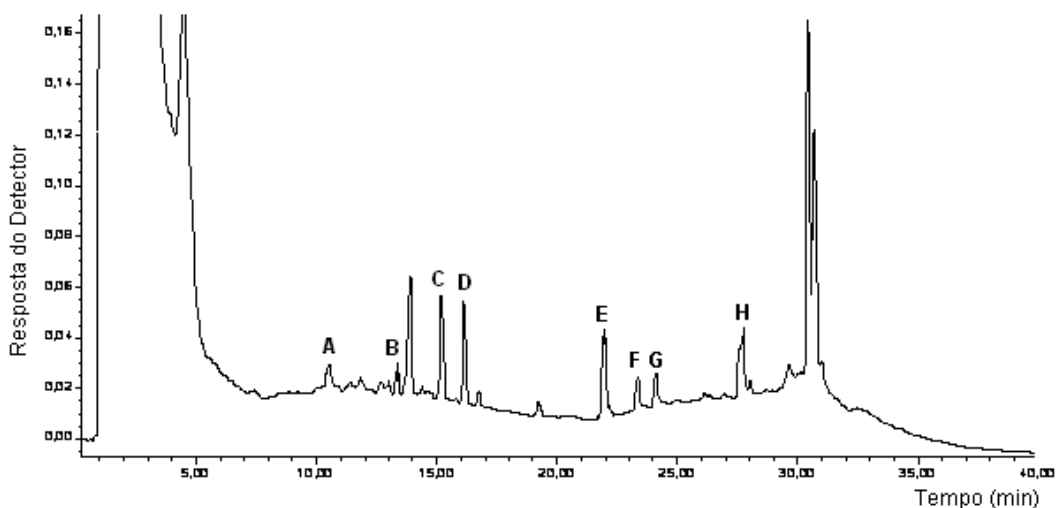


Figura 14 - Cromatograma obtido por ELL-CLAE-DAD para amostra de uva fortificada com os agrotóxicos (5 mg kg^{-1}). Condições cromatográficas similares as da Figura 13. Identificação dos picos: A: Simazina; B: Tiofanato Metílico; C: Carbaril; D: Diurum; E: Fenarimol; F: Triadimefom; G: Tebuconazol; H: Difenoconazol.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de recuperação obtidos nos experimentos com as novas condições de separação.

Tabela 5. Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados determinados por ELL-CLAE-DAD (método de separação 2).

Agrotóxico	Recuperação (%)	CV (%)
Simazina	32,6	11,3
Tiofanato Metílico	4,8	38,8
Carbaril	54,5	18,4
Diuron	70,0	9,8
Fenarimol	64,7	10,4
Triadimefom	47,0	1,4
Tebuconazol	47,2	12,8
Difenoconazol	60,1	9,3

Os resultados obtidos para os testes de recuperação mostraram que o método adotado para a extração dos agrotóxicos na matriz uva ainda não se encontra satisfatório para a determinação de resíduos dos princípios ativos estudados. Foi observado que os valores de recuperação obtidos variavam muito entre cada extração realizada, e mesmo modificando o método de separação cromatográfico, não houve melhoras nos resultados. Outra questão a ser mencionada é que nas regiões em que são eluídos o tiofanato metil e a simazina houve eluição de interferentes da matriz. Resolveu-se mudar a técnica de extração, considerando que, por ser muito demorada a ELL e com várias etapas, poderia estar ocorrendo perdas de alguns agrotóxicos. Testou-se a extração em fase sólida (EFS), utilizando as mesmas condições de separação cromatográfica.

4.1.3 Método de separação 3: EFS-CLAE-DAD

A ELL não foi capaz de gerar extratos livres da interferência da matriz e por consumir grandes volumes de solventes, além de poder favorecer a perda de alguns

agrotóxicos, a EFS foi selecionada como uma alternativa para o preparo de amostra esperando que, quando aplicado à matriz estudada, fosse capaz de gerar extratos mais limpos, simultaneamente a uma boa eficiência de extração para os agrotóxicos estudados.

Foram realizados alguns ensaios de extração, nos quais foram mantidas as condições cromatográficas pré-estabelecidas: coluna analítica e de guarda, Nova Pak C18, WATERS; modo de eluição por gradiente, com programação linear (iniciando com 20% de ACN e 80% de H₂O, aumentando linearmente até 70% de ACN e 30% de H₂O em 28 min, voltando às condições iniciais em 7 min e permanecendo nesta condição por 5 min, com um tempo total de corrida cromatográfica de 40 min); vazão de 1 mL min⁻¹.

Os cromatogramas referentes às amostras branco e fortificada com os agrotóxicos, na concentração de 5 mg kg⁻¹, estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

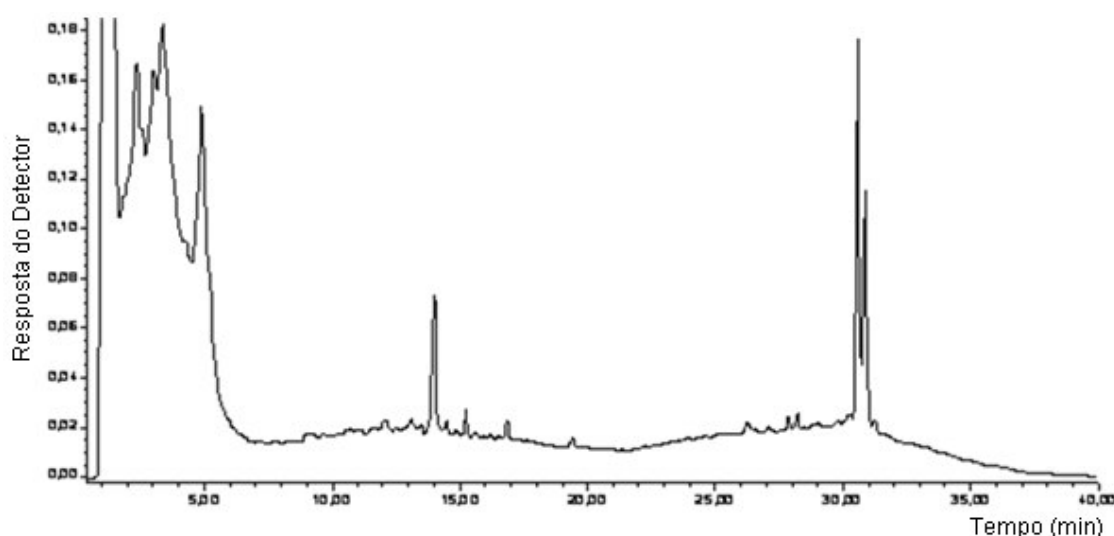


Figura 15- Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD para amostra branco. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 μ L; FM: ACN:H₂O; eluição por gradiente, programação linear (inicia com 80% de H₂O e 20% de ACN, aumenta linearmente até 70% de ACN em 28 min e retorna as condições iniciais em 40 min); vazão: 1 mL min⁻¹; coluna analítica e de guarda: Nova Pak C18; detecção UV em 205 nm.

Analisando a Figura 15, observa-se que os interferentes referentes aos constituintes da matriz aparecem em toda a extensão do cromatograma, sendo alguns bem intensos.

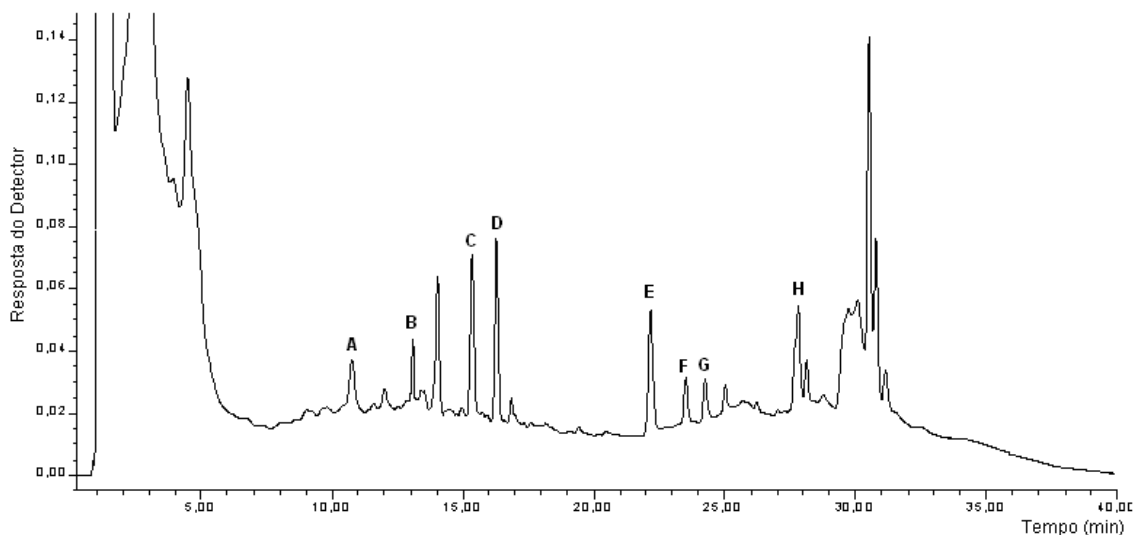


Figura 16- Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD para amostra fortificada com 5 mg kg^{-1} dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas similares as da Figura 15. Identificação dos picos: A- Simazina; B- Tiofanato Metílico; C- Carbaril; D- Diurom; E- Fenarimol; F- Triadimefom; G- Tebuconazol; H- Difenconazol.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de recuperação e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados.

Tabela 6: Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados por EFS-CLAE-DAD (método de separação 2).

Agrotóxicos	Recuperação (%)	CV (%)
Simazina	50,5	11,3
Tiofanato Metílico	12,9	18,8
Carbaril	80,5	13,4
Diurom	81,4	9,8
Fenarimol	80,7	10,4
Triadimefom	87,5	1,4
Tebuconazol	70,9	12,8
Difenconazol	80,5	9,2

Os resultados preliminares obtidos para a recuperação mostraram que a maioria dos valores foi considerada satisfatória, ou seja, dentro da faixa aceitável que é de 70–120%. Os valores do coeficiente de variação obtidos estão dentro da faixa estipulada pela literatura referenciada que deve ser menor que 20%. As exceções foram para os compostos tiofanato metílico e simazina, os quais forneceram valores de recuperação bem inferiores aos recomendados na literatura.

Foi observado que usando o mesmo nível de fortificação e mudando a técnica de extração o valor de recuperação obtido para o tiofanato metílico aumentou ligeiramente, porém ainda se encontra bem abaixo do valor indicado na literatura. Dessa forma, decidiu-se retirá-lo da mistura.

Foram realizados vários testes para a escolha dos compostos a serem adicionados na análise multirresíduo, em substituição ao tiofanato metílico, com o propósito de obter uma melhor separação e distribuição dos compostos no cromatograma. Foi decidido acrescentar mais dois compostos a ametrina e o aldicarbe.

Na Figura 17 está mostrado o cromatograma da separação da mistura contendo novos padrões dos agrotóxicos selecionados. Na Figura 18 está apresentado o cromatograma referente a amostra fortificada na concentração de 5 mg kg^{-1} .

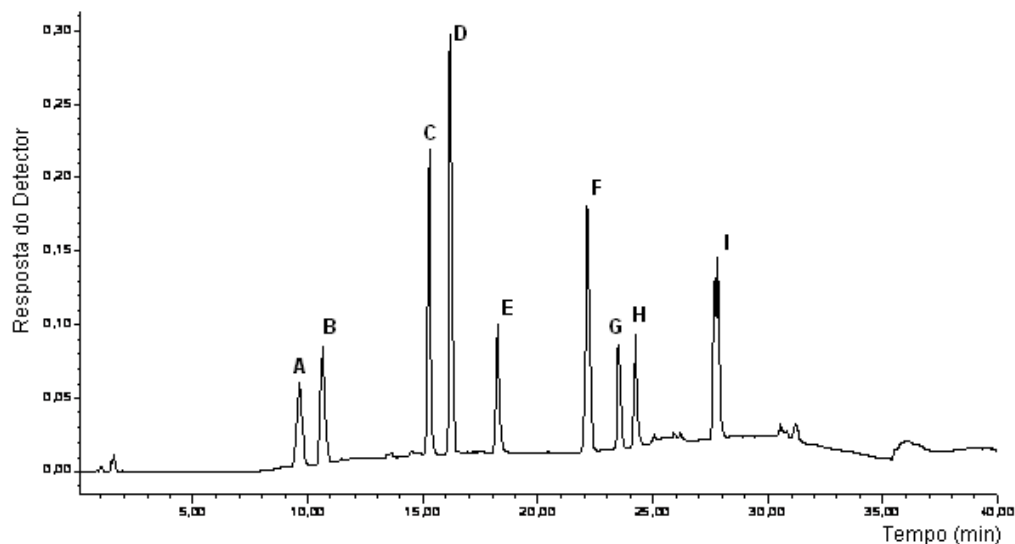


Figura 17 Cromatograma obtido por EFS-CLAE-DAD na separação da mistura dos agrotóxicos com os novos compostos ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; FM: ACN:H₂O; eluição por gradiente, programação linear (0 min com 20 % de ACN e 80 % de H₂O para 70 % de ACN e 30 % de H₂O em 28 min, voltando as condições iniciais em 7 min, permanecendo nessas condições por 5 min, num total de 40 min); vazão: 1 mL min^{-1} ; coluna analítica e de guarda: Nova Pak C18; detecção em 225 nm. Identificação dos picos: A: Aldicarbe; B: Simazina; C: Carbaril; D: Diurom; E: Ametrina; F: Fenarimol; G: Triadimefom; H: Tebuconazol; I: Difenconazol.

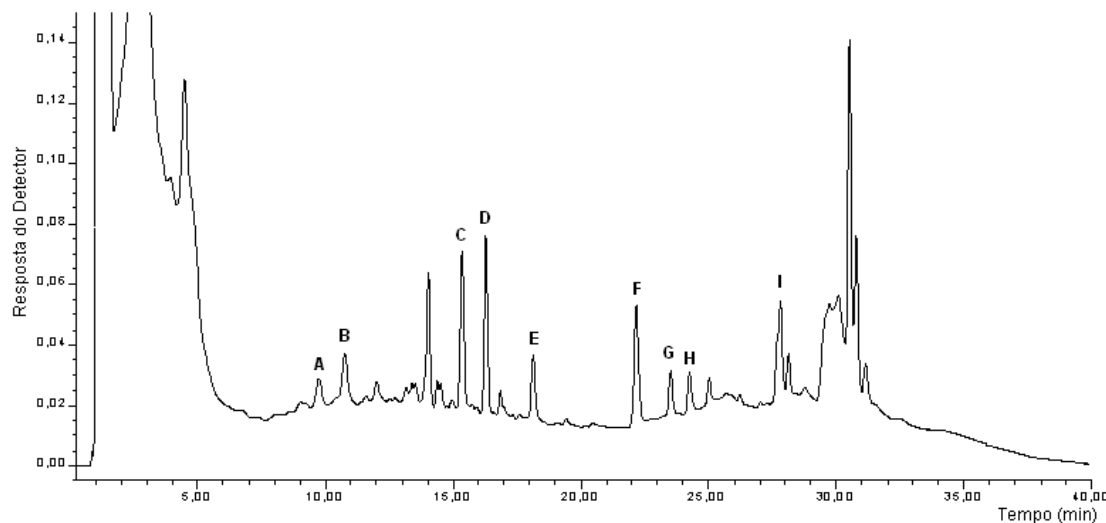


Figura 18- Cromatograma obtidos por EFS- CLAE-DAD para amostra fortificada com 5 mg kg^{-1} dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas similares as da Figura 17. Identificação dos picos: A- Aldicarbe; B- Simazina; C- Carbaril; D- Diurom; E- Ametrina; F- Fenarimol; G- Triadimefom; H- Tebuconazol; I- Difenconazol.

A separação dos compostos melhorou consideravelmente em relação às anteriores e os resultados obtidos para recuperação também foram considerados satisfatórios, como pode ser comprovado pelos valores apresentados na Tabela 7, juntamente com os coeficientes de variação.

Tabela 7: Recuperações e coeficientes de variação obtidos para os agrotóxicos estudados por EFS-CLAE-DAD (método de separação 3)

Agrotóxicos	Recuperação (%)	CV (%)
Aldicarbe	69,3	5,6
Simazina	56,4	4,4
Carbaril	90,5	7,9
Diurum	107	4,5
Ametrina	81,9	7,1
Fenarimol	92,1	6,2
Triadimefom	85,4	17,6
Tebuconazol	71,9	6,5
Difenoconazol	84,4	18

Os resultados obtidos para os testes de recuperação mostraram que a metodologia adotada somada a adição de novos compostos apresentou valores considerados satisfatórios, de acordo com a literatura consultada, de 70 a 120 %, exceto para a simazina. Os valores do coeficiente de variação obtidos estão dentro da faixa indicada pela literatura especializada que deve ser menor que 20 %.

Entretanto, este método não foi validado devido à disponibilidade de um cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas, que é mais seletivo e sensível que o DAD. Dessa forma, optou-se por desenvolver e validar o método empregando CL-EM/EM. Devido às características de maior detectabilidade e seletividade do detector, foram acrescentados alguns agrotóxicos, totalizando em 13 (aldicarbe, ametrina, azoxistrobina, carbaril, cimoxanil, ciproconazol, diurum, difenoconazol, fenarimol,

miclobutanil, simazina, tebuconazol e triadimefom). Desses agrotóxicos, somente aldicarbe e carbaril não são aplicados em uva, contudo resolveu-se mantê-los na mistura, pois muitas vezes os agricultores fazem uso dos agrotóxicos que têm disponíveis no momento da aplicação, sem considerar se há registro ou não para os mesmos.

4.2 Desenvolvimento e validação do método empregando CL-EM/EM

4.2.1 Determinação das condições cromatográficas de separação por CL-EM/EM.

Devido à seletividade do sistema de detecção EM/EM, é possível identificar os agrotóxicos sem que estes estejam necessariamente separados, isto é, possuam tempos de retenção distintos. Desta maneira, como o modo de varredura utilizado foi o MRM, inicialmente foram otimizados os parâmetros da fonte de ionização para obtenção do íon molecular e dos dois íons produto mais abundantes de cada agrotóxico através da infusão, via seringa, diretamente no espectrômetro de massas, de soluções de 0,5 mg L⁻¹ de cada agrotóxico em uma solução aquosa de ácido acético (HAc) 0,1% e acetonitrila 50:50 v/v. A vazão de bombeamento das soluções de agrotóxicos através da seringa para o interior do espectrômetro foi de 20 µL min⁻¹.

A adição de HAc às soluções dos agrotóxicos empregadas na infusão, assim como na FM, facilitou a ionização dos agrotóxicos, no modo positivo, isto é, formando íons [M + H]⁺, diminuindo com isso a intensidade dos adutos. Os adutos são formados, espontaneamente, por alguns analitos quando se utiliza a ionização por ESI, de forma que é necessário o uso de aditivos para que os adutos sejam formados de maneira controlada e, assim, todos os íons obtidos apresentem intensidades significativas e respostas reprodutíveis.

As transições MRM selecionadas para o monitoramento dos agrotóxicos foram aquelas entre o íon precursor e os seus respectivos íons produto de maior intensidade, as quais são apresentadas na Tabela 8 junto aos parâmetros de ionização da fonte otimizados por meio da infusão, como voltagem do cone e energia de colisão.

Tabela 8: Parâmetros do CL-EM/EM otimizados para os 13 agrotóxicos estudados.

Agrotóxicos	Voltagem do cone (V)	Transição MRM 1	Energia de colisão 1 (V)	Transição MRM 2	Energia de colisão 2 (V)
Aldicarbe	35	213,0 → 89,0	-15,5	213,0 → 116,0	-8,5
Ametrina	45	228,2 → 186,0	-15,0	228,2 → 96,0	-21,0
Azoxistrobina	40	404,2 → 372,0	-16,5	404,2 → 344,0	-31,0
Carbaril	35	202,1 → 145,0	-4,5	202,1 → 127,0	-23,5
Cimoxanil	40	199,0 → 128,0	-4,0	199,0 → 111,0	-18,5
Ciproconazol	45	292,2 → 70,0	-14,5	292,2 → 125,0	-29,5
Difenoconazol	50	406,2 → 251,0	-33,5	406,2 → 337,0	-18,0
Diurum	55	233,1 → 72,0	-12,0	233,1 → 160,0	-22,5
Fenarimol	35	331,1 → 268,0	-26,5	331,0 → 139,0	-42,5
Miclobutanil	30	289,2 → 70,0	-15,0	289,2 → 125,0	-32,0
Simazina	55	202,1 → 124,0	-13,0	202,1 → 132,0	-14,0
Tebuconazol	45	308,2 → 70,0	-18,5	308,2 → 125,0	-35,5
Triadimefom	45	294,2 → 225,0	-13,5	294,2 → 197,0	-15,5

Uma vez otimizado os parâmetros da fonte de ionização, foi realizado o acoplamento do sistema cromatográfico ao espectrômetro de massas para otimização do programa da eluição por gradiente. Devido à seletividade do detector, foi necessário apenas otimizar um gradiente que garantisse uma melhor detectabilidade dos agrotóxicos analisados e possibilitasse que o equilíbrio da coluna fosse restabelecido entre injeções consecutivas. A FM utilizada foi ACN e HAc 0,1%. A separação cromatográfica no sistema CL-EM/EM, para os 13 compostos estudados, ocorre no modo de eluição por gradiente, com programação linear, iniciando com 20% de ACN e 80% de HAc 0,1%, aumentando linearmente até 63% de ACN e voltando as condições iniciais em um tempo de 23 min, sendo necessário mais 10 min para voltar às condições iniciais do gradiente, e mais 12 min para o reequilíbrio da coluna, resultando em um tempo total de análise de 45 min.

Foram testados vários gradientes com tempo de corrida menor, porém a pressão no equipamento demorava a estabilizar, devido a baixa vazão empregada. A pressão instável acarretava problemas na reprodutibilidade dos tempos de retenção dos íons. Dessa forma, resolveu-se aumentar o tempo de estabilização da coluna e da pressão do equipamento, a

fim de manter a confiabilidade e a repetibilidade dos resultados. Deve-se ressaltar que a coluna analítica empregada nos sistemas CLAE-DAD e CL-EM/EM, foram diferentes.

Nas Figuras 19 e 20 estão apresentados, respectivamente, o cromatograma de íons totais referente a separação cromatográfica no sistema CL-EM/EM, para os 13 compostos estudados e o cromatograma obtido para cada agrotóxico no canal correspondente.

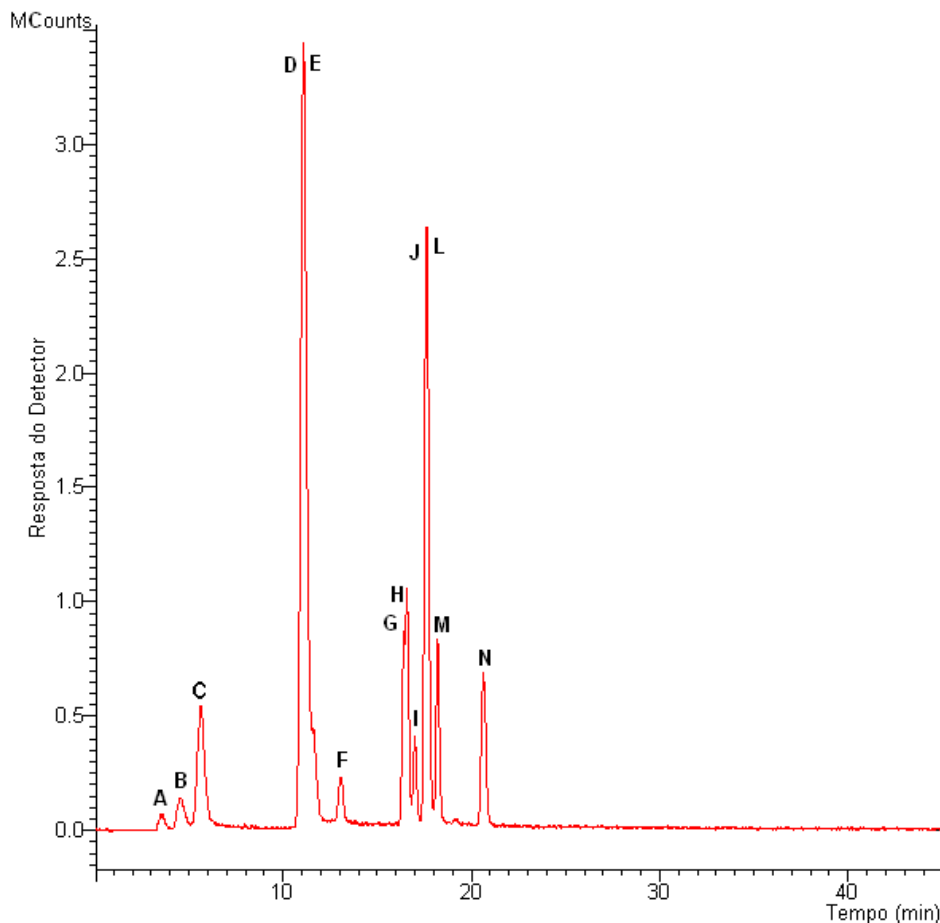


Figura 19 - Cromatograma de íons totais obtido por CL-EM/EM para separação da mistura de padrão dos agrotóxicos estudados (50 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas: volume de injeção: $20 \text{ }\mu\text{L}$; FM: ACN:HAc 0,1%; eluição por gradiente, programação linear (0 min com ACN:HAc 0,1%, 20:80, v/v, aumentando linearmente até 63% de ACN voltando as condições iniciais, tempo total de 45 min); vazão = $0,25 \text{ mL/min}$; coluna: Polaris C18. Identificação dos picos: A: Cimoxanil; B: Aldicarbe; C: Simazina; D: Ametrina; E: Carbaril; F: Diurom; G: Ciproconazol; H: Fenarimol, I: Miclobutanil J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenoconazol.

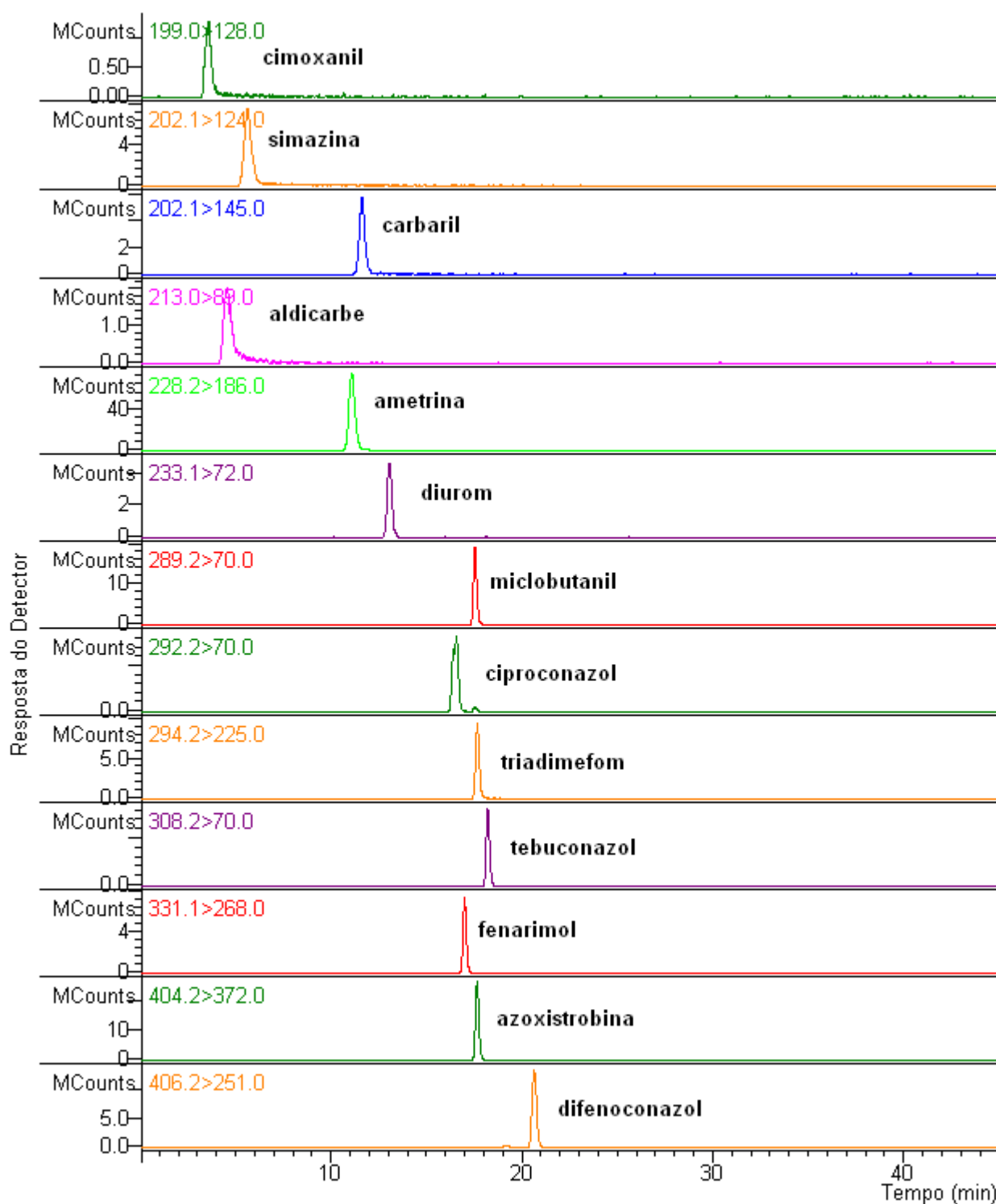


Figura 20: Cromatograma obtido por CL-EM/EM para separação da mistura de padrões dos agrotóxicos estudados (50 ng mL^{-1}). Condições cromatográficas similares as da Figura 19.

4.2.2 Otimização do método de preparo de amostra para CL-EM/EM

4.2.2.1 Extração em fase sólida (EFS)

A otimização do método de preparo de amostra por EFS foi realizada qualitativamente, isto é, comparando-se os cromatogramas obtidos para os extratos da amostra branco e para a amostra fortificada. A comparação entre estes cromatogramas permitiu observar quando houve a extração de todos os agrotóxicos estudados, comparar a intensidade dos picos dos agrotóxicos em relação aos picos oriundos de interferentes da matriz, assim como a coeluição de interferentes da matriz com os agrotóxicos.

O procedimento de EFS usado inicialmente nos estudos empregando CL-EM/EM foi o mesmo otimizado para CLAE-DAD. Foi efetuada apenas uma mudança para que o método se adequasse ao novo tipo de detecção empregado, que consistiu em ressuspender o extrato final em 1 mL de uma solução de acetonitrila:ácido acético 0,1% (30:70, v/v). O ácido acético adicionado ao extrato tem a função de facilitar a ionização dos compostos estudados. Em seguida, injetou-se o extrato no sistema cromatográfico.

Em todas as extrações realizadas usando a amostra fortificada, os resultados de recuperação obtidos sempre estiveram muito acima do esperado para os compostos difenoconazol e, principalmente, para o tebuconazol. Cogitou-se o fato destes compostos estarem sofrendo efeito matriz e devido a isso, o seu sinal no espectrômetro de massas, era bastante intenso.

Em CL-EM/EM o efeito matriz é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo tempo de retenção do analito e, por isso, competem com o analito durante o processo de ionização. O número de íons do analito pode ser diminuído pela interação com os íons da matriz, o que é chamado de supressão iônica (*ion suppression*), ou aumentar (pela presença dos íons da matriz) resultando num efeito matriz negativo ou positivo, respectivamente [104].

O efeito matriz é um processo que ocorre na fase líquida e não na fase gasosa. Constituintes não voláteis na amostra ou na fase móvel impedem que os íons pré-formados do analito escapem da gota para a fase gasosa. Compostos com afinidade alta por prótons no modo positivo ou com baixa acidez na fase gasosa, no modo negativo

também podem suprimir a ionização do analito. Outra forma de supressão é a promovida por compostos que formam par-iônico com os íons pré-formados do analito. O efeito matriz depende tanto do analito quanto da matriz. Os compostos responsáveis pelo efeito matriz geralmente não são ionizados por ESI e desta forma não podem ser detectados pelo EM [100].

As duas maneiras mais comuns de remover os constituintes da amostra que causam o efeito de matriz são o aperfeiçoamento do procedimento de extração dos analitos ou do método cromatográfico. Um procedimento de extração mais seletivo ou um maior número de etapas de limpeza das amostras é a forma mais efetiva para se reduzir ou eliminar o efeito de matriz [100].

Depois de vários ensaios de extração percebeu-se que o aumento do sinal do difenoconazol e tebuconazol acontecia em todos os métodos de extração empregado, levando a deduzir que o problema residia na sua presença na amostra branco. Teve-se a constatação de que a amostra de uva orgânica, adquirida para ser a amostra branco, continha os agrotóxicos tebuconazol e difenoconazol.

As Figuras 21 e 22 apresentam, respectivamente, o cromatograma de íons totais referente a extração da amostra branco e o cromatograma obtido em diversos canais correspondentes às transições dos agrotóxicos estudados.

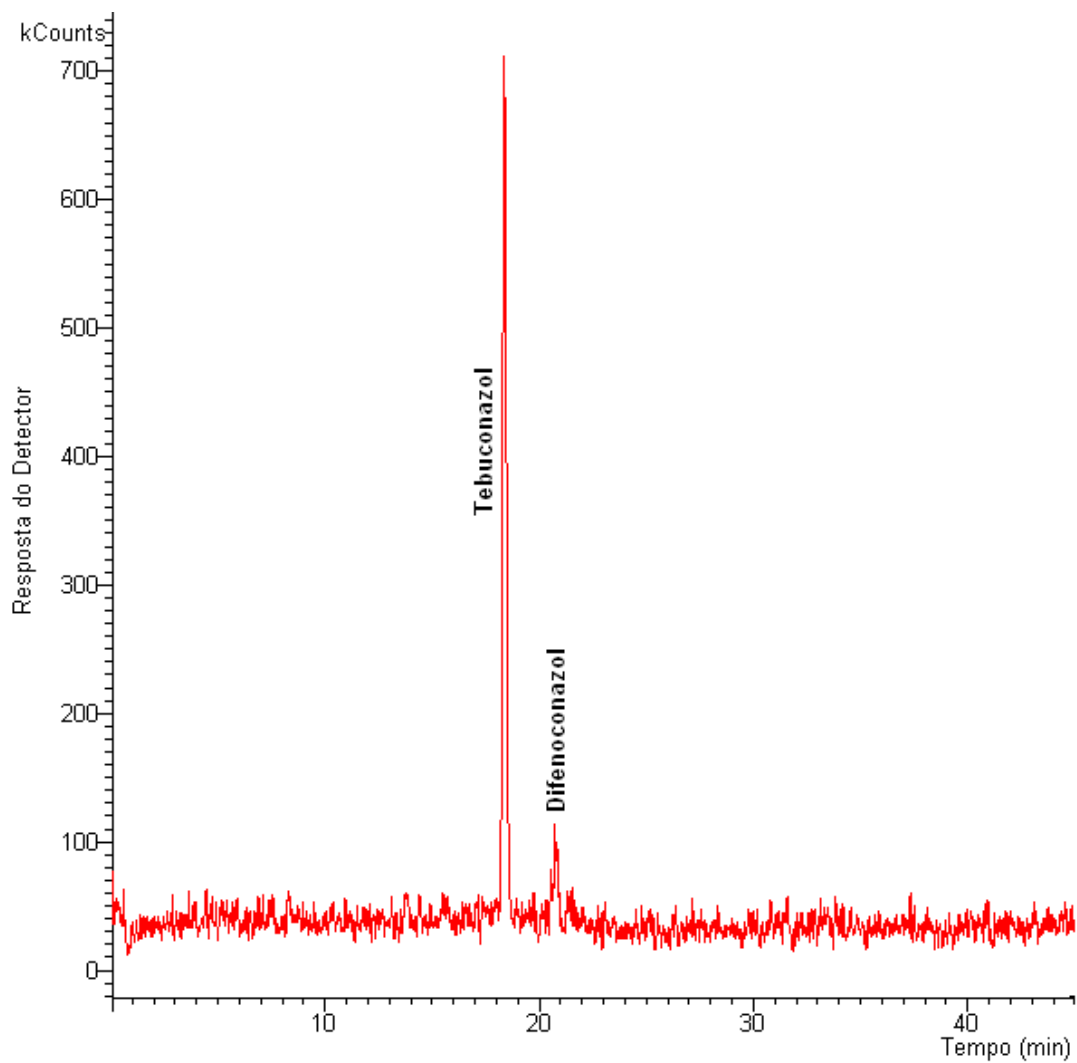


Figura 21 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra branco. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19.

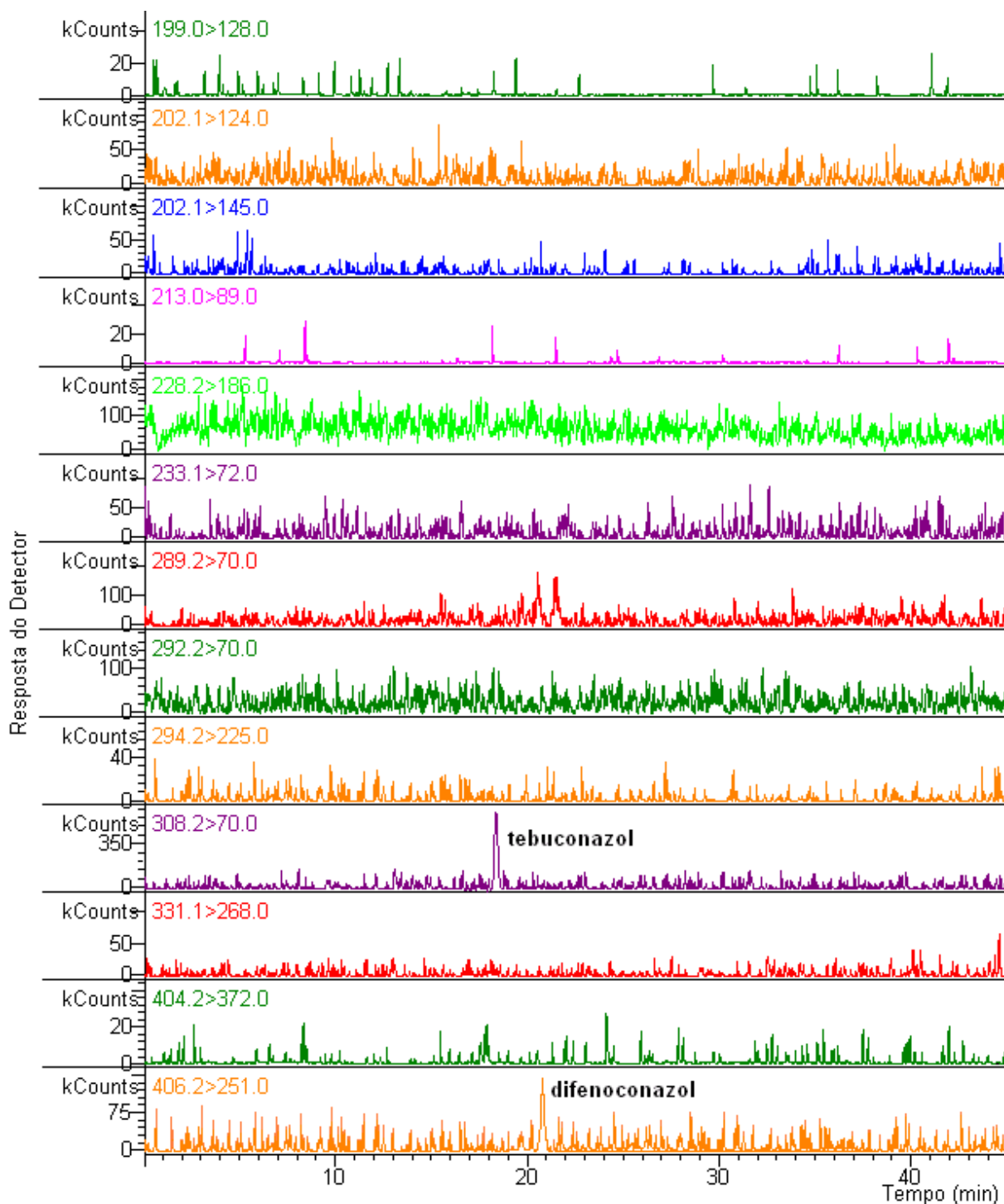


Figura 22: Cromatogramas obtidos por EFS-CL-EM/EM para amostra branco, em todos os canais dos agrotóxicos estudados. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19.

A partir de então, passou-se a subtrair o branco na quantificação do tebuconazol e difenoconazol.

As Figuras 23 e 24 apresentam o cromatograma de íons totais e os cromatogramas referentes a amostra fortificada no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, empregando a EFS CL-EM/EM.

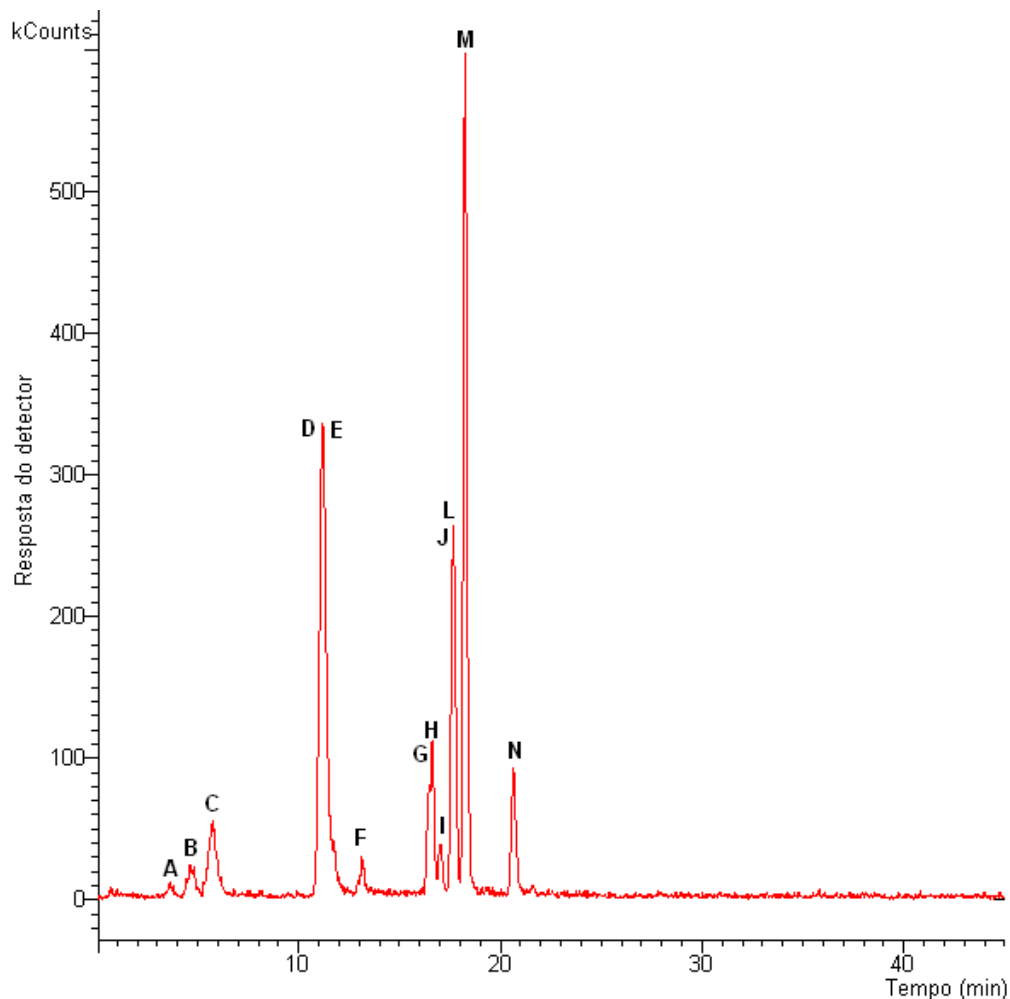


Figura 23 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos em concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas a Figura 19. Identificação dos picos: A: Cimoxanil, B: Aldicarbe, C: Simazina, D: Ametrina, E: Carbaril, F: Diurom, G: Ciproconazol, H: Fenarimol, I: Miclobutanil, J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenoconazol.

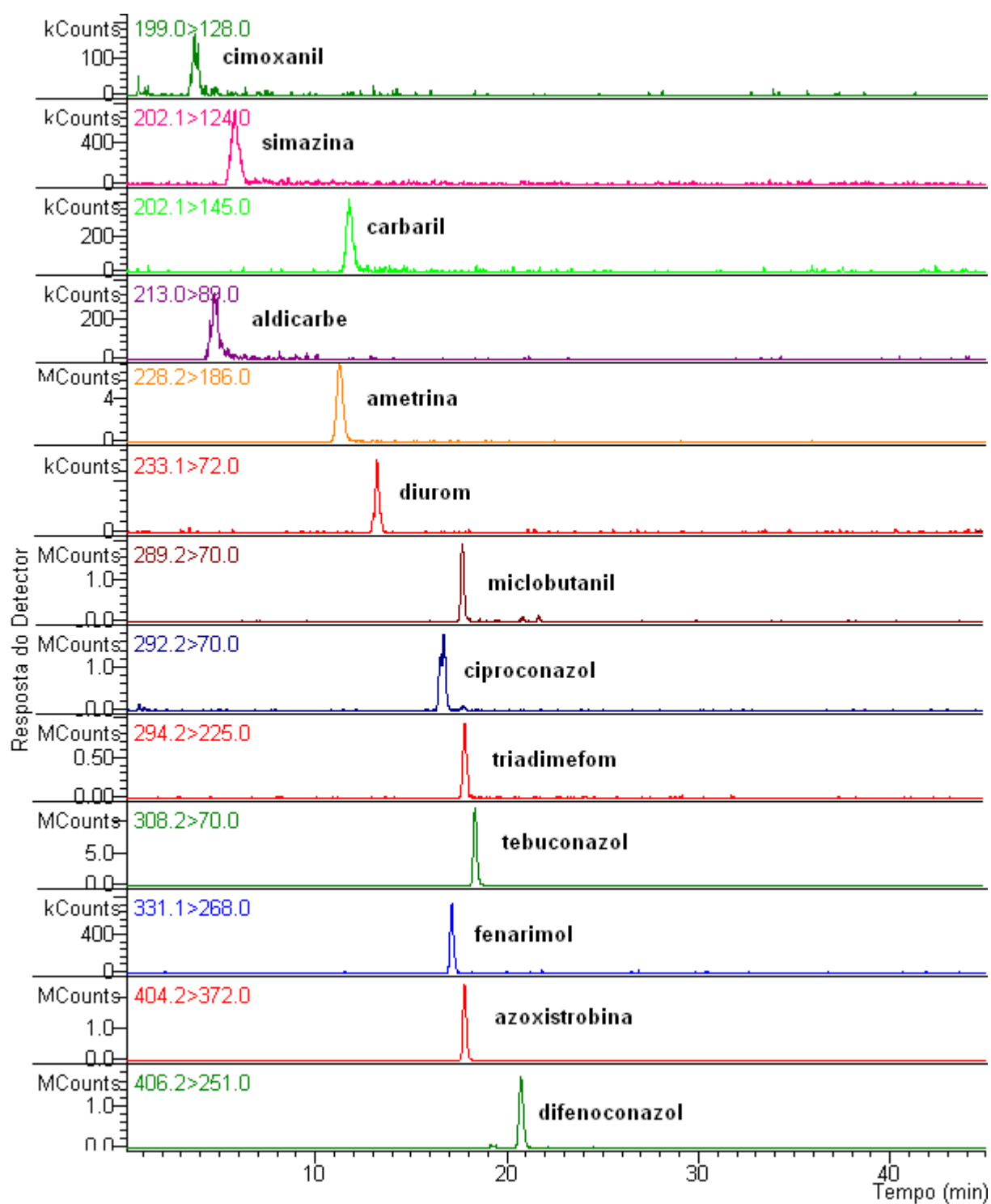


Figura 24: Cromatograma obtido por EFS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos estudados ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19

4.2.2.2 Método QuEChERS

O método QuEChERS trata-se de uma técnica de extração que minimiza o número de etapas de preparo de amostra, uma vez que envolve apenas 2 etapas, sendo uma a extração com acetonitrila por partição, utilizando-se uma mistura de sais e outra de limpeza do extrato por EFS dispersiva, empregando um sorvente composto por amins primárias e secundárias (PSA). Esta técnica é capaz de extrair agrotóxicos altamente polares, assim como aqueles de caráter ácido e básico a partir de matrizes complexas. Utiliza pequenas quantidades de solventes e é relativamente mais rápida e robusta.

O método QuEChERS foi empregado na tentativa de se obterem extratos mais limpos, com boa recuperação para os agrotóxicos estudados e de forma mais rápida.

Nas Figuras 25 e 26 estão, respectivamente o cromatograma de íons totais e os cromatogramas do extrato obtido utilizando-se o método QuEChERS para a amostra fortificada e o cromatograma de cada agrotóxico obtido no canal correspondente a sua transição.

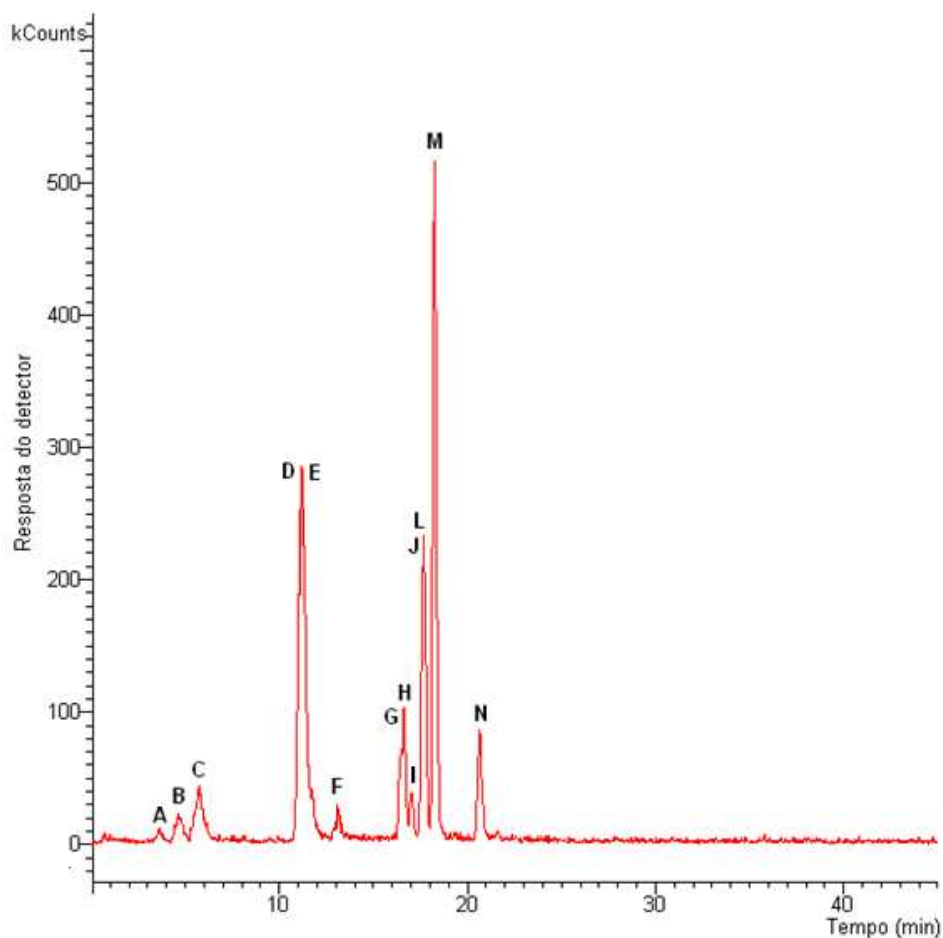


Figura 25- Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por QuEChERS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos em concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas as da Figura 19. Identificação dos picos: A: Cimoxanil, B: Aldicarbe, C: Simazina, D: Ametrina, E: Carbaril, F: Diurom, G: Ciproconazol, H: Fenarimol, I: Miclobutanil, J: Azoxistrobina, L: Triadimefom, M: Tebuconazol, N: Difenconazol.

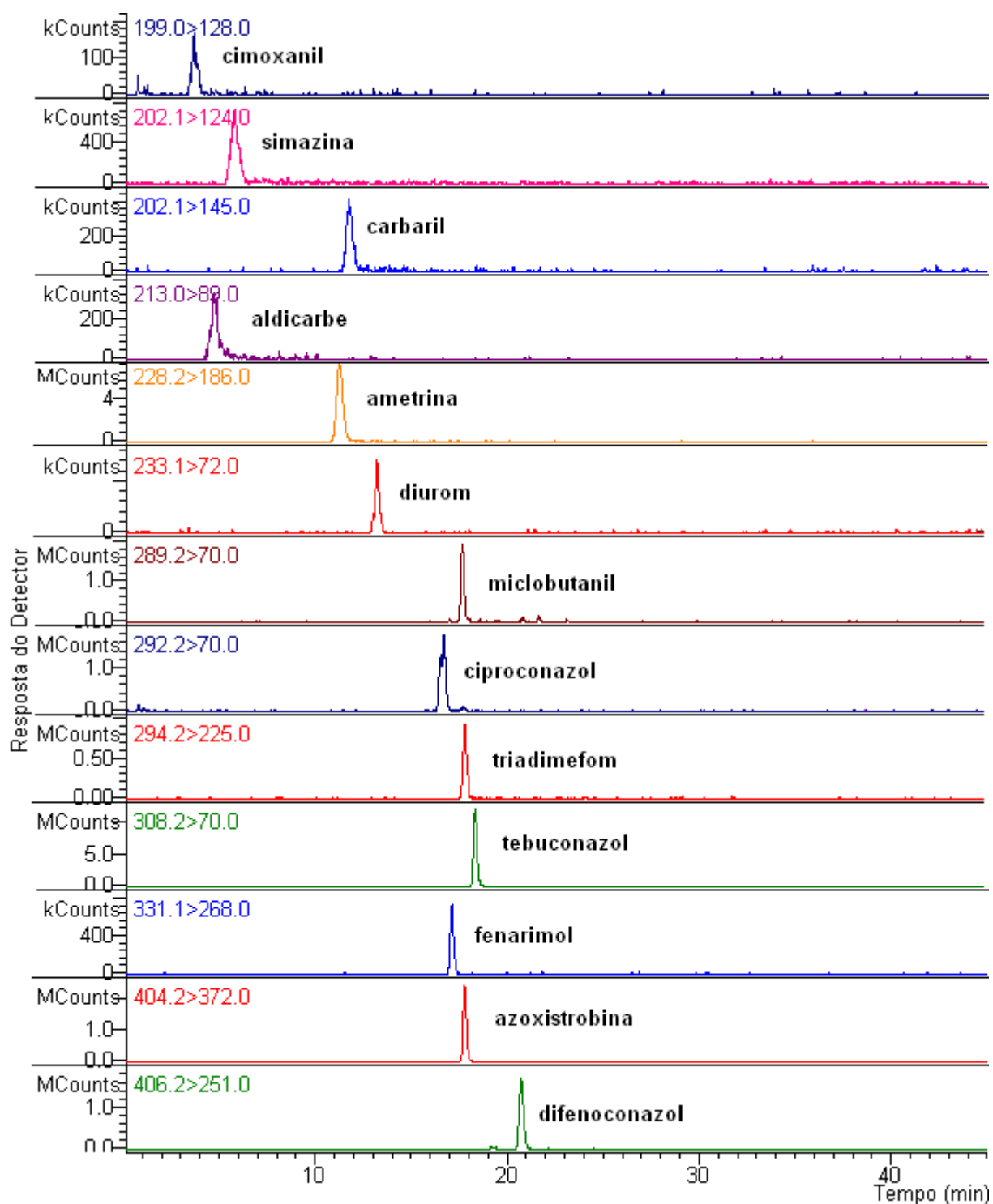


Figura 26 – Cromatogramas obtidos por QuEChERS-CL-EM/EM para amostra fortificada com os agrotóxicos em concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas a Figura 19.

4.2.3 Validação do método por EFS e QuEChERS seguido por CL-EM/EM

4.2.3.1 Seletividade

No desenvolvimento de métodos envolvendo a análise de vários compostos presentes em uma matriz complexa, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou a coeluição de interferentes com os compostos de interesse. Quando se trata de detecção por espectrometria de massas, a separação dos compostos não se mostra tão importante, visto que mesmo picos sobrepostos podem ser quantificados separadamente. Quando injetados os extratos das amostras fortificadas de uva, os cromatogramas obtidos nos diversos canais, dentro das janelas de retenção dos agrotóxicos, mesmo na presença da matriz, não foram obtidos sinais de falso positivo, ou seja, os sinais obtidos foram gerados apenas pelos agrotóxicos, mas não por interferentes provenientes das matrizes estudadas. Desta maneira, o método pode ser considerado seletivo.

4.2.3.2 Linearidade ou faixa linear de trabalho

Em se tratando de matrizes complexas, como a uva, quando se utiliza a padronização externa sem superposição de matriz, a reta obtida pode não ser paralela a obtida com a superposição da matriz. Estes desvios nas retas podem ser atribuídos ao efeito causado pela presença da matriz na fonte de ionização, o que afeta a obtenção dos íons das moléculas dos agrotóxicos [105]. Desta maneira, para corrigir ou evitar possíveis efeitos da matriz sobre os sinais dos analitos, as curvas analíticas foram construídas a partir de padrões puros dos agrotóxicos utilizando o método de padronização externa com superposição da matriz, ou seja, a partir da adição dos padrões no extrato da matriz para a quantificação dos agrotóxicos.

A partir das curvas analíticas construídas foram obtidas as equações de reta e os coeficientes de correlação (r), mostrados nas Tabelas 9 e 10, para o método de padronização externa com superposição de matriz, empregando no preparo de amostra, respectivamente, EFS e o método QuEChERS. Todos os coeficientes de correlação

obtidos foram maiores que 0,99, de maneira que o método pode ser considerado linear de acordo com as normas da ANVISA [74].

Tabela 9– Equações da reta e coeficientes de correlação das curvas analíticas, na matriz uva, obtidas para os compostos estudados empregando EFS- CL-EM/EM.

Agrotóxico	Equações da reta	Coeficiente de correlação (r)
Aldicarbe	$Y = 2E+08x + 3E+06$	0,999
Ametrina	$Y = 7E+09x + 7E+07$	0,999
Azoxistrobina	$Y = 3E+09x + 2E+07$	0,999
Carbaril	$Y = 2E+09x + 3E+07$	0,999
Cimoxanil	$Y = 1E+09x + 2E+07$	0,999
Ciproconazol	$Y = 3E+09x + 3E+07$	0,999
Difenoconazol	$Y = 2E+09x + 3E+07$	0,999
Diurom	$Y = 4E+08x + 6E+06$	0,999
Fenarimol	$Y = 4E+08x + 7E+06$	0,999
Miclobutanil	$Y = 2E+09x + 2E+07$	0,999
Simazina	$Y = 9E+08x + 8E+06$	0,999
Tebuconazol	$Y = 1E+09x + 1E+08$	0,999
Triadimefom	$Y = 2E+09x + 3E+07$	0,999

Tabela 10- Equações da reta e coeficientes de correlação das curvas analíticas, na matriz uva, obtidas para os compostos estudados empregando o método QuEChERS seguido de CL-EM/EM.

Agrotóxico	Equações da reta	Coeficiente de correlação (r)
Aldicarbe	$Y = 2E+08x - 2E+06$	0,999
Ametrina	$Y = 1E+09x - 2E+06$	0,999
Azoxistrobina	$Y = 8E+08x - 1E+04$	0,999
Carbaril	$Y = 5E+08x - 6E+06$	0,999
Cimoxanil	$Y = 1E+09x - 2E+06$	0,999
Ciproconazol	$Y = 6E+08x - 2E+06$	0,999
Difenoconazol	$Y = 4E+08x + 1E+04$	0,999
Diurom	$Y = 6E+07x + 4E+04$	0,999
Fenarimol	$Y = 1E+08x - 8E+04$	0,999
Miclobutanil	$Y = 5E+08x - 5E+06$	0,999
Simazina	$Y = 1E+08x + 2E+04$	0,999
Tebuconazol	$Y = 6E+08x + 2E+06$	0,999
Triadimefom	$Y = 7E+08x - 5E+06$	0,999

Os gráficos de resíduos foram construídos para cada uma das curvas, para verificar a qualidade da linearidade onde verificou-se que os valores dos resíduos estavam distribuídos aleatoriamente ao longo da linha de regressão, sem demonstrar nenhuma tendência ou padrão, confirmando a linearidade do método.

As faixas lineares de trabalho foram determinadas plotando-se o gráfico da razão entre a resposta do detector e a concentração versus o log da concentração.

Nas Tabelas 11 e 12 estão as faixas lineares obtidas através do método de padronização externa com superposição da matriz, empregando no preparo de amostra, respectivamente, EFS e o método QuEChERS, para todos os agrotóxicos estudados.

Tabela 11: Faixas lineares obtidas por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados, empregando EFS seguida de CL-EM/EM.

Agrotóxico	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aldicarbe	9,5 – 500
Ametrina	6,0 – 460
Azoxistrobina	0,6 – 100
Carbaril	5,0 - 360
Cimoxanil	5,5 - 370
Ciproconazol	9,5 - 500
Difenoconazol	0,7 - 120
Diurom	3,0 - 250
Fenarimol	5,4 - 370
Miclobutanil	7,3 - 480
Simazina	3,0 - 250
Tebuconazol	0,4 - 100
Triadimefom	4,0 - 300

Tabela 12: Faixas lineares obtidas por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados, empregando o método QuEChERS seguido de CL-EM/EM.

Agrotóxico	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aldicarbe	6,5 – 500
Ametrina	3,0 – 460
Azoxistrobina	0,3 – 100
Carbaril	2,5 - 360
Cimoxanil	3,0 - 370
Ciproconazol	5,0 - 500
Difenoconazol	0,4 - 120
Diurom	1,0 - 250
Fenarimol	3,0 - 370
Miclobutanil	4,0 - 480
Simazina	1,0 - 250
Tebuconazol	0,1 - 100
Triadimefom	2,0 - 300

As faixas lineares de trabalho foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado.

4.2.3.3 Limite de detecção e de quantificação

No desenvolvimento de um método de análise de resíduos de agrotóxicos, variáveis como, a técnica de extração, o nível de concentração dos analitos e o tipo de detector utilizado, dentre outras, são otimizadas ou determinadas visando a obtenção de valores de LQm cada vez menores. O principal objetivo é que estes valores estejam abaixo dos LMR estabelecidos pela legislação vigente.

Nas Tabelas 13 e 14 são apresentados os LQi e LDi, calculados pelo método da razão sinal/ruído, e do método (LDm e LQm), para as duas técnicas de preparo de amostra estudadas, EFS e QuEChERS, respectivamente.

Tabela 13: Limites de detecção e quantificação do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados empregando EFS seguida por CL-EM/EM.

Agrotóxicos	LDi ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LDm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQi ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aldicarbe	2,9	0,29	9,5	0,95
Ametrina	1,8	0,18	6,0	0,60
Azoxistrobina	0,2	0,02	0,6	0,06
Carbaril	1,5	0,15	5,0	0,50
Cimoxanil	1,7	0,17	5,5	0,55
Ciproconazol	2,9	0,29	9,5	0,95
Difenoconazol	0,2	0,02	0,7	0,07
Diuron	0,9	0,09	3,0	0,30
Fenarimol	1,6	0,16	5,4	0,54
Miclobutanil	2,2	0,22	7,3	0,73
Simazina	0,9	0,09	3,0	0,30
Tebuconazol	0,1	0,01	0,4	0,04
Triadimefom	1,2	0,12	4,0	0,40

Os valores de LQ_i mostraram que os agrotóxicos estudados têm boa detectabilidade no sistema cromatográfico. O LQ_m foi calculado considerando a capacidade de concentração do método EFS, que é de 10. Assim, o LQ_m foi obtido dividindo o LQ_i por 10. Os valores de LQ_m foram considerados satisfatórios para a análise dos agrotóxicos estudados na matriz uva, pois atendem aos LMR impostos pela legislação.

No método QuEChERS não houve etapa de concentração de amostra. Logo o LQ_m e LD_m são os mesmos LQ_i e LD_i.

Tabela 14: Limites de detecção e quantificação do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados empregando o método QuEChERS seguido por CL-EM/EM

Agrotóxicos	LD e LD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ_i e LQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aldicarbe	1,95	6,5
Ametrina	0,90	3,0
Azoxistrobina	0,09	0,3
Carbaril	0,75	2,5
Cimoxanil	0,90	3,0
Ciproconazol	1,50	5,0
Diuron	0,12	0,4
Difenoconazol	0,30	1,0
Fenarimol	0,90	3,0
Miclobutanil	1,20	4,0
Simazina	0,30	1,0
Tebuconazol	0,03	0,1
Triadimefom	0,60	2,0

A obtenção de valores pequenos de LQ_m com a CL-EM/EM pode ser considerada vantajosa, uma vez que têm sido estabelecidos LMR cada vez menores pelas agências reguladoras. Para determinados agrotóxicos em algumas matrizes, nas quais os seus

LMR são elevados, não há a necessidade de utilizar técnicas de preparo de amostras que concentrem os analitos, podendo usar o método QuEChERS ou, em alguns casos, o emprego da CL-EM/EM pode não ser o mais adequado, pois a determinação de analitos em concentrações acima de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, pode gerar a saturação do espectrômetro de massas.

4.2.3.4 Exatidão e precisão

A exatidão dos métodos desenvolvidos (EFS e o método QuEChERS seguidos por CL-EM/EM) foram determinadas por meio de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração (1 x LQ, 2 x LQ e 10 x LQ) e em triplicatas, resultando em um total de nove determinações, conforme sugerido pela ICH [79] e pela ANVISA [74].

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em 3 níveis de fortificação e em triplicatas. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em 3 dias diferentes e consecutivos.

Nas Tabelas 15 e 16 estão apresentados, respectivamente, os valores obtidos para a exatidão e precisão para os métodos de preparo de amostras EFS e método QuEChERS seguidos de determinação por CL-EM/EM.

Tabela 15: Recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método de EFS seguido por CL-EM/EM*.

Agrotóxicos	Recuperação (%)			Repetitividade (% CV)			Precisão Intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Aldicarbe	52,2	61,2	56,6	9,4	6,6	2,9	6,8	5,8	8,1
Ametrina	93,9	92,1	84,6	4,2	2,9	1,3	2,2	1,8	4,4
Azoxistrobina	74,1	81,2	77,1	2,2	2,3	3,4	2,9	2,6	2,0
Carbaril	65,0	71,2	74,8	6,1	3,9	2,3	5,4	3,2	6,5
Cimoxanil	48,3	46,9	54,3	4,5	2,9	5,1	3,9	3,9	3,5
Ciproconazol	74,2	73,1	74,7	8,9	3,4	3,8	2,6	2,9	1,3
Diurom	82,1	78,7	87,2	5,6	9,5	3,6	4,2	3,1	1,6
Difenoconazol	106,0	87,6	84,8	7,7	2,0	5,7	1,8	1,4	5,6
Fenarimol	90,4	92,4	86,7	6,3	4,6	1,8	3,5	2,4	6,7
Miclobutanil	75,5	79,0	80,0	8,5	5,7	6,0	2,0	5,3	1,3
Simazina	77,8	73,8	72,4	5,7	1,4	2,6	3,3	4,1	3,7
Tebuconazol	204,7	148,6	113,4	0,9	2,1	6,4	0,5	3,0	0,8
Triadimefom	72,9	79,7	71,1	7,5	0,9	0,5	1,7	0,4	1,2

*Média de 3 repetições: F1 = 1 x LQ; F2 = 2 x LQ; F3 = 10 x LQ

Analisando a Tabela 15, para a EFS verifica-se que a maioria dos agrotóxicos estudados apresentou valores de recuperação no intervalo aceito na literatura, para todos os níveis de fortificação, considerando o método suficientemente exato. A exceção foi para os compostos cimoxanil, que apresentou valores inferiores ao estipulado e para o tebuconazol que, para os níveis de fortificação mais baixos apresentou valores altos de recuperação, provavelmente, pelo fato da matriz conter o tebuconazol (Figura 21).

Tanto a repetitividade quanto a precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação abaixo dos 9,5%, portanto menores que os 20% estipulados pela literatura, comprovando que a metodologia é repetitiva não só em ensaios realizados no mesmo dia, mas permaneceram baixos em dias diferentes, com pequenas variações, sendo considerado adequado para a determinação multirresidual dos agrotóxicos investigados.

Tabela 16: Recuperação, repetitividade e precisão intermediária para o método QuEChERS seguido por CL-EM/EM*.

Agrotóxicos	Recuperação (%)			Repetitividade (% CV)			Precisão Intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Aldicarbe	85,1	91,0	97,4	1,1	1,6	0,5	2,8	3,5	1,4
Ametrina	76,0	81,8	87,7	3,1	2,8	0,9	3,2	3,8	2,6
Azoxistrobina	82,1	88,7	102,5	3,2	2,9	2,2	3,9	3,6	2,2
Carbaril	80,9	89,2	99,1	3,5	3,2	0,7	4,1	2,3	0,5
Cimoxanil	77,6	93,8	98,4	0,8	0,6	0,4	1,9	2,6	1,1
Ciproconazol	83,1	89,6	98,6	1,6	1,5	1,3	1,6	1,7	0,7
Diurom	82,3	93,2	98,5	1,3	1,2	0,8	3,2	3,7	2,5
Difenoconazol	89,9	91,9	104,3	2,3	2,2	0,9	2,4	1,6	3,3
Fenarimol	82,2	98,1	105,4	1,6	1,3	1,0	4,2	2,9	1,8
Miclobutanil	76,6	83,2	91,7	3,2	2,9	2,4	2,4	2,1	2,6
Simazina	73,8	86,1	96,7	0,7	0,6	0,5	1,8	2,3	1,9
Tebuconazol	87,5	99,7	104,6	1,4	1,2	1,7	1,6	2,0	1,4
Triadimefom	86,9	91,8	107,4	0,9	1,9	0,3	1,2	1,4	1,6

*Média de 3 repetições: F1 = 1 x LQ; F2 = 2 x LQ; F3 = 10 x LQ

Para o método QuEChERS todos os agrotóxicos estudados apresentaram valores de recuperação satisfatórios, pois se encontram dentro do intervalo aceito na literatura, uma vez que foram obtidas recuperações entre 73,8% e 107,4% para os três níveis de concentração avaliados.

Para a repetitividade foram obtidos coeficientes de variação menores que 3,5% e para a precisão intermediária, menores que 4,2%, comprovando que a metodologia empregada também é repetitiva não somente quando os ensaios foram realizados no mesmo dia, mas também em dias diferentes.

Comparando-se as Tabela 15 e 16 comprova-se que o método QuEChERS é mais eficiente, exato e preciso em relação à EFS.

4.2.3.5 Robustez

A robustez do método cromatográfico avaliada pela variação das marcas dos reagentes empregados no preparo das amostras e da FM, não apresentou alteração nos resultados obtidos.

A metodologia desenvolvida pode também ser considerada robusta por não ter sido afetada quando pequenas variações na fonte de ionização e na vazão do gás de dessolvatação foram introduzidas, bem como variações na FM.

4.2.4 Análise de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e do Distrito de Barão Geraldo

As Tabelas 17 e 18 mostram as concentrações dos agrotóxicos encontrados nas três amostras de uva Niágara rosada compradas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas-SP e do Distrito de Barão Geraldo: amostra A, amostra B e amostra C utilizando respectivamente os métodos EFS-CL-EM/EM e o método QuEChERS.

As amostras A e B foram processadas em liquidificador doméstico com casca e sem sementes. O último lote adquirido, amostra C, foi dividido em três partes: com casca e sem sementes, com casca e sementes, e sem casca. Todas as amostras foram analisadas por CL-EM/EM, tanto por EFS quanto pelo método QuEChERS.

De acordo com os resultados obtidos foi constatado que todas as amostras estavam contaminadas com os agrotóxicos tebuconazol e difenoconazol, uma vez que foram encontradas quantidades detectáveis dos agrotóxicos analisados. Esta constatação foi realizada com base nas janelas de retenção dos agrotóxicos e nos cromatogramas obtidos pela injeção das amostras fortificadas com uma solução da mistura dos agrotóxicos estudados na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Essa concentração escolhida para fortificação das amostras comerciais corresponde ao menor LMR dos agrotóxicos estudados (Tabela 3).

Dentre as amostras analisadas, para o método EFS, foi detectado o tebuconazol em quantidades entre 15 e $356 \mu\text{g kg}^{-1}$. O difenoconazol foi encontrado em concentrações entre 9 e $138 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Na Tabela 17 estão apresentados os valores obtidos para os agrotóxicos tebuconazol e difenoconazol nas amostras adquiridas no comércio, analisados por EFS-CL-EM/EM.

Tabela 17: Concentração de tebuconazol e difenoconazol nas amostras de uva adquiridas no comércio empregando a EFS-CL-EM/EM.

Amostras		Tebuconazol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Difenoconazol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amostra A		30	9
Amostra B		15	17
Amostra C	Com casca e sem sementes	327	135
	Com casca e com sementes	356	138
	Sem casca e com sementes	290	87

Empregando o método QuEChERS, dentre as amostras analisadas, foi detectado o tebuconazol em quantidades entre 40 e 415 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o difenoconazol foi encontrado em quantidades entre 20 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Isto significa que o método QuEChERS permite maior detectabilidade.

As concentrações mais altas encontradas, usando ambos os métodos de extração, estão abaixo do LMR permitido para tebuconazol e no LMR e abaixo para o difenoconazol, segundo os limites impostos pelo Sistema de Informações sobre Agrotóxico (SIA – ANVISA) [101].

Na Figura 27 encontra-se o cromatograma obtido para uma das amostras analisadas (uma amostra de uva), fortificada em 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com os agrotóxicos estudados, para mostrar que as amostras coletadas no comércio apresentaram comportamento semelhante às amostras fortificadas, o que confirma a eficiência do método.

Na Tabela 18 estão apresentados os valores obtidos para os agrotóxicos tebuconazol e difenoconazol nas amostras adquiridas no comércio analisados pelo método QuEChERS-CL-EM/EM.

Tabela 18: Concentração de tebuconazol e difenoconazol nas amostras de uva adquiridas no comércio empregando o método QuEChERS-CL-EM/EM.

Amostras		Tebuconazol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Difenoconazol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amostra A		40	20
Amostra B		28	40
Amostra C	Com casca e sem sementes	396	198
	Com casca e com sementes	415	200
	Sem casca e com sementes	330	146

Analisando as Tabelas 17 e 18, verifica-se um menor nível de contaminação por agrotóxicos quando o consumidor ingere a uva sem casca, enquanto que as sementes praticamente não são afetadas pelos agrotóxicos.

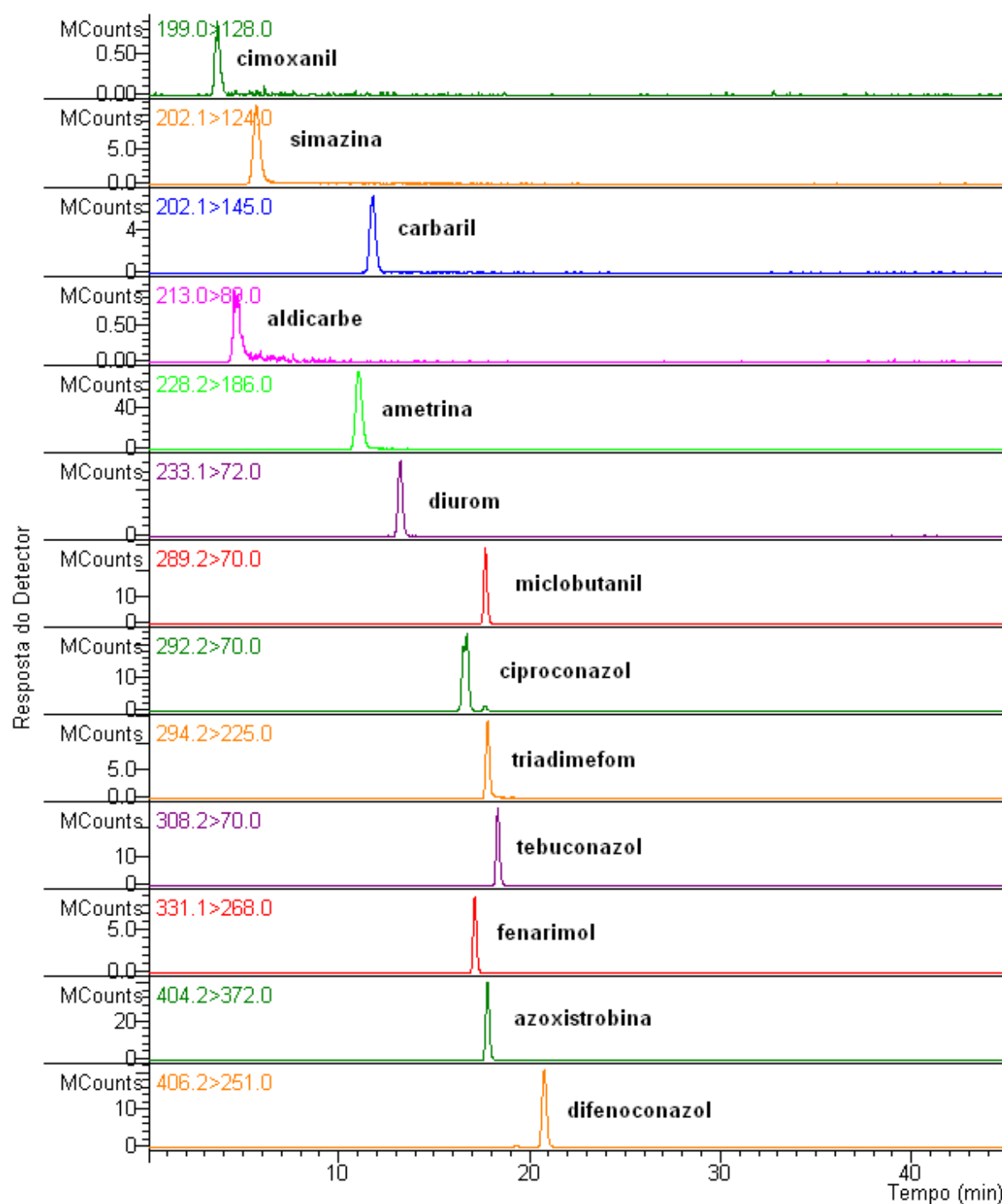


Figura 30 – Cromatogramas obtidos por QuEChERS seguido por CL-EM/EM para amostra comercial fortificada com os agrotóxicos em concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Condições cromatográficas idênticas a Figura 19. A: Cimoxanil; B: Aldicarbe; C: Simazina; D: Ametrina; E: Carbaril; F: Diurom; G: Ciproconazol; H: Fenarimol; I: Miclobutanil; J: Azoxistrobina; L: Triadimefom; M: Tebuconazol; N: Difenoconazol.

4.3 Comparações entre as técnicas CLAE-DAD x CL-EM/EM e entre os métodos de preparo de amostras ELL, EFS e o método QuEChERS

A seguir será apresentada uma comparação entre as diferentes técnicas cromatográficas de análise (CLAE-DAD e CL-EM/EM) e as três técnicas de preparo de amostra (ELL, EFS e o método QuEChERS), evidenciando as vantagens e desvantagens de cada uma delas, em termos de seletividade, detectabilidade, rapidez das análises, facilidade de otimização dos parâmetros instrumentais, quantidade de reagente, produção de resíduos e recuperações obtidas.

4.3.1 Comparação entre as técnicas cromatográficas CLAE-DAD x CL-EM/EM empregadas

Com relação à seletividade, a CL-EM/EM mostrou-se mais vantajosa que as CLAE-DAD. A CL-EM/EM com o detector triplo quadrupolo detecta o íon do analito e os íons dos fragmentos gerados a partir deles. A informação estrutural adicional, fornecida pelos fragmentos gerados, permite que, mesmo quando se analisa agrotóxicos de mesma massa molar, consiga diferenciá-los entre si, desde que eluam em tempos de retenção diferentes. Esta propriedade é muito importante no caso da análise de matrizes complexas, como é o caso da uva. Algumas agências reguladoras estabelecem que a espectrometria de massas em série é a técnica de detecção mais adequada para ser empregada em métodos oficiais de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, devido a sua seletividade [106].

Os cromatogramas obtidos nas janelas de retenção dos agrotóxicos mostraram que os sinais obtidos foram gerados apenas pelo analito, e não por interferentes provenientes da matriz. Isto não foi possível, quando foi empregada a CLAE-DAD, pois o detector por arranjo de diodos identifica o analito através dos espectros de absorção no UV, somente quando o sinal gerado for puro. Essa identificação é prejudicada se interferentes da matriz eluem no mesmo tempo de retenção do composto. Além disso, agrotóxicos pertencentes a mesma classe possuem o mesmo espectro de absorção no UV, não sendo possível identificá-los individualmente.

O ajuste das condições cromatográficas empregando CL-EM/EM foi mais rápido que por CLAE-DAD, pois devido a seletividade da espectrometria de massas, não foi necessário conseguir a resolução entre os sinais dos analitos, visto que por CLAE-DAD a resolução entre os picos de interesse é fundamental.

Para evitar que houvesse problemas na ionização dos analitos, foi necessário utilizar a padronização externa com superposição de matriz, pois a ionização dos analitos, na fonte de ionização, pode ser afetada pela presença da matriz (efeito matriz), principalmente em se tratando de amostras complexas.

Os limites de quantificação obtidos na CL-EM/EM permitiram alcançar a detectabilidade adequada à análise dos agrotóxicos de interesse na matriz uva, uma vez que eles foram inferiores aos LMR determinados pela ANVISA [101] e pelo CODEX [102].

4.3.2 Comparação entre as técnicas de preparo de amostra ELL x EFS x Método QuEChERS

A Tabela 19 apresenta uma comparação entre as técnicas de preparo de amostra estudadas, em termos de tempo de análise, consumo de solvente, produção de resíduos e valores de recuperações obtidos.

Tabela 19: Comparação entre as técnicas de preparo de amostras empregadas

Preparo de amostra	Tempo de análise* (h)	Consumo de reagente (mL)	Recuperação (%)	CV (%)	Fator de concentração
ELL	24	1330	35-110	18,4	1,25
EFS	12	145	52-106	6,8	10
QuEChERS	8	50	74-107	4,2	0

*Referente a extração simultânea de 5 amostras

A técnica de preparo de amostra ELL empregada mostrou-se muito demorada, com várias etapas, fato esse que pode ter contribuído para a perda de material que afetou a variação dos valores das recuperações obtidos assim como resultou em valores mais

baixos. A ELL apresentou o dobro do tempo de análise da EFS e o triplo do método QuEChERS. O consumo de reagente e a produção de resíduos foram bem maior em relação as demais técnicas utilizadas.

O método QuEChERS foi realizado em um menor tempo de análise, possivelmente por envolver um menor número de etapas, consumiu menor volume de solvente e, conseqüentemente, a produção de resíduos foi reduzida em relação as outras técnicas de preparo de amostra. Obtiveram recuperações satisfatórias para todos os compostos estudados e conseguiram atingir CV menores.

Portanto, após a análise da Tabela 19 pode-se concluir que a melhor técnica de preparo de amostra a ser utilizada em termos de rapidez, consumo de solvente, resíduos gerados, que atende a Química Verde, eficiência e repetibilidade de extração é o QuEChERS.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O método empregando a EFS e CL-EM-EM forneceu recuperações e coeficientes de variação dentro do intervalo aceito na literatura, demonstrando ser suficientemente exato e preciso para análise dos agrotóxicos ametrina, azoxistrobina, carbaril, ciproconazol, diurom, difenoconazol, fenarimol, miclobutanil, simazina, e triadimefom em uva *in natura*. Porém, não foi eficiente para os agrotóxicos aldicarbe, cimoxanil e tebuconazol.
- O método QuEChERS apresentou-se mais rápido, com menor consumo de solvente e produção de descarte, atendendo a Química Verde, além de ter menor número de etapas.
- O método QuEChERS seguido de CL-EM/EM resultou em valores de recuperação de 73,8 a 107,4 com CV inferiores a 4,2%, comprovando ser exato e reprodutível, além de atingir baixos limites de quantificação, que permitiram que os limites máximos de resíduos dos agrotóxicos estudados aldicarbe, ametrina, azoxistrobina, carbaril, cimoxanil, ciproconazol, difenoconazol, diurom, fenarimol, miclobutanil, simazina, tebuconazol e triadimefom, em uva *in natura*, fossem alcançados.

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram concluir que ao desenvolver um método de determinação de multirresíduos de agrotóxicos em matrizes complexas, como as frutas, deve-se selecionar como método de preparo de amostra, o método QuEChERS por vencer os desafios de reduzir a presença de interferentes, eliminados na etapa de extração em fase sólida dispersiva, fornecer valores de recuperação satisfatórios para compostos de diferentes polaridades e volatilidade, ser rápido, uma vez que envolve somente duas etapas e requer baixo consumo de solvente, o que diminui a quantidade de resíduos gerados, indo ao encontro dos objetivos da “Química Limpa”. Além disso, há uma grande facilidade no preparo das soluções padrão, é um método mais econômico pela redução no consumo de reagentes e na frequência de manutenção do sistema cromatográfico, é bastante reprodutível e robusto. A principal desvantagem deste método está relacionada com a não concentração do analito, uma vez que a relação amostra/extrato final é de 1 g por 1 mL. Entretanto, esta dificuldade pode ser vencida empregando técnicas cromatográficas de alta detectabilidade como a CL-EM/EM.

De fato, na determinação dos agrotóxicos deve ser usado, como recomendado pela União Européia, a CL-EM/EM, uma vez que ela oferece aumento na seletividade, na detectabilidade e na confiabilidade, proporcionando o monitoramento de um número elevado de agrotóxicos em uma única análise. A CL-EM/EM, atualmente, pode ser considerada uma técnica indispensável em laboratórios que realizam análises de multirresíduos de agrotóxicos, devido a sua elevada detectabilidade, menor tempo no desenvolvimento de métodos e, principalmente, facilidade em se estabelecer o procedimento de preparo de amostra e pela possibilidade de confirmação da identidade de cada agrotóxico, o que não se consegue ao utilizar o detector por arranjo de diodos. Estas vantagens superam o alto custo de aquisição e manutenção do CL-EM/EM.

Portanto, confirmou-se durante todos estes anos de pesquisa que o método QuEChERS e a CL-EM/EM constituem os pilares da determinação de multirresíduos de agrotóxicos nas mais variadas matrizes como a uva *in natura*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P. da; CAMPOS, S. X. de; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Rev. Ecotox. Meio Amb., 13 (2003), 53.
2. KNEŽEVIĆ, Z.; SERDAR, M. Screening of fresh fruit and vegetables for pesticide residues on Croatian market. Food Control, 20 (2009) 419.
3. ROMERO-GONZÁLES; R., FRENICH, A. G.; VIDAL; J. L. M. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Talanta, 76 (2008) 211.
4. STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. Ciênc. Saúde Coletiva, 10 (2005) 91.
5. IMOTO, M. N. Validação de método multirresíduos para agrotóxicos organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura se elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC/MS). Dissertação de mestrado, Curitiba, 2004.
- 06 TOPUZ, S.; ÖZHAN, G.; ALPERTUNGA, B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD, Food Control, 16 (2005) 87.
- 7 SAGRATINI, G.; MAÑES, J.; GIARDINÁ, D.; DAMIANI, P.; PICÓ; Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1147 (2007) 135.
- 8 Agenda Propositiva da Agropecuária/Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). Disponível em: [http://www.cna.org.br/](http://www.cna.org.br;); <http://www.canaldoprodutor.com.br/busca?chave=Agenda+Propositiva+da+Agropecu%C3%A1ria%2FConfederal%20da+agricultura+e+Pecu%C3%A1ria+do+Brasil+%28CNA%29&tid=All>. Acessado em 05/10/2010.
- 9 Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 10, de 31 de julho de 2003. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3656>. Acessado em 28/09/10.
- 10 Produção Integrada de Frutas (PIF), Instrução Normativa nº20 de 27/09/2001. Disponível

em <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/pif/uva/instrucaonormativa2027.pdf>. Acessado em **05/10/2010**.

- 11 Informativo de Procedimentos para Avaliação Toxicológica de Agrotóxicos, seus Componentes e Afins”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/toxicologia/informativo/index.htm>. Acessado em **05/10/2010**.
- 12 OLIVEIRA, M. D. M.; SILVA, P. R.; AMARO; A. A.; TECCHIO, M. A. Viabilidade econômica em tratamento antidegrana em uva “niagara rosada” no estado de São Paulo. Informações Econômicas, SP, v.38, n.6, jun. **2008**. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/tec6-0608.pdf>. Acessado em **05/10/2010**.
- 13 THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends Genet., 22, (**2006**) 511.
- 14 UVA. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=14249. Acessado em **05/10/2010**.
- 15 UVA. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Uva>. Acessado em **05/10/2010**.
- 16 Informações sobre a uva, características, vitaminas, benefícios e propriedades. Disponível em: www.suapesquisa.com/frutas/uva.htm. Acessado em **05/10/2010**.
- 17 Pesquisa identifica gargalos na pós-colheita da uva Niágara. Jornal da Unicamp. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/abril2007/ju354pag4b.html. Acessado em **05/10/2010**.
- 18 TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; POMMER, C. V.; BOTELHO, R. V. Produtividade da cultivar de uva de mesa niagara rosada sobre diferentes porta-enxertos, em Monte Alegre do Sul-SP. Rev. Bras. Frutic., 25 (**2003**) 549. Jaboticabal – SP. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v25n3/18692.pdf>. Acessado em **05/10/2010**.
- 19 A Cultura da Uva. Disponível em: <http://www.comturjundiai.com.br/sitecomtur/portal.nsf/3b723606f1deab8203256b0400507209/7825313a5a283c160325747a004755a6?OpenDocument>. Acessado em **05/10/2010**.

- 20 UVA. Disponível em: <http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/uva/uva.php>. Acessado em **05/10/2010**.
- 21 Característica da uva. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=15831. Acessado em **05/10/2010**.
- 22 Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16764>. Acessado em **05/11/2010**.
- 23 RADIŠIĆ, M.; GRUJIĆ, S.; VASILJEVIĆ, T.; LAUŠEVIĆ, M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 113 (**2009**) 712.
- 24 Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30e999004067a945834eeb137b78f2dc/nota+tecnica+risco+consumo+frutas+e+hortalicas.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em **14/10/10**.
- 25 CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; ALVES, A.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *J. Chromatogr. A*, 1216 (**2009**) 119.
- 26 KIRCHNER, M.; HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; MOCÁK, J. Fast gas chromatography for pesticide residues analyses using analyte protectants. *J. Chromatogr. A*, 1186 (**2008**) 271.
- 27 CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; LACINA, O.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection–low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1186 (**2008**) 281.
- 28 ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 520 (**2004**) 33.
- 29 WU, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; WU, C.; ZENG, X.; WEN, J.; WANG, Z. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the determination

- of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 5504.
- 30 LIKAS, D.T.; TSIROPOULOS, N.G.; MILIADIS, G.E. Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples. J. Chromatogr. A, 1150 (2007) 208.
- 31 CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample Preparation. J. Chromatogr. A, 1184 (2008) 191.
- 32 KHALILI-ZANJANI, M.R.; YAMINI, Y.; YAZDANFAR, N.; SHARIATI, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame photometric detection. Anal. Chim. Acta, 606 (2008) 202.
- 33 ŠKRBIĆ, B.; PREDOJEVIĆ, Z. Levels of Organochlorine Pesticides in Crops and Related Products From Vojvodina, Serbia: Estimated Dietary Intake. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 54 (2008) 628.
- 34 WATANABE, E.; BABA, K.; EUN, H. Simultaneous Determination of Neonicotinoid Insecticides in Agricultural Samples by Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography Equipped with Diode-Array Detection. J. Agric. Food Chem., 55 (2007) 3798.
- 35 LANÇAS, F. M.. Extração em Fase Sólida (SPE). RIMA, 2004.
- 36 LANÇAS, F. M.. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. Scientia Chromatographica, 0 (2008) 17.
- 37 FARIA, L. J. de S. Avaliação de diferentes sorventes na Extração em Fase Sólida de agrotóxicos em água. Desenvolvimento e validação de metodologia. Dissertação de mestrado, **agosto/2004**, UNICAMP.
- 38 OTERO, R. R.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. J. Chromatogr. A, 992 (2003) 121
- 39 TEIXEIRA, M. J., AGUIAR, A., AFONSO, C. M. M., ALVES, A., BASTOS, M. S. M.. Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. Anal. Chim. Acta, 513 (2004) 333.
- 40 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHECK, F. J. Fast and

easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.*, 86 (2003) 412.

- 41 ANASTASSIADES, M. QuEChERS - Mini-multiresidue method for the analysis of pesticides in low-fat products. Disponível em: http://www.quechers.com/docs/quechers_en_oct2005.pdf. Acessado em 10/07/2009
- 42 PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, 32 (2009) 1620.
- 43 PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBRA, A. Analysis of pesticides residues using the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multirresíduo method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1697
- 44 LESUEUR, C.; KNITTL, P.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, 19 (2008) 906.
- 45 BANERJEE, K.; OULKAR, D. P.; DASGUPTA, S.; PATIL, S. B.; PATIL, S. H.; SAVANT, R.; ADSULE, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1173 (2007) 98.
- 46 SANNINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1036 (2004) 161.
- 47 KRUBE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 58.
- 48 KAALE, E.; CHAMBUSO, M.; KITWALA, J. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. *Food Chem.*, 107 (2008) 1289.
- 49 HU, Y.; YANG, X.; WANG, C.; ZHAO, J.; LI, W.; WANG, Z. A sensitive determination

method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Addit. Contam.*, 25 **(2008)** 314.

- 50 MALDANER, L.; SANTANA, C. C.; JARDIM, I. C. S. F. HPLC Determination of pesticides in soybeans using matrix solid phase dispersion. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 31 **(2008)** 972.
- 51 CHEN, Z.; ZHANG, H.; LIU, B.; YANG, G.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; WANG, W.; DING, R.; DU, H.; LI, H. Determination of herbicide residues in garlic by GC–MS. *Chromatographia*, 66 **(2007)** 887.
- 52 GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. *Food Chem.*, 107 **(2008)** 1342.
- 53 FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; PASTOR-MONTORO, E.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 **(2008)** 947.
- 54 PICÓ, Y.; FARRÉ, M.; SOLER, C.; BARCELÓ, D. Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry: Imazalil as a case study of quantification. *J. Chromatogr. A*, 1176 **(2007)** 123.
- 55 HERNANDEZ, F.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; BIJLSMA, L.; BARREDA, M.; PITARCH, E. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *J. Chromatogr. A*, 1109 **(2006)** 242.
- 56 GOTO, T.; ITO, Y.; YAMADA, S.; MATSUMOTO, H.; OKA, H.; NAGAE, H. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetable by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column. *Anal. Chem. Acta*, 555 **(2006)** 225.
- 57 HIEMSTRA, M.; KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1154 **(2007)** 3.

- 58 PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT C.; PRESTES, O. Method validation for analysis of 169 pesticides in soya grain, without lean-up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *J. Chromatogr. A*, 1142 (**2007**) 123.
- 59 VENKATESWARLU, P.; MOHAN, K. R.; KUMAR Ch, R; SESHIAIAH, K. Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, 105 (**2007**) 1760.
- 60 Y. PICÓ, M. FARRÉ, N. TOKMAN, D. BARCELÓ. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits. *J. Chromatogr. A*, 1203 (**2008**) 36.
- 61 GONÇALVES, F. F.. Estudo de método empregando HPLC e LC-MS/MS para determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado. Tese de Doutorado. Santa Maria – RS, **2007**.
- 62 KUSTER, M.; ALDA, M. L. de; BARCELÓ, D. Analysys of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (**2006**) 900.
- 63 PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. "Environmental and Food Applications of LC-Tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: An Overview", *Mass Spectrom. Rev.*, 23 (**2004**) 45.
- 64 HOGENBOOM, A. C.; NIESSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. Th. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water. *J. Sep. Sci.*, 24 (**2001**) 331.
- 65 ARDREY, R. E. "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an Introduction", John Wiley & Sons, England, **2003**.
- 66 CHIARADIA, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massa acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova*, 31 (**2008**) 623.
- 67 VEKEY, R. K. *Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. J. Chromatogr. A*, 921 (**2001**) 227.
- 68 NIESSEN, W. M. A. "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", 3ª ed., Taylor and

Francis Group, Boca Raton, **2006**.

- 69 EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. "Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation and Applications", John Wiley & Sons, New Jersey, **2009**.
- 70 PICÓ, Y.; FONT, G.; RUIZ, M. J.; FERNÁNDEZ, M. "Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety", *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (**2006**) 917
- 71 JUNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F. Determinação de resíduos de clorafenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). *Quím. Nova*, 29 (**2006**) 586.
- 72 THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R., "Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, 74 (**2002**) 835.
- 73 INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2007**. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acessado em **14/10/10**.
- 74 ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, *Resolução RE nº 899*, de **29/05/2003**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acessado em **14/10/2010**.
- 75 Codex Alimentarius Commission; Report of the Thirty-Fifth Session of the Codex Committee on Pesticide Residues, CL 2003/15-PR, **2003**.
- 76 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, 27(**2004**) 771.
- 77 SANCO, Commission of the European Communities (203). Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed. 3ª Ed., Bruxelas, Bélgica. Acessado em **14/10/2010**)
- 78 Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Agrotóxicos (GARP); Manual de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, apostila, **1999**.
- 79 ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Harmonised Tripartite Guideline –

- Validation Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), **2005**. Disponível em <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acessado em **14/10/10**.
- 80 Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, LGC, Teddington, Middlesex, UK, **1998**. Disponível em <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>. Acessado em **14/10/10**.
- 81 AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, **2002**. Disponível em http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf. Acessado em **14/10/10**.
- 82 Comitê Codex Alimentarius do Brasil (CCAB). Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/ccab.asp>. Acessado em **14/10/10**.
- 83 The Codex Alimentarius Commission. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp. Acessado em **14/10/10**.
- 84 GOBO, A.B.; KURZ, M.H.S.; PIZZUTI, I.R.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R., "Development and Validation of Methodology for the Determination of Residues of Organophosphorus Pesticides in Tomatoes", *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (**2004**) 945;
- 85 IMOTO, M.N.; FREITAS, R.J.S., Determinação dos limites de detecção (ld) e quantificação (lq) em análise de resíduos de pesticidas organohalogenados por cromatografia em fase gasosa", *Pest. Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 18 (**2008**) 35)
- 86 Anvisa, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Gerência Geral de Toxicologia, RELATÓRIO DE ATIVIDADES DE **2001- 2007**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/38cffe804067a7c8833ceb137b78f2dc/relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em **14/10/2010**.; <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c66e25804067a87e8345eb137b78f2dc/nota+tecnica+-+resultados+para+2008.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em **14/10/2010**.
- 87 ANVISA, Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública (GGLAS), Gerência Geral de Toxicologia (GGTOX), Planejamento estratégico e Delineamento das Ações da Coordenação Técnica do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), **2006**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/planejamento_programa_analise_residuos_agro_alimentos.pdf. Acessado em **14/10/2010**.

- 88 ANVISA, Guia para o Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os Laboratórios Integrantes do PARA, **2007**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/reblas/para/CONTROLE_QUALIDADE.pdf. Acessado em **14/10/2010**.
- 89 Comission of the European Communities (SANCO), 2003, Document nº SANCO/2007/3131. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Bruxelas, Bélgica, **2007**. Disponível em http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acessado em **14/10/2010**.
- 90 Codex Alimentarius, CAC/GL, Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, 40-1993, Rev.1-2003, **2003**. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=378, Acessado em **14/10/2010**.
- 91 BLIESNER, D.M. "Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide", John Wiley & Sons, United States, **2006**.
- 92 PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIRO, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos *Quim. Nova*, 31 (5) (**2008**) 1190.
- 93 CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. "Comparison of various international guidelines for analytical method validation", *Pharmazie*, 62 (**2007**) 4.
- 94 HUBER, L. "Validation of Analytical Methods: Review and Strategy", *LC/GC International*, 11 (**1998**) 96
- 95 TAVERNIERS, I; de LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. "Trends in quality in the analytical laboratory. ii. analytical method validation and quality assurance", *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 23 (**2004**) 535
- 96 VALENTE, A. L. P; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F, "Métodos de Separação - Análise Quantitativa por Cromatografia", **2003**. Disponível em <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGl0YXRpdmcEtcG9yLWNyb21hdG9ncmFmaWE=>. Acessado em **14/10/2010**.
- 97 RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P., "Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na

- validação de métodos analíticos univariados", *Quim. Nova*, 31 (2008) 164
- 98 KONIECZKA, P. "The Role and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 37 (2007) 173.
- 99 Council Directive 2002/657/Ec. Official Journal of The European Communities, L221, 8, 2002.
- 100 MORAIS, L. S. R. de. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de agrotóxicos em água e solo das áreas de recarga do aquífero Guarani, na região das nascentes do Rio Araguaia, GO/MT. Tese de doutorado. Campinas, 2009.
- 101 ANVISA, Monografias Autorizadas. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotoxicotoxicologias&cat=Monografias+de+Agrotoxicos&cat1=com.ibm.workplace>. Acessado em 14/10/2010; Sistema de Informações sobre Agrotóxico (SIA). Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>. Acessado em 10/07/2009
- 102 Codex Alimentarius. Pesticide Residues in Food. Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp. Acessado em 14/10/2010
- 103 LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. J. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Ass. Official Anal. Chem.*, 58 (1975) 1020.
- 104 PIZZUTTI, I. R. Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de agrotóxicos em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS. Tese de Doutorado. UFSM, Santa Maria, RS. 2007
- 105 CHEN, Z. L.; ZHANG, H.; LIU, B.; YANG, G.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; WANG, W.; DING, R.; DU, H.; LI, H. Determination of herbicide residues in garlic by GC-MS. *Chromatographia*, 66 (2007) 887.
- 106 European Commission; *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36.