



UNICAMP

Instituto de Química
Departamento de Química Analítica

Tese de doutorado:

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS
PARA ANÁLISE MULTIRRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM SUCO
DE LARANJA E TANGERINA UTILIZANDO CLAE-DAD, CL-EM-EM
E CLUE-DAD**

Aluna: Mariza Campagnolli Chiaradia

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Campinas – SP
2009

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

C43d Chiaradia, Mariza Campagnolli.
Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD / Mariza Campagnolli Chiaradia. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Agrotóxicos. 2 CLAE. 3. CLUE. 4. CL-EM-EM.
I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development, validation and application of methods for multiresidual pesticide determination of orange juice tangerine juice by HPLC-DAD, LC-MS-MS and UPLC-DAD

Palavras-chaves em inglês: Pesticides, HPLC, UPLC, LC-MS-MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Prof. Dr. Renato Zanella (DQ-UFSM), Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças (IQSC-USP), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 23/04/2009

Aos meus pais, João e Edna, que me deram oportunidade e incentivo para realizar meus estudos, aos meus “pais do coração”, José e Cacilda, que me deram apoio para não desistir nos momentos de adversidade, ao meu amor e eterno companheiro, Kleber, que foi essencial para que eu chegasse até aqui,

Com amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu o dom da vida.

Ao meu marido, Kleber, por acreditar, incondicionalmente, na minha capacidade e no meu trabalho. Tenho plena certeza de que foi o seu incentivo e todo amor e carinho que você me dedicou que permitiram que eu chegasse até aqui. Amo você!

Aos meus pais, João e Edna, pelo amor, dedicação, por tudo o que me ensinaram, por terem me dado a oportunidade de estudar e não desistir dos meus sonhos. Muito do que sou hoje eu devo a vocês!

À Profa. Dra. 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 3 anos de doutorado. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Carol e ao Prof. Dr. Kenneth, pela disponibilidade, contribuições, ensinamentos e importantes sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

À todos do LabCrom, Rose, Louise, Lais, Camila, Milena, Liane, Priscila, Lucília, Rafael, Ana Paula, Paulo, Patrícia, Juliano, Fernanda, Adriana, Marcelo, Marcel, Lívia e Vanessa, pelas conversas, momentos de diversão, companheirismo, respeito e agradável convívio. Em especial à Rose pelas sugestões, amizade, companhia e por todo o carinho; à minha amiga Louise, que foi companheira em todos os momentos de trabalho e de diversão e à Lais, pela humildade com que me auxiliou durante a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para a participação em reuniões científicas.

Ao assessor da FAPESP, pela contribuição com olhar crítico sobre os relatórios.

Ao S. José, à D. Cacilda e ao Guilherme, pelos conselhos, incentivos e por todo o carinho.

Aos meus amigos do Instituto de Química da UNICAMP, Roberto, Thaís e Karen, pelo companheirismo, conselhos e amizade.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

CURRICULUM VITAE

1- FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Mestrado em Química**, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, julho de 2005. Título da dissertação: "**Otimização do processo de imobilização térmica de PMOS sobre um suporte de sílica aluminizada para sua aplicação como fase estacionária em CLAE.**", sob orientação da Profa. Dra. Carol H. Collins.
- **Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas**, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, março 2003.

2- INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Bolsista do Programa PIBIC/SAE de julho de 2000 a julho de 2001. Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins.
- Bolsista do Programa PIBIC/SAE de julho de 2001 a julho de 2002. Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins.

3- EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- Participação no Programa de Estágio Docente (PED) do Instituto de Química da UNICAMP, na disciplina QA 111 (Química Analítica Qualitativa I), 03/2005 a 07/2005.
- Participação no Programa de Estágio Docente (PED) do Instituto de Química da UNICAMP, na disciplina QA 313 (Química III), 03/2007 a 07/2007.

4- EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Empresa: Novotex Sul Americana, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Laminados Sintéticos, contrato em regime CLT de 12/2002 a 10/2003.
- Empresa: Novotex Sul Americana, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Laminados Sintéticos, estágio realizado de 12/2002 a 10/2003.
- Empresa: Nestlé do Brasil Ltda., Laboratório de Garantia da Qualidade, estágio realizado em 07/2002.

5- INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- Trabalhos apresentados em eventos nacionais: **6**
- Trabalhos apresentados em eventos internacionais: **2**

6- ARTIGO CIENTÍFICO

Chiaradia, M. C.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; O Estado da Arte da Cromatografia com Detecção por Espectrometria de Massas Acoplada a Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos, *Química Nova*, 31 (3) **(2008)** 623.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE MULTIRRESIDUAL DE AGROTÓXICOS EM SUÇO DE LARANJA E TANGERINA UTILIZANDO CLAE-DAD, CL-EM-EM E CLUE-DAD. O Brasil é o maior produtor mundial de citrus e o principal exportador de suco. Dentre as espécies cultivadas no Brasil, há a predominância de laranjas Pera e tangerinas Murcote. Porém, os agricultores brasileiros têm enfrentado a incidência de várias pragas agrícolas na cultura de citrus, de forma que, para manter a produção e a qualidade, tem sido necessário aplicar agrotóxicos de forma constante e cada vez maior. Por outro lado, devido ao risco resultante da exposição dos consumidores aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, agências governamentais reguladoras têm estabelecido limites máximos de resíduos (LMR) para todos os agrotóxicos. Neste contexto, três métodos para a determinação de resíduos dos principais agrotóxicos (aldicarbe, difenoconazol, diflubenzurom, diurom, imidacloprido e tiofanato metílico) aplicados no cultivo de laranjas Pera e tangerinas Murcote foram desenvolvidos e validados. Vários métodos de preparo de amostras foram avaliados e o método QuEChERS foi o que se mostrou mais eficiente, rápido e simples. Foram utilizadas diferentes técnicas cromatográficas para a validação do método: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (CL-EM-EM) e cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). Os parâmetros analíticos mostraram que o método proposto extrai de maneira satisfatória os agrotóxicos das matrizes, permitindo sua detecção por todas as técnicas analíticas utilizadas. Entretanto, devido à complexidade da matriz estudada foi necessário fazer a calibração na matriz. As recuperações obtidas foram de 79 a 124% com CLAE-DAD, de 83 a 119% com CL-EM-EM e de 78 a 113% com CLUE-DAD, com coeficientes de variação menores que 15% para todas as técnicas cromatográficas. Os limites de quantificação obtidos mostraram que os métodos podem ser utilizados para a detecção dos agrotóxicos em concentrações abaixo dos LMR estabelecidos pela legislação brasileira e dos EUA. Com a CLUE-DAD obtiveram-se os menores tempos de análise, 7 min, e a CL-EM-EM foi a técnica cromatográfica mais seletiva e com a melhor detectabilidade ($4 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizada neste trabalho. O método foi aplicado a amostras coletadas no comércio da cidade de Campinas-SP e o agrotóxico encontrado com maior frequência foi o imidacloprido, mas em concentrações abaixo dos LMR.

ABSTRACT

DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF METHODS FOR MULTIRRESIDUAL PESTICIDE DETERMINATION OF ORANGE JUICE AND TANGERINE JUICE BY HPLC-DAD, LC-MS-MS AND UPLC-DAD. Brazil is the world's largest producer of oranges and the largest exporter of juice. Among the species grown in Brazil, there is a predominance of Pera oranges and Murcote tangerines. Brazilian agriculturist have faced several diseases during orange and tangerine cultivation that demand constant and even expensive applications of pesticides to maintain production and quality. On the other hand, because of potential health risk to the consumers, resulting from acute and/or chronic dietary exposure, government regulatory agencies have established maximum residue limits (MLR) for all the pesticides. Thus, this work developed and validated three methods to determine the main pesticides applied to Pera orange and Murcote tangerine cultivation in Brazil: aldicarb, difenoconazole, diflubenzuron, diuron, imidacloprid and thiophanate-methyl. Several sample preparation methods were evaluated and the QuEChERS method was the more suitable, rapid and simplest extraction method for the matrices studied. The methods were validated using different chromatographic techniques: high performance liquid chromatography – diode array detection (HPLC-DAD), liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) and ultra-performance liquid chromatography – diode array detection (UPLC-DAD). The analytical parameters demonstrate that the proposed methodologies satisfactorily extract the pesticides from the matrices, allowing detection using all the quantification techniques employed. Because of the complexity of the matrices studied, it was necessary to employ matrix-matched calibration. When using HPLC-DAD recoveries of 79 to 124% were obtained, with LC-MS-MS the recoveries were 83 to 119% and when using UPLC they were 78 to 113%, with coefficients of variation below to 15% for all chromatographic techniques. These limits of quantification show that the methods developed can be used to detect these pesticides at concentrations below the MRL established by Brazilian and USA legislation. UPLC-DAD had a more rapid analysis time, 7 min, and LC-MS-MS had the best selectivity and detectivity ($4 \mu\text{g L}^{-1}$). The methods were applied to samples collected in markets of Campinas city, and the pesticide most frequently found was imidacloprid, with concentrations well below the listed MRL.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A origem da laranja e a citricultura no Brasil.....	2
1.2 - O uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo.....	4
1.3 - Os benefícios do consumo da laranja, da tangerina e dos sucos dessas frutas, e a importância dos seus empregos como matrizes.....	7
1.4 - Métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	10
1.4.1 - Técnicas de preparo de amostras.....	10
1.4.1.a – QuEChERS.....	12
1.4.2 - Uso de métodos cromatográficos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	13
1.4.2.a - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série e sua utilização na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos [84].....	14
1.4.2.b - Cromatografia líquida de ultra eficiência e sua utilização na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	21
1.5 - Validação de métodos analíticos.....	25
1.5.1 - Parâmetros analíticos de validação.....	25
1.5.1.a - Seletividade.....	25
1.5.1.b - Linearidade e faixa linear.....	26
1.5.1.c – Precisão.....	28
1.5.1.d – Exatidão.....	29
1.5.1.e - Limite de detecção.....	31
1.5.1.f - Limite de quantificação.....	32
1.5.1.g – Robustez.....	32
2 - OBJETIVOS.....	33
3 - JUSTIFICATIVA.....	33
4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34

4.1- A escolha dos agrotóxicos.....	34
4.2 - Materiais e reagentes.....	36
4.3 - Equipamentos e instrumentação.....	37
4.4 - Preparo das soluções estoque dos agrotóxicos.....	38
4.5 - Amostras de laranja Pera e tangerina Murcote.....	38
4.6 - Determinação das condições cromatográficas de separação e detecção.....	39
4.6.1 - CLAE-DAD.....	39
4.6.2 - CL-EM-EM.....	40
4.6.3 - CLUE-DAD.....	40
4.7 - Métodos de preparo de amostras.....	41
4.7.1 - Extração líquido-líquido.....	41
4.7.2 - Extração líquido-líquido seguida de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	43
4.7.3 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero.....	44
4.7.4 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero seguida de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	46
4.7.5 - Extração em fase sólida.....	48
4.7.5.a - Procedimento baseado no trabalho de Diserens e Henzelin [49].....	48
4.7.5.b - Procedimento baseado no trabalho de Obana et al. [50].....	49
4.7.5.c - Procedimento baseado no trabalho de Miliadis et al. [51].....	52
4.7.6 - QuEChERS modificado.....	53
4.8 - Obtenção da curva analítica.....	54
4.8.1 - Padronização externa sem superposição da matriz.....	54
4.8.2 - Padronização externa com superposição de matriz.....	54
4.9 - Validação dos métodos.....	56
4.10 - Análises de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e região.....	56
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 - Determinação das condições cromatográficas de separação e detecção.....	57
5.1.1 - CLAE-DAD.....	57
5.1.2 - CL-EM-EM.....	60
5.1.3 - CLUE-DAD.....	63
5.2 - Otimização do método de preparo de amostra.....	64
5.2.1 - Extração líquido-líquido.....	65

5.2.2 - Extração líquido-líquido seguida de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	65
5.2.3 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero.....	67
5.2.4 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero seguida de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	68
5.2.5 - Extração em fase sólida.....	69
5.2.6 - QuEChERS modificado.....	71
5.2.6.a - QuEChERS modificado combinado à LC-EM-EM.....	74
5.2.6.b - QuEChERS modificado combinado à CLUE-DAD.....	76
5.3 - Validação dos métodos.....	78
5.3.1 - CLAE-DAD.....	79
5.3.1.a - Seletividade.....	79
5.3.1.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação.....	80
5.3.1.c - Exatidão e precisão.....	84
5.3.1.d - Robustez.....	85
5.3.2 - CL-EM-EM.....	86
5.3.2.a - Seletividade.....	86
5.3.2.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação.....	86
5.3.2.c - Exatidão e precisão.....	90
5.3.2.d – Robustez.....	92
5.3.3 – CLUE-DAD.....	92
5.3.3.a – Seletividade.....	92
5.3.3.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação.....	93
5.3.1.c - Exatidão e precisão.....	96
5.3.1.d – Robustez.....	97
5.4 - Análise de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e região.....	98
5.4.1 - CLAE-DAD.....	98
5.4.2 - CL-EM-EM.....	101
5.4.3 - CLUE-DAD.....	102
5.5 – CLAE-DAD x CLUE-DAD x CL-EM-EM.....	102

6 – CONCLUSÕES.....	106
7- REFERÊNCIAS.....	110

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – ionização química a pressão atmosférica (“*atmospheric pressure chemical ionization*”)

APP – fotoionização a pressão atmosférica (“*atmospheric pressure photoionization*”)

C8 – octil, C₈H₁₇—

C18 – octadecil, C₁₈H₃₇—

CG – cromatografia gasosa

CG-EM-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série

CID – dissociação induzida por colisão (“*collision-induced dissociation*”)

CL-EM-EM – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

CLUE – cromatografia líquida de ultra eficiência

CLUE-DAD – cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos

CV – coeficiente de variação

DAD – detecção por arranjo de diodos

DMFS – extração por dispersão da matriz em fase sólida

EAM – extração assistida por micro-ondas

EFS – extração em fase sólida

EFS-D – extração em fase sólida dispersiva

EFSC – extração por fluido supercrítico

ELL – extração líquido-líquido

ELL-TSZ – extração líquido-líquido à temperatura sub-zero

ELP – extração por líquido pressurizado

EM – espectrometria de massas

EM-EM – espectrometria de massas em série

ESBA – extração por sorção em barra de agitação

ESI – ionização por eletronebulização (“*electrospray ionization*”)

eV – electron volts

FDA – “*United States Food and Drug Administration*”

FE – fase estacionária

FM – fase móvel

GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH – “*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*”

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – limite de detecção

LD_I – limite de detecção do instrumento

LD_M – limite de detecção do método

LDL - *low density lipoprotein*

LMR – limite máximo de resíduos

LQ – limite de quantificação

LQ_I – limite de quantificação do instrumento

LQ_M – limite de quantificação do método

MEFL – microextração em fase líquida

MEFS – microextração em fase sólida

min – minutos

MRM – monitoramento de múltiplas reações (“*multiple-reaction monitoring*”)

MSR – monitoramento seletivo de reações (“*selected-reaction monitoring*”)

m/z – massa/carga

PARA – Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PEEK – poliéter éter cetona

PIB – produto interno bruto

QToF – quadrupolo-analisador de tempo de voo (“*time-of-flight*”)

Qtrap – quadrupolo-*Ion-Trap*

QuEChERS – *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*

r – coeficiente de variação

RSD – desvio padrão relativo

s – estimativa do desvio padrão

SIM – monitoramento dos íons selecionados (“*selected ion monitoring*”)

t_R – tempo de retenção

TIC – cromatograma de íons totais (“*total ion chromatogram*”)

UV – ultravioleta

UV-VIS – ultravioleta-visível

V – volts

λ_{max} – comprimento de onda de máxima absorção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de amostras contaminadas com resíduos de agrotóxicos não autorizados para cultura ou acima dos LMR obtidos pelo Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), realizado pela ANVISA entre os anos de 2002 e 2008 [35].....	6
Tabela 2: Composição nutricional da laranja, da tangerina e dos respectivos sucos destas frutas (por 100 g de porção comestível) [38].....	8
Tabela 3: Classe, grupo químico, classificação toxicológica, pKa e estrutura química dos agrotóxicos estudados [108, 109].....	35
Tabela 4: Limites máximos de resíduos para os agrotóxicos estudados segundo a ANVISA [108], a FDA [110] e o CODEX [111].....	36
Tabela 5: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado nos diferentes sistemas cromatográficos utilizados e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}).....	60
Tabela 6: Parâmetros do LC-EM-EM otimizados para os 6 agrotóxicos estudados.....	61
Tabela 7: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CLAE-DAD	82
Tabela 8: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CLAE-DAD	82
Tabela 9: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando CLAE-DAD	84

Tabela 10: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando CLAE-DAD	85
Tabela 11: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de tangerina Murcote, utilizando CLAE-DAD	85
Tabela 12: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CL-EM-EM	89
Tabela 13: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CL-EM-EM	89
Tabela 14: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_i e LQ_i) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando CL-EM-EM	90
Tabela 15: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando CL-EM-EM	91
Tabela 16: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de tangerina Murcote, utilizando CL-EM-EM	91
Tabela 17: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CLUE-DAD	95
Tabela 18: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando CLUE-DAD	95

Tabela 19: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando **CLUE-DAD**.....96

Tabela 20: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando **CLUE-DAD**.....97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do procedimento de ELL.....	42
Figura 2: Fluxograma do procedimento de ELL seguido de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	44
Figura 3: Fluxograma do procedimento de ELL-TSZ.....	46
Figura 4: Fluxograma do procedimento de ELL-TSZ seguida de uma etapa de “ <i>clean-up</i> ”.....	47
Figura 5: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Diserens e Henzelin [49].....	49
Figura 6: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Obana et al. [50].....	51
Figura 7: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Miliadis et al. [51].....	53
Figura 8: Fluxograma do procedimento baseado no método QuEChERS modificado [75].....	55
 Figura 9: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de 10 mg L ⁻¹) empregando-se a CLAE-DAD . Condições cromatográficas: volume de injeção - 10 µL; coluna analítica - Nova-Pak C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula), Waters; coluna de guarda - Nova-Pak C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula); FM - água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 80:20 v _A /v _B ; 4 min - 70:30 v _A /v _B ; 5 min - 50:50 v _A /v _B ; 6 min - 30:70 v _A /v _B ; 7 min - 20:80 v _A /v _B , retornando linearmente às condições iniciais em 13 minutos (20 min - 80:20 v _A /v _B); vazão - 1 mL min ⁻¹ ; detecção UV - 248 nm. Identificação dos picos: (A) 1-imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol, 6-	

abamectina; (B) 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom	e	6-
difenoconazol.....		59

Figura 10: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) empregando-se a **CL-EM-EM**. Condições cromatográficas: volume de injeção - $10 \mu\text{L}$; coluna analítica - Nova-Pak C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., $4 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula), Waters; coluna de guarda - Nova-PaK C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., $4 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula); FM - solução aquosa de 3 mmol L^{-1} de formiato de amônio com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 20:80 v_A/v_B , 8 min – 80:20 v_A/v_B , 15 min – 20:80 v_A/v_B e mais 5 min para estabilização da coluna após o retorno às condições iniciais (20 min - 20:80 v_A/v_B); vazão – $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito no item 4.6.2. Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.....62

Figura 11: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) empregando-se a **CLUE-DAD**. Condições cromatográficas: volume de injeção - $1 \mu\text{L}$; coluna analítica - Acquity C18 (50 mm x 2.1 mm d.i., $1,7 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula), Waters; FM - água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min – 80:20 v_A/v_B ; 1,2 min – 70:30 v_A/v_B ; 1,6 min 50:50 v_A/v_B ; 1,9 min – 30:70 v_A/v_B ; 2,2 min – 20:80 v_A/v_B ; 6,6 min – 80:20 v_A/v_B ; vazão – $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV - 248 nm. Identificação dos picos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....64

Figura 12: Cromatogramas resultantes da injeção dos extratos obtidos a partir da amostra testemunha (1) e testemunha **fortificada a 20 mg L^{-1}** (2), submetidas ao procedimento de ELL com os solventes extratores acetonitrila (A), acetato de etila (B) e acetona (C), utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 A.** Identificação dos picos dos cromatogramas: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + * interferente, 3- tiofanato metílico + # interferente, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol e 6- abamectina.....66

Figura 13: Cromatogramas resultantes da injeção dos extratos obtidos a partir do suco das amostras testemunhas (A) e do suco **fortificado a 2 mg L⁻¹** das amostras testemunhas (B) submetidas à ELL-TSZ com 10 mL de água:acetato de etila 1:9 v/v, utilizando-se a **CLAE-DAD.. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 A**. Identificação dos picos do cromatograma (B): 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + * interferente, 3- tiofanato metílico + # interferente, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol + ° interferente, 6- abamectina.....68

Figura 14: Cromatogramas da injeção da solução resutante da passagem do extrato contendo os agrotóxicos pelo cartucho de sílica (A) e da solução resultante da eluição dos agrotóxicos retidos no cartucho (B) obtidos a partir do suco das amostras testemunhas (1) e do suco **fortificado a 2 mg L⁻¹** das amostras testemunhas (2), segundo o procedimento de extração desenvolvido por Miliadis et al. [51], utilizando-se a **CLAE-DAD.. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 A**. Identificação dos picos do cromatograma (B): 1- imidacloprido + * interferente, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diflubenzurom + # interferente, 5- difenoconazol, 6- abamectina.....70

Figura 15: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para o suco das amostras testemunhas e para o suco **fortificado a 100 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **laranja Pera** utilizando-se a **CLAE-DAD. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 B**. Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + * interferente, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....72

Figura 16: Cromatogramas dos extratos obtidos pelo método QuEChERS para o suco da amostras testemunhas e para o suco **fortificado a 100 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **tangerina Murcote** utilizando-se a **CLAE-DAD. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 B**. Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + ° interferente, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + * interferente da matriz, 5 diflubenzurom e 6 – difenoconazol.....73

Figura 17: Cromatograma do extrato obtido pelo método QuEChERS para a amostra branco (livre da matriz e dos compostos de interesse) utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 B**.....74

Figura 18: Cromatogramas dos íons obtidos pela injeção do extrato do suco **fortificado em 100 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **laranja Pera** obtido pelo método QuEChERS, utilizando-se a **CL-EM-EM**. **Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 10**. Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.....75

Figura 19: Cromatogramas dos íons obtidos pela injeção do extrato do suco **fortificado em 100 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **tangerina Murcote** obtido pelo método QuEChERS, utilizando-se a **CL-EM-EM**. **Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 10**. Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.....76

Figura 20: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para o suco das amostras testemunhas e para o suco **fortificado a 500 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **laranja Pera**, utilizando-se a **CLUE-DAD**. **Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 11**. Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido + * interferente, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + ° interferente, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....77

Figura 21: Cromatograma do extrato obtido pelo método QuEChERS para a amostra branco (livre da matriz e dos compostos de interesse), utilizando-se **CLUE-DAD**. **Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 11**.....78

Figura 22: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (para as matrizes de suco de laranja Pera e tangerina Murcote) utilizando **CLAE-DAD**.....81

Figura 23: Gráfico dos resíduos estatísticos determinados para o agrotóxico tiofanato metílico.....	82
Figura 24: Gráfico da razão entre a resposta do detector e a concentração versus o log da concentração obtido para a determinação da faixa linear de trabalho para o agrotóxico tiofanato metílico.....	83
Figura 25: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (para as matrizes de sucos de laranja Pera e tangerina Murcote) utilizando CL-EM-EM	88
Figura 26: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (suco de laranja Pera) utilizando CLUE-DAD	94
Figura 27: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de laranja Pera coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco fortificado em 100 µg L⁻¹ desta mesma amostra (B), utilizando-se CLAE-DAD. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 B . Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....	99
Figura 28: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de tangerina Murcote coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco fortificado em 100 µg L⁻¹ desta mesma amostra (B), utilizando-se CLAE-DAD. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 9 B . Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....	100

Figura 29: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma amostra de **laranja Pera** coletada no comércio de Campinas-SP e região, **fortificada em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** , utilizando-se **CL-EM-EM. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 10.** Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.....101

Figura 30: Cromatogramas do extrato de suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de **laranja Pera** coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco **fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** desta mesma amostra (B), utilizando-se **CLUE-DAD. Condições cromatográficas semelhantes às da Figura 11.** Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.....103

1- INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas cada vez mais eficientes. Neste sentido, o uso de agrotóxicos para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita tornou-se uma ferramenta essencial para garantir o crescimento e a qualidade da produção agrícola [1-4].

Atualmente existem mais de 800 compostos, pertencentes à cerca de 100 classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos de produtos comercializados como agrotóxicos no mundo todo [4-7]. Mas, o uso incorreto destes compostos pode contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos adversos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos [2, 8-10].

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos [11, 12]. No Brasil, que é detentor de um grande potencial agrícola e o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo [13], a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) [11, 14].

Dentre as espécies frutíferas cultivadas em solo brasileiro, a laranja é a mais importante, seja em área plantada ou colhida, quantidade produzida, valor de produção ou geração de empregos. Hoje, o Brasil é o primeiro produtor mundial de citros e o maior exportador de suco concentrado de laranja [15]. Para que o Brasil possa manter sua atividade produtora, consumidora e exportadora no setor, torna-se indispensável realizar um controle rigoroso para avaliação da possível contaminação por resíduos de agrotóxicos das principais variedades de citrus cultivadas no país.

Na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, geralmente são empregados métodos cromatográficos de análise, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Também têm sido desenvolvidas técnicas de análise de agrotóxicos em alimentos cada vez mais rápidas, seletivas e sensíveis devido à necessidade de se detectar simultaneamente um grande número de compostos em baixos

níveis de concentração (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$). Dentre elas, pode-se destacar a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e os métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas em série (EM-EM).

1.1 - A origem da laranja e a citricultura no Brasil

A laranjeira, assim como todas as plantas cítricas, é nativa da Ásia, de onde foi levada, na Idade Média, para o norte da África e daí, para o sul da Europa. Da Europa, foi trazida para as Américas na época dos descobrimentos, por volta de 1500 [16]. Atualmente, os pomares mais produtivos encontram-se nas regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se como grandes produtores de citrus o Brasil, Estados Unidos, Espanha, países do mediterrâneo, México, China e África do Sul [16].

As mudas e as técnicas de cultivo da laranja foram trazidas da Espanha para o Brasil pelos portugueses, entre 1530 e 1540, para suprir a necessidade de vitamina C das tripulações dizimadas pelo escorbuto na época do descobrimento e da colonização da América Latina [16]. Graças à excelente adaptação da laranja ao clima e solo brasileiros, por volta de 1800 surgiu no Brasil uma variedade particular de laranja reconhecida internacionalmente: a laranja Bahia (ou baiana) [16].

Após a proclamação da República em 1889, o principal produto agrícola do Brasil era o café, cuja produção encontrava-se concentrada principalmente no interior do estado de São Paulo. A laranja, neste período, era produzida na mesma região, mas apenas como cultura acessória. Mais tarde, com a crise do café, a citricultura foi ganhando um espaço maior, ocorrendo o início das exportações da laranja em 1910. Com o investimento de produtores no desenvolvimento de tecnologias de produção cítrica, a laranja se tornou um dos dez produtos mais importantes na exportação do país em 1939 [16].

Por isso, a produção brasileira de citrus encontra-se distribuída por todas as regiões do país, mas com uma notória concentração na região sudeste. Atualmente, a região sudeste é responsável por 84% da produção cítrica brasileira, especialmente em decorrência da produção de laranja, limão e tangerina do estado de São Paulo, que é responsável por 80% da produção nacional de laranja [15 - 18].

A citricultura no Brasil encontra-se, também, igualmente concentrada quanto à variedade e destino da produção. Há um predomínio da cultura de laranja Pera, típica de uso

industrial, já que a produção brasileira é orientada para o processamento de suco [15]. Esta configuração da cultura de citrus no Brasil é um reflexo das sucessivas geadas que ocorreram nos anos sessenta no sul da Flórida, principal região produtora de citrus dos Estados Unidos. As geadas ocasionaram uma grande demanda por suco de laranja naquele país, o que motivou a instalação de indústrias de suco concentrado de laranja no estado de São Paulo [15]. A exportação de suco de laranja industrializado continua crescendo até os dias de hoje, tendo aumentado, em média, 4,9% nos últimos dez anos em consequência de problemas climáticos (furacões) que ainda vêm assolando as lavouras da Flórida [19].

As tangerinas, assim como as laranjas, pertencem ao gênero ***Citrus*** e à família das ***Rutaceae*** e tiveram origem no continente asiático [20]. Existem também híbridos de tangerinas que podem ser originados de cruzamentos naturais ou artificiais, como os chamados tangores (cruzamento entre tangerinas e laranjas doces), dos quais alguns têm considerável importância comercial, como Temple e Murcote [20].

Do total de citrus produzidos no mundo, as laranjas doces perfazem 66%, as tangerinas 16%, os limões e limas ácidas 10,5% e os pomelos 6,5% [20]. Portanto, a tangerina e seus híbridos são o segundo grupo em importância comercial. O Brasil exporta, em média, 17 mil toneladas de tangerinas e seus híbridos por ano [21]. No estado de São Paulo, as tangerinas ocupam 3,2% das áreas de cultivo de citrus, sendo cultivadas apenas 4 variedades comerciais: Poncã, Cravo, Murcote e Mexerica do Rio. Dentre estas variedades de tangerina, o estado de São Paulo exporta apenas a Murcote, cuja produção tem crescido a uma taxa anual de 3,8% [22].

Atualmente, a União Européia e os Estados Unidos são os maiores importadores mundiais de suco de laranja e o Brasil continua sendo o maior exportador. Mais recentemente, o programa Brazilian Fruit, que faz a promoção de frutas brasileiras no mercado externo, elegeu como mercados prioritários os países asiáticos, países do leste europeu, países árabes e a Rússia, além dos países da América Latina [15]. Nos países asiáticos, o consumo de suco supera o de refrigerantes e estes países registram as maiores taxas de crescimento de renda per capita do mundo, especialmente a China. Os países do leste europeu foram recentemente integrados à União Européia sendo esperado um aumento na sua renda per capita e, conseqüentemente, um aumento no consumo de frutas e sucos. Já os países árabes são também considerados alvos das exportações brasileiras de frutas e

sucos devido ao não consumo de bebidas alcoólicas. Na Rússia, um país de dimensão continental, o crescimento das importações de suco de laranja concentrado tem superado o registrado para os demais tipos de sucos e os países da América Latina são parceiros tradicionais do Brasil no comércio de bens industrializados que ainda podem crescer muito no comércio de frutas e derivados, especialmente pela facilidade de distribuição [15].

O sistema agroindustrial da laranja é, sem dúvida, um caso de sucesso no Brasil, pois emprega diretamente mais de 400 mil pessoas, é a atividade principal de 322 municípios paulistas e 11 mineiros. Também atende a 50% da demanda e 75% das transações internacionais trazendo, anualmente, 1 bilhão de dólares em divisas para o Brasil, no centro de uma cadeia produtiva que gera PIB equivalente a 5 bilhões de dólares [16]. Segundo pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a safra brasileira de laranja em 2008 foi de 18,7 milhões de toneladas [22].

1.2 - O uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo

As práticas agrícolas modernas dependem, extensivamente, da aplicação de agrotóxicos durante o cultivo e após a colheita, na etapa de estocagem dos produtos agrícolas [23-25]. O uso de agrotóxicos é essencial para prevenir ou reduzir perdas na agricultura, melhorando, assim, a produção, e para que sejam obtidos produtos com qualidade, que satisfaçam os consumidores e garantam seu comércio [25].

A aplicação de agrotóxicos aumentou em 50% no mundo, desde 1950. Atualmente, a produção industrial de agrotóxicos é de $2,5 \times 10^9$ kg ao ano [4 - 7]. Porém, o uso incorreto destes compostos pode contaminar o meio ambiente e causar efeitos adversos à saúde dos seres vivos [2, 8-10].

Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição dos seres humanos aos agrotóxicos [3, 26, 27]. Um estudo realizado por Margni *et al.* [28] acerca do impacto do uso de agrotóxicos na saúde humana e nos ecossistemas confirma este dado, pois conclui que a ingestão de alimentos é uma fonte toxicológica de exposição cerca de 10^3 a 10^5 vezes maior que a ingestão de água ou a inalação pelos seres humanos.

Dependendo do nível de exposição do homem a estes contaminantes podem ocorrer efeitos adversos à sua saúde, como dores de cabeça, náusea, distúrbios endócrinos e até

câncer [9, 29]. Mesmo a exposição a pequenas quantidades de agrotóxicos pode causar efeitos adversos e irreparáveis à saúde humana, principalmente durante o estágio fetal e em crianças, que são as fases de maior vulnerabilidade do desenvolvimento do homem [30]. A maior concentração em que um agrotóxico pode estar presente nos alimentos sem causar prejuízo à saúde humana é denominada limite máximo de resíduos (LMR) [31, 32].

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm estabelecido LMR cada vez menores e criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos [11, 12]. No Brasil, que é o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo e responde pelo uso de 86% dos produtos na América Latina [13], a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) [11, 14].

O PARA tem como 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; proteger a credibilidade de exportadores perante seus clientes e melhorar ações contra o uso impróprio destes produtos [14, 33]. Entre 2002 e 2006 o PARA monitorou 92 princípios ativos de agrotóxicos em amostras de alface, banana, batata, cenoura, **laranja**, maçã, mamão, morango e tomate, tendo sido realizadas 561.200 análises de amostras coletadas em 16 diferentes estados brasileiros que integram o programa. Neste período, os dados do PARA apontaram um índice geral de 14% de irregularidades nas culturas analisadas [14, 34]. Em 2007 foram analisadas 1200 amostras, das quais 17% apresentaram irregularidades e em 2008, além das nove culturas já avaliadas, foram analisadas também, amostras de abacaxi, arroz, cebola, feijão, manga, pimentão, repolho e uva, sendo que os resultados apontaram principalmente o uso de agrotóxicos não autorizados para as culturas [35]. Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos pelo PARA entre 2002 e 2008 [35].

Tabela 1: Porcentagem de amostras contaminadas com resíduos de agrotóxicos não autorizados para cultura ou acima dos LMR obtidos pelo Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), realizado pela ANVISA entre os anos de 2002 e 2008 [35].

cultura	ano						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
alface	8,6	6,7	14,0	46,5	28,7	40,0	19,8
banana	6,5	2,2	3,6	3,7	N	4,3	1,0
batata	22,2	8,7	1,8	0	0	1,4	2,0
cenoura	0	0	19,5	11,3	N	9,9	30,4
laranja	1,4	0	4,9	4,7	0	6,0	14,9
mamão	19,5	37,7	2,5	0	N	17,2	17,3
maçã	4,0	3,7	5,0	3,1	5,3	2,9	3,9
morango	46,0	54,6	39,1	N	37,7	43,6	36,1
tomate	26,1	0	7,4	4,4	2,0	44,7	18,3

* N = análises não realizadas.

Os dados da Tabela 1, analisando-se os dois últimos anos, apontam para um crescimento no número de irregularidades para cinco das nove culturas estudadas, o que evidencia a necessidade de se desenvolver estratégias para a redução do nível de contaminação nos alimentos que chegam ao consumidor brasileiro [35]. Este aumento nas irregularidades também é evidente na cultura da laranja, a qual tem sofrido com a incidência de doenças, desde a década de 40 quando a “tristeza”, doença de origem espanhola causada por um vírus que provoca o definhamento progressivo das árvores, destruiu cerca de 80% dos pomares de citrus do Brasil [16].

O estado de São Paulo tem enfrentado sérios problemas fitossanitários. O cultivo de variedades de copa (Pera, especialmente; Valência, Natal e Hamilin) de estreita base genética em São Paulo, tem facilitado a rápida proliferação de pragas e doenças, fazendo com que os gastos com agrotóxicos representem a maior parte dos custos de produção nos pomares deste estado [15]. Atualmente, o principal desafio dos citricultores do estado de São Paulo é a erradicação do Cancro Cítrico, doença causada pela bactéria *Xantomonas axonopodis* pv. *citri* [16].

O Cancro Cítrico é uma doença originária da Ásia, que causa lesões nas frutas, folhas e ramos da laranjeira e que entrou no Brasil na década de 50, por meio de mudas trazidas

clandestinamente do Japão [16]. Para promover a erradicação desta doença e um maior controle sanitário nos pomares, o governo do estado de São Paulo criou, em 1977, o Fundecitrus (Fundo Paulista de Defesa da Citricultura), que é financiado pelos citricultores e indústrias do setor no estado. O Fundecitrus atua até hoje, com um orçamento 100% privado de mais de 40 milhões de reais, eventuais verbas obtidas junto ao governo Federal e através de parcerias com institutos de pesquisa e universidades do mundo todo para realização de pesquisas sobre a prevenção e o combate às pragas e as doenças no maior parque citrícula mundial [16].

1.3 - Os benefícios do consumo da laranja, da tangerina e dos sucos dessas frutas, e a importância dos seus empregos como matrizes

As frutas cítricas, como a laranja e a tangerina, possuem grande quantidade de água em sua composição e um teor calórico relativamente baixo. Estas frutas são ricas em vitamina C e uma importante fonte alimentar de ácido fólico, potássio e magnésio [36]. Apresentam coloração amarelo-alaranjada devido às apreciáveis quantidades de β -carotenos que possuem em sua composição [36].

As laranjas e as tangerinas apresentam quantidades consideráveis de fibras, que podem auxiliar na função intestinal. Porém, estas fibras encontram-se principalmente no bagaço e na casca destas frutas e estas partes geralmente são descartadas antes do consumo, também porque estas frutas são consumidas principalmente sob a forma de suco [36].

Porém, dentre os componentes das frutas cítricas, os que mais merecem destaque são aqueles com atividade antioxidante, como as vitaminas (em especial a vitamina C), os flavonóides e β -carotenos [25, 36, 37]. A atividade antioxidante destes compostos evita que o colesterol LDL (do inglês “low density lipoprotein”), também chamado “mau colesterol”, assuma a sua forma oxidada que tem a propriedade de se acumular no interior das artérias, ocasionando a arteriosclerose e podendo levar até à morte [36]. Assim, o consumo das frutas cítricas, em especial as laranjas e tangerinas, é de grande importância para a manutenção da saúde cardiovascular.

Na Tabela 2 encontram-se as composições da laranja, da tangerina e de seus respectivos sucos [38].

Tabela 2: Composição nutricional da laranja, da tangerina e dos respectivos sucos destas frutas (por 100 g de porção comestível) [38].

NUTRIENTES	laranja	tangerina	suco de laranja	suco de tangerina
água (g)	88,7	85,2	88,3	89,5
energia (kcal)	47	53	45	37
energia (kJ)	197	223	188	155
proteínas (g)	0,9	0,81	0,7	0,6
gorduras totais (g)	0,1	0,31	0,2	0,03
cinzas (g)	0,4	0,38	0,4	0,28
carboidratos (g)	11,7	13,3	10,4	9,6
fibras totais (g)	0,4	1,8	0,2	0,7
açúcares totais (g)	9,3	10,6	8,4	8,9
MINERAIS				
cálcio (mg)	40	37	11	11
ferro (mg)	0,1	0,15	0,2	0,3
magnésio (mg)	10	12	11	11
fósforo (mg)	14	20	17	10
potássio (mg)	181	166	200	133
sódio (mg)	0	2	1	5
zinco (mg)	0,07	0,07	0,05	0,51
cobre (mg)	0,04	0,04	0,04	0,03
manganês (mg)	0,02	0,04	0,01	0,03
selênio (µg)	0,5	0,1	0,1	0,4
VITAMINAS				
vitamina C (mg)	53,2	26,7	50	34,2
tiamina (mg)	0,09	0,06	0,09	0,08
riboflavina (mg)	0,04	0,04	0,03	0,03
niacina (mg)	0,28	0,38	0,4	0,44
ácido pantotênico (mg)	0,25	0,22	0,2	0,12
vitamina B-6 (mg)	0,06	0,08	0,04	0,04
folato total (µg)	30	16	30	5
ácido fólico (µg)	30	0	0	0

colina total (mg)	8,4	10,2	6,2	8,9
vitamina B-12 (µg)	0	0	0	0
vitamina A (µg)	11	34	10	43
retinol (µg)	0	0	0	0
β-caroteno (µg)	71	155	33	193
α-caroteno (µg)	11	101	6	133
β-criptoxantina (µg)	116	407	169	503
licopeno (µg)	0	0	0	0
luteína + zeaxantina (µg)	129	138	115	163
vitamina E (mg)	0,18	0,20	0,04	0,1
vitamina K (µg)	0	0	0,1	0
LIPÍDIOS				
ácidos graxos saturados totais (g)	0,02	0,04	0,02	0,03
ácidos graxos monoinsaturados totais (g)	0,02	0,06	0,04	0,05
ácidos graxo poliinsaturados totais (g)	0,02	0,06	0,04	0,05
colesterol (mg)	0	0	0	0
AMINOÁCIDOS				
triptofam (g)	0,009	0,002	0,002	0,06
treonina (g)	0,015	0,016	0,008	0,010
isoleucina (g)	0,025	0,017	0,008	0,017
leucina (g)	0,023	0,028	0,013	0,015
lisina (g)	0,047	0,032	0,009	0,031
metionina (g)	0,020	0,002	0,003	0,013
cistina (g)	0,010	0,002	0,005	0,006
fenilalanina (g)	0,031	0,018	0,009	0,020
tirosina (g)	0,016	0,015	0,004	0,010
valina (g)	0,040	0,021	0,011	0,026
arginina (g)	0,065	0,068	0,047	0,043
histidina (g)	0,018	0,011	0,003	0,011
alanina (g)	0,050	0,028	0,015	0,033
ácido aspártico (g)	0,114	0,129	0,075	0,074
ácido glutâmico (g)	0,094	0,061	0,033	0,062
glicina (g)	0,094	0,019	0,009	0,062
prolina (g)	0,046	0,074	0,044	0,030
serina (g)	0,032	0,033	0,013	0,021

A degradação dos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos se dá por mecanismos oxidativos [25, 37]. Mas, em alimentos ricos em compostos antioxidantes, como a laranja, a tangerina e seus sucos, a oxidação dos agrotóxicos pode se tornar mais lenta, aumentando a persistência de resíduos desses compostos nestes alimentos [25, 37].

Devido a maior persistência de resíduos de agrotóxicos na laranja, na tangerina e no suco destas frutas, o consumo desses alimentos pode ser uma fonte potencial de efeitos adversos à saúde dos seres humanos. Esta constatação torna-se ainda mais agravante, porque o consumo de suco de frutas é maior entre as crianças [25] que são suscetíveis a problemas de saúde quando expostas à concentrações de resíduos de agrotóxicos bem menores que aquelas capazes de ocasionar prejuízos aos seres humanos em idade adulta [30]. Estes fatos, aliados à importância da produção e da exportação de citrus no Brasil, em especial no estado de São Paulo, permitem considerar o suco de laranja e de tangerina como matrizes de grande interesse para o desenvolvimento de métodos para a determinação da presença de resíduos de agrotóxicos.

1.4 - Métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos compreendem, basicamente, três etapas: A primeira etapa consiste na amostragem, que deve ser representativa de um todo, a segunda é o preparo da amostra, isto é, a extração do analito da matriz, remoção de interferentes (“*clean-up*”) e concentração; a terceira etapa trata-se da separação e determinação dos analitos [5, 39].

1.4.1- Técnicas de preparo de amostras

Uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizada é a extração líquido-líquido (ELL) [6, 24, 26, 30, 39-43]. A ELL é uma técnica clássica de extração, baseada na transferência dos analitos presentes em uma matriz líquida para outra fase líquida imiscível (solvente orgânico menos polar ou apolar), de acordo com as diferenças de solubilidade dos analitos nestas duas fases [44]. Esta técnica de extração apresenta alguns problemas como a possibilidade de formação de emulsões, o consumo de grandes quantidades de amostra e

solventes, muitas vezes não é capaz de eliminar os interferentes presentes em matrizes complexas, como alimentos, além de ser relativamente lenta e gerar um grande volume de descarte [10, 45]. Por isso, há uma busca pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra mais rápidos, que consumam menores quantidades de solventes tóxicos e que permitam o seu acoplamento “*on-line*” aos sistemas de análise.

Dentre as técnicas de extração desenvolvidas como alternativa à ELL destaca-se a extração em fase sólida (EFS) [10, 25, 36, 40, 46-52] que é uma técnica bastante empregada, muitas vezes em conjunto com a ELL como etapa de “*clean-up*” [3, 12, 53-56]. A EFS é baseada na adsorção dos analitos, inicialmente presentes em uma matriz líquida, em cartuchos contendo um sorvente sólido. Os analitos são, posteriormente, eluídos do cartucho com um sorvente apropriado. Os mecanismos de retenção da EFS são semelhantes aos da cromatografia em coluna e os sorventes utilizados são os mesmos empregados na cromatografia líquida, sendo o mais popular o grupo octadecil ligado à sílica (C18) [44].

Além da EFS pode-se destacar como avanços em técnicas de preparo de amostras a extração por fluido supercrítico (EFSC) [57, 58], extração por líquido pressurizado (ELP) [59, 60], extração assistida por micro-ondas (EAM) [42, 61], extração líquido-líquido à temperatura sub-zero (ELL-TSZ) [62, 63], extração por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) [64, 65], microextração em fase sólida (MEFS) [66-69], microextração em fase líquida [10], extração por sorção em barra de agitação (ESBA) [70] e QuEChERS (do inglês “quick, easy, cheap, effective, rugged and safe”) [4, 5, 23, 32, 71-74].

Dentre estas técnicas de preparo de amostra merecem destaque a ELL-TSZ e o método QuEChERS. Na ELL-TSZ, a etapa de partição da ELL é realizada em temperatura inferior a 0 °C, de maneira que a fase aquosa se encontrará no estado sólido, o que, segundo os autores, reduz consideravelmente a quantidade de interferentes da matriz que passam para a fase orgânica [63]. Já o método QuEChERS tem sido amplamente empregado na extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos, principalmente por ser capaz de extrair agrotóxicos altamente polares, bem como aqueles de elevada acidez ou basicidade, de matrizes complexas, utilizando pequenas quantidades de solventes, de forma mais rápida, robusta e segura que os outras técnicas de preparo de amostras [32, 71].

1.4.1.a - 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.* [74]. 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 tem sido publicados empregando sua forma original ou com variações [4, 5, 23, 32, 71-73].

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 [75]. 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, comercializado pela Varian como Bond Elut PSA [76]. Este sorvente tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos [75]. O extrato final, em acetonitrila, obtido pelo método QuEChERS, pode ser diretamente analisado empregando-se técnicas cromatográficas [32].

O método QuEChERS foi desenvolvido para análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes com baixo teor de gordura. Porém, quando realizadas algumas modificações, ele pode ser empregado na análise de matrizes com elevado teor de gorduras, assim como à matrizes que possuem grandes quantidades de pigmentos [75]. As gorduras podem ser removidas do extrato utilizando-se sorventes de fase reversa, como C8 e C18 à base de sílica, na etapa de EFS-D [74]. Já para matrizes com elevadas concentrações de carotenóides ou clorofila, deve-se utilizar uma mistura de PSA e carbono grafitizado na etapa de EFS-D [75]. É possível, também, variar a polaridade do solvente de extração empregado, uma vez que no método QuEChERS a acetonitrila pode ser substituída por acetona ou acetado de etila [73].

O método QuEChERS foi inicialmente desenvolvido para ser utilizado com as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas em série, isto é, CG-EM-EM e CL-

EM-EM [74], mas neste trabalho propôs-se utilizá-lo com a CLAE com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), com a CLUE-DAD, além de empregá-lo com a CL-EM-EM.

1.4.2 - Uso de métodos cromatográficos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Na etapa de identificação, separação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos em alimentos, geralmente são empregados métodos cromatográficos de análise. Historicamente, a cromatografia gasosa (CG) foi a primeira técnica a ser empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos devido ao elevado grau de desenvolvimento e especificidade de seus detectores [4, 77], como o detector por captura de elétrons [12, 78], de nitrogênio-fósforo [25, 67, 73] e o fotométrico de chama [10]. Porém, nos últimos anos tem aumentado significativamente o número de agrotóxicos registrados que possuem baixa estabilidade térmica, o que inviabiliza o emprego direto da CG ou limita a sua aplicação ao uso de técnicas de derivatização do analito [26, 46].

Como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) trata-se de uma técnica mais versátil, neste sentido [79], têm sido desenvolvidos vários métodos de análise de agrotóxicos em alimentos que empregam a CLAE com detecção por absorção no UV [41], por fluorescência [66] ou por arranjo de diodos (DAD) [56, 64], que se trata de um método de detecção também qualitativo, porém, de aplicação restrita a amostras relativamente limpas, uma vez que muitos dos interferentes presentes na matriz absorvem na mesma região do UV em que absorvem o agrotóxicos [80].

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 [71]. O uso de capilares de diâmetro interno estreito em CG [71], assim como o uso de colunas recheadas com partículas de tamanho inferior a 2 µm na chamada cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) [4, 7, 26, 39, 47, 81, 82] são avanços recentes que podem ser destacados porque geram aumento na eficiência de separação, melhoram a resolução, diminuem o tempo de análise e aumentam a detectabilidade. Outro avanço que merece destaque é o emprego da detecção por espectrometria de massas (EM) [3, 46, 54, 55, 67, 69, 80] e por espectrometria de massas

em série (EM-EM) [4, 6, 7, 23, 26, 30, 32, 37, 39, 42, 43, 48, 52, 53, 65, 72, 83] que gerou um aumento significativo na seletividade e detectabilidade dos métodos cromatográficos [6, 32], possibilitando a análise de um grande número de agrotóxicos simultaneamente e a detecção e confirmação desses compostos em concentrações muito pequenas.

1.4.2.a - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série e sua utilização na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos [84]

O acoplamento do cromatógrafo a líquido com o espectrômetro de massas possibilita combinar as vantagens da técnica cromatográfica (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, da massa molar e aumento adicional da seletividade e detectabilidade). Mas, para que o acoplamento seja possível, idealmente é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perdas de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas.

Porém, quando se utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. As vazões utilizadas em CLAE são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em CL-EM é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (FM).

Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por CLAE são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura de maneira que não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na EM. Desta forma, para o acoplamento da CLAE à EM foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas.

Nas interfaces que foram desenvolvidas, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis. Por esse motivo, algumas dessas interfaces são simplesmente chamadas de fontes de ionização. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são ionização por eletronebulização (*"electrospray ionization"*) - ESI, ionização química a pressão atmosférica (*"atmospheric pressure chemical ionization"*) - APCI e, mais recentemente, a fotoionização a pressão atmosférica (*"atmospheric pressure photoionization"*) – APP. Neste trabalho, será dada maior ênfase à ESI, que foi a fonte de ionização utilizada no método proposto para a determinação de resíduos de agrotóxicos em laranja e tangerina.

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da CLAE) 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 N₂) 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 espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização.

Graças ao modo de obtenção dos íons nesta fonte de ionização, ela pode ser utilizada na análise de compostos sensíveis à temperatura e com elevadas massas molares. 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. Assim, como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons, o intervalo de "massa" de aplicabilidade do instrumento pode ser expandido por um fator equivalente ao número de cargas do íon,

isto é, um íon com m/z 1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20 000 Da.

Como a ESI é dependente da concentração do analito no eluente da coluna cromatográfica, o uso de divisores de fluxo, para diminuir a vazão do eluente para o interior da interface, não afeta, de forma notável, sua detectabilidade. Há a necessidade de uso de divisores de fluxo somente quando a vazão utilizada no cromatógrafo ultrapassar 1 mL min⁻¹ ou 0,5 mL min⁻¹ no caso de FM com elevada porcentagem de água em sua composição.

O modo de ionização que ocorre na ESI é denominado ionização suave, porque 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 [53]. Nesta fonte de ionização pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na⁺, K⁺, NH₄⁺, HCOO⁻ e CH₃COO⁻. A formação de adutos pode ser controlada através da adição de modificadores à FM que disponibilizem estas espécies iônicas.

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 (EM₁ e EM₂), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. Esta técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter.

Os analisadores de massas mais comumente empregados na EM-EM são o triplo quadrupolo, quadrupolo-analisador de tempo de voo (*"time-of-flight"*) - QToF, *"Ion-Trap"* e quadrupolo-*Ion-Trap* (Qtrap) [32, 83]. Para realização deste trabalho foi utilizado um triplo quadrupolo, o qual é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas como cela de colisão e como direcionador

dos íons ao terceiro quadrupolo. Na cela de colisão ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (*“collision-induced dissociation”*) – CID.

Na CID, 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 CID é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada.

Além de informações estruturais, CID pode melhorar a detectabilidade do método quando usada para gerar um íon característico de uma molécula e assim realizar sua detecção a partir deste íon fragmento, quando a molécula do analito de interesse encontra-se em presença de outras moléculas de mesma massa molar nominal.

Na EM-EM podem ser utilizadas várias técnicas de varredura para se realizar a análise, tais como a varredura dos íons produto (*“product-ion scan”*), varredura dos íons precursores (*“precursor-ion scan”*), varredura da contante perda de íons neutros (*“constant-neutral-loss scan”*) e o monitoramento seletivo de reação (*“selected-reaction monitoring”*). Neste trabalho, utilizou-se o monitoramento seletivo de reações - MSR, no qual se realizam o monitoramento da fragmentação de um íon precursor selecionado no triplo quadrupolo por EM₁ aos seus correspondentes íons produto que atravessam EM₂. Porém, como foi realizado o monitoramento da fragmentação de vários íons precursores (correspondentes a cada um dos agrotóxicos analisados), o modo de varredura empregado é mais adequadamente denominado de monitoramento de reações múltiplas (*“multiple-reaction monitoring”*) – MRM.

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a EM obtém-se o chamado 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.

Têm sido publicados, recentemente, vários trabalhos em que a CL-EM-EM é empregada junto a diferentes técnicas de preparo de amostras na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos [6, 23, 30, 32, 37, 42, 43, 52, 53, 73].

Kmellár *et al.* [23] desenvolveram um método empregando-se a CL-EM-EM para a determinação de resíduos de 160 agrotóxicos em vegetais divididos em matrizes com grande concentração de água, açúcar e ácido, para verificar a influência da matriz nos valores de recuperação e na ionização dos analitos. Os autores empregaram o método QuEChERS para o preparo das amostras e um cromatógrafo a líquido acoplado a um triplo quadrupolo com ESI, no modo positivo, para a análise dos extratos obtidos.

Para a calibração, os autores utilizaram o método de padronização externa com superposição de matriz empregando-se o tomate para as matrizes com elevado teor de água, a pera para as matrizes com elevado teor de açúcar e a laranja para aquelas com elevada concentração de ácido. A linearidade foi estudada no intervalo de 5 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dez dos agrotóxicos avaliados apresentaram baixa intensidade de sinal, problemas de linearidade ou detectabilidade. Foram observados efeitos de matriz brandos ($< 20\%$), médios ($20\text{-}50\%$) e fortes ($> 50\%$) para 69%, 20% e 11% dos compostos estudados, respectivamente. Mais de 90% dos agrotóxicos estudados apresentaram limites de detecção menores ou iguais a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foram obtidos coeficientes de variação (CV) maiores que 20 % em poucos casos [23].

Scordino *et al.* [30] realizaram a determinação de resíduos do agrotóxico guazatina em laranjas empregando-se a ELL no preparo das amostras e um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro “*Ion-Trap*” com interface por ESI, operando no modo positivo e varredura por MSR em EM-EM. Foram obtidas recuperações de 81%, 90% e 104% nos

níveis de fortificação de 10, 35 e 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, com CV de 2% a 8%, limites de detecção inferiores a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limites de quantificação menores ou iguais a 6,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Payá *et al.* [32] realizaram a determinação de resíduos de 43 agrotóxicos em farinha de trigo, vinho tinto, uvas, uvas passas, laranja, limão e pepino empregando-se o método QuEChERS no preparo das amostras e CG-EM-EM e CL-EM-EM na etapa de quantificação, sendo que para CL-EM-EM foi empregado um Qtrap com interface ESI operando no modo positivo e varredura por MRM. Os ensaios de recuperação foram realizados nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CG-EM-EM e 1 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para LC-EM-EM tendo sido obtidas recuperações entre 70% e 110% com CV inferiores a 10%.

Pico e Kozmutza [37] utilizaram a LC-EM-EM para determinar resíduos dos agrotóxicos aldicarbe, demetom-S-metil, fenamifós e metiocarbe em suco de uva e avaliar o efeito dos oxidantes naturais presentes nesta matriz na velocidade de degradação dos agrotóxicos aos seus respectivos produtos de degradação sulfóxido e sulfona. Para isto, os autores empregaram a EFS utilizando cartuchos C18 e diclorometano na etapa de eluição para o preparo das amostras, CL-EM-EM, na qual foi utilizado um triplo quadrupolo, interface *Z-spray* e varredura MRM, na etapa de quantificação.

Foram obtidas recuperações superiores a 80% para todos os agrotóxicos estudados, com CV inferiores a 15%, num intervalo linear de concentração de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação entre 0,1 e 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a degradação dos agrotóxicos é mais lenta quando estão presentes no suco de frutas do que quando estão em meio aquoso. Foram avaliados vários sucos de frutas disponíveis comercialmente e, em algumas dessas amostras foram encontrados os agrotóxicos metiocarbe, fenamifós e demetom-S-metil em baixas concentrações [37].

Pan *et al.* [42] realizaram a determinação de resíduos dos agrotóxicos monocrotofós, dimetoato, imidacloprido, carbendazim, carbaril e simazina em hortaliças de folhas empregando a EAM no preparo das amostras e um triplo quadrupolo, com interface ESI operando no modo positivo e varredura MRM na etapa de quantificação por CL-EM-EM. Foram obtidas recuperações maiores que 83% e limites de quantificação menores que 1,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os seis agrotóxicos estudados. Os autores encontraram resíduos de carbendazim em amostras de alface e mostarda, carabaril em espinafre e monocrotofós em couve-flor, comercializadas na China.

Ticha *et al.* [43] determinaram variações na concentração de resíduos de 21 agrotóxicos em maçãs, durante o período de estocagem destas frutas em meio resfriado, empregando-se a MEFS para o preparo das amostras que foram analisadas por CG-EM e a ELL com acetonitrila para o preparo das amostras que foram analisadas por CL-EM-EM. O detector utilizado na CL-EM-EM foi um triplo quadrupolo com interface ESI, operando no modo positivo e varredura por MRM. Segundo os autores, verificou-se uma diminuição sucessiva da concentração dos resíduos de agrotóxicos nas maçãs, durante o período de estocagem, sendo que, após 5 meses, somente os agrotóxicos dodim e fosalone foram detectados. Porém, nenhum dos agrotóxicos estudados foi encontrado em concentrações acima dos LMR nas maçãs durante a etapa de estocagem.

Durden [52] utilizou a CL-EM-EM com interface ESI nos modos positivo e negativo para determinar resíduos de abamectina, doramectina, emamectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina e selamectina em leite. Os modos de ionização positivo e negativo foram utilizados porque os agrotóxicos abamectina, doramectina e ivermectina contêm somente átomos de C, H e O em sua estrutura, sendo esperado que se ionizem apenas no modo negativo, e os demais agrotóxicos estudados apresentam em sua estrutura átomos de nitrogênio, de maneira que são ionizados preferencialmente no modo positivo. O espectrômetro de massa utilizado foi um triplo quadrupolo e a varredura empregada foi a MRM.

Segundo o autor, os compostos analisados apresentaram sinais mais intensos quando se utilizou um tampão de ácido fórmico/formiato de amônio e acetonitrila como FM para que a ionização ocorresse no modo positivo, num intervalo linear de 0,5 a 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, os sinais obtidos no modo positivo foram mais largos que os obtidos no modo negativo e, conseqüentemente, levaram a obtenção de limites de detecção menores. Desta maneira, o autor verificou que, no modo negativo foram obtidas respostas mais lineares e resultados mais consistentes [52].

1.4.2.b - Cromatografia líquida de ultra eficiência e sua utilização na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos

A necessidade de se realizar análises cada vez mais rápidas levou ao desenvolvimento da chamada cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), a qual se baseia nos mesmos princípios da CLAE, porém utiliza fases estacionárias (FE) com partículas menores que 2 μm e altas velocidade lineares de FM, que aumentam as resoluções e a detectabilidade e diminuem o tempo de análise obtidos com esta técnica em comparação aos obtidos empregando-se a CLAE [85-92].

O emprego de FE com partículas menores que 2 μm faz com que seja necessário utilizar altas pressões no sistema cromatográfico, da ordem de 100 MPa (15000 psi) [93, 94]. Portanto, foi necessário o desenvolvimento de bombas, injetores e detectores capazes de operar nestas condições, já que os sistemas cromatográficos convencionais não suportam pressões dessa ordem de grandeza.

Desta maneira, além de ser capaz de trabalhar a altas pressões (em torno de 100 MPa), os sistemas de CLUE devem possuir volumes internos muito menores que os da CLAE (conexões, cela do detector, alça de amostragem, bombas), detectores com celas que não gerem dispersão da amostra e com altas taxas de aquisição, melhores sistemas de controle e aquisição de dados, colunas resistentes às altas pressões e com baixo volume morto, e injetores com volumes da ordem de 0,1 à 50 μL [86, 87].

O primeiro equipamento comercial desenvolvido e adaptado para operar nas condições necessárias à CLUE foi introduzido em 2004 pela Waters Corporation, denominado *AcquityTM ultra performance chromatography system* (UPLCTM) [86, 87]. Este equipamento é capaz de operar em pressões acima de 100 MPa (15000 psi). Atualmente, estão disponíveis no mercado instrumentos de CLUE produzidos por outros fabricantes, como o *Xtrem LC (X-LC)* da Jasco e o *1200 Series Rapid Resolution LC system* da Agilent [86, 87, 94].

O equipamento de CLUE possui um sistema binário de solventes, com duas bombas individuais em série para propiciar gradientes a altas pressões. Nas saídas das bombas, o filtro e o misturador (50 μL) estão acoplados em um mesmo dispositivo, para reduzir o volume do sistema, resultando num volume total do sistema de bombeamento de,

aproximadamente, 150 μL . Nesta configuração, o sistema de bombeamento de CLUE é capaz de impulsionar a FM de forma suave e reprodutível sob as altas pressões requeridas e, graças ao seu volume reduzido, o tempo de residência da FM neste sistema é menor [86, 87].

Para proteger a entrada da coluna das flutuações resultantes do emprego das altas pressões, a injeção da amostra em CLUE é feita automaticamente e em um curto intervalo de tempo, geralmente da ordem de 60 s, quando são realizadas duas etapas de lavagem do injetor. O processo de lavagem da agulha do injetor é realizado em duas etapas, pois são empregados dois solventes de polaridades diferentes para evitar o arraste da amostra injetada em análise anterior (efeito de memória), aumentando-se, assim, a detectabilidade [85, 87, 95].

A agulha empregada no sistema de injeção de CLUE é do tipo *needle-in-needle*, isto é, uma agulha dentro de outra agulha. A agulha interna é de PEEK (poliéter éter cetona) e a externa é de aço inoxidável, sendo que a externa é usada para perfurar o septo e a interna para sugar a amostra. Este tipo de agulha anula o efeito de memória, pois a adsorção da amostra no PEEK é menor que no aço inoxidável, além de reduzir problemas com entupimento e diminuir a dispersão da amostra dentro da agulha [85, 87].

Na CLUE são utilizadas colunas cromatográficas de diâmetro interno de 1,0 a 2,1 mm para FE com partículas menores que 2 μm , enquanto as colunas convencionais utilizadas em CLAE possuem diâmetros internos de 3,0 a 4,6 mm para FE com partículas de 3 a 5 μm . O uso de colunas com menores diâmetros internos foi necessário para minimizar o efeito do aquecimento da FM que ocorre quando são usadas altas pressões. Este efeito pode gerar uma vazão não uniforme da FM e, conseqüentemente, separações irreprodutíveis [85, 87].

Existem várias colunas desenvolvidas para CLUE disponíveis comercialmente, como a AcquityTM UPLC BEH, Waters; Zorbax, Agilent; Platinum HPLC, Altech; Pathfinder, Shimadzu; entre outras. Mas apenas a coluna AcquityTM UPLC BEH é a que preenche todos os requisitos necessários para ser empregada na condição de máximo desempenho da CLUE [82]. Isto, porque, nestas colunas são utilizadas partículas híbridas (orgânicas e inorgânicas) que são mais resistentes mecanicamente que as partículas de sílica pura empregadas nas demais colunas desenvolvidas para CLUE. Estas partículas híbridas são resistentes em uma extensa faixa de pH (de 1 a 12), geram picos com boa simetria,

resolução e colunas que fornecem altas eficiências, uma vez que estas partículas são obtidas em uma distribuição estreita de tamanho, o que gera um leito cromatográfico mais homogêneo [82, 85-87, 96]. Neste trabalho, empregou-se uma coluna Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm de diâmetro de partícula), na qual a FE é capeada e as cadeias alquil encontram-se ligadas à superfície das partículas, o que garante a esta FE uma maior estabilidade hidrolítica [96].

A detectabilidade de um sistema CLUE é cerca de 2 a 3 vezes maior que a de um sistema CLAE, uma vez que a largura a meia altura dos picos cromatográficos em CLUE é menor que 1 s. Desta maneira, a constante de tempo do detector deve ser suficientemente rápida (menor ou igual a 100 ms), as taxas de amostragem e aquisição de dados devem ser altas (menores que 20 Hz e de 20 a 40 pontos, respectivamente) para adquirir dados suficientes em um curto espaço de tempo [85-87]. Os detectores utilizados em CLUE são espectrômetros de massas e detectores ópticos (UV-VIS e arranjo de diodos). Os detectores ópticos utilizados em CLUE possuem celas com pequeno volume e longo caminho ótico (aproximadamente 500 nL e 10 mm, respectivamente) para haver uma baixa dispersão da amostra, garantindo, assim, a manutenção da concentração do analito e do sinal, a fim de se obter alta detectabilidade [85-87].

É possível realizar a transferência de um método de separação desenvolvido utilizando-se a CLAE para um sistema de CLUE, desde que a FE empregada em ambos os métodos sejam similares e sejam otimizados alguns fatores que dependem do modo de eluição empregado no método desenvolvido. Se o modo de eluição é o isocrático, os parâmetros a serem otimizados são o volume de injeção e a vazão da FM. Se o método utiliza eluição por gradiente, os parâmetros que devem ser otimizados são o volume de injeção, a vazão da FM, o tempo da etapa isocrática do gradiente e o tempo do gradiente, sendo mantidas constantes as composições inicial e final do gradiente empregado em ambos os métodos. Esta transferência de método pode ser realizada utilizando softwares disponíveis na internet como o HPLC calculator v. 2.1 [97] ou softwares fornecidos pelos fabricantes dos sistemas CLUE, como o Acquity Column Selector, Waters; o qual foi empregado para a transferência do método de CLAE, utilizado neste trabalho, para o sistema de CLUE.

Recentemente, muitos trabalhos têm sido publicados empregando-se a CLUE na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos [4, 7, 26, 39, 47, 81].

Picó *et al.* [7] utilizaram a CLUE com detecção por EM e EM-EM, empregando-se um QToF, para a determinação de resíduos dos agrotóxicos carbendazim, imazalil e etoxiquim em peras. Os autores utilizaram colunas recheadas com a FE C18 com partículas de 1,7 μm , no sistema CLUE-QToF, e um procedimento de ELL no qual o acetato de etila foi empregado. As técnicas de detecção por EM e EM-EM foram comparadas utilizando-se os resultados obtidos para o agrotóxico imazalil, que mostraram que não foram encontradas diferenças significativas entre as técnicas.

Em outro trabalho semelhante realizado por Picó *et al.* [81] a CLUE-QToF foi empregada na determinação de amitraz e seus produtos de degradação em peras, utilizando-se o mesmo tipo de coluna e o mesmo procedimento de preparo de amostra descrito no trabalho anterior [7]. Foram obtidas recuperações entre 83% e 101%, com coeficientes de variação entre 9 e 19%, e limites de detecção entre 5 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Frenich *et al.* [39] utilizaram a CLUE-EM-EM para a determinação de resíduos de 53 agrotóxicos em pepino, laranja, morango e olivas. Estas matrizes, bastante distintas, foram escolhidas para que fosse possível avaliar o seu efeito nos valores de recuperação e na precisão. O método QuEChERS foi utilizado no preparo das amostras, para a detecção foi empregado um triplo quadrupolo e no sistema de CLUE foi utilizada uma coluna com FE C18 com partículas de 1,7 μm . Foram obtidas recuperações entre 70% e 109% com CV inferiores a 20% para todos os agrotóxicos, nas quatro matrizes analisadas.

O método desenvolvido foi aplicado na análise de mais de 200 amostras de vegetais de matrizes semelhantes às empregadas no desenvolvimento do método e o agrotóxico encontrado com maior frequência foi o imidacloprido, em concentrações entre 0,01 e 1,00 mg kg^{-1} . Os autores verificaram que o alto poder de resolução da CLUE, minimiza o tempo de análise, de maneira que, quando combinada com o método QuEChERS, que é um método de preparo de amostra relativamente rápido e fácil de executar, resultou em um método rápido e adequado a realização de análises rotineiras de determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas [39].

Kovalczuk *et al.* [4] desenvolveram um método rápido baseado na CLUE-EM-EM utilizando um triplo quadrupolo para quantificar e identificar, simultaneamente, resíduos de 64

agrotóxicos e seus metabólitos tóxicos em extratos de frutas obtidos pelo método QuEChERS. O tempo total da análise por CLUE-EM-EM foi de 8 min e mais 2 min para o reequilíbrio da coluna às condições iniciais. Foram obtidos coeficientes de variação entre 1,5% e 13% para repetibilidade, quando analisadas amostras fortificadas em $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, e limites de quantificação menores que $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Graças aos baixos limites de quantificação obtidos, o método abrangeu os LMR determinados pela União Européia para várias combinações agrotóxico/fruta, inclusive para os LMR determinados para alimentos de bebês.

1.5 - Validação de métodos analíticos

Para garantir que um novo método analítico é capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. As agências reguladoras do Brasil e de outros países têm estabelecido documentos oficiais que contêm as diretrizes a serem adotadas no processo de validação [98-103] que possibilitem a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado.

As variáveis utilizadas na validação de métodos são conhecidas como parâmetros analíticos de validação e algumas vezes como figuras analíticas de mérito. São elas: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez [104, 105].

1.5.1- Parâmetros de desempenho analítico

1.5.1.a - 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 das dos outros [99]. 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 [104, 105].

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

(A) comparando-se a matriz isenta dos agrotóxicos com a matriz adicionada com os padrões dos agrotóxicos para verificar a existência de coeluição destes compostos junto a interferentes da matriz;

(B) 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 e, no caso da espectrometria de massas em série, é possível selecionar as transições MRM entre os íons dos analitos e seus íons fragmentos específicos [104].

1.5.1.b - Linearidade e faixa linear

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração [99].

A faixa linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio [99].

A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico) e a massa ou concentração da substância a ser quantificada [104]. Essa correlação pode ser expressa matematicamente como uma equação de reta denominada curva analítica. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear [104]. A equação de reta que descreve uma curva analítica pode ser expressa pela equação I.

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

onde,

y é a resposta medida (altura ou área do pico)

x é a concentração do analito

a é o coeficiente angular (inclinação da curva)

b é o coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

A partir da regressão linear, além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados [104]. A ANVISA [100] recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 e o INMETRO [99], valores acima de 0,90.

As curvas analíticas podem ser construídas utilizando-se os seguintes métodos:

(A) *Padronização Externa*: compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão;

(B) *Padronização Interna*: consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado de padrão interno;

(C) *Adição Padrão*: é realizada adicionando-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada às quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo [104].

Tanto o método de padronização externa quanto o de padronização interna possibilitam que as curvas analíticas sejam construídas com *superposição da matriz*, ou seja, pela adição do padrão da substância de interesse, em diversas concentrações, em uma matriz similar à amostra e isenta dessa substância, denominada amostra testemunha, relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões para a construção da curva. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes no sinal dos analitos. A interferência da matriz pode ser determinada sobrepondo-se as curvas obtidas pela padronização interna ou externa com e sem superposição da matriz. A obtenção de retas paralelas indica que a matriz não interfere no sinal do analito, mas se as retas se cruzarem, a matriz está interferindo nas determinações e torna-se necessário realizar a quantificação usando o método da superposição da matriz [104].

Outra forma de se avaliar a linearidade da curva analítica é por meio do cálculo dos resíduos estatísticos, isto é, medidas de quanto as áreas teóricas se afastam das áreas experimentais. Para isso, calculam-se as diferenças entre os valores teóricos e experimentais (resíduos estatísticos) e constrói-se um gráfico dos resíduos estatísticos

versus concentração teórica. Para validar a curva analítica os resíduos estatísticos devem estar distribuídos de forma aleatória entre valores positivos e negativos, não apresentando nenhuma tendência [105, 106].

Uma maneira alternativa de estabelecer a linearidade é plotando-se um gráfico da razão entre a resposta do detector e a concentração versus o log da concentração. A linha obtida deve ser horizontal em toda a faixa de concentração avaliada, com desvios positivos e negativos para baixas e altas concentrações, respectivamente. Traçando-se duas linhas paralelas a 95 e 105% da linha obtida, os pontos de intersecção delimitam a faixa linear do método [104, 105].

1.5.1.c - Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [99]. A precisão é avaliada usualmente pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra [104, 105].

O s e o CV podem ser obtidos utilizando-se as equações II e III, respectivamente.

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

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

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

A precisão é normalmente determinada para condições específicas de medição, de forma que é geralmente expressa em termos de:

(A) *Repetitividade*: 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 [99]. Segundo o INMETRO, para se determinar a repetitividade de um método é necessário realizar sete ou mais repetições para o cálculo da *CV (%)* [99]. Segundo a ICH [102] e a ANVISA [100], para o cálculo da *CV (%)* são necessárias nove repetições (três níveis, três repetições em cada um).

(B) *Precisão Intermediária*: Refere-se à precisão avaliada sobre a 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 [99]. O número de ensaios necessários para o cálculo da *CV (%)*, segundo a ICH [102] e a ANVISA [100], são os mesmos recomendados para a repetitividade.

(C) *Reprodutibilidade*: grau de concordância entre medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição, como mudança de laboratórios, operadores e equipamentos [99]. A reprodutibilidade não é avaliada em validações rotineiras realizadas em um único laboratório [99, 104], pois a sua avaliação só é requerida para procedimentos analíticos que serão enquadrados, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc. [104].

1.5.1.d - 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 [99].

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são:

(A) *Materiais de Referência Certificados*: são materiais acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os valores da média e da estimativa do desvio padrão obtidos pelo laboratório para uma série de replicatas da mesma amostra padrão devem ser

comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método [104, 105].

(B) *Comparação de Métodos*: consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência [104].

(C) *Ensaio de Recuperação*: 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 [98]. 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 [102] e a ANVISA [100] é necessário um mínimo de nove determinações, envolvendo um mínimo de três níveis de concentração para a determinação da exatidão. A GARP [103] recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação.

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é de 80 a 120%, com precisão de $\pm 20\%$ [103]. Mas, dependendo da complexidade da amostra, esta faixa pode ser de 70 a 130% com precisão de $\pm 15\%$ [107].

A recuperação pode ser calculada utilizando-se a equação IV.

$$R (\%) = (C_1 / C_2) \times 100 \quad (IV)$$

onde,

C₁ é a concentração determinada na amostra fortificada

C₂ é a concentração adicionada à amostra

(D) *Adição Padrão*: este método é usado quando for difícil ou impossível obter uma amostra testemunha, ou seja, a matriz sem a substância de interesse. No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância de interesse são adicionadas em diferentes níveis

numa amostra que já contenha quantidades desconhecidas da substância, antes do procedimento de preparo da amostra [104, 105].

1.5.1.e - Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada e declarada com um intervalo de confiança, em que a concentração do analito é maior que zero [99, 102].

O limite de detecção do instrumento (LD_I) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do instrumento [99].

O limite de detecção do método (LD_M) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero [99].

O limite de detecção pode ser determinado por três métodos diferentes:

(A) *Visual*: o LD é determinado através da adição de concentrações conhecidas do analito à matriz, de tal modo que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado [102].

(B) *Relação Sinal/Ruído*: o LD é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco dessas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal/ruído pode ser de 5:1, 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção [99, 100, 102].

(C) *Baseado em Parâmetros da Curva Analítica*: o LD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação V [104].

$$LD = 3,3 \times (s / a) \quad (V)$$

onde,

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

a é a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica

1.5.1.f - Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão.

O limite de quantificação do instrumento (LQ_I) é definido como a concentração do analito que produz um sinal seis a dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de quantificação do método (LQ_M) é determinado a partir do LQ_I e do fator a que a amostra é concentrada durante o processo de extração, denominado fator de concentração [99].

Os mesmos critérios usados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado pelo método visual, sinal/ruído (10:1) ou baseado na curva analítica, utilizando-se a equação VI [104].

$$LQ = 10 \times (s / a) \quad (VI)$$

onde,

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

a é a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica

1.5.1.g - Robustez

Diz-se que um método é robusto quando ele se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado [99].

A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros como a composição e a vazão da fase móvel em CLAE, natureza do gás de arraste em CG, programação de temperatura, bem como tempo de agitação, extração, etc. [104, 105].

2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento, a validação e a aplicação de métodos analíticos rápidos e eficientes para a determinação multirresidual de agrotóxicos no suco de laranja Pera e de tangerina Murcote empregando-se, inicialmente, CLAE com detecção por arranjo de diodos. Posteriormente, foram empregadas técnicas analíticas consideradas mais avançadas em termos de detecção e separação, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série e a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos.

3 - JUSTIFICATIVA

No Brasil, a laranja Pera e a tangerina Murcote são variedades cítricas amplamente empregadas na produção industrial de suco e que apresentam produção e exportação significativas, tanto *in natura* como sob a forma de suco. Por isso, realizar um controle dos resíduos de agrotóxicos no suco obtido a partir dessas variedades cítricas é imprescindível para que sejam atendidos os limites máximos de resíduos estabelecidos pelas agências reguladoras, de forma que o Brasil possa manter sua atividade produtora e exportadora no setor.

4) - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1- A escolha dos agrotóxicos

Os agrotóxicos avaliados neste trabalho foram selecionados dentre os apontados como os mais empregados na lavoura de laranja e tangerina por produtores e engenheiros agrônomos que atuam na citricultura do Estado de São Paulo, na região de Campinas, onde foram coletadas amostras reais destas frutas para análise utilizando-se o método desenvolvido.

Na Tabela 3 encontram-se a classe, o grupo químico, a classificação toxicológica, o pKa e a estrutura de cada um dos agrotóxicos estudados neste trabalho. Na Tabela 4 são apresentados os LMR designados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), pela *“United States Food and Drug Administration”* (FDA) e pelo *“CODEX Alimentarius”* para os agrotóxicos em frutas cítricas. Estes valores de LMR foram utilizados para a realização deste trabalho porque as principais agências reguladoras não definem LMR para os agrotóxicos em sucos de frutas, mas somente LMR para os agrotóxicos nas frutas [25]. Para melhor adequar os valores de LMR da Tabela 4 às matrizes estudadas, consideraram-se os mesmos valores numéricos apresentados, porém as unidades foram mudadas de mg kg^{-1} para mg L^{-1} .

Tabela 3: Classe, grupo químico, classificação toxicológica, pKa e estrutura química dos agrotóxicos estudados [108, 109].

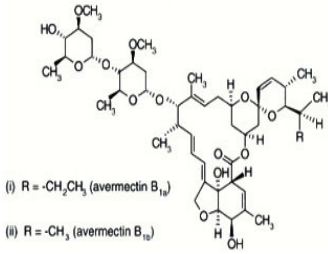
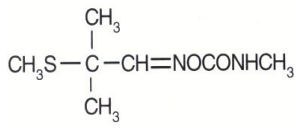
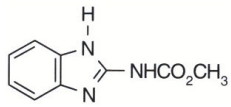
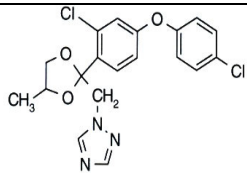
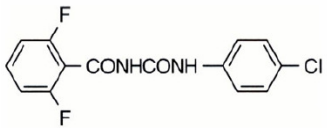
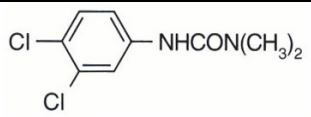
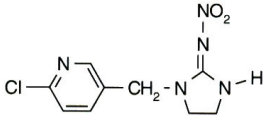
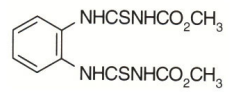
AGROTÓXICO	CLASSE	GRUPO QUÍMICO	CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA	pKa (25 °C)	FÓRMULA ESTRUTURAL
abamectina	acaricida inseticida nematicida (aplicado nas folhas)	avermectinas	classe I (extremamente tóxico)	----	 (i) R = -CH₂CH₃ (avermectin B_{1a}) (ii) R = -CH₃ (avermectin B_{1b})
aldicarbe	acaricida inseticida nematicida (aplicado no solo)	metilcarbamato de oxima	classe I (extremamente tóxico)	----	
carbendazim	fungicida (aplicado nas folhas)	benzimidazol	classe III (medianamente tóxico)	4,2	
difenoconazol	fungicida (aplicado nas folhas)	triazol	classe I (extremamente tóxico)	< 0	
diflubenzurom	inseticida acaricida (aplicado nas folhas)	benzoiluréia	classe IV (pouco tóxico)	----	
diurum	herbicida (aplicação pré/pós-emergência)	uréia	classe III (medianamente tóxico)	----	
imidacloprido	inseticida (aplicado nas folhas e no tronco)	neonecotinóide	classe III (medianamente tóxico)	----	
tiofanato metílico	fungicida (aplicado nas folhas)	benzimidazol (precursor de)	classe IV (pouco tóxico)	7,28	

Tabela 4: Limites máximos de resíduos para os agrotóxicos estudados segundo a ANVISA [108], a FDA [110] e o CODEX [111].

AGROTÓXICO	LMR – ANVISA (mg kg ⁻¹)	LMR – FDA (mg kg ⁻¹)	LMR – CODEX (mg kg ⁻¹)
abamectina	0,005	0,02	0,01
aldicarbe	0,2	0,3	0,2
carbendazim	5,0	0,5	n.f.
difenoconazol	0,5	0,1	1,0
diflubenzurom	0,2	0,5	0,5
diurom	0,1	1,0	n.f.
imidacloprido	1,0	0,7	1,0
tiofanato metílico	5,0	0,5	n.f.

n.f.: não fornecido

4.2 - Materiais e reagentes

Foram utilizados padrões analíticos dos agrotóxicos, todos com pureza maior que 97%, da Pestanal (Fluka). Acetato de etila (grau cromatográfico – Tedia), acetona (p.a. – Synth), acetonitrila (grau cromatográfico – Tedia), água (Milli-Q – Millipore), éter dietílico (p.a. – Merck), tetraidrofurano (grau cromatográfico – Tedia), 1-propanol (grau cromatográfico – Merck), ácido clorídrico (p.a. – Merck), cloreto de sódio (p.a. – Vetec), hidrogenocitrato de dissódio sesquidratado (p.a. – Sigma), citrato de trissódio diidratado (p.a. – Sigma), sulfato de magnésio anidro (p.a. – Synth), formiato de amônio (p.a. – Sigma) e ácido fórmico (p.a. – Merck) foram utilizados no preparo das amostras e das fases móveis (FM) utilizadas.

Na etapa de preparo das amostras foram utilizados os sorventes Florisil (100-200 mesh, 17,5 – 35 µm), sílica gel para cromatografia (400 – 200 mesh, 35 – 70 µm, diâmetro de poro 6 nm – Acrös Organics), Bondesil-PSA (40 µm – Varian) e os cartuchos para extração em fase sólida Supelclean LC-18 (Supelco), Supelclean ENVI Chrom-P (Supelco), OASIS HLB (Waters) e LiChrolut NH₂ (Merck).

4.3 - Equipamentos e instrumentação

Os equipamentos utilizados foram: agitador vortex (Phoenix, modelo AP 56), balança analítica, com precisão de 5 casas decimais (Sartorius, modelo CP 225 D), banho ultrassom (Thronton, modelo T14), centrífuga (Fisher Scientific, modelo 225), “*manifold*” de extração em fase sólida (20 posições – Supelco), micropipeta de 10 – 100 μL (Eppendorf Research), micropipeta de 100 – 1000 μL (Eppendorf Research). Um sistema de filtração à vácuo de vidro (Millipore) e uma bomba de vácuo, modelo DOA-Y52-AA (Waters) foram utilizados para filtrar as fases móveis, empregando-se uma membrana de polietileno com 0,45 μm de porosidade (Millipore).

Nas análises cromatográficas foram utilizados os seguintes sistemas cromatográficos:

(A) Cromatógrafo Waters, composto por um sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para programação de gradiente de alta pressão, modelo 515, com detector por arranjo de diodos, modelo 996, uma válvula de injeção manual do tipo Reodyne[®], com volume de injeção de 10 μL . A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando-se o software Millenium³².

(B) Cromatógrafo Shimadzu, composto por um sistema controlador de solventes LC-10AT_{vp} (bomba de quatro vias) para programação de gradiente à baixa pressão, desgaseificador “*on-line*” DGU-2A que utiliza gás hidrogênio para a desgaseificação dos solventes utilizados como FM, um forno CTO-10AS_{vp} para o controle de temperatura da coluna, injetor automático SIL-10A_{vp}, detector por arranjo de diodos SPD-M10A_{vp} e um sistema controlador SCL-10A_{vp} que permite a operação totalmente automatizada. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando-se o software Class VP.

(C) LC-MS-MS composto por cromatógrafo Waters Alliance 2695 acoplado a um espectrômetro de massas em série Micromass Quattro MicroTM API, triplo quadrupolo, com interface ESI (ESITM multi mode ionization). A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando-se o software Mass Lynx v. 4.1.

(D) CLUE Waters Acquity, equipado com um sistema de bombeamento de solventes binário, um sistema de injeção de amostras automático e sistema de detecção por arranjo de diodos.

Uma coluna cromatográfica analítica (Nova-Pak) C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 μm de diâmetro de partícula), Waters e uma coluna de guarda (Nova-PaK) C18 (20 mm x 3,9 mm

d.i., 4 µm de diâmetro de partícula) do mesmo fabricante foram utilizadas nos sistemas cromatográficos empregados, exceto no UPLC, no qual foi utilizada uma coluna analítica Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula), Waters.

4.4 - Preparo das soluções estoque dos agrotóxicos

Soluções estoque dos agrotóxicos de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas em acetonitrila (grau cromatográfico – Tedia), exceto para o carbendazim. A solução de 1000 mg L⁻¹ de carbendazim foi preparada em acetonitrila com adição de 8% de uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, uma vez que a adição da solução de HCl leva à solubilização do carbendazim, o qual não é totalmente solúvel apenas em acetonitrila. Estas soluções foram estocadas em refrigerador a - 4 °C por até 4 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 testemunhas. Estas soluções, principalmente as mais diluídas, permanecem estáveis por um período de sete dias se armazenadas adequadamente e refrigeradas a - 4 °C.

4.5 - Amostras de laranja Pera e tangerina Murcote

As amostras testemunhas que foram empregadas no desenvolvimento e validação do método, tanto de laranja Pera quanto da tangerina Murcote, foram obtidas em um estabelecimento comercial da cidade de Campinas-SP especializado em produtos orgânicos. As amostras para a aplicação dos métodos foram obtidas em supermercados de Campinas-SP e da região para a determinação de possíveis resíduos de agrotóxicos.

Estas amostras foram processadas utilizando-se um aparelho elétrico para a extração do suco de forma a ser o mais similar possível ao processo caseiro de preparação de suco de laranja. O suco obtido foi passado por uma peneira plástica, também de uso doméstico, apenas para eliminar o excesso de material sólido, e foi acondicionado em frascos de vidro tipo âmbar, de 20 mL, que foram tampados. Os frascos foram mantidos em freezer a cerca

de - 4 °C até o momento de serem utilizados. Antes de ser utilizado, o suco foi mantido no frasco tampado sobre uma bancada do laboratório até que entrasse em equilíbrio térmico com o ambiente.

4.6 - Determinação das condições cromatográficas de separação e detecção

4.6.1- CLAE-DAD

Utilizando-se o sistema cromatográfico Waters descrito no item 4.3, a separação cromatográfica dos agrotóxicos estudados foi otimizada avaliando-se as seguintes condições:

(A) Modo de eluição isocrático: Foram utilizadas FM de composição 10:90 v_A/v_B , 20:80 v_A/v_B , 30:70 v_A/v_B , 40:60 v_A/v_B e 50:50 v_A/v_B de água (solvente A), acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B) em uma vazão de 1 mL min⁻¹.

(B) Modo de eluição por gradiente: Foram utilizadas FM compostas por água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B), cuja composição foi variada em função do tempo conforme a programação de diferentes gradientes lineares.

As condições de separação otimizadas utilizando-se o cromatógrafo Waters foram transferidas diretamente para o sistema cromatográfico da Shimadzu.

Após serem definidas as condições cromatográficas de separação, foi realizada a identificação dos agrotóxicos estudados injetando-se uma solução de 5 mg L⁻¹ em acetonitrila de cada um deles separadamente. 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.

Através do espectro de absorção no UV, determinou-se o comprimento de onda de absorção máxima de cada agrotóxico. Como os comprimentos de onda de absorção máxima dos agrotóxicos em estudo variaram entre 233 e 285 nm, foi escolhido um comprimento de onda intermediário (248 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.

4.6.2 - CL-EM-EM

No cromatógrafo a líquido foram utilizados como FM uma solução aquosa de 3 mmol L⁻¹ de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B). Empregou-se o seguinte gradiente linear com vazão de 0,3 mL min⁻¹: 0 min - 20:80 v_A/v_B, 8 min - 80:20 v_A/v_B, 15 min - 20:80 v_A/v_B e mais 5 min para estabilização da coluna após o retorno às condições iniciais (20 min - 20:80 v_A/v_B). O volume de injeção utilizado foi 10 µL.

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados para que operasse em EM-EM, no modo de varredura MRM e ionização por ESI no modo íon positivo, da seguinte maneira: voltagem do capilar - 3,5 kV; temperatura da fonte - 100 °C; temperatura de dessolvatação - 350 °C; vazão do gás de dessolvatação (N₂) - 700 L h⁻¹; intervalos de tempo de varredura (*“dwell times”*) - 0,5 s; *“RF lens”* 1 - 0; *“RF lens”* 2 - 0; resolução LM 1 - 15,0; resolução HM 1 - 15,0; energia do íon 1 - 0,5 V; voltagem de entrada - 1 V; voltagem de saída - 1 V; resolução LM 2 - 15,0; resolução HM 2 - 15,0; energia do íon 2 - 1,5 V; voltagem da multiplicadora - 650 V. A voltagem do cone, a energia de colisão e a transição MRM empregada na identificação dos agrotóxicos foram otimizadas realizando-se a infusão, no espectrômetro de massas, de soluções de 0,5 mg L⁻¹ de cada agrotóxico em acetonitrila:solução aquosa 3 mmol L⁻¹ de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico 50:50 v/v.

4.6.3 – CLUE-DAD

Foi utilizado o software Acquity Column Selector, Waters, para realizar a transferência do método de separação otimizado no sistema CLAE-DAD (sistemas cromatográficos A e B descritos no item 3.3) para o sistema CLUE-DAD. A transferência direta do método de separação empregado no sistema CLAE-DAD para o sistema CLUE-DAD por meio do

software Acquity Column Selector só foi possível porque foram empregadas, em ambos os sistemas cromatográficos, colunas com FE semelhantes.

Inserindo-se no software os dados de tamanho de partícula da FE, de comprimento e de diâmetro interno das colunas utilizadas em ambos os sistemas, CLUE e CLAE, assim como a programação de gradiente otimizada para o sistema CLAE, o software forneceu a programação de gradiente adequada ao sistema CLUE. Desta maneira, o programa de gradiente adequado ao sistema CLUE-DAD obtido foi: 0 min – 80:20 v_A/v_B ; 1,2 min – 70:30 v_A/v_B ; 1,6 min 50:50 v_A/v_B ; 1,9 min – 30:70 v_A/v_B ; 2,2 min – 20:80 v_A/v_B ; 6,6 min – 80:20 v_A/v_B ; com vazão de 0,3 mL min⁻¹, sendo a FM composta por água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B). O volume de amostra injetado foi de 1 µL.

Como no sistema CLUE a detecção foi realizada no UV por arranjo de diodos, a identificação dos compostos foi feita da mesma maneira que nos sistemas cromatográficos A e B, conforme descrito no item 3.6.1. O comprimento de onda de 248 nm foi utilizado para apresentação dos cromatogramas e as demais medidas foram realizadas no comprimento de absorção máxima para cada agrotóxico estudado.

4.7 - Métodos de preparo de amostras

Para o desenvolvimento e otimização do método de preparo das amostras foram avaliados vários métodos de extração, empregando-se amostras testemunhas de suco de **laranja Pera**, com o objetivo de se obterem resultados adequados, tanto em termos de recuperação quanto em quantidade de interferentes. Nesta etapa, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (sistemas cromatográficos descritos no item 4.3 A e B).

Os procedimentos de extração avaliados estão descritos nos itens 4.7.1 a 4.7.6

4.7.1 - Extração líquido-líquido

Empregou-se o seguinte procedimento de ELL:

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 20 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;

- adicionaram-se 10 mL do solvente extrator (acetonitrila, acetona ou acetato de etila) e agitou-se com agitador vortex por 1 minuto;
- centrifugou-se por 15 minutos a 10 000 rpm e transferiu-se a fase orgânica para outro frasco e realizou-se uma nova extração da parte aquosa remanescente no frasco com mais 10 mL de solvente extrator, procedendo-se da mesma maneira;
- Juntou-se o primeiro ao segundo extrato, o qual foi submetido a um fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura e, posteriormente, foi dissolvido em 500 µL de acetonitrila em banho ultrassom, para injeção no sistema cromatográfico.

Na Figura 1 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de ELL.

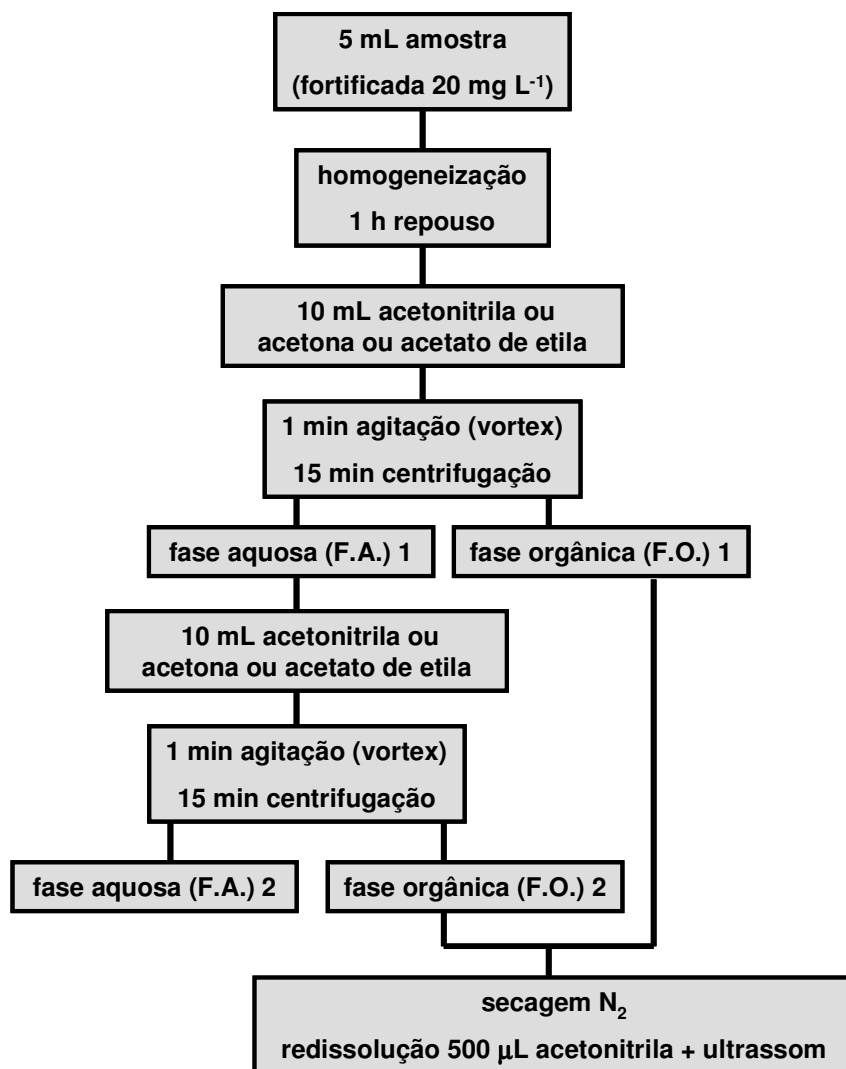


Figura 1: Fluxograma do procedimento de ELL.

4.7.2 - Extração líquido-líquido seguida de uma etapa de “*clean-up*”

O procedimento realizado consistiu nas seguintes etapas:

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 20 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionaram-se 10 mL de acetato de etila e agitou-se em agitador vortex por 1 minuto;
- centrifugou-se por 15 minutos a 10 000 rpm e transferiu-se a fase orgânica para outro frasco e realizou-se uma nova extração da parte aquosa remanescente no frasco com mais 10 mL de acetato de etila, procedendo-se da mesma maneira;
- prepararam-se cartuchos em nosso laboratório, preenchendo-se, manualmente, seringas de polipropileno de 1 mL com 500 mg de sílica ou florisil;
- utilizando-se o “*manifold*”, condicionaram-se os cartuchos com 5 mL de acetato de etila a uma vazão de cerca de 1 mL min⁻¹ e passaram-se os extratos obtidos em acetato de etila pelos cartuchos sob a mesma vazão;
- o eluato foi mantido sob fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura e, em seguida, foi dissolvido em 500 µL de acetonitrila em banho ultrassom, e foi injetado no sistema cromatográfico.

Na Figura 2 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de ELL seguida de uma etapa de “*clean-up*”.

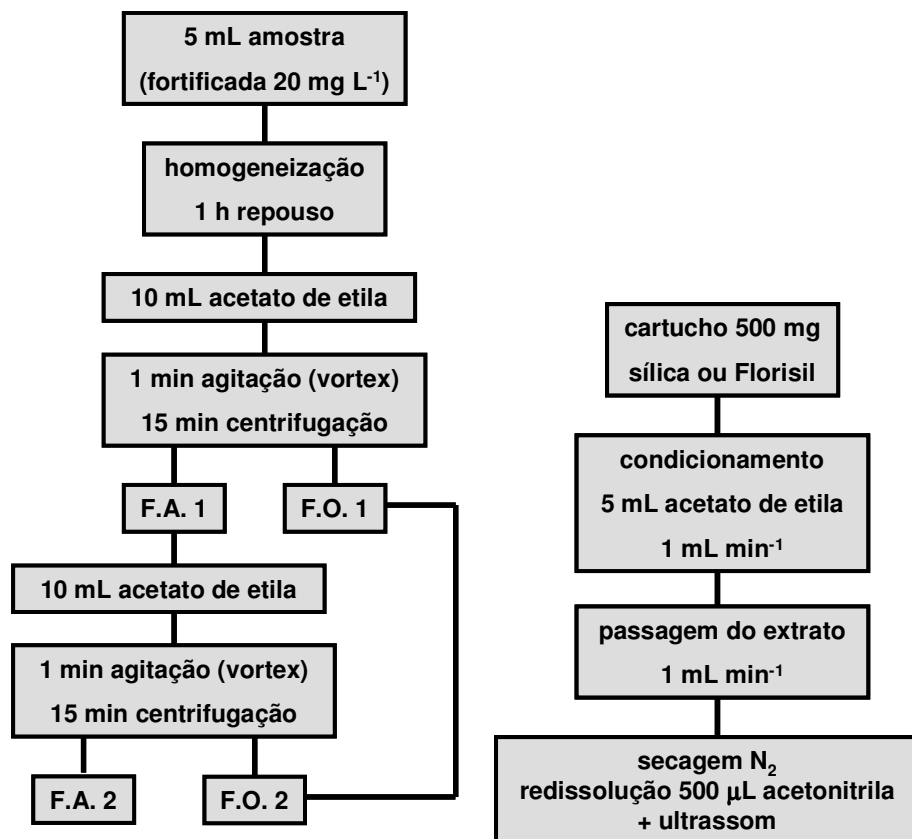


Figura 2: Fluxograma do procedimento de ELL seguido de uma etapa de “clean-up”.

4.7.3 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero

Este procedimento trata-se de uma adaptação da metodologia de extração desenvolvida por Vieira *et al.* [63]. A nomenclatura utilizada, extração líquido-líquido à temperatura sub-zero, foi adotada com base no trabalho de Yoshida e Akane [62], publicado anteriormente ao trabalho de Vieira *et al.* [63], em que os autores utilizaram esta mesma técnica de extração seguida por CLAE para análise de drogas.

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 2 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;

- adicionaram-se misturas de solventes para extração compostas por:

a) 1 mL água destilada + 7,5 mL acetonitrila + 1,5 mL acetato de etila

- b) 1 mL água destilada + 6,5 mL acetonitrila + 2,5 mL acetato de etila
- c) 1 mL água destilada + 9 mL acetato de etila
- d) 5 mL água destilada + 5 mL acetato de etila
- e) 3 mL água destilada + 7 mL acetato de etila
- f) 1 mL água destilada + 14 mL acetato de etila
- g) 1 mL água destilada + 9 mL 1-propanol
- h) 1 mL água destilada + 9 mL tetraidrofurano
- i) 1 mL água destilada + 9 mL éter dietílico

- manteve-se em banho ultrassom por 15 minutos, centrifugou-se por 15 minutos a 10000 rpm para obter a separação entre a fase aquosa e a fase orgânica, que se dá pela formação de uma fase composta pelos resíduos sólidos da matriz de densidade intermediária às fases orgânica e aquosa, e levou-se ao freezer à -10 °C por 12 horas para solidificação da fase aquosa;

- a fase líquida (orgânica) foi transferida para outro frasco, mantida sob fluxo de gás nitrogênio até a secura e dissolvida em 500 µL de acetonitrila em banho ultrassom e injetada no sistema cromatográfico.

Na Figura 3 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de ELL-TSZ.

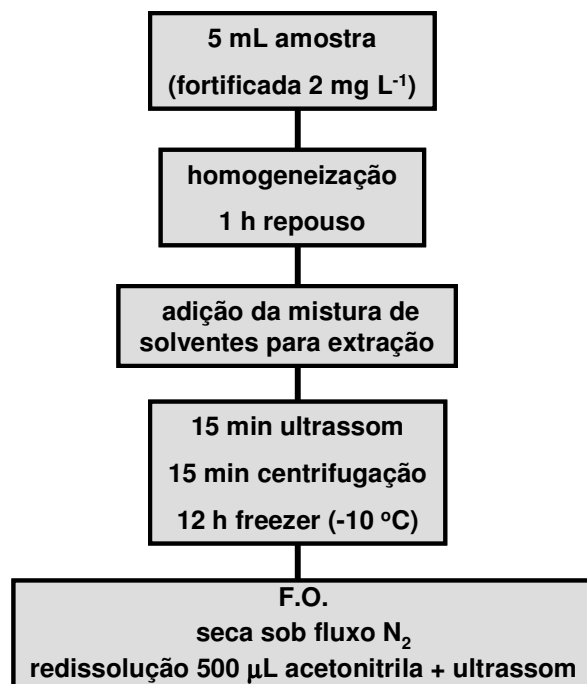


Figura 3: Fluxograma do procedimento de ELL-TSZ.

4.7.4 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero seguida de uma etapa de “*clean-up*”

Neste procedimento:

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 2 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionaram-se 10 mL de uma mistura de solventes para extração composta por 1 mL água destilada + 9 mL acetato de etila e manteve-se em banho ultrassom por 15 minutos;
- centrifugou-se por 15 minutos a 10 000 rpm e levou-se ao freezer à -10 °C por 12 horas para solidificação da fase aquosa;
- utilizando-se o “*manifold*”, condicionou-se o cartucho OASIS HLB, respectivamente, com 5 mL de água, 5 mL de acetonitrila e 5 mL de acetato de etila, a uma vazão de aproximadamente 1 mL min⁻¹ e passou-se através dele, sob a mesma vazão, o extrato obtido na ELL-TSZ.

- o eluato foi mantido sob fluxo de gás nitrogênio até a secura e dissolvido em 500 μL de acetonitrila em banho ultrassom, e injetado no sistema cromatográfico.

Na Figura 4 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de ELL-TSZ seguido de uma etapa de “*clean-up*”.

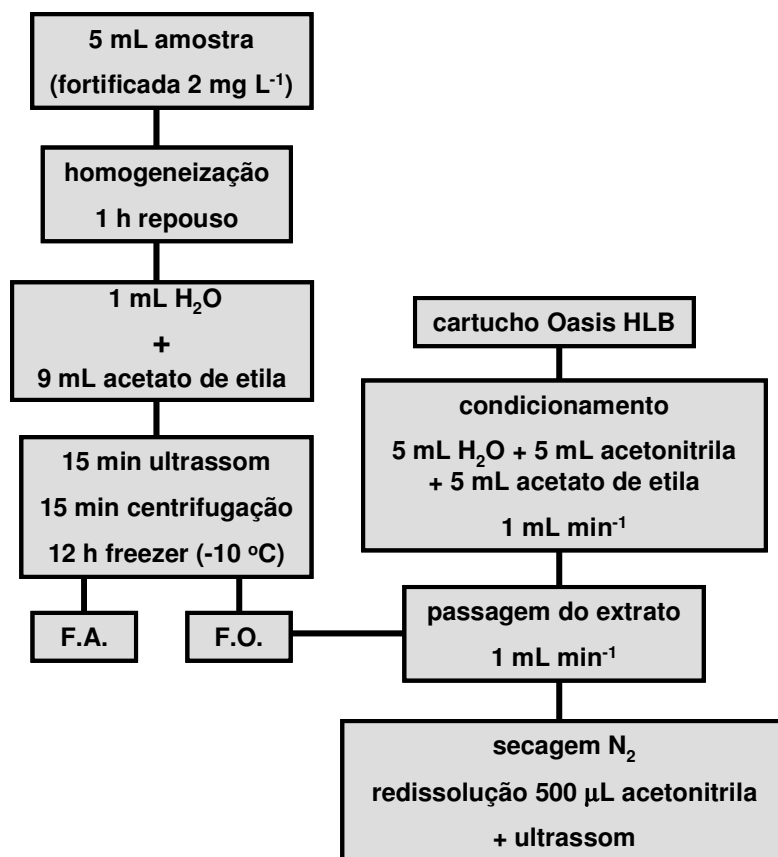


Figura 4: Fluxograma do procedimento de ELL-TSZ seguida de uma etapa de “*clean-up*”.

4.7.5 - Extração em fase sólida

4.7.5.a - Procedimento baseado no trabalho de Diserens e Henzelin

[49]

O procedimento apresentado neste item trata-se de uma adaptação da metodologia de extração desenvolvida por Diserens e Henzelin [49].

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 20 mg L^{-1} , homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionaram-se 10 mL do solvente extrator (acetonitrila) e agitou-se com agitador vortex por 1 minuto;
- centrifugou-se por 15 minutos a 10 000 rpm e transferiu-se a fase orgânica para um balão volumétrico de 50 mL e realizou-se uma nova extração da parte aquosa remanescente no frasco com mais 10 mL de acetonitrila, procedendo-se da mesma maneira;
- Adicionaram-se 50 μL de trietilamina ao balão contendo o produto das duas extrações com acetonitrila e o volume foi completado com água destilada;
- O “*manifold*” foi utilizado para condicionar os cartuchos Supelclean LC-18, ENVI Chrom-P e OASIS HLB, sucessivamente, com 5 mL de acetonitrila e 5 mL de uma solução constituída por 30 mL de acetonitrila, 70 mL de água e 0,1 mL de trietilamina, a uma vazão de aproximadamente 1 mL min^{-1} e, a seguir, passaram-se através deles, sob a mesma vazão, o conteúdo do balão;
- Os cartuchos foram secos pela passagem de um fluxo contínuo de ar através deles, aplicando-se vácuo ao “*manifold*” por 10 minutos, para então realizar-se a eluição dos compostos retidos em cada cartucho, sucessivamente, com 5 mL de acetonitrila e 5 mL de acetato de etila;
- os eluatos foram mantidos sob fluxo de gás nitrogênio até a secura, ressuspensos em 500 μL de acetonitrila em banho ultrassom e injetados no sistema cromatográfico.

Na Figura 5 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de EFS baseado no trabalho de Diserens e Henzelin [49].

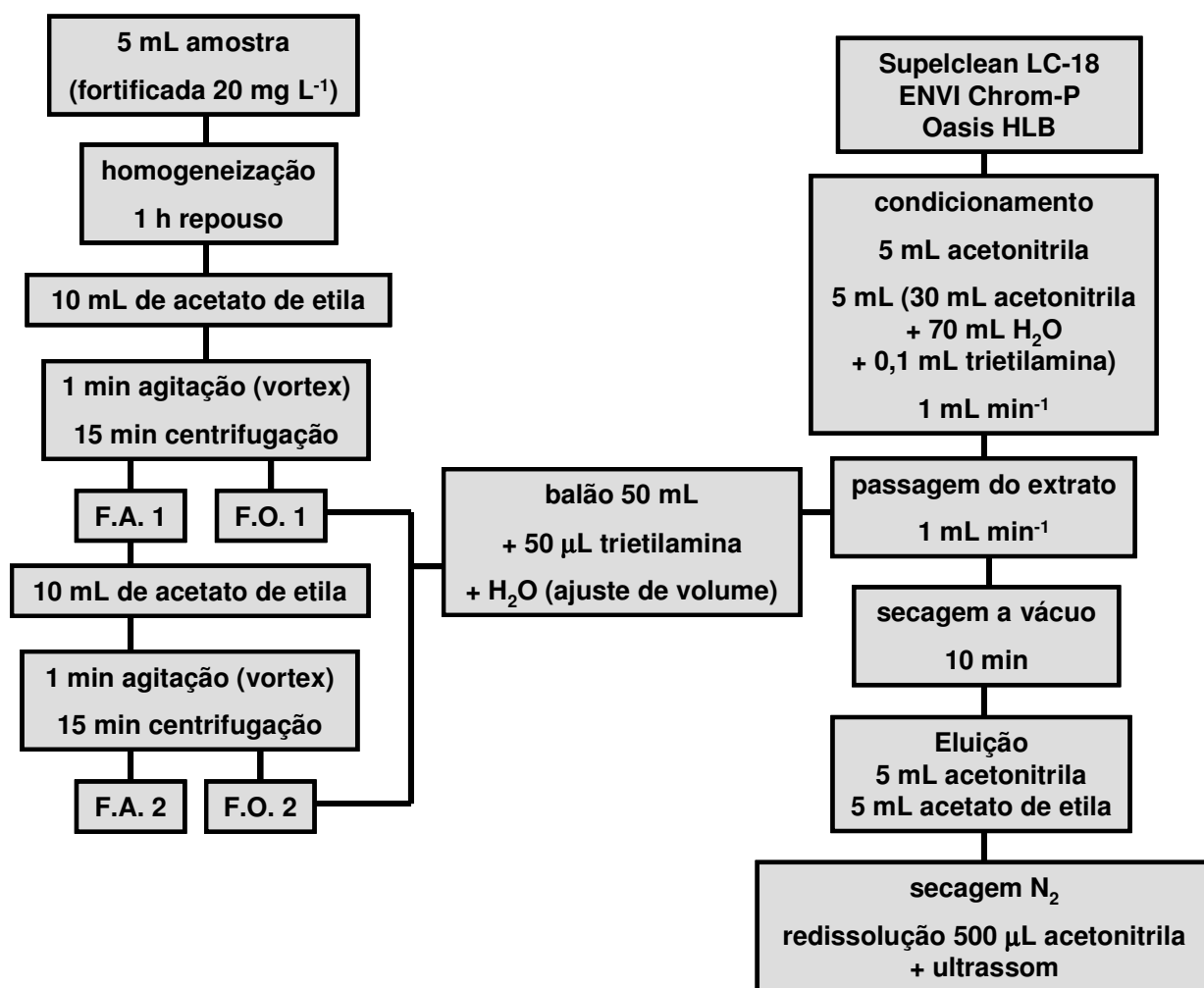


Figura 5: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Diserens e Henzelin [49].

4.7.5.b - Procedimento baseado no trabalho de Obana *et al.* [50]

O procedimento apresentado neste item trata-se de uma adaptação da metodologia de extração desenvolvida por Obana *et al.* [50].

- fortificaram-se 5 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 20 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;

- adicionaram-se 25 mL do solvente extrator (acetato de etila) e agitou-se com agitador vortex por 1 minuto;
- centrifugou-se por 15 minutos a 10 000 rpm e transferiu-se a fase orgânica para um outro tubo ao qual foi adicionado 3 g de cloreto de sódio e a mistura foi agitada para separar qualquer remanescente de fase aquosa da fase orgânica;
- 15 mL da fase orgânica (equivalente a 3 mL de amostra) foram transferidos para outro frasco, mantida sob fluxo de gás nitrogênio até a secura;
- o resíduo foi dissolvido em 2 mL de acetona e transferido para outro frasco;
- o frasco foi lavado com mais 2 mL de acetona e, em seguida, estes 2 mL de lavagem foram transferidos para o mesmo frasco contendo o resíduo dissolvido;
- foram adicionados ao frasco contendo o resíduo da extração dissolvido em acetona, 4 mL de hexano, obtendo-se assim, uma mistura 1:1 v/v acetona/hexano;
- o “*clean-up*” do extrato obtido foi realizado passando-o por um cartucho Lichrolut NH₂ e, em seguida, o cartucho foi lavado com 5 mL de acetona/hexano 1:1 v/v;
- o eluato foi mantido sob fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura e, em seguida, foi ressuspendido 2 mL de uma mistura de acetona/hexano 3:7 v/v e passado através de um cartucho preenchido com 500 mg de sílica gel, preparado em nosso laboratório;
- o extrato passado pelo cartucho foi coletado junto a mais 10 mL de acetona/hexano 3:7 v/v;
- o eluato foi mantido sob um fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura e dissolvido em 500 µL de acetonitrila, em banho ultrassom, e injetado no sistema cromatográfico.

Na Figura 6 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de EFS baseado no trabalho de Obana *et al.* [50].

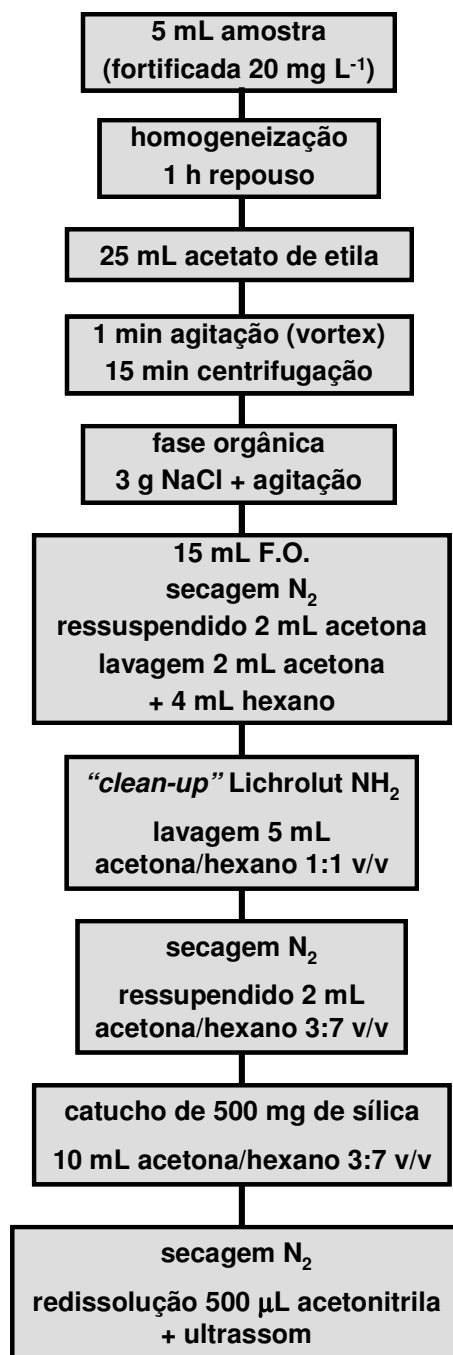


Figura 6: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Obana *et al.* [50].

4.7.5.c - Procedimento baseado no trabalho de Miliadis *et al.* [51]

Este procedimento trata-se de uma adaptação da metodologia de extração desenvolvida por Miliadis *et al.* [51].

- fortificaram-se 10 mL de amostra testemunha resultando em uma concentração de 2 mg L⁻¹, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionaram-se 20 mL de acetato de etila e 10 g de sulfato de sódio, agitou-se por 3 minutos com o agitador vortex e centrifugou-se a 10 000 rpm por 15 minutos;
- transferiram-se 10 mL de fase orgânica (equivalente a 5 g de amostra) para outro frasco e manteve-se sob fluxo contínuo de gás nitrogênio até a secura;
- dissolveu-se com 5 mL de hexano utilizando-se o banho ultrassom;
- utilizando-se o “*manifold*”, condicionou-se um cartucho contendo 500 mg de sílica preparado no laboratório, com 10 mL de hexano a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e passou-se o extrato através do cartucho sob a mesma vazão;
- a eluição foi realizada com 2 mL de diclorometano:isopropanol 9:1 v/v;
- o eluato foi levado a secura utilizando-se um fluxo contínuo de gás nitrogênio, foi dissolvido com 500 µL de acetonitrila, em banho ultrassom e injetado no sistema cromatográfico.

Na Figura 7 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento de EFS baseado no trabalho de Miliadis *et al.* [51].

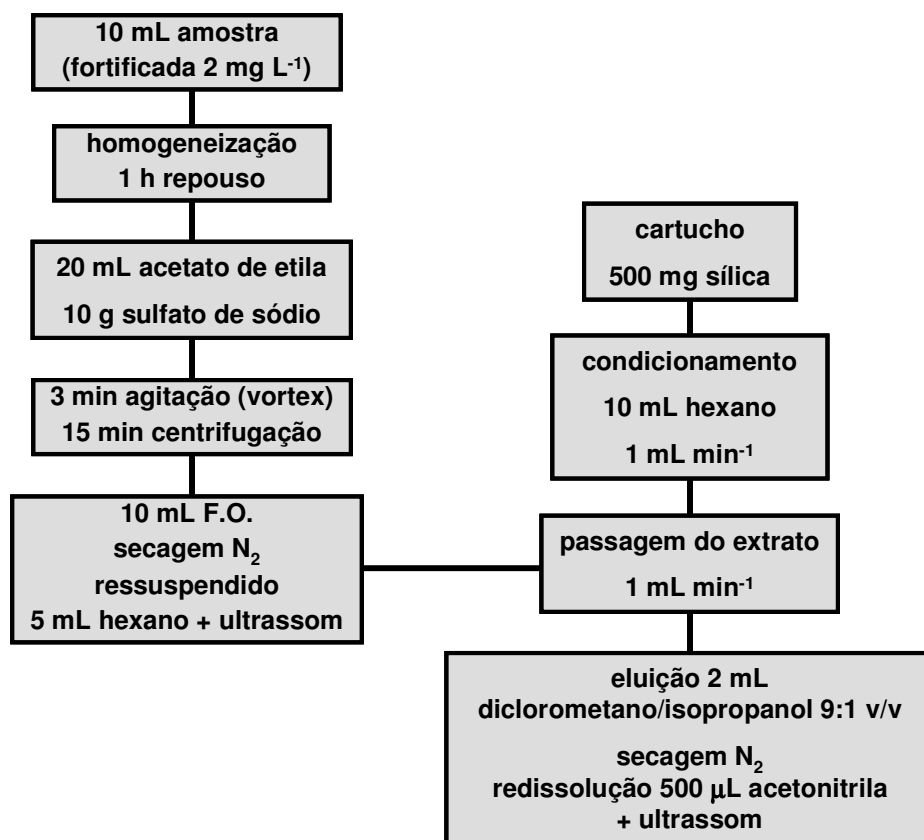


Figura 7: Fluxograma do procedimento de EFS baseado no trabalho de Miliadis *et al.* [51]

4.7.6 - QuEChERS modificado

O procedimento a seguir foi desenvolvido com base no procedimento denominado “QuEChERS - A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products” [75].

- fortificaram-se 10 mL de amostra testemunha em 100 µg L⁻¹ com os agrotóxicos, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionaram-se 10 mL de acetato de etila e agitou-se por 1 minuto no agitador vortex;
- adicionaram-se à mistura 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio, 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio e agitou-se por mais 1 minuto no agitador vortex;

- centrifugaram-se a 10 000 rpm por 15 minutos e transferiu-se a fase orgânica para outro frasco;
- adicionaram-se 0,25 g de Bondesil-PSA, 1,5 g de sulfato de magnésio anidro e agitou-se por 30 segundos no agitador vortex;
- centrifugou-se a 10 000 rpm por 15 minutos e transferiu-se a fase líquida para outro frasco ao qual foi adicionado 100 μL de uma solução 5% de ácido fórmico em acetonitrila;
- o extrato foi levado à secura utilizando-se um fluxo contínuo de gás nitrogênio, foi dissolvido em 1 mL de acetonitrila utilizando-se banho ultrassom e foi injetado no sistema cromatográfico.

Na Figura 8 está apresentado o fluxograma que descreve este procedimento baseado no método QuEChERS modificado.

4.8 - Obtenção da curva analítica

4.8.1 - Padronização externa sem superposição da matriz

As curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração dos agrotóxicos (40 a 2250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o sistema cromatográfico B; 16 a 960 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o de CL-EM-EM e 20 a 11250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o de CLUE-DAD) injetando-se, no sistema cromatográfico, soluções dos padrões dos agrotóxicos em acetonitrila, em sete níveis de concentração e em triplicada. Construíram-se as curvas com o auxílio do programa Origin 6.1 o qual forneceu o coeficiente de correlação (r) e os coeficientes de regressão.

4.8.2 - Padronização externa com superposição de matriz

As curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração dos agrotóxicos (40 a 2250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o sistema cromatográfico B; 16 a 960 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o de CL-EM-EM e 20 a 11250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o de CLUE-DAD) a partir da adição dos agrotóxicos, em sete níveis de concentração, ao extrato da matriz isenta desses compostos, e posterior injeção, em

triplicata, no sistema cromatográfico. Construíram-se as curvas com o auxílio do programa Origin 6.1, o qual forneceu o coeficiente de correlação (r) e os coeficientes de regressão.

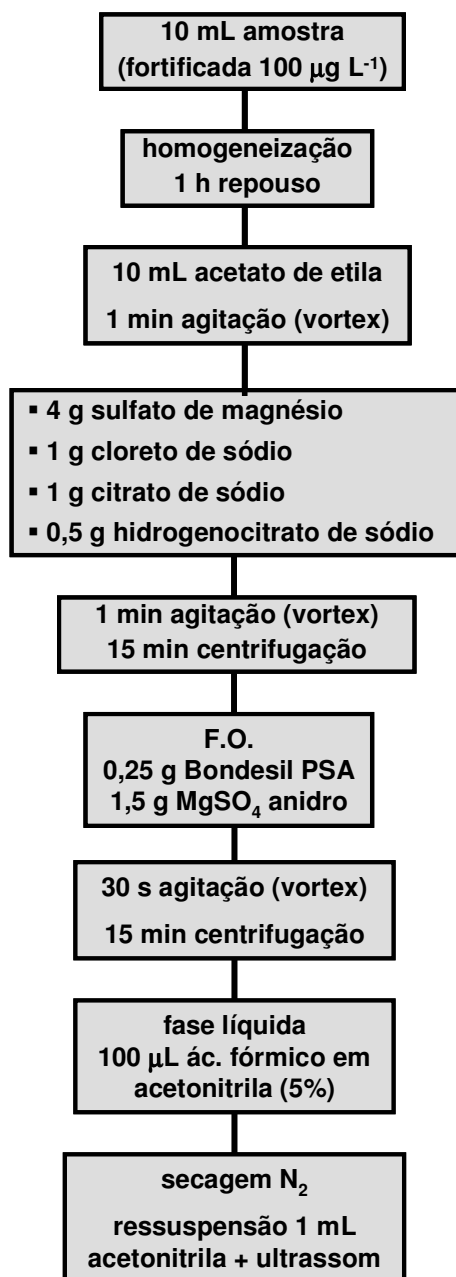


Figura 8: Fluxograma do procedimento baseado no método QuEChERS modificado [75].

4.9 - Validação dos métodos

Definidas as melhores condições cromatográficas de separação e de detecção dos agrotóxicos nos 3 sistemas cromatográficos estudados (CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD) e o método de extração, foram realizadas as validações dos métodos por meio da determinação dos parâmetros analíticos de validação descritos na seção 1.5.1.

4.10 - Análises de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e região

Depois de realizadas as validações dos métodos desenvolvidos foram analisadas amostras de laranja Pera e tangerina Murcote coletadas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas e região para avaliação do método desenvolvido quando aplicado a amostras provenientes de lavouras nas quais se utilizam agrotóxicos. Seis amostras de cada matriz foram analisadas no sistema CLAE-DAD, três amostras de cada matriz foram analisadas no sistema LC-EM-EM e seis amostras da matriz laranja Pera foram analisadas no sistema CLUE-DAD.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Determinação das condições cromatográficas de separação e detecção

5.1.1 – CLAE-DAD

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos agrotóxicos no sistema CLAE 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 promover a separação com boa resolução entre todos os compostos estudados.

Passou-se, então, a empregar a eluição por gradiente, com a qual, independentemente da programação de gradiente utilizada, quando foi empregada FM sem ajuste de pH, não foi possível obter uma boa separação entre o agrotóxico carbendazim e o tiofanato metílico. O tiofanato metílico apresenta pK_a de 7,28 (ácido fraco), de forma que se torna estável em meio ácido (pH 2-5), mas é instável em meio alcalino, permanecendo não degradado por cerca de 46 dias em soluções aquosas em pH 7 à 22 °C e por apenas 4 minutos em pH 9 à 65 °C [77]. O principal produto de degradação (metabólito) do tiofanato metílico é o carbendazim, que se trata de uma base fraca (pK_a 4,2) [77, 110]. Desta maneira, verificou-se que se fosse utilizada como FM uma solução de pH ácido a neutro para evitar a degradação do tiofanato metílico, o carbendazim estaria na forma ionizada e, conseqüentemente, haveria uma baixa interação deste composto com a FE, o que não é desejado, uma vez que todo método analítico deve ser robusto e preciso.

O carbendazim foi então substituído pelo diflubenzurom na mistura de agrotóxicos em estudo e, utilizando-se como FM água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B), estabeleceu-se o seguinte programa de gradiente para a separação dos agrotóxicos: 0 min – 80:20 v_A/v_B ; 4 min – 70:30 v_A/v_B ; 5 min – 50:50 v_A/v_B ; 6 min – 30:70 v_A/v_B ; 7 min – 20:80 v_A/v_B , retornando linearmente às condições iniciais em 13 minutos (20 min – 80:20 v_A/v_B). O cromatograma obtido utilizando-se o programa de gradiente otimizado para a separação da

mistura composta pelos agrotóxicos abamectina, aldicarbe, difenoconazol, diflubenzurom, imidacloprido e tiofanato metílico, está apresentado na Figura 9 A.

Após a realização de alguns estudos quantitativos, verificou-se que os métodos de extração e concentração que poderiam possivelmente ser empregados para análise dos agrotóxicos de interesse nas matrizes em estudo neste trabalho não seriam capazes de atingir o limite de quantificação igual ou inferior ao LMR do agrotóxico abamectina determinado pela ANVISA [108]. Desta maneira, substituiu-se a abamectina por outro agrotóxico também amplamente empregado nas lavouras brasileiras de laranja e tangerina, o diurom.

Com a adição do diurom na mistura dos agrotóxicos estudados não foi necessário alterar o programa de gradiente otimizado, porém, os tempos de retenção apresentados pelos compostos modificaram-se, porque o método de separação foi transferido do sistema cromatográfico Waters para um sistema cromatográfico Shimadzu. Esta transferência se fez necessária durante o desenvolvimento do método, porque o cromatógrafo Waters, utilizado até o momento, apresentou um dano irreparável na parte ótica do sistema de detecção. O cromatograma obtido utilizando-se o sistema cromatográfico Shimadzu, para a mistura composta pelos agrotóxicos aldicarbe, difenoconazol, diflubenzurom, diurom, imidacloprido e tiofanato metílico, está apresentado na Figura 9 B.

Na Tabela 5 encontram-se os tempos de retenção dos agrotóxicos injetados separadamente em ambos os sistemas cromatográficos utilizados (Waters e Shimadzu) e seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\max}$), determinados com base nos espectros de absorção obtidos experimentalmente pela injeção de soluções individuais de 5 mg L⁻¹ de cada um dos agrotóxicos estudados. Uma diferença significativa foi observada entre os tempos de retenção obtidos para os mesmos agrotóxicos nos diferentes sistemas cromatográficos, conforme mostrado na Tabela 5, pois no sistema cromatográfico Waters emprega-se um programador de gradiente a alta pressão e no sistema cromatográfico Shimadzu um programador a baixa pressão, no qual o tempo de residência é maior. Os dados apresentados na Tabela 5 foram utilizados para identificação dos agrotóxicos quando estes estavam presentes em misturas e nas matrizes estudadas.

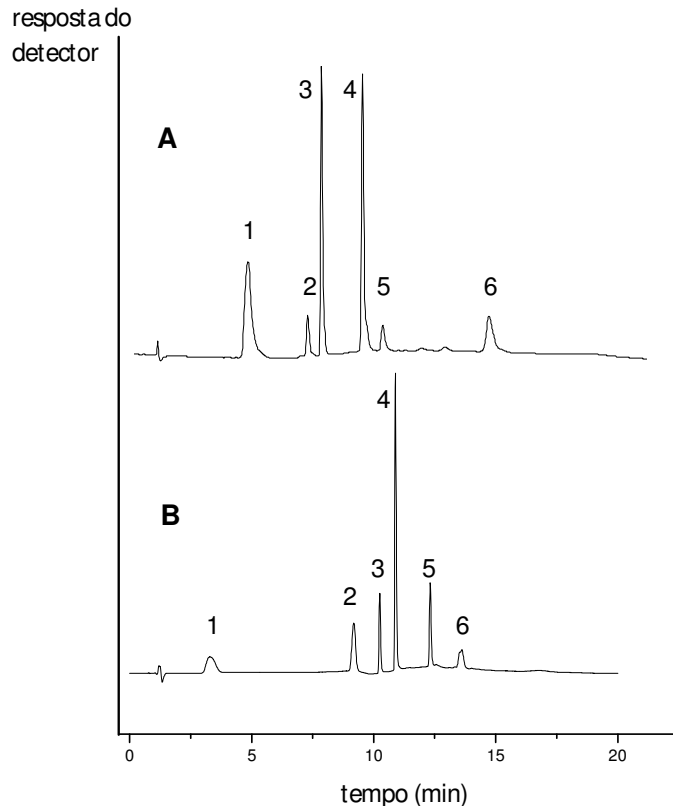


Figura 9: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de 10 mg L⁻¹) empregando-se a **CLAE-DAD**. Condições cromatográficas: volume de injeção - 10 µL; coluna analítica - Nova-Pak C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula), Waters; coluna de guarda - Nova-Pak C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula); FM - água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 80:20 v_A/v_B; 4 min - 70:30 v_A/v_B; 5 min - 50:50 v_A/v_B; 6 min - 30:70 v_A/v_B; 7 min - 20:80 v_A/v_B, retornando linearmente às condições iniciais em 13 minutos (20 min - 80:20 v_A/v_B); vazão - 1 mL min⁻¹; detecção UV - 248 nm. Identificação dos picos: (A) 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol, 6- abamectina; (B) 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

Tabela 5: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado nos diferentes sistemas cromatográficos utilizados e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}).

agrotóxico	t_R (min)		λ_{max} (nm)
	cromatógrafo Waters	cromatógrafo Shimadzu	
imidacloprido	4,8	3,7	269
aldicarbe	6,8	9,3	245
tiofanato metílico	7,4	10,3	265
diurom	-----	10,9	249
diflubenzurom	8,9	12,3	254
difenoconazol	9,5	13,5	233
abamectina	13,5	-----	244

5.1.2 - CL-EM-EM

Na CL-EM-EM, graças à seletividade do sistema de detecção, 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 do íon produto mais abundante de cada agrotóxico através da infusão via seringa, diretamente no espectrômetro de massas, de soluções de 0,5 mg L⁻¹ dos agrotóxicos em uma solução aquosa de 3 mmol L⁻¹ de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila 50:50 v/v. A vazão de bombeamento das soluções de agrotóxicos através da seringa para o interior do espectrômetro foi de 10 µL min⁻¹.

A adição de ácido fórmico às soluções dos agrotóxicos empregadas na infusão, assim como na FM, fez com que a ionização dos agrotóxicos se desse no modo positivo, isto é, foram formados íons $[M + H]^+$, exceto para o aldicarbe, conforme mostrado na Tabela 6. Foi necessário utilizar como aditivo o formiato de amônio, para gerar a formação de adutos de amônio do agrotóxico aldicarbe ($[M + NH_4]^+$) e impedir a formação de adutos de sódio com

este composto. Isto, porque adutos de sódio 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 ($[M + H]^+$ ou $[M + NH_4]^+$) e o seu respectivo íon produto de maior intensidade, as quais são apresentadas na Tabela 6 junto aos parâmetros de ionização da fonte otimizados por meio da infusão, como voltagem do cone e energia de colisão.

Uma vez otimizados os parâmetros da fonte de ionização, foi realizado o acoplamento do sistema cromatográfico ao espectrômetro de massas para otimização do gradiente de separação. Devido à seletividade do detector, foi necessário apenas otimizar um gradiente que garantisse uma maior detectabilidade dos agrotóxicos analisados e possibilitasse que o equilíbrio da coluna fosse restabelecido entre injeções consecutivas, para que as janelas de retenção fossem reprodutíveis. As janelas de retenção otimizadas encontram-se na Tabela 6 e o cromatograma obtido, utilizando-se o programa de gradiente descrito no item 4.6.2, encontra-se na Figura 10.

Tabela 6: Parâmetros do LC-EM-EM otimizados para os 6 agrotóxicos estudados

agrotóxico	íon precursor	transição MRM (m/z)	voltagem do cone (V)	energia de colisão (eV)	janela de retenção (min)
aldicarbe	$[M + NH_4]^+$	208,3 $\rightarrow$ 88,5	20	20	4,6 $\pm$ 0,3
difenoconazol	$[M + H]^+$	406,3 $\rightarrow$ 251,3	40	25	9,3 $\pm$ 1,4
diflubenzurom	$[M + H]^+$	311,3 $\rightarrow$ 141,0	20	20	7,2 $\pm$ 0,5
diurom	$[M + H]^+$	233,2 $\rightarrow$ 71,5	25	20	5,4 $\pm$ 0,3
imidacloprido	$[M + H]^+$	256,3 $\rightarrow$ 175,0	20	20	4,1 $\pm$ 0,4
tiofanato metílico	$[M + H]^+$	343,3 $\rightarrow$ 151,0	20	20	4,4 $\pm$ 0,3

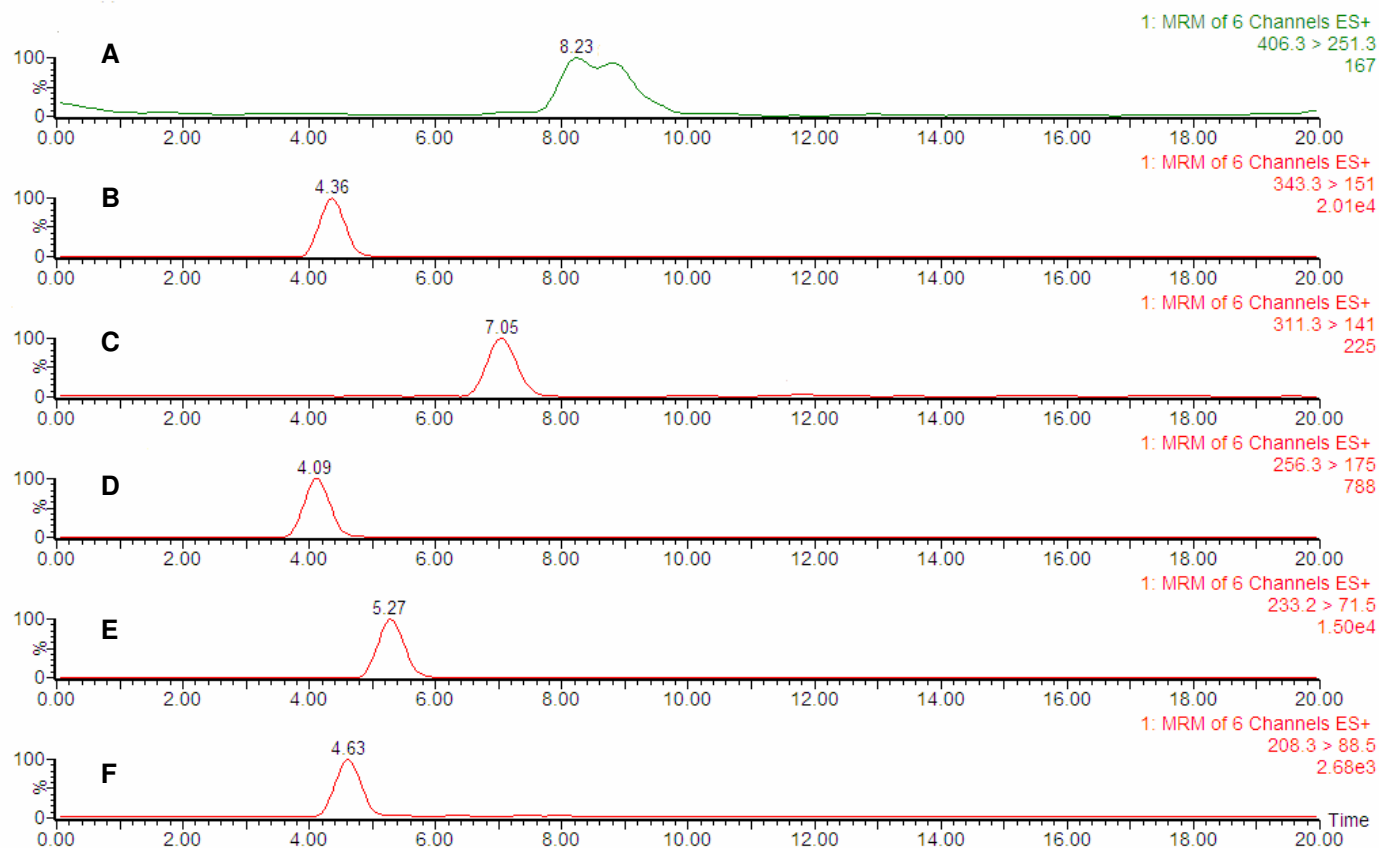


Figura 10: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) empregando-se a **CL-EM-EM**. Condições cromatográficas: volume de injeção - $10 \mu\text{L}$; coluna analítica - Nova-Pak C18 ($150 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm d.i.}$, $4 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula), Waters; coluna de guarda - Nova-PaK C18 ($20 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm d.i.}$, $4 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula); FM - solução aquosa de 3 mmol L^{-1} de formiato de amônio com $0,1\%$ de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila:água $90:10 \text{ v/v}$ (solvente B); programa de gradiente linear: $0 \text{ min} - 20:80 \text{ v}_\text{A}/\text{v}_\text{B}$, $8 \text{ min} - 80:20 \text{ v}_\text{A}/\text{v}_\text{B}$, $15 \text{ min} - 20:80 \text{ v}_\text{A}/\text{v}_\text{B}$ e mais 5 min para estabilização da coluna após o retorno às condições iniciais ($20 \text{ min} - 20:80 \text{ v}_\text{A}/\text{v}_\text{B}$); vazão - $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; as condições utilizadas no detector foram ajustadas conforme descrito no item 4.6.2. Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.

A separação cromatográfica no sistema CL-EM-EM, segundo mostrado na Figura 10, é realizada em cerca de 11 min , sendo necessário mais 9 min para o reequilíbrio da coluna às condições iniciais do gradiente, resultando em um tempo total de análise de 20 min . O

tempo total de análise obtido no sistema LC-EM-EM é semelhante ao obtido quando se utiliza a CLAE-DAD (Figura 9 B), pois, neste caso, foram necessários cerca de 14 min para a separação dos analitos e mais 6 min para o reequilíbrio da coluna às condições iniciais do gradiente. Deve-se ressaltar que a coluna analítica empregada em ambos os sistemas, CLAE-DAD e LC-EM-EM, foi a mesma.

5.1.3 – CLUE-DAD

Na Figura 11 encontra-se o cromatograma obtido pela injeção de uma solução de 0,5 mg L⁻¹ da mistura dos agrotóxicos em acetonitrila, empregando-se o programa de gradiente otimizado, conforme mostrado no item 4.6.3.

No sistema CLUE-DAD, a separação dos agrotóxicos foi realizada em, aproximadamente, 3,5 min, sendo necessários mais 3,5 min para o reequilíbrio da coluna nas condições iniciais do gradiente, resultando num tempo total de análise de 7 min. O tempo total de análise no sistema CLUE é quase 3 vezes menor que nos sistemas CLAE-DAD e LC-EM-EM (20 min), o que evidencia a capacidade desta técnica em realizar análises bem mais rápidas, sem perda de resolução e assimetria, graças à elevada eficiência de separação das colunas recheadas com partículas porosas de tamanho inferior a 2 µm e à elevada taxa de aquisição de dados dos sistemas de detecção empregados nesta técnica. Como consequência da realização de análises mais rápidas e uso de uma baixa vazão de FM houve, também, uma significativa redução no volume de FM utilizado, o qual foi 3 vezes menor que na CL-EM-EM e 10 vezes menor que na CLAE-DAD, mostrando que essa técnica cromatográfica além de proporcionar maior economia, atende aos requisitos da química verde ou limpa. O volume de amostra injetado (1 µL) também foi 10 vezes menor que o utilizado nos demais sistemas cromatográficos (10 µL).

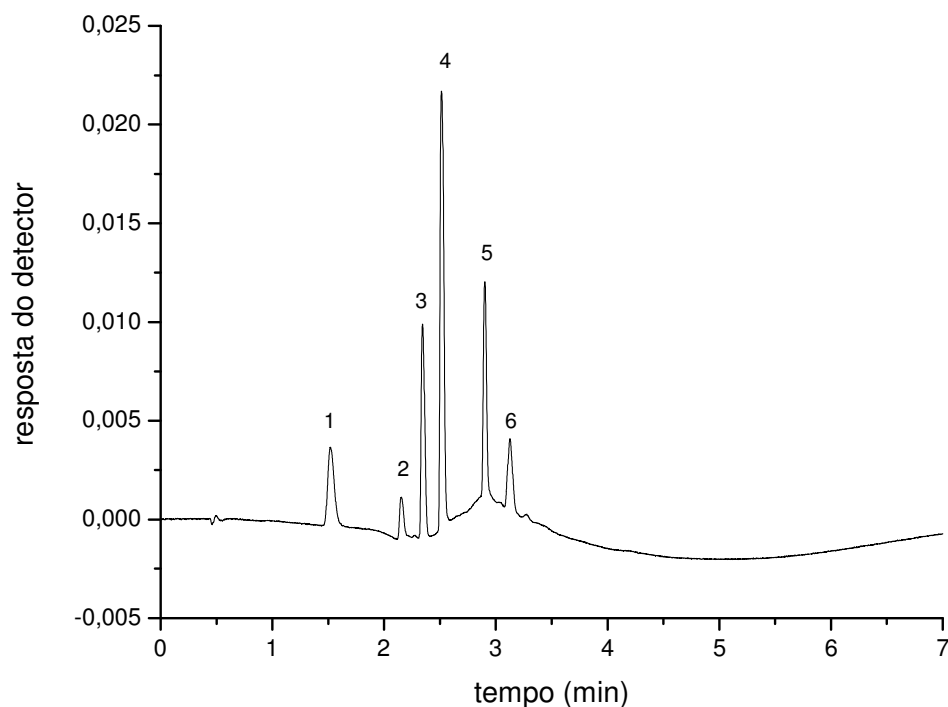


Figura 11: Cromatogramas obtidos na separação dos agrotóxicos (solução de trabalho de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) empregando-se a **CLUE-DAD**. Condições cromatográficas: volume de injeção - $1 \mu\text{L}$; coluna analítica - Acquity C18 ($50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm d.i.}$, $1,7 \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula), Waters; FM - água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min – 80:20 v_A/v_B ; 1,2 min – 70:30 v_A/v_B ; 1,6 min 50:50 v_A/v_B ; 1,9 min – 30:70 v_A/v_B ; 2,2 min – 20:80 v_A/v_B ; 6,6 min – 80:20 v_A/v_B ; vazão – $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV - 248 nm. Identificação dos picos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

5.2 - Otimização do método de preparo de amostra

A otimização do método de preparo de amostra foi realizada qualitativamente, isto é, comparando-se os cromatogramas obtidos para os extratos da amostra testemunha e para a amostra testemunha 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.

Nesta etapa, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (sistemas cromatográficos descritos no item 4.3 A e B). Uma vez otimizado o método de preparo de amostra, empregou-se, também, a LC-EM-EM e a CLUE-DAD na análise dos extratos obtidos.

5.2.1 - Extração líquido-líquido

Utilizando-se a técnica de ELL foram avaliados solventes de diferentes polaridades a fim de selecionar o de maior capacidade de extração dos agrotóxicos da matriz. Os cromatogramas obtidos utilizando-se os diferentes solventes de extração encontram-se na Figura 12.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que o acetato de etila é mais eficiente que a acetonitrila e a acetona para a extração dos agrotóxicos da matriz. Porém este solvente extrai também interferentes que coeluem com os agrotóxicos aldicarbe e tiofanato metílico, o que indica a necessidade de se realizar uma etapa de *“clean-up”* para eliminar interferentes.

5.2.2 - Extração líquido-líquido seguida de uma etapa de *“clean-up”*

A necessidade de se acrescentar uma etapa de *“clean-up”* posterior a ELL surgiu devido à co-eluição de interferentes provenientes da matriz junto aos agrotóxicos aldicarbe e tiofanato metílico. Porém, os sorventes utilizados, sílica gel e Florisil, não foram capazes de eliminar os interferentes que coeluem com os agrotóxicos, de forma que não foram obtidos melhores resultados com esta modificação realizada no procedimento de preparo das amostras por ELL.

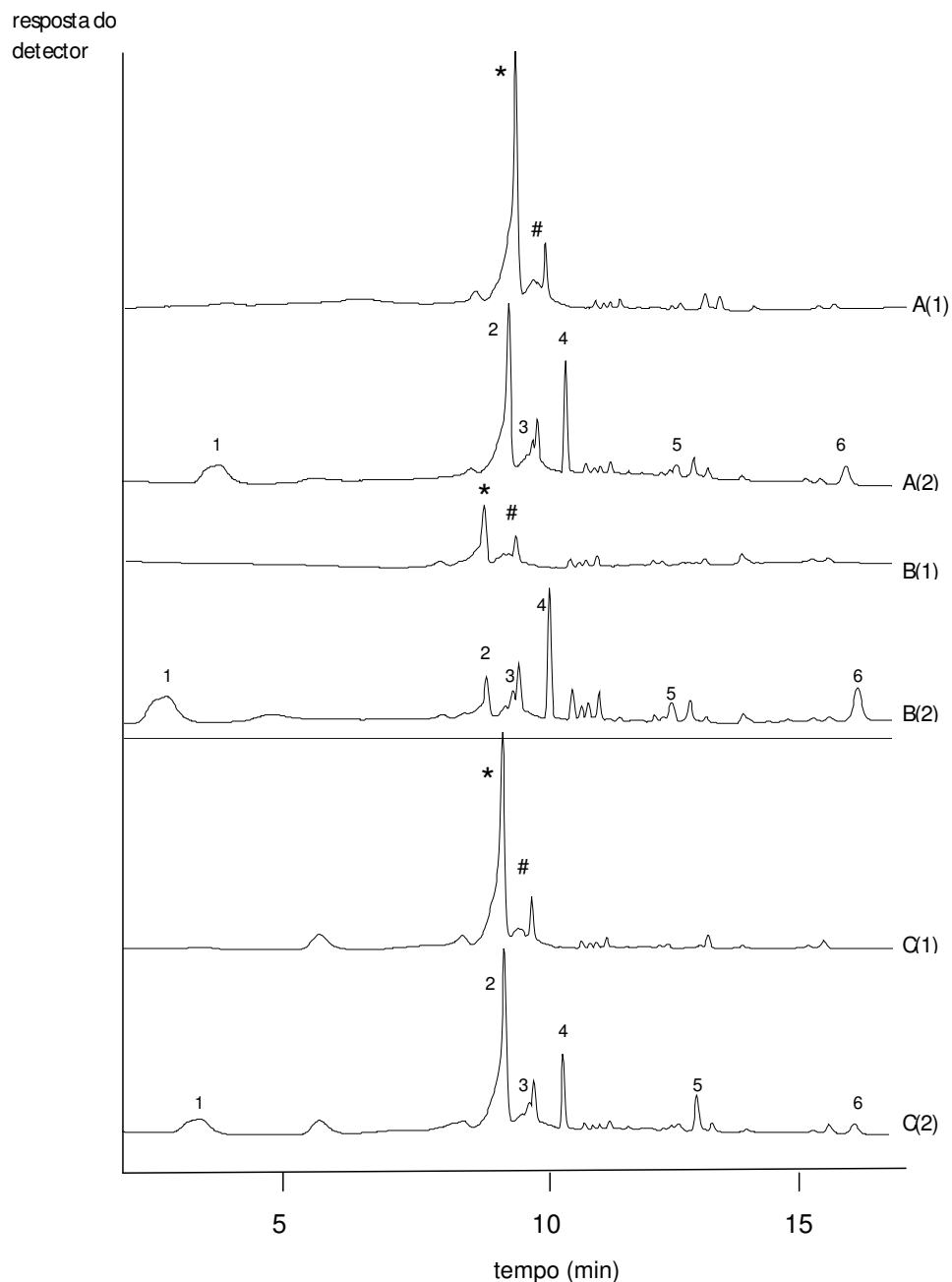


Figura 12: Cromatogramas resultantes da injeção dos extratos obtidos a partir da amostra testemunha (1) e testemunha **fortificada a 20 mg L⁻¹** (2), submetidas ao procedimento de ELL com os solventes extratores acetonitrila (A), acetato de etila (B) e acetona (C), utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 A.** Identificação dos picos dos cromatogramas: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + * interferente, 3- tiofanato metílico + # interferente, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol e 6- abamectina.

5.2.3 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero

Este método de extração foi avaliado na tentativa de eliminar a interferência da matriz na eluição dos agrotóxicos estudados, uma vez que seus autores [63] destacam que quando se realiza a partição entre a fase aquosa e a fase orgânica na ELL à temperatura reduzida ocorre uma diminuição considerável de interferentes provenientes da matriz no extrato em comparação a ELL convencional.

Inicialmente utilizaram-se misturas ternárias de solventes compostas por acetonitrila, acetato de etila e água em diferentes proporções conforme proposto pelos autores [63], as quais estão descritas no item 4.7.3 a e b. Utilizando-se estas misturas ternárias de solvente verificou-se que quanto maior a porcentagem de acetato de etila na mistura, maior a eficiência de extração. Isto já era esperado uma vez que na ELL o solvente com o qual se obtiveram melhores resultados foi o acetato de etila.

Realizou-se, então uma nova extração utilizando-se uma mistura composta apenas por água e acetato de etila (item 4.7.3 c) e com isso obtiveram-se resultados ainda melhores quanto às quantidades de agrotóxicos extraídas, mas pouco satisfatórios quanto à presença de interferentes da matriz nos extratos, conforme pode ser observado nos cromatogramas da Figura 13.

Em seguida, variou-se a porcentagem de água na composição do solvente de extração, conforme descrito nos itens 4.7.3 c, d e e, na tentativa de se obterem extratos mais limpos. Porém, verificou-se que quanto maior a porcentagem de água menor a intensidade dos picos cromatográficos, tanto dos agrotóxicos quanto dos interferentes provenientes da matriz. Ou seja, a porcentagem de água interfere apenas na recuperação e não na obtenção de extratos mais limpos. O uso de um maior volume de solvente extrator (item 4.7.3 f) também não melhorou os resultados.

Substituiu-se o acetato de etila na mistura de solventes utilizada para extração por outros solventes de polaridades semelhantes (item 4.7.3 g, h e i) buscando-se obterem extratos mais limpos e picos cromatográficos mais intensos para os agrotóxicos. Entretanto, nenhum dos solventes avaliados foi capaz de extrair da matriz todos os agrotóxicos da mistura em estudo e os extratos obtidos continham grande quantidade de interferentes.

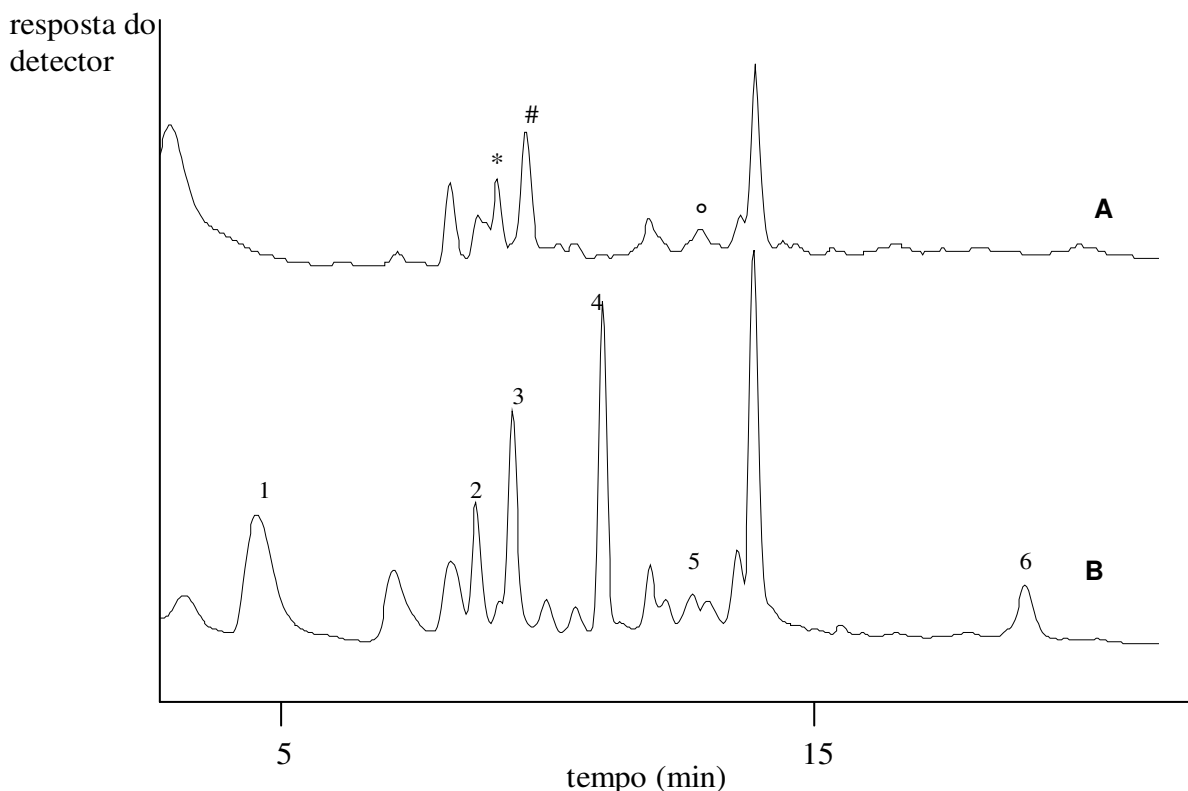


Figura 13: Cromatogramas resultantes da injeção dos extratos obtidos a partir da amostra testemunha (A) e testemunha **fortificada a 2 mg L⁻¹** (B) submetidas à ELL-TSZ com 10 mL de água:acetato de etila 1:9 v/v, utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 A.** Identificação dos picos do cromatograma (B): 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + * interferente, 3- tiofanato metílico + # interferente, 4- diflubenzurom, 5- difenoconazol + ° interferente, 6- abamectina.

5.2.4 - Extração líquido-líquido à temperatura sub-zero seguida de uma etapa de “*clean-up*”

Como a ELL-TSZ não foi capaz, por si só, de eliminar a interferência da matriz na determinação dos agrotóxicos estudados, adicionou-se ao procedimento uma etapa de “*clean-up*”. Como os interferentes observados no extrato obtido por ELL-TSZ (Figura 13) apresentam diferentes polaridades, empregou-se o cartucho OASIS HLB na etapa de “*clean-up*”, uma vez que este cartucho apresenta boa eficiência quando aplicado à extração de compostos polares e apolares.

Nos extratos obtidos verificou-se um aumento do sinal da matriz, ao contrário do que era esperado.

5.2.5 - Extração em fase sólida

Como a ELL e a ELL-TSZ, mesmo quando realizadas juntas a uma etapa de “*clean-up*”, não foram capazes de gerar extratos livres da interferência da matriz, a EFS poderia ser uma alternativa para o desenvolvimento de métodos de extração que, quando aplicados à matriz estudada, fossem capazes de gerar extratos mais limpos, simultaneamente a uma boa eficiência de extração para os agrotóxicos estudados. Desta maneira, buscaram-se na literatura procedimentos de EFS aplicados à matrizes complexas, com os quais foram obtidos bons resultados quanto à limpeza da amostra.

No procedimento proposto por Diserens e Henzelin [49] é utilizado o cartucho Supelclean LC18, o qual, aplicado à extração dos agrotóxicos em estudo neste trabalho, não foi capaz de extrair os compostos mais polares presentes na mistura, devido ao caráter apolar deste cartucho. Por isso, buscaram-se melhores resultados substituindo-se o Supelclean LC18 por cartuchos capazes de reter os compostos de caráter polar, como o ENVI-Chrom P e OASIS HLB. Porém, nenhum destes cartuchos foi capaz de extrair todos os agrotóxicos da matriz em estudo.

O procedimento de extração desenvolvido por Obana *et al.* [50] é mais complexo, por envolver uma etapa de “*clean-up*” e etapas de EFS, nas quais a eluição dos compostos adsorvidos no cartucho é controlada pela polaridade dos solventes utilizados na eluição. Este procedimento torna-se interessante no caso da matriz e dos agrotóxicos em estudo uma vez que se tem encontrado dificuldades em eliminar os interferentes provenientes da matriz e também, em reter e eluir os agrotóxicos de diferentes polaridades nos procedimentos de EFS e “*clean-up*” estudados anteriormente. Apesar do controle realizado sobre a polaridade dos solventes empregados durante o processo de EFS, verificou-se que nenhum dos agrotóxicos ficou retido no cartucho de sílica.

Miliadis *et al.* [51] desenvolveram um procedimento em que, de maneira semelhante ao procedimento desenvolvido por Obana *et al.* [50], a polaridade das misturas de solventes empregadas é utilizada para controlar a retenção e a eluição dos compostos de interesse

durante o processo de EFS. Neste caso, para verificar se efetivamente houve a retenção dos agrotóxicos no cartucho de sílica empregado na EFS, coletou-se a solução resultante da passagem do extrato contendo os agrotóxicos pelo cartucho além de se coletar a solução resultante da eluição realizada com a mistura de diclorometano:isopropanol 9:1 v/v. Os cromatogramas resultantes da injeção dessas soluções encontram-se, respectivamente, nas Figuras 14 A e 14 B.

Observando-se a Figura 14, verifica-se que houve a retenção dos agrotóxicos no cartucho de sílica e que a mistura de diclorometano e isopropanol foi capaz de eluir todos os agrotóxicos retidos no cartucho. Porém, na Figura 14 B observa-se que houve a coeluição dos agrotóxicos imidacloprido e diflubenzurom com interferentes provenientes da matriz.

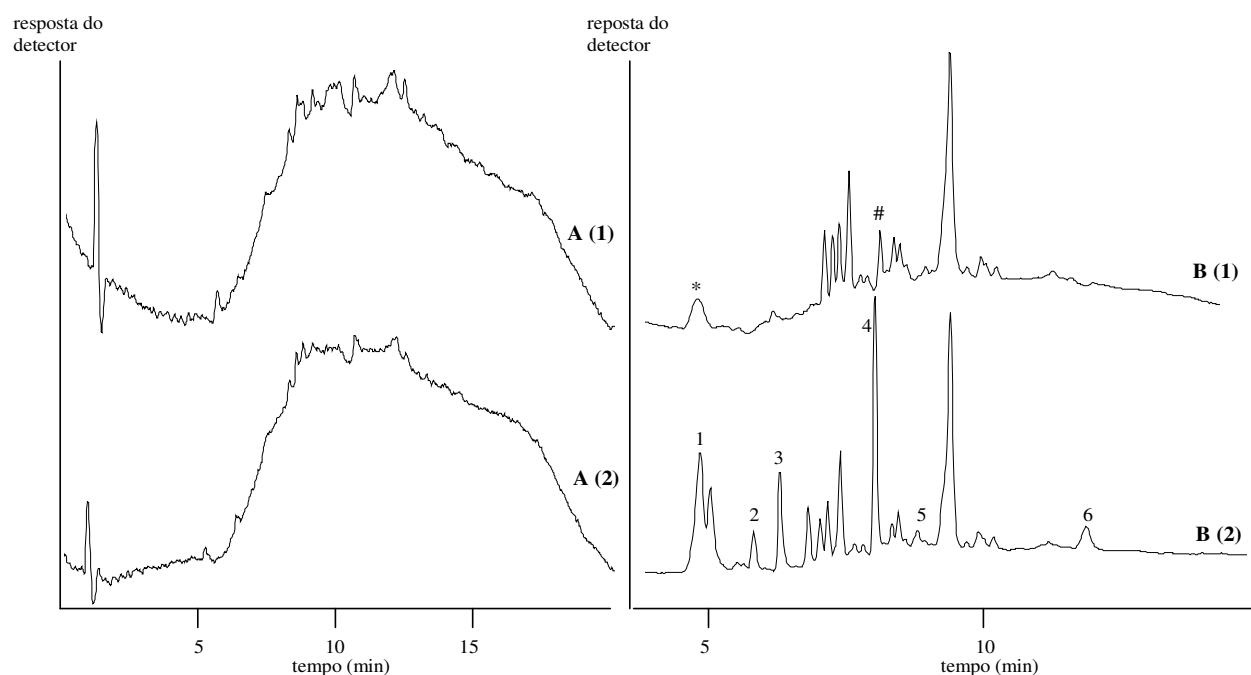


Figura 14: Cromatogramas da injeção da solução resultante da passagem do extrato contendo os agrotóxicos pelo cartucho de sílica (A) e da solução resultante da eluição dos agrotóxicos retidos no cartucho (B) obtidos a partir da amostra testemunha (1) e testemunha **fortificada a 2 mg L⁻¹** (2), segundo o procedimento de extração desenvolvido por Miliadis *et al.* [51], utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9**
A. Identificação dos picos do cromatograma (B): 1- imidacloprido + * interferente, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diflubenzurom + # interferente, 5- difenoconazol, 6- abamectina.

5.2.6 - QuEChERS modificado

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 de extração com acetonitrila com partição, utilizando-se uma mistura de sais, e outra de limpeza do extrato por EFS dispersiva, empregando um sorvente que possui aminas primárias e secundárias em sua estrutura (PSA). Esta técnica é capaz de extrair agrotóxicos altamente polares, assim como aqueles de caráter ácido e básico a partir de matrizes complexas [32].

Como não foi possível eliminar a interferência da matriz sobre o sinal cromatográfico dos agrotóxicos, mesmo quando se utilizou métodos de extração mais complexos, envolvendo várias etapas, conforme descrito nos itens 5.2.2 à 5.2.5, empregaram-se o método QuEChERS na tentativa de se obterem extratos mais limpos, com boa recuperação para os agrotóxicos e de forma mais rápida. Para a sua aplicação à matriz e aos agrotóxicos em estudo, julgou-se conveniente substituir a acetonitrila, utilizada na primeira etapa deste método de extração, por acetato de etila, uma vez que o acetato de etila mostrou-se um solvente extrator mais eficiente que a acetonitrila, conforme pôde ser observado na Figura 12. Além disso, a substituição da acetonitrila pelo acetato de etila tornou o método bem mais viável economicamente.

Na Figura 15 estão os cromatogramas dos extratos obtidos utilizando-se o método QuEChERS para as amostras testemunha e testemunha fortificada da matriz laranja Pera. Os cromatogramas apresentados na Figura 15 mostram que o método QuEChERS foi capaz de gerar extratos mais limpos que os obtidos com os métodos de extração mais complexos avaliados anteriormente (Figuras 13 e 14), embora não tenha eliminado totalmente a interferência da matriz no sinal dos analitos. Porém, simultaneamente a obtenção de extratos mais limpos, também se conseguiu uma boa recuperação dos agrotóxicos estudados com esta metodologia de extração.

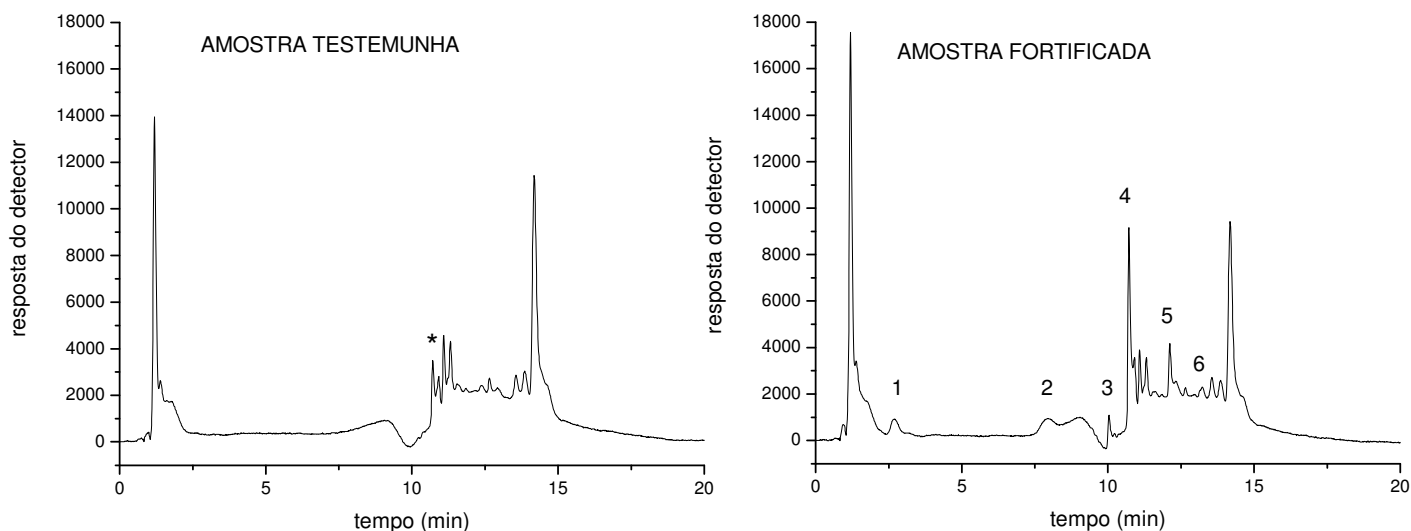


Figura 15: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para as amostras testemunha e testemunha **fortificada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$** de suco de **laranja Pera** utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 B.** Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + * interferente, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

Devido às suas características (rapidez, capacidade de extração, menor número de etapas) e aos resultados obtidos com a sua aplicação, o método QuEChERS foi escolhido como o método de extração mais apropriado para ser aplicado aos agrotóxicos de interesse na matriz em estudo neste trabalho.

Na Figura 16 estão os cromatogramas dos extratos obtidos utilizando-se o método QuEChERS para amostras testemunha e testemunha fortificada da matriz tangerina Murcote, os quais indicam que para esta matriz também foram conseguidos resultados adequados quanto à recuperação dos agrotóxicos e à interferência da matriz.

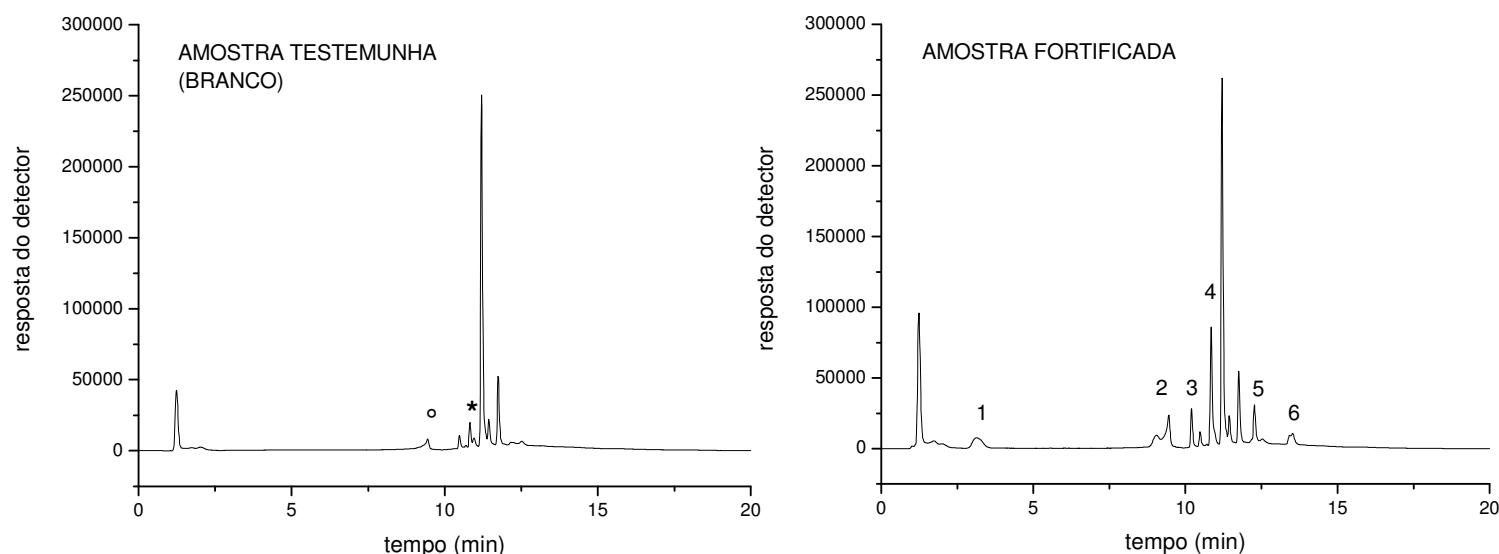


Figura 16: Cromatogramas dos extratos obtidos pelo método QuEChERS para as amostras testemunha e testemunha **fortificada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$** de suco de **tangerina Murcote** utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 B**. Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe + ° interferente, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + * interferente da matriz, 5 diflubenzurom e 6 – difenoconazol.

Na Figura 17 está o cromatograma obtido para uma amostra, preparada da mesma forma, mas excluindo-se a matriz e os analitos, denominada *branco* ou *amostra branco*. O preparo da amostra branco é necessário para identificar interferentes provenientes dos solventes, vidrarias, reagentes, etc. [103]. No caso da metodologia estudada, segundo o cromatograma da Figura 17, este tipo de interferência não foi identificado.

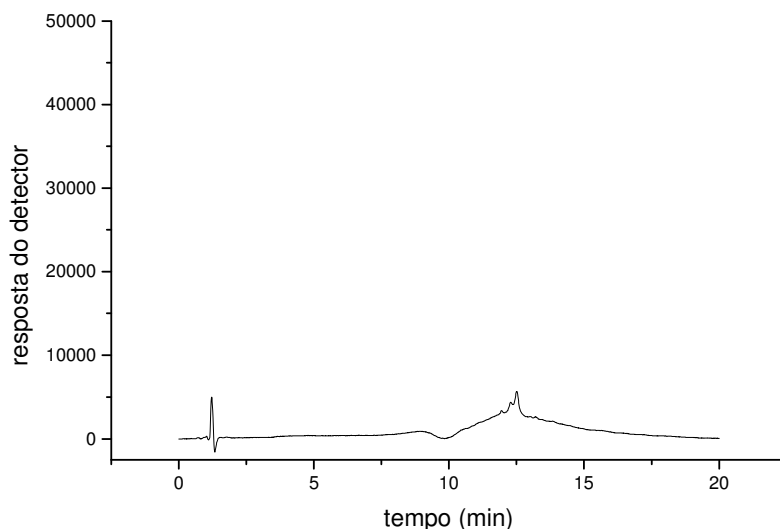


Figura 17: Cromatograma do extrato obtido pelo método QuEChERS para o branco (livre da matriz e dos compostos de interesse) utilizando-se a **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 B.**

5.2.6.a - QuEChERS modificado combinado à LC-EM-EM

Nas Figuras 18 e 19 estão os cromatogramas obtidos para os extratos do suco fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ das amostras testemunhas de laranja Pera e de tangerina Murcote, respectivamente, obtidos pelo método QuEChERS modificado. Os cromatogramas mostram que, mesmo na presença da matriz, foi possível detectar os agrotóxicos pelas transições selecionadas no modo de varredura MRM, empregando-se as condições otimizadas para o ajuste do espectrômetro de massas descritas no item 5.1.2.

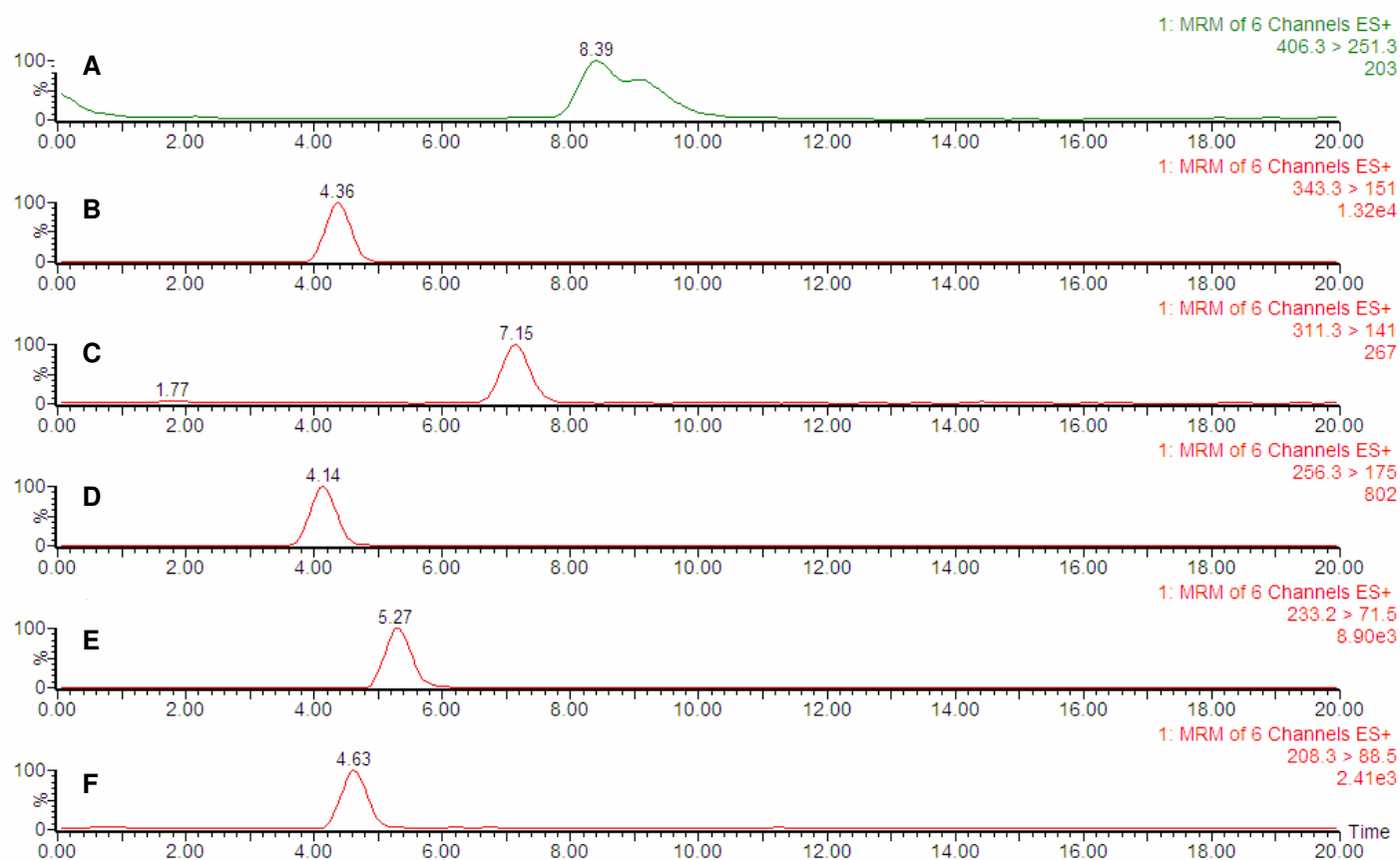


Figura 18: Cromatogramas dos íons obtidos pela injeção do extrato do suco **fortificado em 100 µg L⁻¹** das amostras testemunhas de **laranja Pera** obtido pelo método QuEChERS, utilizando-se a **CL-EM-EM**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 10.** Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.

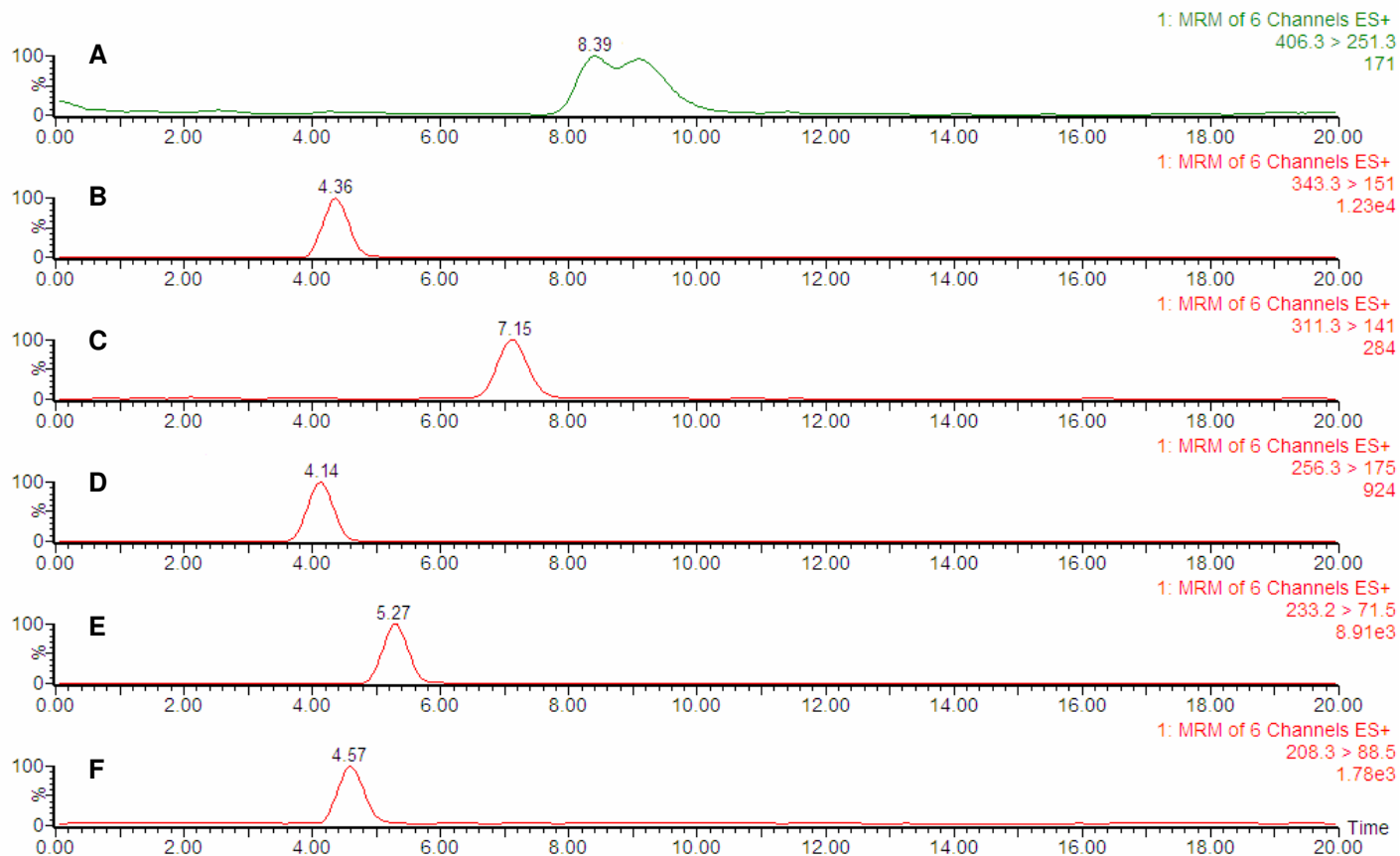


Figura 19: Cromatogramas dos íons obtidos pela injeção do extrato do suco **fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** das amostras testemunhas de **tangerina Murcote** obtido pelo método QuEChERS, utilizando-se a **CL-EM-EM**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 10**. Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.

5.2.6.b - QuEChERS modificado combinado à CLUE-DAD

Na Figura 20 estão os cromatogramas obtidos utilizando-se CLUE com detecção por DAD associada ao método QuEChERS empregado na obtenção dos extratos do suco das amostras testemunhas e do suco fortificado das amostras testemunhas de laranja Pera. Os cromatogramas apresentados na Figura 20 mostram que, na CLUE-DAD, ocorreu a eluição

de interferentes da matriz junto aos agrotóxicos. Isto já era esperado, pois o método de detecção empregado na CLUE foi a detecção por DAD, assim como na CLAE.

Porém, a CLUE pode ser considerada vantajosa quando comparada à CLAE, se forem consideradas a rapidez e a eficiência com que são realizadas as análises por CLUE. Estas características da CLUE, quando associadas às características do método QuEChERS de preparo de amostras (rapidez, capacidade de extração, menor número de etapas), levam à obtenção de um método extremamente rápido de determinação de resíduos de agrotóxicos.

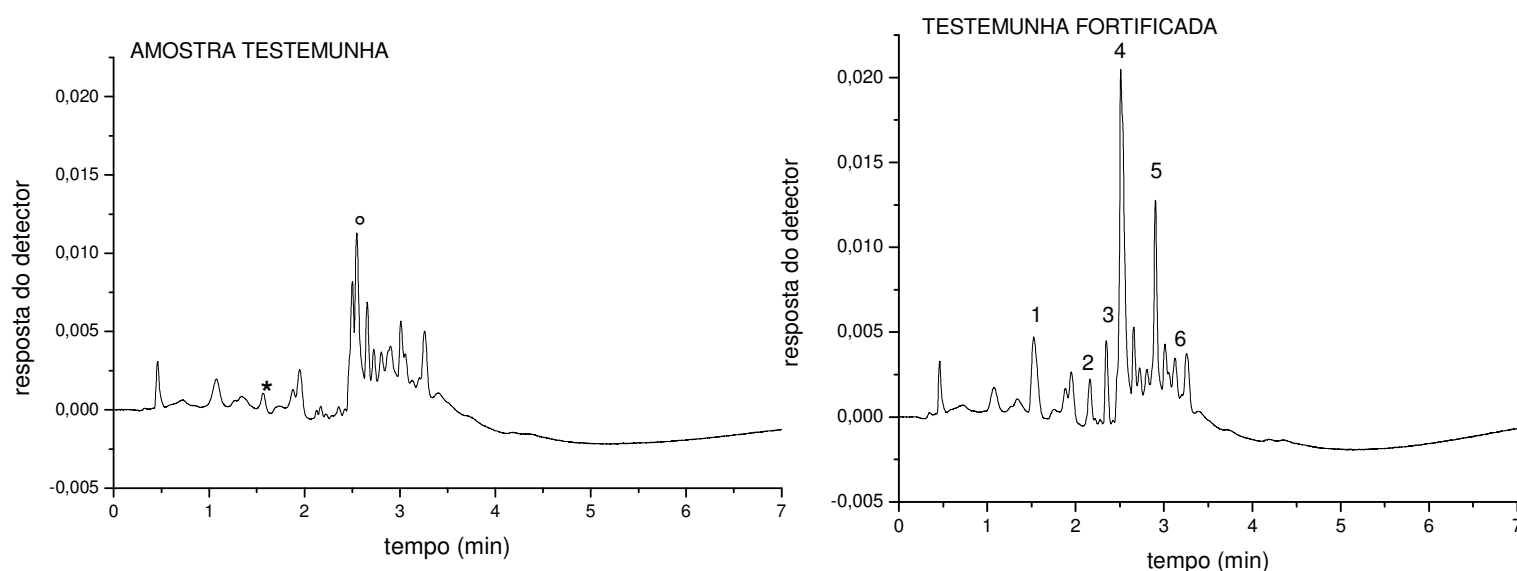


Figura 20: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para o suco das amostras testemunhas e para o suco **fortificado a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$** das amostras testemunhas de **laranja Pera**, utilizando-se a **CLUE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 11.** Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido + * interferente, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom + ° interferente, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

A CLUE não foi empregada na análise de extratos de suco de tangerina Murcote, pois, quando foram realizadas as análises empregando-se a CLUE-DAD, a tangerina Murcote encontrava-se fora do período de safra.

Na Figura 21 está o cromatograma obtido para a amostra branco, ou seja, preparada da mesma forma que as amostras testemunhas, mas excluindo-se a matriz e os analitos. No

caso da metodologia estudada, segundo o cromatograma da Figura 21, não foram identificados interferentes provenientes dos solventes, vidrarias, reagentes, etc. [103].

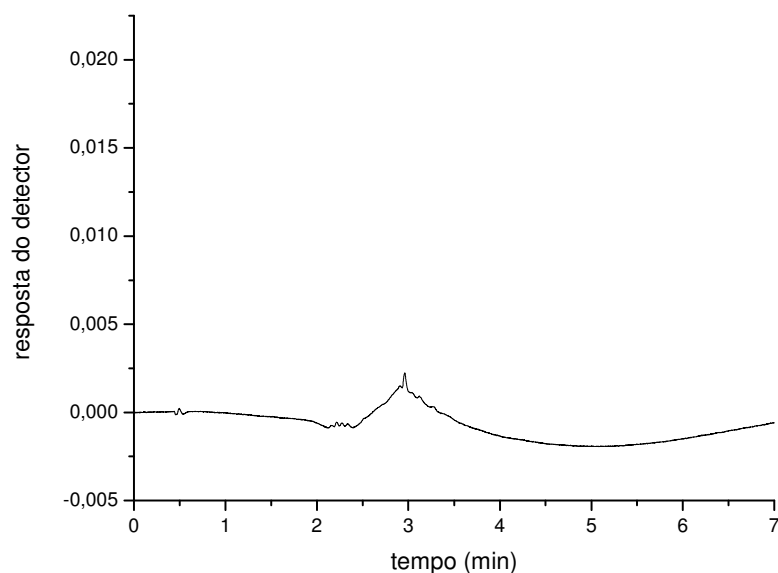


Figura 21: Cromatograma do extrato obtido pelo método QuEChERS para o branco (livre da matriz e dos compostos de interesse), utilizando-se **CLUE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 11.**

5.3 - Validação dos métodos

Foram validados os métodos empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (sistema cromatográfico descrito no item 4.3 B) a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (sistema cromatográfico descrito no item 4.3 C) e a cromatografia líquida de ultra eficiência (sistema cromatográfico descrito no item 4.3 D).

A validação do método utilizando-se a CLUE-DAD foi realizada somente para a matriz suco de laranja Pera, uma vez que, quando foi realizada esta etapa do trabalho, a tangerina Murcote encontrava-se fora do período de safra.

5.3.1 - CLAE-DAD

5.3.1.a - Seletividade

No desenvolvimento de métodos envolvendo a análise de vários compostos presentes em uma matriz complexa por CLAE-DAD, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou a coeluição de interferentes com os compostos de interesse. Comparando-se os cromatogramas obtidos para os extratos do suco das amostras testemunhas, do suco fortificado com os agrotóxicos das amostras testemunhas e o branco (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente) pode-se afirmar que o método desenvolvido para a determinação dos seis agrotóxicos é seletiva para cinco deles na matriz de suco de laranja Pera, pois houve a coeluição de interferentes no mesmo tempo de retenção do diurom e para 4 deles na matriz de suco de tangerina Murcote, já que nesta matriz além do diurom ocorreu também a coeluição do aldicarbe com interferente da matriz.

Apesar de ter ocorrido a eluição de interferentes da matriz nos mesmos tempos de retenção de alguns dos agrotóxicos estudados, a metodologia foi considerada aceitável, para fins quantitativos, uma vez que, mesmo quando as matrizes foram fortificadas com os agrotóxicos em concentrações equivalentes aos seus limites de quantificação, o sinal dos interferentes da matriz sobre os picos dos agrotóxicos foi menor que 20 % [100].

Além da comparação entre a amostra testemunha e amostra testemunha fortificada, pode-se avaliar a seletividade pela pureza do pico cromatográfico, isto é, comparando-se o espectro no UV obtido para o padrão do agrotóxico puro com o espectro de absorção no UV obtido no início, no meio e no fim do pico cromatográfico do agrotóxico na amostra. Por meio dessa comparação, foi confirmada a seletividade do método para apenas cinco dos seis agrotóxicos analisados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diflubenzurom e difenoconazol) na matriz de suco de laranja Pera, uma vez que, para o diurom, apenas no ponto central do pico, o espectro obtido correspondeu ao espectro do padrão puro deste agrotóxico. Já na matriz de suco de tangerina Murcote, o método foi seletivo apenas para quatro dos seis agrotóxicos estudados, pois para diurom e para o aldicarbe, o espectro obtido correspondeu ao do padrão puro no início e no meio dos picos destes compostos.

5.3.1.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas as curvas analíticas a partir de padrões puros dos agrotóxicos, ou seja, por padronização externa sem superposição de matriz e a partir da adição dos padrões no extrato da matriz, ou seja, padronização externa com superposição de matriz, as quais se encontram na Figura 22. Com base nas curvas analíticas da Figura 22 verificou-se que a reta obtida pelo método de padronização externa com superposição de matriz não é paralela à reta obtida quando se utilizou padronização externa sem superposição de matriz para os agrotóxicos aldicarbe e diurom. Esta constatação indica que há a necessidade do uso do método de superposição da matriz para a quantificação dos agrotóxicos, para corrigir efeitos da matriz provocados por interferentes coextraídos.

A partir das curvas analíticas construídas foram obtidas as equações de reta e os coeficientes de correlação (r) que se encontram descritos nas Tabelas 7 e 8 para o método de padronização externa sem e com superposição de matriz, respectivamente. Todos os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método e estão de acordo com as normas da ANVISA [100].

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentados, também, os valores extremos obtidos para os resíduos estatísticos, sendo que os demais valores estão distribuídos nessa faixa de forma aleatória como exemplificado na Figura 23, para o agrotóxico tiofanato metílico, ao se utilizar a padronização externa sem superposição de matriz. Através dos gráficos dos resíduos estatísticos confirmaram-se as baixas dispersões dos resultados para todos os agrotóxicos estudados e verificou-se que eles não apresentaram nenhuma tendência, o que confirmou a linearidade. Verificou-se também que houve uma menor variação dos resíduos quando se empregou a padronização externa com superposição de matriz do que quando se utilizou a padronização externa sem superposição de matriz.

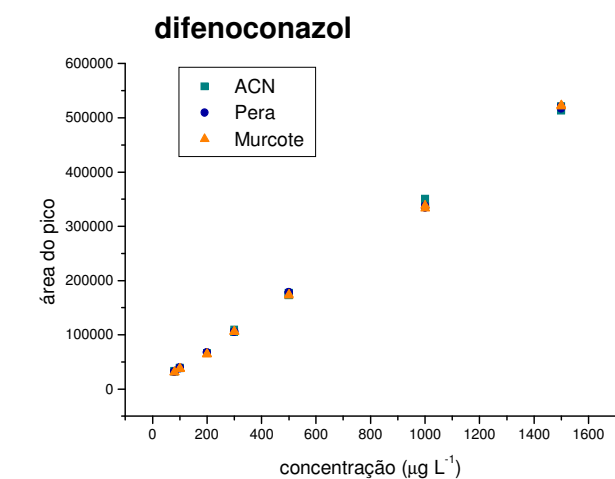
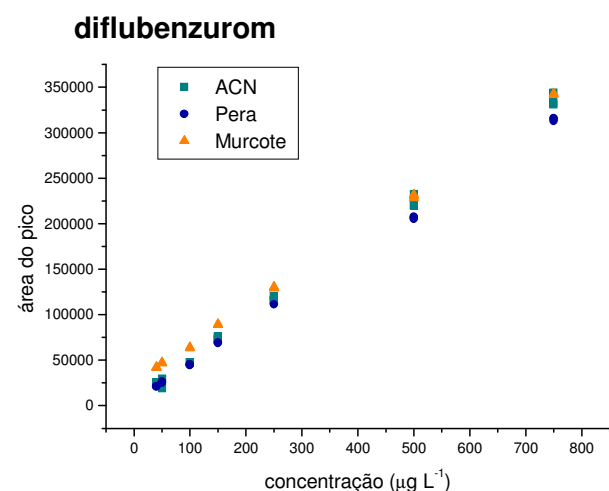
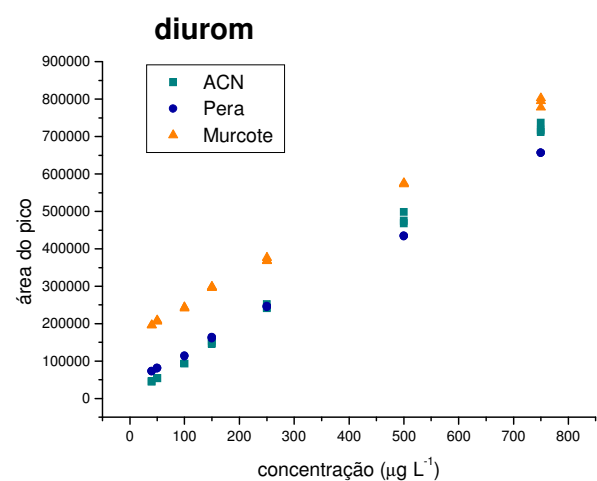
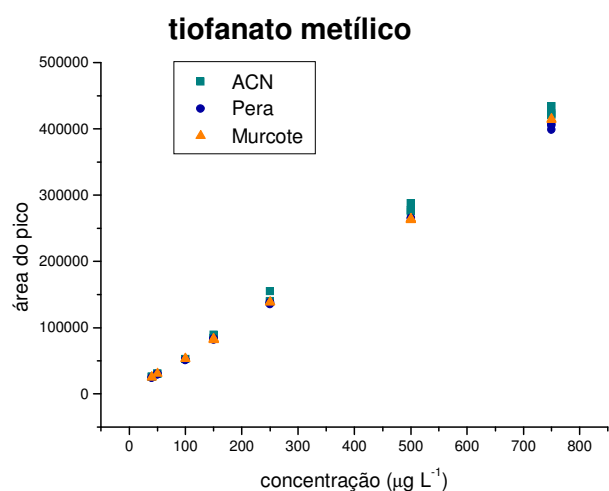
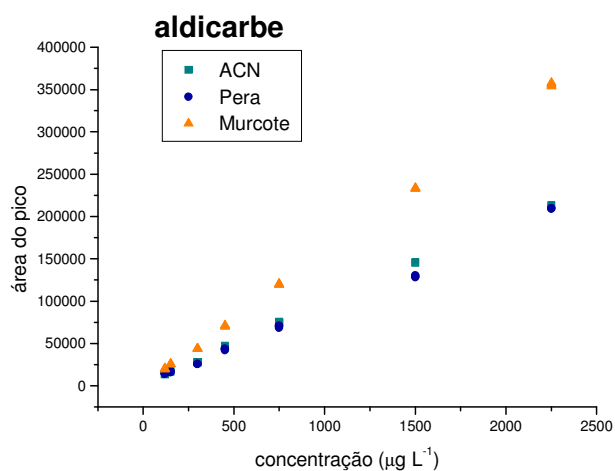
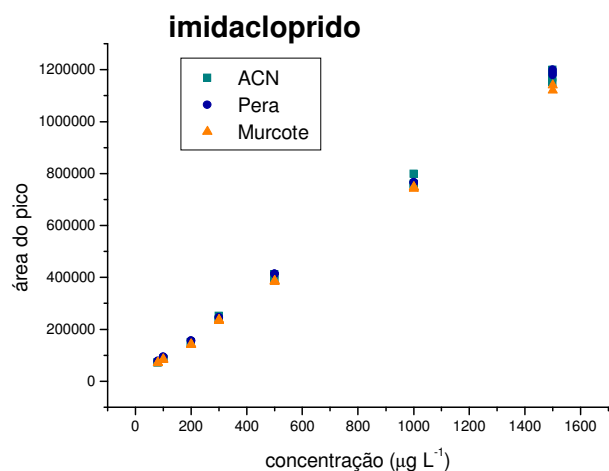


Figura 22: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (para as matrizes de suco de laranja Pera e tangerina Murcote) utilizando **CLAE-DAD**.

Tabela 7: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CLAE-DAD**.

agrotóxico	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 5377 + 776 x$	0,999	-697 à +766
aldicarbe	$y = 2602 + 94 x$	0,999	-863 à +475
tiofanato metílico	$y = 1042 + 564 x$	0,999	-289 à +235
diurom	$y = 4267 + 956 x$	0,999	-96 à +130
diflubenzurom	$y = 6007 + 439 x$	0,999	-196 à +259
difenoconazol	$y = 3049 + 341 x$	0,999	-467 à +781

Tabela 8: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CLAE-DAD**.

agrotóxico	suco de laranja Pera			suco de tangerina Murcote		
	equação da reta	r	resíduos	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 10287 + 779 x$	0,999	-17 à +31	$y = 6308 + 746 x$	0,999	-8 à +20
aldicarbe	$y = 1419 + 90 x$	0,998	-63 à +81	$y = 67 + 157 x$	0,999	-179 à +21
tiofanato metílico	$y = 1096 + 544 x$	0,999	-10 à +18	$y = 1782 + 533 x$	0,999	-4 à +7
diurom	$y = 37627 + 816 x$	0,999	-9 à +14	$y = 163869 + 833x$	0,999	-10 à +6
diflubenzurom	$y = 5550 + 410 x$	0,999	-8 à +10	$y = 24253 + 421 x$	0,999	-7 à +11
difenoconazol	$y = 3168 + 341 x$	0,999	-13 à +23	$y = 527 + 344 x$	0,999	-17 à +23

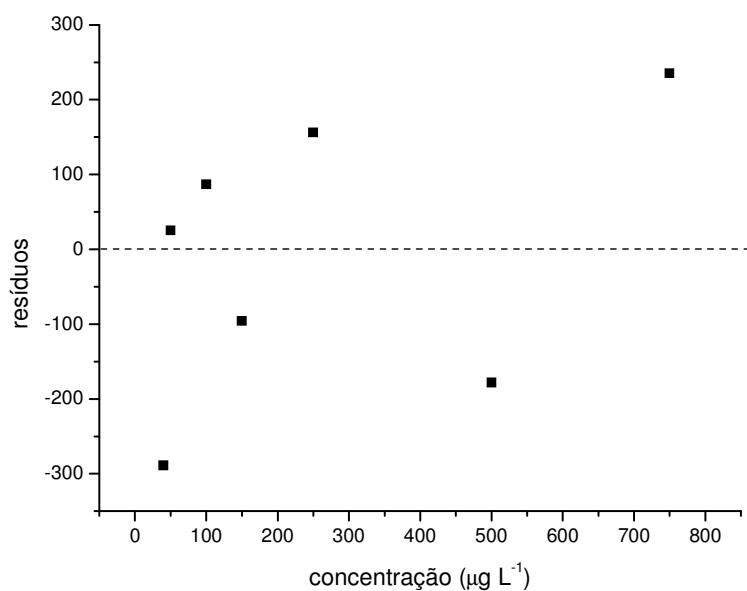


Figura 23: Gráfico dos resíduos estatísticos determinados para o agrotóxico tiofanato metílico.

Na Tabela 9 são apresentadas as faixas lineares de trabalho, que foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado. 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, como demonstrado na Figura 24 para o agrotóxico tiofanato metílico. Os limites de detecção e quantificação descritos na Tabela 9 foram obtidos pelo método da razão sinal/ruído. Os valores de LD_i e LQ_i mostram que os agrotóxicos estudados têm boa detectabilidade no sistema cromatográfico e, levando-se em consideração que os agrotóxicos foram concentrados 10 vezes no método de preparo de amostra desenvolvido, os valores de LQ_M obtidos foram satisfatórios para a análise destes agrotóxicos nas matrizes estudadas, pois atendem aos LMR impostos pela legislação [108, 110, 111].

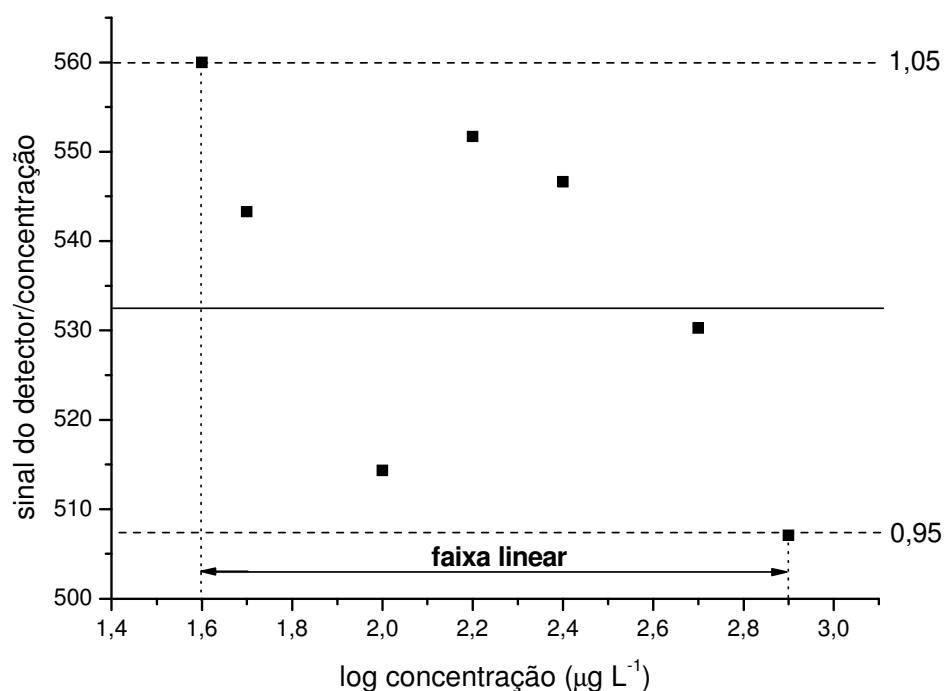


Figura 24: Gráfico da razão entre a resposta do detector e a concentração versus o log da concentração obtido para a determinação da faixa linear de trabalho para o agrotóxico tiofanato metílico.

Tabela 9: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_i e LQ_i) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando **CLAE-DAD**.

agrotóxico	faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	sucos de laranja Pera e tangerina Murcote		
		LD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_M ($\mu\text{g L}^{-1}$)
imidacloprido	80 – 1500	30	100	10
aldicarbe	120 – 2250	45	150	15
tiofanato metílico	40 – 750	15	50	5
diurom	40 – 750	15	50	5
diflubenzurom	40 – 750	15	50	5
difenoconazol	80 – 1500	30	100	10

5.3.1.c - Exatidão e precisão

A exatidão do método desenvolvido 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 [102] e pela ANVISA [100]. Os resultados dos ensaios de recuperação apresentados nas Tabelas 10 e 11 encontram-se dentro do intervalo permitido para amostras complexas [103, 107] para os três níveis de concentração em ambas as matrizes.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em 3 dias consecutivos para verificar se o método desenvolvido apresenta o mesmo comportamento quando mudam algumas variáveis como temperatura, umidade, fase móvel, entre outras. Tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária, determinada em três dias consecutivos, foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 15% (Tabelas 10 e 11), comprovando que o método é repetitivo não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece constante mesmo com a mudança de algumas variáveis.

Tabela 10: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando **CLAE-DAD**.

agrotóxico	recuperação (%)			repetitividade (% CV)			precisão intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	106	93	95	0,7	0,6	2,8	0,8	2,8	5,4
aldicarbe	113	88	94	1,6	1,5	0,3	3,7	4,7	0,4
tiofanato metílico	106	95	79	2,3	0,6	1,5	2,6	1,4	1,4
diurom	118	95	97	0,7	3,7	1,0	4,1	3,9	1,1
diflubenzurom	124	98	102	4,0	1,0	2,3	5,3	1,6	2,7
difenoconazol	123	93	104	4,3	6,4	1,1	4,1	7,4	4,5

F1 = 1 x LQ; F2 = 2 x LQ; F3 = 10 x LQ

Tabela 11: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de tangerina Murcote, utilizando **CLAE-DAD**.

agrotóxico	recuperação (%)			repetitividade (% CV)			precisão intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	115	89	102	1,5	2,0	0,1	1,7	0,7	0,2
aldicarbe	106	95	110	2,8	1,4	0,7	3,7	2,9	5,3
tiofanato metílico	104	100	98	6,0	0,9	1,4	5,9	1,2	2,0
diurom	128	98	93	2,7	1,7	2,9	3,1	2,8	3,1
diflubenzurom	92	74	100	14,5	5,5	3,2	15	1,3	3,0
difenoconazol	125	90	97	7,3	2,5	0,8	6,9	4,0	1,0

F1 = 1 x LQ; F2 = 2 x LQ; F3 = 10 x LQ

5.3.1.d - Robustez

O método desenvolvido utilizando-se CLAE-DAD pode ser considerado robusto por não ter sido afetado quando pequenas mudanças, como variações no pH da fase móvel em $\pm 0,05$ e variações na temperatura da coluna de $\pm 2^\circ\text{C}$ foram introduzidas.

5.3.2 - CL-EM-EM

5.3.2.a - Seletividade

Conforme mostrado no item 5.1.2, foram selecionadas as transições entre o íon precursor e o respectivo íon produto de maior intensidade dos agrotóxicos estudados, para que pudesse ser realizada a identificação e a quantificação destes agrotóxicos com base nestas transições. Isto, porque, o sinal gerado pelo detector em CL-EM-EM, quando se empregou a varredura MRM, corresponde às transições selecionadas, que devem ser específicas de cada agrotóxico estudado.

No caso dos agrotóxicos estudados neste trabalho, todos apresentaram íons precursores, assim como íons produtos distintos uns dos outros, o que assegura seletividade ao método.

Outra forma de verificar se o método de análise com detecção por EM-EM é seletivo, é analisando-se se os espectros de massas obtidos na janela de retenção de cada um dos agrotóxicos apresentam intensidade de cerca de 100% para os íons produto monitorados [104]. Quando injetados os extratos do suco fortificado das amostras testemunhas de laranja Pera e tangerina Murcote, obtidos pelo método QuEChERS, no sistema CL-EM-EM (Figuras 18 e 19), os espectros de massas, dentro das janelas de retenção dos agrotóxicos, apresentaram íons produto com 100% de intensidade. Isto mostra que, mesmo na presença da matriz, não foram obtidos sinal de falso positivo, ou seja, o sinal obtido é gerado apenas pelos agrotóxicos, mas não por interferentes provenientes das matrizes estudadas. Desta maneira, o método pode ser considerado seletivo.

5.3.2.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas as curvas analíticas a partir de padrões puros dos agrotóxicos, ou seja, por padronização externa sem superposição de matriz e a partir da adição dos padrões no extrato da matriz, ou seja, padronização externa com superposição de matriz, as quais se

encontram na Figura 25. Com base nas curvas analíticas da Figura 25 verificou-se que a reta obtida pelo método de padronização externa com superposição de matriz não é paralela à reta obtida quando se utilizou padronização externa sem superposição de matriz para alguns dos agrotóxicos estudados. Estes desvios observados nas retas obtidas 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 [23]. Desta maneira, para corrigir os efeitos da matriz sobre os sinais dos analitos, foi utilizado o método de padronização com superposição 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) que se encontram descritos nas Tabelas 12 e 13, para o método de padronização externa sem e com superposição de matriz, respectivamente. 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 [100].

Os valores extremos obtidos para os resíduos estatísticos estão descritos, também, nas Tabelas 12 e 13. Os demais valores obtidos para os resíduos estatísticos estão distribuídos, aleatoriamente, dentro da faixa apresentada e não apresentam nenhuma tendência, o que confirma a baixa dispersão dos resultados e a linearidade das curvas obtidas.

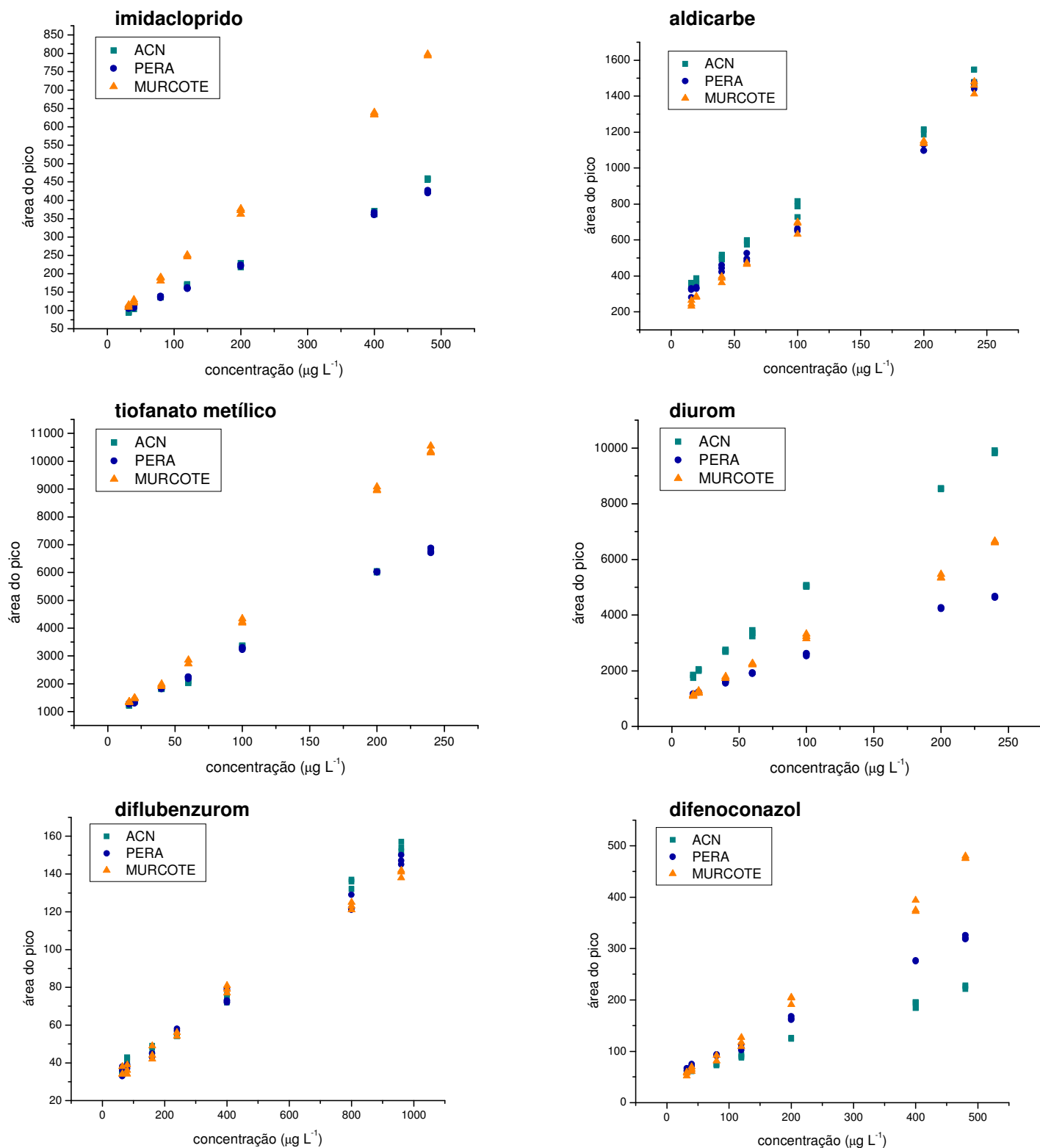


Figura 25: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (para as matrizes de sucos de laranja Pera e tangerina Murcote) utilizando **CL-EM-EM**.

Tabela 12: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CL-EM-EM**.

agrotóxico	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 71,4 + 0,8 x$	0,998	-25 à +2
aldicarbe	$y = 281,9 + 4,9 x$	0,996	-57 à +35
tiofanato metílico	$y = 772,7 + 25,5 x$	0,998	-227 à +260
diurom	$y = 1280 + 36,1 x$	0,999	-94 à +163
diflubenzurom	$y = 25,9 + 0,1 x$	0,997	-32 à +29
difenoconazol	$y = 48,6 + 0,4 x$	0,998	-15 à +6

Tabela 13: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CL-EM-EM**.

agrotóxico	suco de laranja Pera			suco de tangerina Murcote		
	equação da reta	r	resíduos	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 80,9 + 0,7 x$	0,999	-2 à +57	$y = 66,7 + 1,5 x$	0,999	-24 à +8
aldicarbe	$y = 221,9 + 4,8 x$	0,992	-74 à +82	$y = 166,8 + 5,1 x$	0,997	-54 à +59
tiofanato metílico	$y = 808,7 + 25,2 x$	0,999	-361 à +454	$y = 438,3 + 41,6 x$	0,998	-382 à +239
diurom	$y = 938,0 + 16,0 x$	0,998	-126 à +114	$y = 770,4 + 23,9 x$	0,999	-183 à +104
diflubenzurom	$y = 26,7 + 0,1 x$	0,998	-8 à +24	$y = 27,5 + 0,1 x$	0,998	-2 à +16
difenoconazol	$y = 45,8 + 0,6 x$	0,999	-105 à +143	$y = 18,1 + 0,93 x$	0,997	-10 à +27

Na Tabela 14 são apresentadas as faixas lineares de trabalho, que foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado. 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.

Os limites de detecção e quantificação descritos na Tabela 14 foram obtidos pelo método da razão sinal/ruído. Os valores de LD_1 e LQ_1 mostram que os agrotóxicos estudados tem boa detectabilidade no sistema CL-EM-EM. Estes valores de LD_1 e LQ_1 são bem menores que os valores obtidos no sistema CLAE-DAD (Tabela 9), o que comprova que há um aumento da detectabilidade dos métodos cromatográficos quando acoplados à EM-EM.

Como os agrotóxicos foram concentrados 10 vezes no método de preparo de amostra desenvolvido, os valores de LQ_M obtidos são bem menores que os LMR impostos pela legislação [108, 110, 111]. Para o tiofanato metílico, por exemplo, o LQ_M é 25000 vezes

menor que o seu LMR determinado pela ANVISA ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) [108] e 2500 vezes menor que o seu LMR determinado pela FDA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) [110].

A obtenção de valores pequenos de LQ_M com a LC-EM-EM pode ser considerada vantajosa, uma vez que têm sido determinados LMR cada vez menores pelas agências reguladoras [42]. Porém, alguns agrotóxicos apresentam LMR elevados para algumas matrizes, como é o caso do LMR do tiofanato metílico na matriz laranja ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) [108].

Desta maneira, o método para análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de laranja Pera e tangerina Murcote empregando-se a CL-EM-EM foi validado para concentrações a partir de 10 vezes os limites de quantificação obtidos para os agrotóxicos estudados, para que fosse possível avaliar o método em uma faixa de concentrações dos agrotóxicos mais próximas do LMR e também dos LQ obtidos quando se utilizou a detecção por DAD.

Tabela 14: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_I e LQ_I) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando **CL-EM-EM**.

agrotóxico	faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	sucos de laranja Pera e tangerina Murcote		
		LD_I ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_I ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_M ($\mu\text{g L}^{-1}$)
imidacloprido	3,2 – 480	1,2	4	0,4
aldicarbe	1,6 – 240	0,6	2	0,2
tiofanato metílico	1,6 – 240	0,6	2	0,2
diurom	1,6 – 240	0,6	2	0,2
diflubenzurom	6,4 – 960	2,4	8	0,8
difenoconazol	3,2 – 480	1,2	4	0,4

5.3.2.c - Exatidão e precisão

A exatidão do método desenvolvido foi determinada por meio de ensaios de recuperação, conforme sugerido pela ICH [102] e pela ANVISA [100]. Os resultados dos ensaios de recuperação apresentados nas Tabelas 15 e 16 encontram-se entre 83% e 119% para a matriz de suco de laranja Pera e entre 81% e 118% para a matriz de suco de tangerina Murcote. Estes valores de recuperação encontram-se dentro do intervalo sugerido para amostras complexas [107].

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas, sendo que a precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em 3 dias consecutivos. Foram obtidos coeficientes de variação menores que 7,5 e 14,3% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, na matriz de suco de laranja Pera (Tabela 15). Na matriz de suco de tangerina Murcote, foram obtidos valores de coeficiente de variação menores que 10,3 e 12,6% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente (Tabela 16). A obtenção de coeficientes de variação menores que 15% mostra que o método é repetitivo e reprodutível [103].

Tabela 15: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando **CL-EM-EM**.

agrotóxico	recuperação (%)			repetitividade (% CV)			precisão intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	101	95	107	2,7	2,7	4,1	1,4	2,8	2,7
aldicarbe	96	104	86	1,0	0,8	2,3	6,6	0,8	4,6
tiofanato metílico	107	100	100	3,7	3,0	0,4	4,0	0,9	0,8
diurom	97	97	92	3,2	2,1	5,1	6,9	1,6	4,0
diflubenzurom	115	119	101	7,5	2,2	1,8	14,3	12,0	1,9
difenoconazol	83	106	95	2,0	4,1	4,9	13,4	4,2	0,8

F1 = 10 x LQ; F2 = 20 x LQ; F3 = 100 x LQ

Tabela 16: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de tangerina Murcote, utilizando **CL-EM-EM**.

agrotóxico	recuperação (%)			repetitividade (% CV)			precisão intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	100	102	98	1,3	4,2	4,6	3,9	2,0	0,7
aldicarbe	96	81	96	10,3	3,2	1,4	7,9	7,2	2,2
tiofanato metílico	100	109	100	3,0	0,4	0,2	1,9	4,2	2,6
diurom	105	102	100	3,7	1,6	0,2	4,0	3,2	0,3
diflubenzurom	104	118	101	9,6	4,7	3,0	10,0	12,6	4,5
difenoconazol	99	103	91	5,0	1,8	6,0	4,0	1,3	5,2

F1 = 10 x LQ; F2 = 20 x LQ; F3 = 100 x LQ

5.3.2.d - Robustez

O método desenvolvido utilizando-se CL-EM-EM pode ser considerado robusto por não ter sido afetado quando variações de $\pm 0,05$ no pH da fase móvel, pequenas variações na temperatura da coluna, na fonte de ionização e na vazão do gás de dessolvatação foram introduzidas.

5.3.3 – CLUE-DAD

5.3.3.a - Seletividade

Quando são utilizados métodos cromatográficos com detecção por DAD para o desenvolvimento de métodos envolvendo a análise de vários compostos presentes em uma matriz complexa, o método pode ser considerado seletivo quando não há sobreposição de picos ou a coeluição de interferentes com os compostos de interesse [104].

Desta maneira, foi possível verificar que o método desenvolvido utilizando-se QuEChERS junto à CLUE-DAD é seletivo para 4 dos 6 agrotóxicos estudados na matriz de suco de laranja Pera, quando se comparam os cromatogramas apresentados na Figuras 20 (cromatogramas obtidos para os extratos de suco das amostras testemunhas e de suco fortificado das amostras testemunhas com os agrotóxicos). Isto, porque, os cromatogramas da Figura 20 mostram que houve a coeluição do imidacloprido e do diurom com interferentes da matriz.

Portanto, a CLUE-DAD mostrou-se menos seletiva que a CLAE-DAD (Figura 15), para esta matriz, apesar do método de detecção empregado em ambas as técnicas ter sido o mesmo. Isto pode ser atribuído ao fato da CLUE gerar um aumento na sensibilidade, não só dos compostos analisados, mas também dos componentes da matriz, fazendo com que a interferência da matriz seja mais intensa em CLUE do que em CLAE.

Apesar desta interferência da matriz, o método foi considerado aceitável, uma vez que, mesmo quando as matrizes foram fortificadas com os agrotóxicos em concentrações correspondentes aos seus limites de quantificação, o sinal dos interferentes da matriz sobre os picos dos agrotóxicos foi menor que 20% [100].

Além da comparação entre os cromatogramas obtidos para os extratos do suco das amostras testemunhas e do suco fortificado das amostras testemunhas, avaliou-se a seletividade com base na pureza dos picos cromatográficos. Desta maneira, confirmou-se que o método é seletivo apenas para 4 dos 6 agrotóxicos estudados (aldicarbe, tiofanato metílico, diflubenzurom e diurom), pois, tanto para o imidacloprido quanto para o diurom, o espectro obtido correspondeu ao espectro do padrão puro do agrotóxico apenas no ponto central do pico.

5.3.3.b - Linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas as curvas analíticas pelo método de padronização externa sem superposição e com superposição de matriz utilizando-se CLUE-DAD. As curvas analíticas obtidas encontram-se na Figura 26.

Com base nas curvas analíticas da Figura 26 foi possível verificar que as retas obtidas pelo método de padronização externa com superposição de matriz não são paralelas às retas obtidas quando se utilizou padronização externa sem superposição de matriz. Portanto, o método de padronização externa com superposição de matriz foi o escolhido para ser empregado na quantificação dos analitos, com a finalidade de corrigir os efeitos da matriz provocados por interferentes coextraídos.

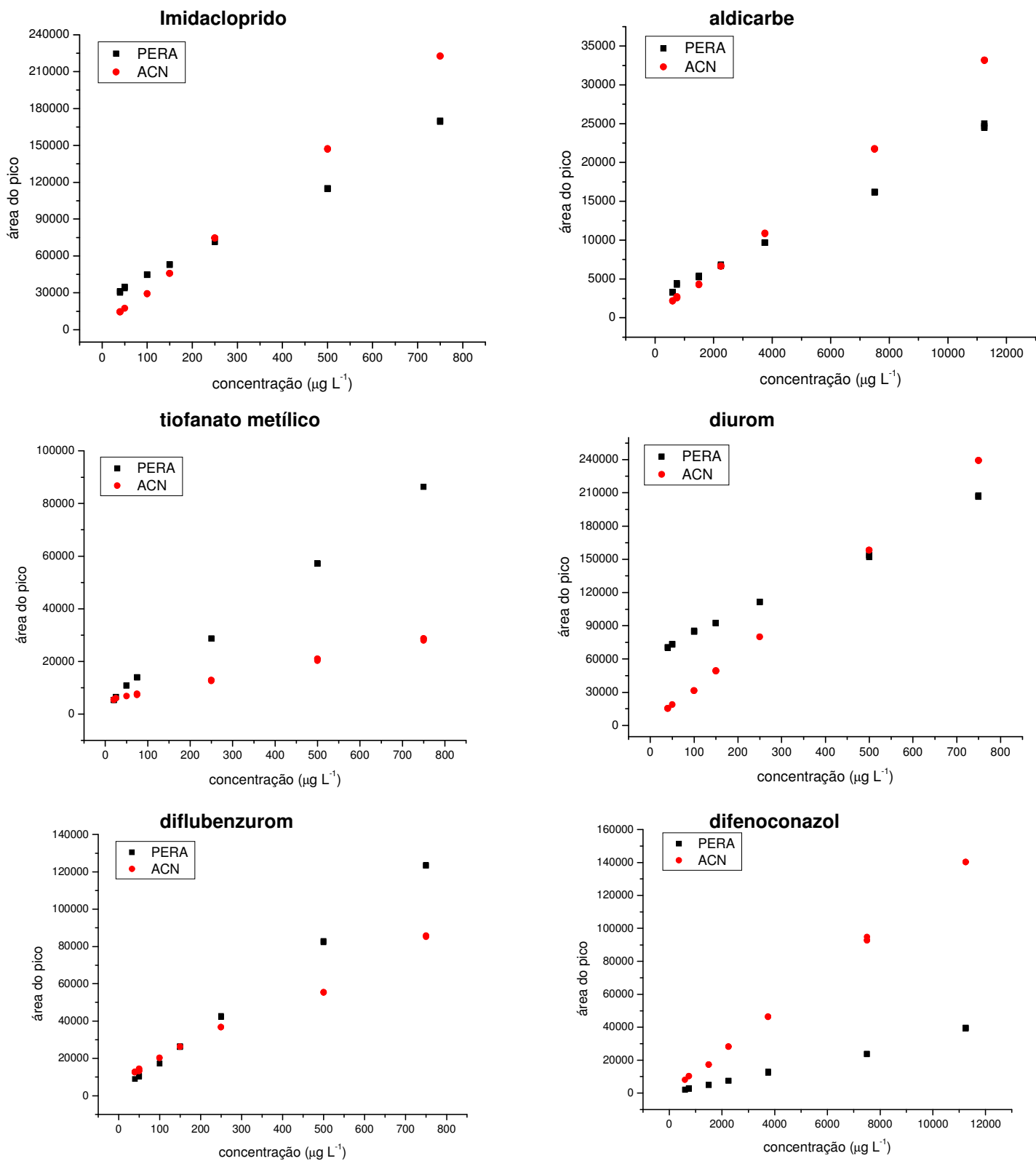


Figura 26: Curvas analíticas obtidas para os seis agrotóxicos estudados (imidacloprido, aldicarbe, tiofanato metílico, diurom, diflubenzurom e difenoconazol) por padronização externa sem e com superposição de matriz (suco de laranja Pera) utilizando **CLUE-DAD**.

Nas Tabelas 17 e 18 encontram-se os coeficientes de correlação (r) obtidos para o método de padronização externa sem e com superposição de matriz, respectivamente. Todos os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método, de acordo com as normas da ANVISA [100].

Os valores extremos obtidos para os resíduos também são apresentados nas Tabelas 17 e 18. Os demais valores obtidos para os resíduos estatísticos estão distribuídos de forma aleatória dentro dos limites apresentados, isto é, não foi verificada nenhuma tendência, o que valida as curvas obtidas.

Tabela 17: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa sem superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CLUE-DAD**.

agrotóxico	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 1675 + 293 x$	0,999	-1144 à +1066
aldicarbe	$y = 165 + 3 x$	0,999	-382 à +214
tiofanato metílico	$y = 4020 + 439 x$	0,999	-1613 à +1423
diurom	$y = 1711 + 315 x$	0,999	-539 à +994
diflubenzurom	$y = 1993 + 162 x$	0,999	-956 à +337
difenoconazol	$y = -13 + 12 x$	0,999	-753 à +1172

Tabela 18: Parâmetros das curvas analíticas obtidos por padronização externa com superposição da matriz para os agrotóxicos estudados utilizando **CLUE-DAD**.

agrotóxico	equação da reta	r	resíduos
imidacloprido	$y = 24062 + 190 x$	0,999	-843 à +406
aldicarbe	$y = 2351 + 2 x$	0,998	-284 à +465
tiofanato metílico	$y = 5085 + 31 x$	0,999	-253 à +206
diurom	$y = 64075 + 187 x$	0,999	-1155 à +2163
diflubenzurom	$y = 9814 + 99 x$	0,997	-1112 à +1770
difenoconazol	$y = -281 + 3 x$	0,998	-712 à +510

As faixas lineares de trabalho, apresentadas na Tabela 19, foram determinadas plotando-se o gráfico da razão entre a resposta do detector e a concentração versus o log da concentração. As faixas lineares foram consideradas satisfatórias porque abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado.

Na Tabela 19 também estão descritos os valores obtidos, pelo método da razão sinal/ruído, para os limites de detecção e quantificação. Os valores de LD_i e LQ_i da Tabela 19 mostram que os agrotóxicos estudados têm boa detectabilidade no sistema cromatográfico utilizado.

Foram obtidos, empregando-se a CLUE-DAD, valores de LD_i e LQ_i menores ou iguais aos obtidos com CLAE-DAD (Tabela 9) para os agrotóxicos imidacloprido, tiofanato metílico, diurom e diflubenzurom. Mas para os agrotóxicos aldicarbe e difenoconazol, os valores de LD_i e LQ_i , foram maiores na CLUE, apesar de ter sido empregado um sistema de detecção semelhante em ambos os sistemas cromatográficos (detecção por DAD).

Levando-se em consideração que os agrotóxicos foram concentrados 10 vezes no método de preparo de amostra desenvolvido, obtiveram-se LQ_M que atendem aos LMR impostos pela legislação [108, 109], de maneira que o método pode ser considerado adequado para a determinação dos agrotóxicos de interesse na matriz suco de laranja Pera.

Tabela 19: Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação do instrumento (LD_i e LQ_i) e limite de quantificação do método (LQ_M) desenvolvido obtidos com padronização externa com superposição da matriz, utilizando **CLUE-DAD**.

agrotóxico	faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	suco de laranja Pera		
		LD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ_M ($\mu\text{g L}^{-1}$)
imidacloprido	40 – 750	15	50	5
aldicarbe	600 – 11250	225	750	75
tiofanato metílico	16 – 375	7,5	25	2,5
diurom	40 – 750	15	50	5
diflubenzurom	40 – 750	15	50	5
difenoconazol	600 – 11250	25	750	75

5.3.1.c - Exatidão e precisão

A exatidão do método desenvolvido foi determinada de acordo com as normas determinadas pela ICH [103] e pela ANVISA [100]. Foram obtidas recuperações entre 78% e 113% para os três níveis de concentração avaliados (1 x LQ , 2 x LQ e 10 x LQ) na matriz suco de laranja Pera, de acordo com os dados apresentados na Tabela 20. Estes valores de

recuperação são considerados satisfatórios, pois se encontram dentro do intervalo aceito para amostras complexas [107].

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas, sendo que, para determinação da precisão intermediária realizaram-se ensaios em 3 dias consecutivos. Os coeficientes de variação obtidos para a repetitividade e precisão intermediária encontram-se na Tabela 20. Para a repetitividade foram obtidos coeficientes de variação menores que 4,4% e para a precisão intermediária, menores que 11,2%, comprovando que o método é repetitivo não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece praticamente constante mesmo com a mudança de algumas variáveis, pois, os coeficientes de variação obtidos foram menores que 20% [107].

Tabela 20: Resultados de recuperação, repetitividade e precisão intermediária para a metodologia desenvolvida aplicada à matriz de suco de laranja Pera, utilizando **CLUE-DAD**.

agrotóxico	recuperação (%)			repetitividade (% CV)			precisão intermediária (% CV)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	103	97	89	4,4	1,9	1,5	3,2	1,7	0,3
aldicarbe	84	78	100	3,9	1,9	0,1	2,8	2,3	1,3
tiofanato metílico	85	103	100	2,0	0,5	0,5	0,9	2,9	0,2
diurom	91	110	113	2,3	0,3	0,2	4,7	4,8	2,9
diflubenzurom	93	98	99	2,3	1,0	0,2	0,6	0,7	0,1
difenoconazol	102	89	107	0,3	0,8	2,8	1,6	1,8	11,2

F1 = 1 x LQ; F2 = 2 x LQ; F3 = 10 x LQ

5.3.1.d - Robustez

O método desenvolvido utilizando-se a CLUE-DAD pode ser considerado robusto por não ter sido afetado quando pequenas mudanças, como variações no pH da fase móvel em $\pm 0,05$ e variações na temperatura da coluna foram introduzidas.

5.4 - Análise de amostras provenientes do comércio da cidade de Campinas-SP e região

5.4.1 - CLAE-DAD

Dentre as seis amostras de laranja Pera coletadas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas-SP e região, nos sucos de cinco delas foi encontrado o agrotóxico imidacloprido em quantidades entre 15 e 31 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas quantidades de imidacloprido encontradas estão abaixo do LMR permitido para este agrotóxico [108, 110, 111]. Em uma destas cinco amostras que continham imidacloprido também foi encontrado 242 $\mu\text{g L}^{-1}$ do agrotóxico aldicarbe, concentração esta, que pode ser considerada abaixo do LMR permitido para este agrotóxico [108, 110].

Os picos obtidos para o imidacloprido e o aldicarbe nas amostras analisadas foram identificados fortificando-se o suco das amostras em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com uma solução da mistura dos agrotóxicos estudados para comparação dos tempos de retenção e através da comparação dos espectros de absorção no UV de cada agrotóxico. Na Figura 27 encontram-se os cromatogramas dos extratos do suco da amostra que continha imidacloprido e aldicarbe e do extrato do suco desta mesma amostra fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com uma solução da mistura dos agrotóxicos.

Dentre as 6 amostras de tangerina Murcote analisadas, no suco de três delas foi encontrado o agrotóxico imidacloprido em concentrações entre 7 e 31 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas quantidades de imidacloprido encontradas estão abaixo do LMR permitido para este agrotóxico [109, 110, 111].

Da mesma forma que para as amostras de laranja Pera, a identificação do pico deste agrotóxico nas amostras analisadas, foi feita fortificando-se o suco das amostras em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com uma solução da mistura dos agrotóxicos estudados para comparação dos tempos de retenção. Na Figura 28 encontram-se o cromatograma do extrato do suco de uma amostra de tangerina Murcote que continha imidacloprido e o cromatograma do extrato do suco desta mesma amostra fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com uma solução da mistura dos agrotóxicos.

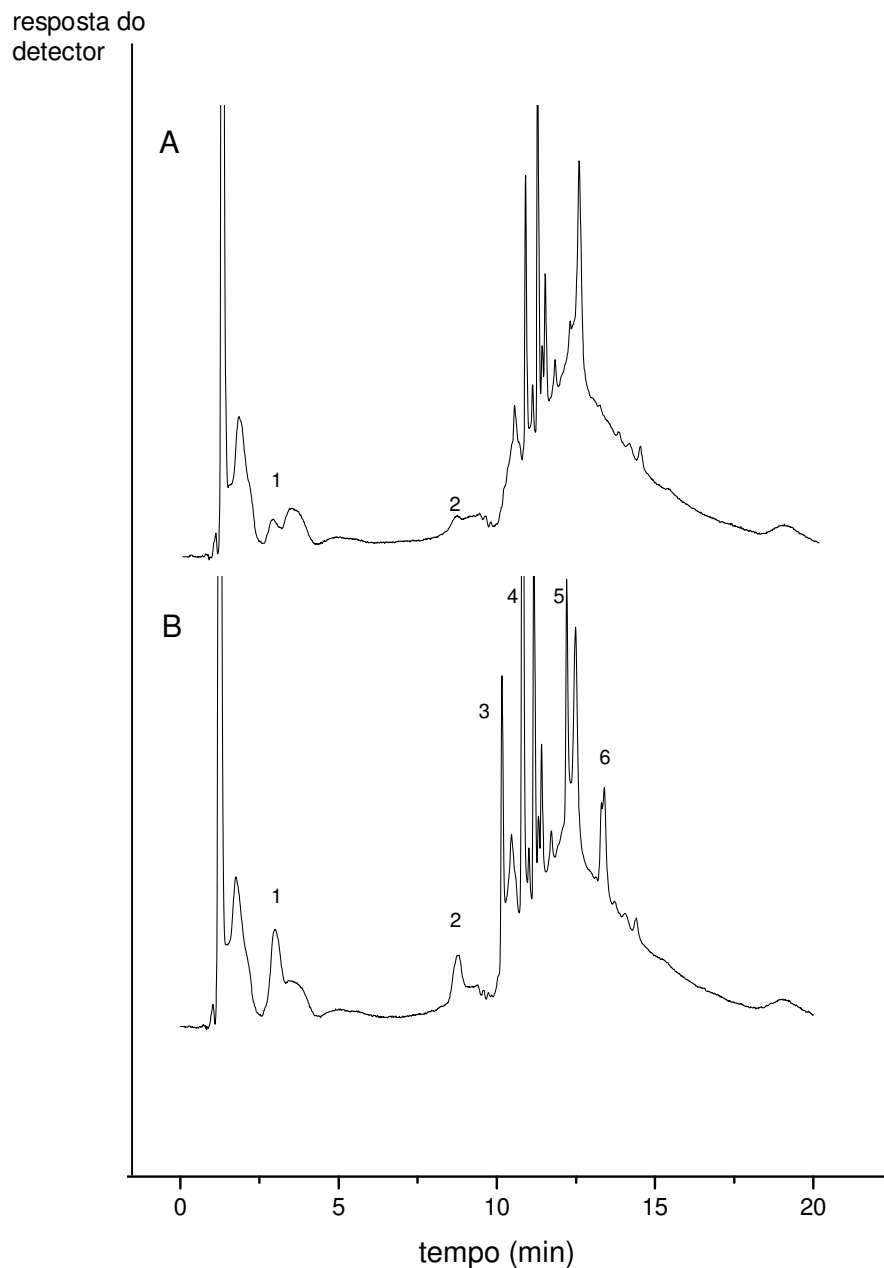


Figura 27: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de **laranja Pera** coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco **fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** desta mesma amostra (B), utilizando-se **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 B.** Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

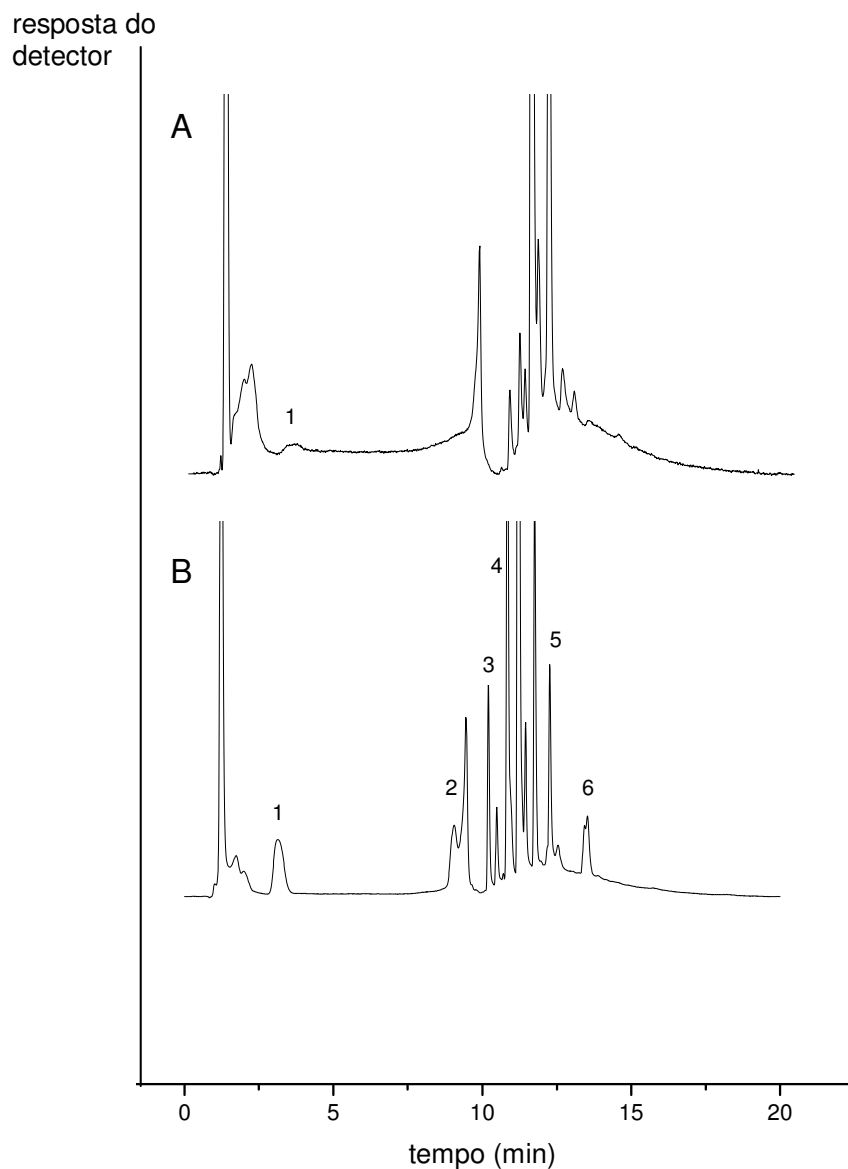


Figura 28: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de **tangerina Murcote** coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco **fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** desta mesma amostra (B), utilizando-se **CLAE-DAD**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 9 B.** Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

5.4.2 - CL-EM-EM

Três amostras de laranja Pera e três amostras de tangerina Murcote, coletadas no comércio, foram analisadas por CL-EM-EM e, no suco de nenhuma delas foram encontradas quantidades detectáveis dos agrotóxicos analisados. Esta constatação foi realizada com base nas janelas de retenção dos agrotóxicos e nos espectros de massas obtidos pela injeção das amostras.

Na Figura 29 encontram-se os cromatogramas obtidos para o extrato do suco de uma das amostras de laranja Pêra analisada, fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ com os agrotóxicos estudados, para mostrar que o suco das amostras coletadas no comércio apresenta comportamento semelhante ao suco das amostras testemunhas fortificado, o que confirma a eficiência do método.

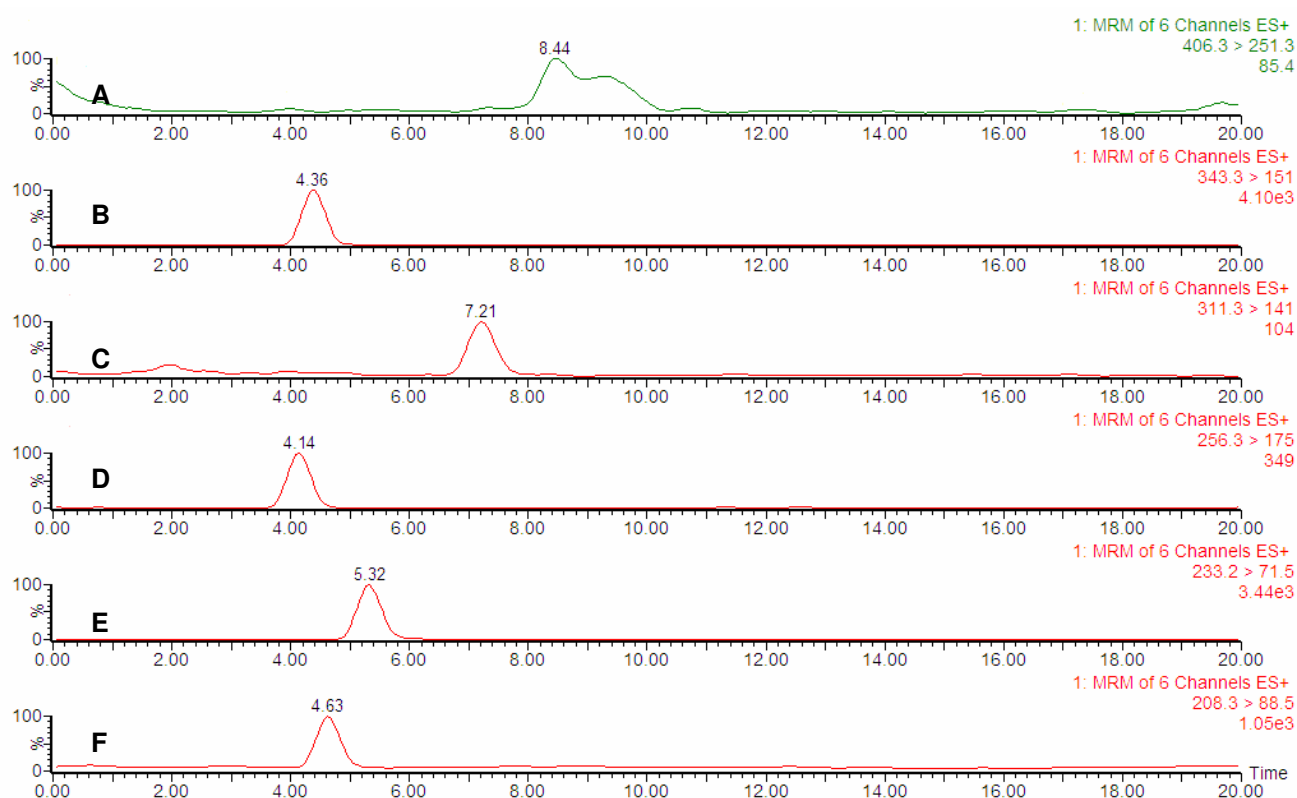


Figura 29: Cromatogramas do extrato do suco obtido pelo método QuEChERS para uma amostra de **laranja Pera** coletada no comércio de Campinas-SP e região, **fortificada em $100 \mu\text{g L}^{-1}$** , utilizando-se **CL-EM-EM**. **Condições cromatográficas idênticas às da Figura 10.** Identificação dos cromatogramas: (A) difenoconazol, (B) tiofanato metílico, (C) diflubenzurom, (D) imidacloprido, (E) diurom e (F) aldicarbe.

5.4.3 - CLUE-DAD

Empregando-se a CLUE-DAD foram analisadas 6 amostras de laranja Pera coletadas no comércio de Campinas-SP e região. Em nenhum dos sucos destas amostras foram detectados resíduos dos agrotóxicos. Os extratos dos sucos das amostras analisadas apresentaram comportamentos semelhantes aos extratos dos sucos das amostras fortificados, como pode ser observado na Figura 30, na qual é apresentado o cromatograma obtido para o extrato do suco de uma das amostras de laranja Pera analisada e o cromatograma do extrato do suco fortificado em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ desta mesma amostra. Os cromatogramas da Figura 30 comprovam que o método desenvolvido é eficiente para a análise dos agrotóxicos de interesse em suco de laranja Pera quando é utilizada a CLUE-DAD.

5.5 – CLAE-DAD x CLUE-DAD x CL-EM-EM

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos neste trabalho, empregando-se as diferentes técnicas cromatográficas de análise, CLAE-DAD, CLUE-DAD e CL-EM-EM, e evidenciar, neste sentido, as vantagens e desvantagens de cada uma delas, será realizada uma comparação entre elas em termos de seletividade, detectabilidade, rapidez das análises, quantidade de amostra injetada e facilidade de otimização dos parâmetros instrumentais para o emprego destas técnicas analíticas.

Com relação à seletividade, a CL-EM-EM mostrou-se mais vantajosa que as demais técnicas cromatográficas, nas quais foi empregada a detecção por arranjo de diodos. A espectrometria de massas em série, na qual foi utilizado um detector do tipo triplo quadrupolo, permite que apenas os íons dos analitos formados na fonte de ionização sejam transmitidos pelo primeiro quadrupolo à cela de colisão, onde estes íons serão fragmentados por CID e, posteriormente detectados no terceiro quadrupolo. Desta maneira, além de se detectar o íon do analito, é também possível detectar os íons dos fragmentos gerados a partir deles. A informação estrutural adicional, fornecida pelos fragmentos gerados, permite que, mesmo quando analisados agrotóxicos de mesma massa molar, eles possam ser diferenciados entre si [23, 84]. Esta propriedade torna-se muito importante no caso da

análise de matrizes complexas, como é o caso do suco de laranja e de tangerina, pois faz com que a obtenção de falsos positivos, gerados por componentes da matriz que tenham a mesma massa molar dos agrotóxicos, seja praticamente anulada, quanto maiores forem os estágios de EM-EM empregados [23, 84]. Desta maneira, algumas agências reguladoras estabelecem que a espectrometria de massas em série é a técnica de detecção a mais adequada para ser empregada em métodos oficiais de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, devido a sua seletividade [112].

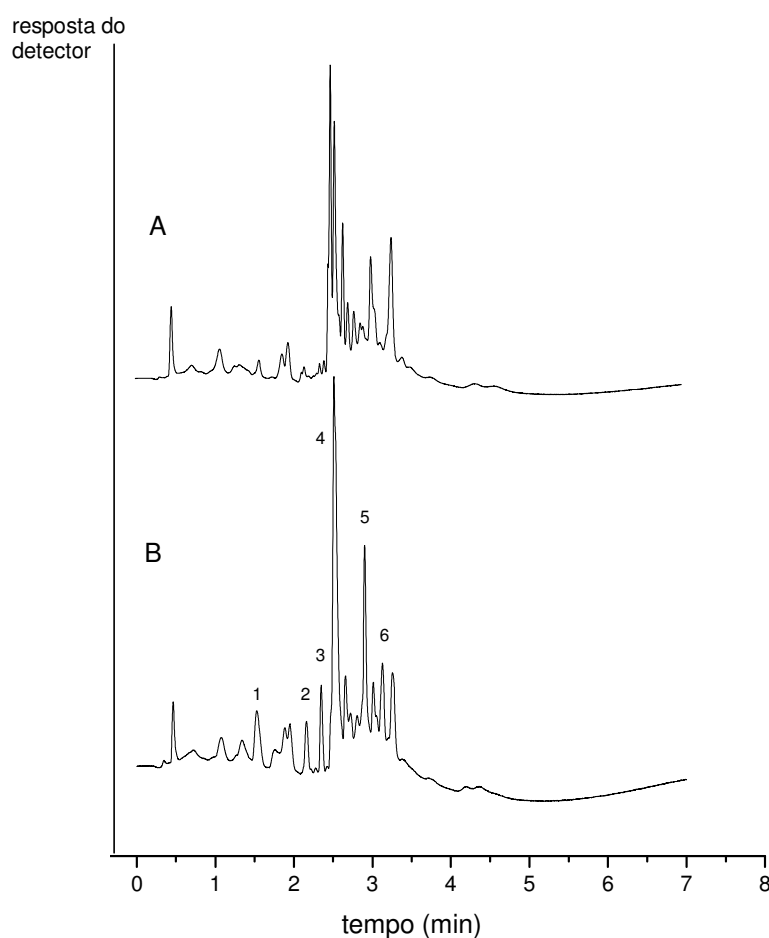


Figura 30: Cromatogramas do extrato de suco obtido pelo método QuEChERS para uma das amostras de **laranja Pera** coletada no comércio de Campinas-SP e região (A) e para o extrato do suco **fortificado em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$** desta mesma amostra (B), utilizando-se **CLUEDAD**. Condições cromatográficas idênticas às da Figura 11. Identificação dos picos cromatográficos: 1- imidacloprido, 2- aldicarbe, 3- tiofanato metílico, 4- diurom, 5- diflubenzurom e 6- difenoconazol.

No caso do método desenvolvido, como não havia agrotóxicos de mesma massa molar, apenas uma etapa de EM-EM foi utilizada e somente o íon fragmento de maior intensidade de cada agrotóxico foi monitorado (item 5.2.6). Mesmo assim, foi possível obter sinais “puros” dos analitos, ou seja, os espectros de massas obtidos nas janelas de retenção dos agrotóxicos mostraram que o sinal obtido havia sido gerado apenas pelo analito, e não por interferentes provenientes da matriz. Isto não foi possível, quando foi empregada a detecção por DAD nos sistemas de CLAE e CLUE, pois o detector por arranjo de diodos permite apenas identificar se o sinal obtido é puro, através dos espectros de absorção no UV, mas não permite resolver (separar) o sinal do analito do sinal gerado pelo interferente da matriz quando ambos eluem no mesmo tempo de retenção.

Apesar da seletividade assegurada pela EM-EM, foi necessário utilizar a padronização externa com superposição de matriz, que também foi empregada quando foram utilizadas a CLAE-DAD e a CLUE-DAD. Isto, porque, a ionização dos analitos na fonte de ionização pode ser afetada pela presença da matriz, conforme foi observado comparando-se a padronização externa com e sem superposição de matriz (Figura 22).

Os limites de quantificação e de detecção obtidos utilizando-se CL-EM-EM (Tabela 14) foram muito menores que os obtidos por CLAE-DAD (Tabela 9) e CLUE-DAD (Tabela 19), mas a detectabilidade obtida em todas estas técnicas analíticas foi adequada à análise dos agrotóxicos de interesse nas matrizes estudadas, uma vez que os limites de quantificação obtidos foram menores que os LMR determinados pela ANVISA [108], pela FDA [110] e pelo CODEX [111] para os agrotóxicos.

Sem dúvida alguma a CLUE trata-se da técnica cromatográfica de análise mais rápida dentre as utilizadas, pois com ela foi possível realizar análises praticamente 3 vezes mais rápidas do que com as demais técnicas. Porém, a otimização dos parâmetros cromatográficos de detecção e separação em CLUE só foi realizada com rapidez porque foi feita com base nos parâmetros do método estabelecido para CLAE, anteriormente, com auxílio de um software especificamente desenvolvido para este fim (item 5.1.3). Se não houvesse um método desenvolvido para CLAE anteriormente, a otimização dos parâmetros de detecção e separação no sistema de CLUE seria tão laboriosa quanto para a CLAE (item 5.1.1).

Entretanto quando se utilizou a CL-EM-EM, a dificuldade em se otimizar as condições instrumentais de análise foi maior com relação aos parâmetros que devem ser ajustados no detector, devido a necessidade de se realizar a infusão de soluções de cada um dos analitos, individualmente. Porém, o ajuste das condições cromatográficas foi, relativamente, mais rápido do que em CLAE-DAD e CLUE-DAD, pois, graças a seletividade do tipo de detecção empregada, não foi necessário obter resolução entre os sinais dos analitos (item 5.1.2).

A CLUE-DAD é a técnica cromatográfica que consome os menores volumes de amostra e de FM. Quando se empregou a CLUE-DAD foram injetados volumes de amostra 10 vezes menores (1 μL) que nas demais técnicas cromatográficas empregadas (10 μL), o que pode possibilitar que se realize uma concentração muito maior da amostra na etapa de preparo, uma vez que o extrato pode ser reduzido a um volume bem menor para ser injetado em CLUE-DAD do que o volume necessário para a injeção em CLAE-DAD e CL-EM-EM. O volume de FM consumido quando se utilizou a CLUE-DAD foi 3 vezes menor que o utilizado na CL-EM-EM e 10 vezes menor que o utilizado na CLAE-DAD, de maneira que esta técnica cromatográfica gera menores quantidades de resíduos, além de ser mais vantajosa economicamente.

6 - CONCLUSÕES

Diferentes métodos de preparo de amostra, como ELL, ELL com “*clean-up*”, ELL-TSZ, ELL-PBT com “*clean-up*”, EFS e QuEChERS foram avaliadas, empregando-se a CLAE-DAD, para a determinação do procedimento mais eficiente para extração dos agrotóxicos livres de interferentes provenientes da matriz. Verificou-se que mesmo os métodos mais complexos, envolvendo várias etapas, não foram capazes de eliminar totalmente a interferência da matriz nos compostos de interesse. Apesar de não eliminar totalmente a interferência da matriz no sinal dos analitos, o método QuEChERS gerou extratos relativamente mais limpos que os demais métodos de extração utilizados, simultaneamente a uma boa eficiência de extração dos agrotóxicos. Aliando-se estes resultados à rapidez e ao menor número de etapas do método QuEChERS, ele foi considerado o mais eficiente para a extração dos agrotóxicos das matrizes estudadas.

Foi possível desenvolver métodos para a determinação de seis agrotóxicos (aldicarbe, difenoconazol, diflubenzurom, diurom, imidacloprido e tiofanato metílico) dentre os apontados como os mais empregados na cultura de citrus do Estado de São Paulo por produtores e engenheiros agrônomos que atuam na região de Campinas-SP. Os métodos desenvolvidos foram baseados em três técnicas cromatográficas de análise: a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série e a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos.

As condições cromatográficas de separação e detecção otimizadas para o sistema CLAE-DAD foram: fase móvel composta por água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, eluição por gradiente com programação de 0 min – 20:80 v_A/v_B ; 4 min – 30:70 v_A/v_B ; 5 min – 50:50 v_A/v_B ; 6 min – 70:30 v_A/v_B ; 7 min – 80:20 v_A/v_B , retornando linearmente às condições iniciais em 13 minutos (20 min – 20:80 v_A/v_B), volume de injeção de 10 μL , coluna cromatográfica analítica (Nova-Pak) C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 μm de diâmetro de partícula) Waters, coluna de guarda (Nova-PaK) C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 μm de diâmetro de partícula) do mesmo fabricante e detecção por arranjo de diodos a 248 nm para o registro do cromatograma contendo os picos de todos os agrotóxicos. Estas

condições permitiram uma boa separação entre os agrotóxicos em um tempo de análise de 20 minutos.

Para o sistema LC-MS-MS, as condições cromatográficas de separação e detecção otimizadas foram: fase móvel composta por uma solução aquosa de 3 mmol L⁻¹ de formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B), vazão de 0,3 mL min⁻¹, eluição por gradiente com programação de 0 min - 20:80 v_A/v_B, 8 min - 80:20 v_A/v_B, 15 min - 20:80 v_A/v_B e mais 5 min para estabilização da coluna após o retorno às condições iniciais (20 min - 20:80 v_A/v_B), volume de injeção de 10 µL, coluna cromatográfica analítica (Nova-Pak) C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula) Waters, coluna de guarda (Nova-PaK) C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula) do mesmo fabricante e detecção por espectrometria de massas em série, com ionização por eletronebulização no modo positivo e varredura por monitoramento de múltiplas reações das transições 406,3 > 251,3 para o difenoconazol, 343,3 > 151,0 para o tiofanato metílico, 311,3 > 141,0 para o diflubenzurom, 256,3 > 175,0 para o imidacloprido, 233,2 > 71,5 para o diurom, 208,3 > 88,5 para o aldicarbe. As transições foram monitoradas sob valores ajustados de voltagem do cone e energia de colisão otimizados, para cada um dos agrotóxicos, por infusão direta no espectrômetro de massas. Estas condições permitiram realizar a detecção seletiva dos agrotóxicos em um tempo de análise de 20 minutos.

No sistema CLUE-DAD as condições cromatográficas de separação e detecção foram otimizadas por meio do ajuste dos parâmetros do método desenvolvido para o sistema CLAE ao sistema CLUE utilizando-se o software Acquity Column Calculator (Waters), sendo elas: fase móvel composta por água (solvente A) e acetonitrila:água 90:10 v/v (solvente B), vazão de 0,3 mL min⁻¹, eluição por gradiente com programação de 0 min - 80:20 v_A/v_B, 1,2 min - 70:30 v_A/v_B, 1,6 min 50:50 v_A/v_B, 1,9 min - 30:70 v_A/v_B, 2,2 min - 20:80 v_A/v_B, retornando à condições iniciais em 6,6 min (80:20 v_A/v_B), volume de injeção de 1 µL, coluna analítica Acquity C18 (50 mm x 2.1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula), Waters, e detecção por arranjo de diodos a 248 nm para o registro do cromatograma contendo os picos de todos os agrotóxicos. Estas condições permitiram uma boa separação entre os agrotóxicos em um tempo de análise de 7 minutos.

Uma vez determinado o método de preparo de amostra mais adequado e as condições cromatográficas de separação dos agrotóxicos em cada um dos sistemas

cromatográficos, foi realizada a validação empregando-se as três técnicas cromatográficas propostas.

A validação do método desenvolvido empregando-se a CLAE-DAD apresentou recuperações entre 79% e 124% e coeficientes de variação inferiores a 8% para todos os agrotóxicos estudados, de forma que o método foi considerado exato e preciso, uma vez que estes valores estão dentro da faixa indicada na literatura, para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras complexas [107]. Verificou-se, também, que o método é linear (coeficientes de correlação superiores a 0,99) e nenhuma tendência foi verificada no gráfico de resíduos. O método foi considerado seletivo para 5 dos agrotóxicos estudados na matriz de suco de laranja Pera (exceto para o diurom) e para 4 deles na matriz de suco de tangerina Murcote (exceto para o diurom e o aldicarbe). Os LQ obtidos para o método permitiram que os LMR impostos pelas agências reguladoras fossem atingidos.

Quando empregada a CL-EM-EM foram obtidas recuperações entre 83% e 119% e coeficientes de variação menores que 14,3%, os quais estão dentro dos intervalos aceitos segundo a literatura [107], de maneira que o método pode ser considerado exato e preciso. O método foi considerado seletivo para todos os agrotóxicos em ambas as matrizes estudadas, devido a capacidade do método de detecção empregado de gerar sinal a partir de íons e fragmentos de íons específicos dos analitos. Mesmo assim, foi necessário o emprego da padronização externa com superposição de matriz para a quantificação dos agrotóxicos para corrigir o efeito da matriz sobre a ionização dos agrotóxicos na fonte de ionização, de forma que o método apresentou-se linear (coeficientes de variação maiores que 0,99) e sem nenhuma tendência, de acordo com o gráfico de resíduos. Os LQ do método foram bem menores que os obtidos quando se empregou a CLAE-DAD, o que é desejável, uma vez que as agências reguladoras têm estabelecido LMR cada vez menores. Porém, esta técnica torna-se limitada quando se deseja aplicá-la às amostras com concentrações na região dos LMR, pois alguns agrotóxicos apresentam valores elevados de LMR, de forma que poderiam gerar a contaminação e a saturação do espectrômetro de massas.

Para CLUE-DAD, a validação foi realizada apenas para a matriz de suco de laranja Pera e foram obtidas recuperações entre 78% e 113%, e coeficientes de variação menores que 11,5%, indicando que o método é repetitivo não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece praticamente constante mesmo com a mudança de algumas

variáveis, pois os valores obtidos encontram-se dentro da faixa apontada na literatura [107]. O método foi considerado linear, pois apresentou coeficientes de variação maiores que 0,99 para todos os agrotóxicos estudados quando foi empregada a padronização externa com superposição de matriz, e nenhuma tendência foi observada nos resultados através do gráfico dos resíduos. Verificou-se a seletividade do método para 4 dos agrotóxicos (exceto imidacloprido e diurom) e os LQ obtidos permitiram que os LMR determinados pelas agências reguladoras fossem atingidos. Além disso, a CLUE possibilitou realizar análises cromatográficas três vezes mais rápidas que as demais técnicas utilizadas e empregar volumes menores de FM e de amostra injetada.

Dentre as técnicas cromatográficas utilizadas a CL-EM-EM foi a que apresentou maior seletividade e detectabilidade e a CLUE-DAD foi a técnica que permitiu a realização de análises mais rápidas com um menor consumo de fase móvel e injeção de menores volumes de amostras. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que a CLUE-EM-EM seria a técnica analítica mais apropriada para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

A análise de amostras provenientes do comércio de Campinas-SP e região indicaram a presença de resíduos do agrotóxico imidacloprido em concentrações abaixo do LMR estabelecido para este composto, no suco de cinco das seis amostras de laranja Pera analisadas por CLAE-DAD. Em uma dessas amostras contaminadas pelo imidacloprido também foi encontrado o agrotóxico aldicarbe, porém dentro do LMR. As amostras analisadas por LC-EM-EM e CLUE-DAD não continham resíduos dos agrotóxicos estudados em quantidades detectáveis, mas apresentaram um comportamento semelhante ao suco fortificado das amostras testemunhas, demonstrando que o método desenvolvido é eficiente.

Os resultados apresentados mostram a eficiência dos métodos desenvolvidos e indicam que os objetivos propostos para este trabalho foram alcançados de maneira satisfatória, uma vez que os métodos desenvolvidos e validados puderam ser aplicados para a determinação dos agrotóxicos estudados em sucos de laranja Pera e tangerina Murcote, utilizando CLAE-DAD e LC-EM-EM, e em suco de laranja Pera utilizando-se CLUE-DAD, e é rápido e robusto.

7- REFERÊNCIAS

- [1] Ragsdale, N.N.; The impact of the food quality protection act on the future of plant disease management, *Rev. Phytopathol.*, 38 (2000) 577.
- [2] Rice, P.J.; Rice, P.J.; Arthur, E.L.; Barefoot, A.C.; Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 5367.
- [3] 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.
- [4] Kovalczuk, T.; Lacina, O.; Jech, M.; Poustka, J.; Hajšlová, J.; Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Addict. and Contam.*, 25 (4) (2008) 444.
- [5] Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Rapid analysis of multiple pesticide 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.
- [6] Botitsi, H.; Economou, A.; Tsipi, D.; Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1685.
- [7] Picó, Y.; la 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.
- [8] Swarup, D.; Patra, R.C.; Environmental pollution and its impact on domestic animals and wildlife, *Indian J. Anim. Sci.*, 75 (2) (2005) 231.
- [9] Cohen, M.; Environmental toxins and health. The health impact of pesticides, *Australian Family Physician*, 36 (12) (2007) 1002.
- [10] 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.
- [11] Resolução RDC 119 de 19/05/2003 - Criar o PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7876>. Acessado em 17/03/2009.

[12] 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.

[13] “Agrotóxicos: Autoridades trocam experiências sobre regulação.”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm. Acessado em 17/03/2009.

[14] “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/toxicologia/estrutura/pesticidas.htm>. Acessado em 19/02/2009.

[15] “Agronegócio Citrícula no Brasil”, Toda Fruta. Disponível em http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8600. Acessado em 19/02/2009.

[16] “História da laranja”, Associação Brasileira dos Exportadores de Citrus (ABECitrus). Disponível em http://www.abecitrus.com.br/historia_br.html#tmundo. Acessado em 19/02/09.

[17] “Característica da laranja”, Toda Fruta. Disponível em http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1348. Acessado em 19/02/2009.

[18] “Levantamento sistemático da produção agrícola”, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=875&id_pagina=1. Acessado em 19/02/2009.

[19] “Mudanças no Consumo da Laranja no Brasil”, Federação da Agricultura e Agropecuária do Estado de Minas Gerais (FAEMG). Disponível em <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=13&ParentCode=2&ParentPath=None&ContentVersion=C>. Acessado em 19/02/2009.

[20] “Tangerina”, Toda Fruta. Disponível em <http://www.todafruta.com.br/todafruta/institucional.asp?menu=261>. Acesso em 19/02/09.

[21] “Tangerina: tendências no cultivo no Estado de São Paulo”, Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo (IEA). Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8134>. Acessado em 19/02/2009.

[22] “Levantamento sistemático da produção agrícola”, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200901_5.shtm.
Acessado em 19/02/2009.

- [23] Kmellár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martinez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernandez-Alba, A. R.; Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1215 (2008) 37.
- [24] Tsukatani, H.; Tobiishi, K.; Tanaka, Y.; Sakuragi, K.; Ikeura, T.; Nakamura, M.; Determination of hexaconazole in surface water samples from river and sea by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (1) (2008) 149.
- [25] Ravelo-Pérez, L.; Hernández-Broges, J.; Rodríguez-Delgado, M. A.; Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices, *J. Chromatogr. A*, 1211 (2008) 33.
- [26] Picó, Y.; Farré, M.; Soler, C.; Barceló, D.; Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 9350.
- [27] Rivas, A.; Cerrillo, I.; Granada, A.; Mariscal-Arcas, M.; Olea-Serrano, F.; Pesticide exposure of two age groups of women and its relationship with their diet, *Sci Total Environ.*, 382 (2007) 14.
- [28] Margni, M.; Rossier, D.; Crettaz, P.; Jolliet, O.; Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems, *Agriculture, Ecosyst. Environ.*, 93 (2002) 379.
- [29] Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain), *Food Control.*, 17 (2006) 841.
- [30] Scordino, M.; Sabatino, L.; Traulo, P.; Gagliano, G.; Garagano, M.; Pantò, V.; Gambino, G. L.; LC/MS/MS detection of fungicide guazatine residues for quality assessment of commercial citrus fruit, *Eur. Food Res. Technol.*, 227 (2008) 1339.
- [31] Cooper, J.; Dobson, H.; The benefits of pesticides to mankind and the environment, *Crop. Protection*, 26 (2007) 1337.
- [32] Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A.; Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometry detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1697.

- [33] “Governo investe em programa de monitoramento de agrotóxicos”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2003/070103_2_monitoramento.htm. Acessado em 17/03/2009.
- [34] “Anvisa divulga resultado do monitoramento de agrotóxico em alimentos”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/300407.htm>. Acessado em 26/02/2009.
- [35] “Nota técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resultados_PARA_2008.pdf. Acessado em 30/03/2009.
- [36] “Alimentos: Laranja”, Nestlé. Disponível em <http://www.nestle.pt/BemEstar/Presentation/Nutricao/Alimentos.aspx?id=188>. Acessado em 19/02/2009.
- [37] Picó, Y.; Kozmutza, C.; Evaluation of pesticides residues in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1805.
- [38] “National Nutrient Database for Standard Reference”, USDA. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acessado em 01/03/2009.
- [39] 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.
- [40] Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A.; Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 (2007) 1663.
- [41] Kaale, E.; Chambuso, M.; Kitwala, J.; Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column, *Food Chem.*, 107 (2008) 1289.
- [42] Pan, J.; Xia, X.; Liang, J.; Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Ultrason. Sonochem.*, 15 (2008) 25.
- [43] Ticha, J.; Hajslova, J.; Jech, M.; Honzicek, J.; Lacina, O.; Kohoutkova, J.; Kocourek, V.; Lansky, M.; Kloutvorova, J.; Falta, V.; Changes of pesticide residues in apples during cold storage, *Food Control*, 19 (2008) 247.
- [44] Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C.; Sample Preparation, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 191.

- [45] Beyer, A.; Biziuk, M.; Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food, *Food Chem.*, 108 **(2008)** 669.
- [46] Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Mezcua, M.; Molina-Díaz, A.; Hernández-Alba, A. R.; Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 55 **(2007)** 10548.
- [47] Kerkdijk, H.; Mol, H. G. J.; van der Nagel, B.; Volume overload cleanup: An approach for on-line SPE-GC, GPC-GC, and GPC-SPE-GC, *Anal. Chem.*, 79 **(2007)** 7975.
- [48] Pozo, O. J.; Barreda, M.; Sancho, J.V.; Hernández, F.; Lliberia, J. Ll.; Cortés, M. A.; Bago, B.; Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 **(2007)** 1765.
- [49] Diserens, H.; Henzelin, M.; Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 833 **(1999)** 13.
- [50] Obana, H.; Okihashi, M.; Akutsu, K.; Kitagawa, Y.; Hori, S.; Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. Agric. Food Chem.*, 50 **(2002)** 4464.
- [51] Miliadis, G.E.; Tsiropoulos, N.G.; Aplada-Sarlis, P.G.; High-performance liquid chromatographic determination of benzoyleurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A*, 835 **(1999)** 113.
- [52] Durden, D. A.; Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk, *J. Chromatogr. B*, 850 **(2007)** 134.
- [53] Wang, j.; Cheung, W.; Grant, D.; Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 53 **(2005)** 528.
- [54] 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.
- [55] Tagami, T.; Kajimura, K.; Satsuki, Y.; Nakamura, A.; Okihashi, M.; Takatori, S.; Kakimoto, K.; Obana, H.; Kitagawa, M.; Rapid analysis of 56 pesticide residues in natural medicines by GC/MS with negative chemical ionization, *J. Nat. Med.*, 62 **(2008)** 126.
- [56] Christodoulou, E. A.; Samanidou, V. F.; Papadoyannis, I. N.; Development of a HPLC multi-residue method for the determination of ten quinolones in bovine liver and porcine kidney according to the European Union Decision 2002/657/EC, *J. Sep. Sci.*, 31 **(2008)** 119.

- [57] Brunner, G.; Supercritical fluids: technology and application to food processing, *J. Food Eng.*, 67 (2005) 21.
- [58] Mendiola, J. A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; & Ibanez, E.; Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications, *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 234.
- [59] Richter, B. E.; Hoefler, F.; Linkerhaegner, M.; Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes, *LC-GC*, 19 (2001) 408.
- [60] Coscolà, C.; Yusà, V.; Martí, P.; Pastor, A.; Analysis of currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1200 (2008) 100.
- [61] Diagne, R. G.; Foster, G. D.; & Khan, S.U.; Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans, *J. Agric. Food Chem.*, 50(11) (2002) 3204.
- [62] Yoshida, M.; Akane, A.; Subzero-temperature liquid-liquid extraction of benzodiazepines for high performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1918.
- [63] Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Optimization and validation of liquid-liquid extraction with the low temperature partition technique (LLE-LTP) for pyrethroids in water and GC analysis, *Quim. Nova*, 30 (3) (2007) 535.
- [64] 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(7) (2008) 972.
- [65] Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Nicolardi, S.; A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk, *Food Chem.*, 108 (2008) 354.
- [66] 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(3) (2008) 314.
- [68] Cortés-Aguado, S.; Sánchez-Morito, N.; Arrebola, F.J.; Frenich, A.G.; Vidal, J. L.; Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.*, 107 (2008) 1314.
- [69] Schurek, J.; Hajslova, J.; Riddellova, K.; Hernández, F.; Application of head-space solid-phase microextraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in tea samples, *Anal. Chim. Acta*, 611 (2008) 163.

- [70] Wennrich, L.; Popp, P.; Koller, G.; Breuste, J.; Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), *J. AOAC Int.*, 84 (2001) 1194.
- [71] Kirchner, M.; Húšková, R.; Matisová, E.; Mocák, J.; Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants, *J. Chromatogr. A*, 1186 (2008) 271.
- [72] Banerjee, K.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Savant, R.; Adsule, P. G.; Single-laboratory validation and uncertainty analysis of 82 pesticides determined in pomegranate, apple, and orange by ethyl acetate extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.*, 91 (2008) 1435.
- [73] Hernández-Borges, J.; Cabrera, J. C.; Rodríguez-Delgado, A.; Hernández-Suárez, E. M.; Saúco, V. G.; Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain), *Food Chem.*, 113 (2009) 313.
- [74] 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.
- [75] "QuEChERS - A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products". Disponível em http://www.quechers.com/docs/quechers_en_oct2005.pdf. Acessado em 17/02/2009.
- [76] "Bond Elut PSA" – Varian. Disponível em <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/consum/samprep/spe/packed/anion/psa&cid=LJKOKFQ>. Acessado em 26/02/2009.
- [77] Sandahl, M.; Mathiasson, L.; Jönsson, J.A.; Determination of thiophanate-methyl and its metabolites at trace level in spiked natural water using the supported liquid membrane extraction and the microporous membrane liquid-liquid extraction techniques combined on-line with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 123.
- [78] Abhilash, P. C.; Jamil, S.; Singh, N.; Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices, *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007) 43.
- [79] Merkulova, N.L.; Shapovalova, E.N.; Shpigun, O.A.; Features of the separation of pesticides of different classes by reversed-phase high-performance chromatography, *J. Anal. Chem.*, 61 (2006) 343.
- [80] Nunes, G.S.; Alonso, R.M.; Ribeiro, M.L.; Barceló, D.; Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in some fruits and vegetables using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 113.

- [81] Picó, Y.; Farré, M.; Tokman, N.; Barceló, D.; 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.
- [82] Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, *Quim. Nova*, 1 **(2009)** 214.
- [83] Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.; Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389 **(2007)** 1773.
- [84] Chiaradia, M. C.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Oestado 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.
- [85] Nováková, L.; Matichová, L.; Solich, P.; Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 68 **(2006)** 908.
- [86] Swartz, M.E.; UPLC (TM): An introduction and review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28 **(2005)** 1253.
- [87] Swartz, M. E.; Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction, *LCGC North Am. Suppl.*, S **(2005)** Suppl. S, 8.
- [88] Dongre, V. G.; Karmuse, P. P.; Kumar, A.; Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46 **(2008)** 236.
- [89] Guan, J.; Lai, C. M.; Li, S. P.; A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using ultra performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 **(2007)** 996.
- [90] Englmann, M.; Fekete, A.; Kuttler, C.; Frommberger, M.; Li, X.; Gebefugi, I.; Fekete, J.; Kopplin, P.S.; The hydrolysis of unsubstituted N-acylhomoserine lactones to their homoserine metabolites Analytical approaches using ultra performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1160 **(2007)** 184.
- [91] Pedraglio, S.; Rozio, M. G.; Misiano, P.; Reali, V.; Dondio, G.; Bigogno, C.; New perspectives in bio-analytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UPLC-MS/MS in in vitro metabolism and pharmacokinetic studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 **(2007)** 665.
- [92] Apollonio, L. G.; Pianca, D. J.; Whittall, I. R.; Maher, W. A.; Kyd, J. M.; A demonstration of the use of ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry [UPLC/MS] in the

determination of amphetamine-type substances and ketamine for forensic and toxicological analysis, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol Biomed. Life Sci.*, 836 **(2006)** 111.

[93] Nguyen, D. T. T.; Guillarme, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μ m stationary phases in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1128 **(2006)** 105.

[94] Nguyen, D. T. T.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Barrioulet, M. P.; Rocca, J. L.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; High throughput liquid chromatography with sub-2 μ m particles at high pressure and high temperature, *J. Chromatogr. A*, 1167 **(2007)** 76.

[95] Nguyen, D. T. T.; Guillarme, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J. Sep. Sci.*, 29 **(2006)** 1836.

[96] Grumbach, E. S.; Wheat, T. E.; Kele, M.; Mazzeo, J. R.; Recent developments in columns for UPLC (TM), *LCGC Eur. Suppl., S* **(2005)** 44.

[97] HPLC calculator v. 2.1. Disponível em <http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/divers/downloads.php>. Acessado em 02/03/2009.

[98] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.*, 74(5) **(2002)** 835.

[99] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

[100] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

[101] Codex Alimentarius Commission; Report of the Thirty-Fifth Session of the Codex Committee on Pesticide Residues, CL 2003/15-PR, 2003.

[102] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH); Harmonised Tripartite Guideline – Validation Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005.

[103] Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos, apostila, 1999.

[104] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova*, 27(5) **(2004)** 771.

[105] Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Aioldi, 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.

- [106] “Análise quantitativa por cromatografia”, ChemKeys. Disponível em www.chemkeys.com. Acessado em 03/03/2009.
- [107] Tolosa, I; Readman, J. W.; Mee, L. D.; Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water, *J. Chromatogr. A*, 725 (1996) 93.
- [108] “SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos”, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>. Acessado em 16/02/2009.
- [109] “Pesticide Properties Database”, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Disponível em <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>. Acessado em 16/02/2009.
- [110] “Tolerances and Exemptions from Tolerance for Pesticides Chemicals in Food”, United States Food and Drug Administration (FDA). Disponível em http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_07/40cfr180_07.html. Acessado em 16/02/2009.
- [111] “Pesticides Residues in Food”, CODEX Alimentarius. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp. Acessado em 30/04/2009.
- [112] European Commission; *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36.