



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NATÁLIA NOGUEIRA SOBRINHO**

**ESTUDO DA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALFACE**

**FORTALEZA**

**2017**

NATÁLIA NOGUEIRA SOBRINHO

ESTUDO DA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALFACE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dra. Helena Becker.  
Co-orientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S659e Sobrinho, Natália Nogueira.  
Estudo da remoção de resíduos de agrotóxicos em alface / Natália Nogueira  
Sobrinho. – 2017. 74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Helena  
Becker. Coorientação: Prof. Dr.  
Guilherme Julião Zocolo.

1. Alface. 2. Agrotóxicos. 3. Remoção. I. Título.

CDD 540

---

NATÁLIA NOGUEIRA SOBRINHO

ESTUDO DA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALFACE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dra. Helena Becker.

Co-orientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo.

DATA DE APROVAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA AVALIADORA

---

Profa. Dra. Helena Becker  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Francisco Wagner de Sousa  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

*In memoriam,*

Aos meus pais, Antônio Henrique e Maria Odete.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS em primeiro lugar pelo dom da vida, e por me permitiu estudar e ansiar pelo conhecimento, por seu amor e por sua infinita misericórdia.

Aos meus pais Antônio Henrique Sobrinho e Maria Odete Nogueira Sobrinho que sempre fizeram tudo para que eu estudasse e tivesse apreço pelos estudos. Embora não estejam mais entre nós, sei que olham por mim de onde estão.

Aos meus irmãos Carlos, Lenara e Taise que se dispuseram a me apoiar e me incentivarem ao longo deste período. E ao meu irmão Henrique que mesmo distante, sempre me apoiou e me incentivou nos estudos.

A minha orientadora a Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Becker, por ter acreditado neste trabalho, pelos ensinamentos, paciência e orientações, tanto no âmbito profissional como pessoal.

Ao pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo pela sua co-orientação, valorosas contribuições e os ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho. Sem esquecer-se do espaço cedido na EMBRAPA para o prosseguimento desta pesquisa e da ajuda valorosa dos técnicos: Lorena, Paulo e Tigressa.

Ao professor participante da banca examinadora Dr. Ronaldo Nascimento por ceder além de seu tempo, as instalações de seus laboratórios para o início e continuidade deste trabalho. Além do auxílio de seus alunos Jhonyson, Carla e Gadelha no uso do CLAE-DAD.

Ao Dr. Francisco Wagner de Sousa participante da banca examinadora, pela disponibilidade, pelo tempo e colaborações que virão a enriquecer esta pesquisa.

A todos os professores e funcionários da pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará (UFC) que de alguma forma contribuíram de modo direto ou indireto para o desfecho deste trabalho. Aos meus professores da Universidade Estadual do Ceará (UECE) que contribuíram com os ensinamentos necessários à minha graduação.

A Ana Cristina Boblitz pela concessão das amostras cultivadas em sua hidroponia para a

realização desta pesquisa, bem como da sua disponibilidade em contribuir com este trabalho, sem estes insumos a pesquisa não teria sido possível.

A comunidade Servos da Divina Misericórdia, especialmente, a fraternidade de irmãos e irmãs, na pessoa do Pe. Edilson, pelo afeto, por todo acolhimento, apoio e momentos de alegria fraterna.

Aos meus amigos, Elaine, Cássia, Davi e Ir. João pelo apoio e os momentos de alegria compartilhados. E também aos meus demais amigos da turma de mestrado e pós-graduação, pelo incentivo e amizade.

A todos os membros do Laboratório de Análises Química (Laquim), em especial ao Mateus que me ajudou na realização dos experimentos, e do Laboratório de Química Ambiental (LaQA), por todo companheirismo e auxílio nos momentos difíceis.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Em suma, a todos que me ajudaram a realizar este trabalho muito obrigada.

“Meu coração encontrava sua alegria no meu trabalho; este é o fruto que dele tirei”. (Eclo 2,10).

## RESUMO

O consumo de alimentos *in natura* tem aumentado devido a mudanças de hábitos para uma alimentação mais saudável. Entretanto, uma preocupação tem surgido relacionado a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, o que tem levantado questionamentos sobre a segurança alimentar. Com a finalidade de promover a remoção de resíduos de agrotóxicos em alface hidropônica, foram avaliados os efeitos de lavagem com água e soluções de limpeza contendo NaClO (2,6%), tintura de iodo (2%), NaHCO<sub>3</sub> (5%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%), todas a temperatura ambiente, mas com tempos de exposições variando entre 20 a 60 min. No estudo de remoção as alfaces foram cultivadas em hidroponia e contaminadas por pulverização, com os agrotóxicos carbendazim e deltametrina. Para a determinação de resíduos de agrotóxicos em estudo, validou-se uma metodologia analítica, adaptada. O método de extração utilizado foi o método QuEChERS original, com o uso do carbono grafitizado (*Grafitized Carbon Black- GCB*) e para análise CLAE-DAD. Os valores estabelecidos para o limite de detecção (LD) foram 0,021 e 0,050 mg kg<sup>-1</sup>, e, para o limite de quantificação (LQ) 0,069 e 0,165 mg kg<sup>-1</sup>, para o carbendazim e deltametrina, respectivamente. As remoções proporcionadas pela solução de NaHCO<sub>3</sub> (5%) variaram entre 67,15% - 98,59%, mas provocou alterações na textura do vegetal. Em virtude disto, a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%) mostrou-se mais eficiente, com percentuais de remoção entre 25,23% - 96,91% dos resíduos na superfície da alface e sem alteração na folha desta hortaliça. O tempo mais favorável para a remoção foi o de 40 min.

**Palavras-chave:** Alface. Agrotóxicos. Remoção.

## ABSTRACT

The consumption of in natura food has increased due to changes in habits for a healthier diet. However, a concern has arisen related to the presence of pesticides residues in food, which has raised questions about food safety. With the purpose of promoting the removal of pesticide residues in hydroponic lettuce, were evaluated the effects of washing with water and cleaning solutions containing NaClO (2.6%), iodine tincture (2%), NaHCO<sub>3</sub> (5%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%), all at room temperature, but with exposure times ranging from 20 to 60 min. In the removal study the lettuces were cultivated in hydroponics and contaminated by spraying, with the pesticides carbendazim and deltamethrin. For the determination of residues of the pesticides in study, an analytical methodology was validated, adapted. The extraction method used was the original QuEChERS method, with the use of Graftitized Carbon Black - (GCB) and for HPLC-DAD analysis. The values established for the limit of detection (LOD) were 0.021e 0.050 mg kg<sup>-1</sup>, and, for the limit of quantification (LOQ) 0.069 and 0.165 mg kg<sup>-1</sup>for carbendazim and deltamethrin, respectively. The removals provided by the NaHCO<sub>3</sub> solution (5%) ranged between 67.15% - 98.59%, but caused changes in vegetable texture. As a result, the use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%) was more efficient, with removal percentages between 25.23% and 96.91%, of the residues on the surface of the lettuce and without alteration in the leaf of this vegetable. The most favorable time for removal was 40 min.

**Keywords:** Lettuce. Pesticides. Removal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química base dos fungicidas benzimidazois.....	21
Figura 2 – Estrutura química dos piretroides sintéticos.....	22
Figura 3 – Procedimento utilizado no preparo de amostra.....	37
Figura 4 – Uso do GCB no clean-up do extrato da alface (A - sem <i>clean-up</i> ; B – <i>clean-up</i> contendo 150 mg MgSO <sub>4</sub> , 25mg PSA e 25mg C18; C – <i>clean-up</i> contendo 150 mg MgSO <sub>4</sub> e 25mg PSA; D - <i>clean-up</i> contendo 150 mg MgSO <sub>4</sub> , 25mg PSA, 25mg C18 e 10 mg de GCB).....	43
Figura 5 – Clean-up contendo 150 mg MgSO <sub>4</sub> , 25mg PSA e 10 mg de GCB.....	43
Figura 6 – Cromatogramas da amostra branco e da amostra fortificada 1 ppm (1 – Carbendazim; 2 – Deltametrina), com seus respectivos espectros de similaridade.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito das soluções de lavagem para o Carbendazim, na matriz contaminada por Carbomax 500 SC e Decis®.....	53
Gráfico 2 – Efeito das soluções de lavagem para a Deltametrina, na matriz contaminada por Carbomax 500 SC e Decis®.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Agrotóxicos usados no cultivo da alface no Brasil, segundo ANVISA.	15
Tabela 2	– Principais doenças da alface, segundo LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, (2010).....	18
Tabela 3	– Classificação toxicológica dos agrotóxicos, baseada na DL <sub>50</sub> .....	20
Tabela 4	– LMR's dos agrotóxicos em estudo.....	23
Tabela 5	– Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos em estudo.....	23
Tabela 6	– Valores para identificação dos agrotóxicos em estudo.....	45
Tabela 7	– Efeito matriz dos agrotóxicos em estudo.....	46
Tabela 8	– Valores obtidos para as curvas analíticas pelo método.....	46
Tabela 9	– Teste da linearidade das curvas analíticas com limite de confiança de 95%.....	47
Tabela 10	– Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas.....	47
Tabela 11	– Parâmetros obtidos pela curva analítica.....	48
Tabela 12	– Comparativo entre os valores de LD obtidos com outros reportados na literatura.....	48
Tabela 13	– Dados de precisão do método por repetibilidade.....	49
Tabela 14	– Valores das recuperações médias e seus respectivos desvios padrões.....	50
Tabela 15	– Efeito das soluções de lavagem na remoção de agrotóxicos em alface hidropônica.....	51
Tabela 16	– Comparativo entre estudos de remoção com soluções de lavagem.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
D- SPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GCB	<i>Grafitized Carbon Black</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMR's	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
UV	Ultra-violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

MeCN	Acetonitrila
kg	Quilograma
®	Marca Registrada
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
C18	Octadecilsilano
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Cultura da alface</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Principais doenças da Alface</b> .....	18
<b>2.3</b>	<b>Agrotóxicos</b> .....	19
<b>2.3.1</b>	<i>Classificação dos agrotóxicos</i> .....	20
<b>2.3.2</b>	<i>Agrotóxicos em estudo</i> .....	20
<b>2.3.2.1</b>	<i>Benzimidazol</i> .....	21
<b>2.3.2.2</b>	<i>Piretroides</i> .....	21
<b>2.4</b>	<b>Remoção de agrotóxicos em alimento</b> .....	23
<b>2.5</b>	<b>Preparo de amostra na determinação de agrotóxicos em alimentos</b> .....	25
<b>2.5.1</b>	<i>Método QuEChERS</i> .....	26
<b>2.5.1.1</b>	<i>Etapa de extração</i> .....	26
<b>2.5.1.2</b>	<i>Etapa de partição</i> .....	27
<b>2.5.1.3</b>	<i>Etapa de limpeza</i> .....	27
<b>2.7</b>	<b>Validação de métodos analíticos</b> .....	28
<b>2.7.1</b>	<i>Seletividade</i> .....	28
<b>2.7.1.1</b>	<i>Efeito matriz</i> .....	29
<b>2.7.2</b>	<i>Linearidade</i> .....	29
<b>2.7.3</b>	<i>Sensibilidade</i> .....	30
<b>2.7.4</b>	<i>Limite de detecção (LD)</i> .....	30
<b>2.7.5</b>	<i>Limite de quantificação (LQ)</i> .....	31
<b>2.7.6</b>	<i>Precisão</i> .....	31
<b>2.7.6.1</b>	<i>Repetibilidade</i> .....	32
<b>2.7.7</b>	<i>Exatidão</i> .....	32
<b>2.8</b>	<b>O uso da cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos na determinação de agrotóxicos em alimentos</b> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35

<b>4.1</b>	<b>Instrumentação.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes, solventes, adsorventes e vidrarias.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções-padrões dos agrotóxicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Preparação das soluções estoque dos agrotóxicos.....</i>	<i>36</i>
<b>4.4</b>	<b>Pré-tratamento das amostras de alface crespa hidropônica.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Preparo da amostra.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.1</b>	<i>Estudo da quantidade de GCB utilizada no clean-up.....</i>	<i>38</i>
<b>4.6</b>	<b>Condições cromatográficas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Validação do método.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Seletividade.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7.1.2</b>	<i>Efeito matriz.....</i>	<i>38</i>
<b>4.7.2</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7.2.1</b>	<i>Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão).</i>	<i>39</i>
<b>4.7.2.2</b>	<i>Teste de significância dos parâmetros da curva de calibração.....</i>	<i>39</i>
<b>4.7.3</b>	<b>Sensibilidade.....</b>	<b>40</b>
<b>4.7.4</b>	<b>Limite de detecção (LD).....</b>	<b>40</b>
<b>4.7.5</b>	<b>Limite de quantificação (LQ).....</b>	<b>40</b>
<b>4.7.6</b>	<b>Precisão.....</b>	<b>40</b>
<b>4.7.7</b>	<b>Exatidão.....</b>	<b>41</b>
<b>4.8</b>	<b>Preparo das soluções de remoção.....</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>Amostras de alface contaminada.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Estudo do GCB no clean-up.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Validação do método analítico.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Seletividade.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.2.1</b>	<i>Efeito matriz.....</i>	<i>45</i>
<b>5.2.3</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.3.1</b>	<i>Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão).</i>	<i>46</i>
<b>5.2.3.2</b>	<i>Teste de significância dos parâmetros da curva de calibração.....</i>	<i>47</i>
<b>5.2.4</b>	<b>Sensibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Precisão.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Exatidão.....</b>	<b>49</b>

<b>5.3</b>	<b>Estudos de remoção dos agrotóxicos.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A – CROMATOGRAMAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A alface produzida no Brasil, em geral, vem dos grandes mercados nacionais (Sudeste e Sul). Esta hortaliça vem sendo a mais consumida e a que possui maior área produtível, dentre as folhosas, na região Sudeste (CARVALHO et al, 2016).

Esta hortaliça folhosa pode ser atacada por doenças que acometem a raiz, a folha ou o seu caule. Tais regiões da planta são atacadas por vírus, bactérias, fungos ou ainda geradas por distúrbios fisiológicos provenientes do seu tipo de cultivo (irrigação ou hidroponia) (SILVA; NETO, 2007; LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

Com o intuito de minimizar as doenças, especialmente nas raízes, procurou-se cultivar esta hortaliça longe do solo, em cultivos protegidos (LOPES; CARRIJO; MAKISHIMA, 2005). Um dos cultivos protegidos mais conhecidos é o cultivo por hidroponia, onde o vegetal recebe nutrientes de uma solução contendo, basicamente, água e sais que possibilitem o seu crescimento (GUALBERTO; OLIVEIRA; GUIMARÃES, 2009). Entretanto, as doenças fúngicas, principalmente, continuaram a se manifestar, pois provinham do novo ambiente de cultivo (LOPES; CARRIJO; MAKISHIMA, 2005).

Devido ao ambiente hidropônico ser bastante úmido, ocorre bastante proliferação de infecções fúngicas e bacterianas nas alfaces produzidas. Em decorrência disso, o uso de agrotóxicos com ação fungicida e inseticida são utilizados para controle (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

Neste contexto, na cultura da alface é requerido um controle destas doenças e pragas que acometem a sua produção, sejam por boas práticas na colheita ou pelo uso de defensivos agrícolas autorizados, para esta cultura. Sendo assim, deve seguir as indicações e normas estabelecidas pelos órgãos reguladores, como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), onde a dosagem a ser aplicada deve seguir níveis aceitáveis, que não venham a comprometer a segurança do alimento (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

O uso de agrotóxicos na cultura da alface hidropônica é permitido, desde que apresentem alta solubilidade em água, e sejam usados em pequenas quantidades (STERTZ; FREITAS, 2003).

O problema gerado pelo uso destes agrotóxicos neste tipo de cultivo representa um maior acúmulo destes resíduos nas folhagens, pois estes defensivos agrícolas após serem pulverizados permanecem mais tempo em contato com a alface (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

Deste modo, a preocupação com a contaminação dos alimentos tem aumentado devido ao uso irregular de agrotóxicos não autorizados para determinados tipos de cultura, dosagens excessivas sem respeitar os limites máximos estabelecidos pelos órgãos reguladores ou ainda pelo uso de agrotóxicos já banidos do nosso país (ANVISA, 2017).

A Tabela 1 mostra os 10 agrotóxicos mais utilizados no Brasil, para a cultura da alface, analisadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que avaliam os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal. No período de 2001 a 2015 (ANVISA, 2017) podemos ver o carbendazim, em segundo lugar, com ação fungicida, e em quarto a deltametrina, que tem ação inseticida.

Tabela 1- Agrotóxicos usados no cultivo da alface no Brasil, de 2001 a 2015, segundo ANVISA.

	Agrotóxicos	Grupo químico	Nº Ocorrências
1º	Ditiocarbamatos	Ditiocarbamato (CS2)	418
2º	Carbendazim	Benzimidazol	155
3º	Imidacloprido	Neonicotinoide	107
4º	Deltametrina	Piretroide	93
5º	Metamidofós	Organofosforado	84
6º	Difenoconazol	Triazol	68
7º	Tebuconazol	Triazol	43
8º	$\lambda$ -Cialotrina	Piretroide	42
9º	Acefato	Organofosforado	41
10º	Clorpirifós	Organofosforado	37

Fonte: elaborada pela autora.

Este monitoramento realizado pelo PARA-ANVISA procura assegurar a segurança alimentar da população, verificando as quantidades de resíduos presentes nos alimentos e ainda se estão contaminados por resíduos de agrotóxicos não autorizados para as diversas culturas (ANVISA, 2017).

Com isto, métodos de análises sensíveis precisam ser propostos com o objetivo de detectar níveis cada vez menores destes resíduos. Além da detecção, é importante também, buscar maneiras que promovam a sua remoção assegurando um alimento de fato mais seguro.

Os estudos de remoção de ditiocarbamatos e imidacloprido em alface já foram reportados na literatura, utilizando soluções de lavagem ou apenas água (LÓPEZ-FERNANDEZ; RIAL-OTERO; SIMAL-GÁNDARA, 2013; ITOIZ et al, 2012). Entretanto, este trabalho propõe avaliar a remoção de resíduos de carbendazim e deltametrina em alface hidropônica, utilizando soluções de lavagem em diferentes tempos. Buscamos avaliar a

remoção de agrotóxicos com características distintas no seu modo de ação, um sistêmico e outro não sistêmico, com diferenças significativas em suas solubilidades em água.

Pelas razões já elencadas acima e devido ao pequeno número de trabalhos de remoção com soluções de lavagem em alface, este trabalho tem por finalidade, adaptar e validar uma metodologia analítica para os compostos em estudo, bem como avaliar uma solução de limpeza que promova a remoção de resíduos de agrotóxicos de uma maneira mais eficiente, observando o efeito do tempo.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Cultura da Alface

Historicamente, a alface (*Lactuca sativa*) é originária da região do Mediterrâneo, no Oriente Médio. Evidências mostram que sua domesticação ocorreu a partir de um ancestral a espécie selvagem *L. serriola*. (VRIES, 1997 *apud* SALA; COSTA, 2012). Pertence à família Asteraceae, sendo o seu representante mais conhecido (DURAZZO et al, 2013).

A alface é uma das hortaliças de maior consumo no Brasil. Sua popularização deve-se ao seu uso em saladas, em preparo de sanduíches por grandes redes de *fast food*, também pela busca de hábitos alimentares mais saudáveis. (SALA; COSTA, 2012).

Dentre os tipos de alface existentes no mundo, até a década de 80 a alface mais produzida e conseqüentemente mais consumida no Brasil foi a alface lisa. No entanto, as altas temperaturas do verão, provocavam elevadas perdas, neste período onde o consumo do produto é maior. Em decorrência disso, começou-se a cultivar a alface do tipo crespa que era adequada a este período de elevadas temperaturas, além de poder ser transportada em caixas de madeira, sem ocorrer a quebra de suas folhas, e ser produzida com coloração verde claro, semelhante à do tipo lisa. (SALA; COSTA, 2012).

Para o cultivo da alface são exigidas temperaturas amenas, sendo sua produção apropriada para o inverno. O seu cultivo no período do verão, compromete a produção, gerando produtos com qualidade inferior e de alto custo. (HENZ; SUINAGAD, 2009). Por conseguinte, procura-se melhoramento nas formas de cultivo da alface visando a sua produção em condições climáticas diferentes, qualidade, quantidade e produção regular. (SALA; COSTA, 2012). Neste contexto, o cultivo da alface hidropônica tem se mostrado como uma alternativa a contornar estes transtornos.

A técnica de hidroponia consiste na utilização de uma solução nutritiva que fornece à planta os nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, substituindo o uso do solo para esta finalidade (NETO; BARRETO, 2013; LOPES; SILVA; GUEDES, 2015).

Dado que a produção é em ambiente protegido, as alfaces cultivadas não são expostas ao vento forte, chuvas intensas ou de granizo, seu ciclo de cultura é reduzido, ocorre redução também no uso de fertilizantes e somando-se a isso a produção durante todo o ano possibilita o abastecimento do mercado continuamente (PAULUS et al, 2012).

O cultivo da alface por hidroponia também foi norteadado pelo intuito da redução do ataque de pragas e da incidência de doenças nesta hortaliça provenientes do solo, especialmente na região das suas raízes. Entretanto, as patologias prosseguiram estando atreladas ao manejo do sistema (LOPES; CARRIJO; MAKISHIMA, 2005; LOPES; SILVA;

GUEDES, 2015).

## 2.2 Principais doenças da Alface

A alface em seus diversos cultivos é acometida por doenças causadas por fungos, bactérias ou vírus. Algumas destas patologias são agravadas pelo meio em que o vegetal é cultivado, devido as interações entre o meio e o agente patogênico. No cultivo hidropônico, caso o conteúdo da solução nutritiva não seja regulado e/ou ocorram drásticas alterações no clima, tais fatores colaboram com a frequente proliferação de doenças (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010). Dentre as principais patologias que incidem na alface, em nosso país temos, conforme Tabela 2:

Tabela 2- Principais doenças da alface, segundo LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, (2010).

Agente Patológico	Doenças	Tipo de cultivo
Fungos	Mildio ( <i>Bremia lactucae</i> )	Campo e hidroponia
	Tombamento ( <i>Rhizoctonia solani</i> )	Campo (mais comum) e hidroponia
	Mancha-de-cercóspora ( <i>Cercospora longissima</i> )	Cultivos protegidos, como hidroponia
	Podridão radicular (espécies do gênero <i>Pythium</i> )	Hidroponia
	Septoriose ( <i>Septoria lactucae</i> )	Cultivos irrigados
Bactérias	Mancha bacteriana ( <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vitians</i> )	Campo
	Podridão –mole ( <i>Pectobacterium</i> spp.)	Campo
Vírus	Mosaico ( <i>Lettuce mosaic virus</i> =LMV)	Campo
	Vira-cabeça (várias espécies do gênero <i>Tospovirus</i> )	Campo

Fonte: elaborada pela autora.

Para o controle destas doenças recomendam-se o uso do conjunto de procedimentos, chamados de boas práticas agrícolas aplicadas desde a pré-colheita até a pós-colheita, além do uso de agrotóxicos, caso necessário, autorizados e aplicados nas quantidades recomendadas pelos órgãos reguladores (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010).

### 2.3 Agrotóxicos

Agrotóxico é a substância ou a mistura de substâncias químicas, empregadas pelo homem, cujo objetivo é prevenir ou destruir direta ou indiretamente a ação de pragas na agricultura (DORS et al, 2011).

No Brasil o uso de agrotóxicos é regido pela Lei Federal nº 7.802 de 1989, e regulamentado pelo decreto nº 4.074 de 2002, que define tais substâncias e afins como *os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos* (BRASIL, 2002).

Geralmente, a agricultura praticada no mundo moderno é altamente dependente do uso de pesticidas. Após a Segunda Guerra Mundial o número de produtos sintéticos para insumos agrícolas tem aumentado, devido aos diferentes tipos de agricultura praticada e ao surgimento de novas pragas, ou a resistência de outras aos pesticidas já existentes (CARNEIRO et al, 2015; CARMO et al, 2016).

No entanto, se os benefícios trazidos pelo uso destes produtos nas plantações são aceitáveis, em contrapartida os efeitos do uso prolongado destes insumos têm causado a contaminação residual de alimentos e a ingestão destes alimentos, tem proporcionado a intoxicação de animais e do homem (LONDRES, 2011; MELO et al, 2012; CARMO et al, 2016).

Tais consequências são geradas pelo uso indiscriminado destes produtos químicos, não respeitando as boas práticas agrícolas, o que tem proporcionado o acúmulo de resíduos e/ou de seus produtos de degradação em alimentos. Por consequência os órgãos reguladores têm procurado estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's), na tentativa de garantir a segurança alimentar (CABRERA et al, 2014; CARMO et al, 2016).

No Brasil, órgãos como a ANVISA através do PARA, e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), visam monitorar e estabelecer normas que venham a assegurar alimentos seguros a população. No âmbito internacional, órgãos como o “*Codex Alimentarius*” e União Europeia (EU) também desempenham papéis semelhantes (ANVISA, 2017; MAPA, 2017; CODEX ALIMENTARIUS, 2016; UNIÃO EUROPEIA, 2016).

### 2.3.1 Classificação dos Agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a sua origem, ao organismo alvo (finalidade) e quanto a sua toxicidade. No que se refere a sua classificação quanto à origem química, são ditos agrotóxicos orgânicos (dentre eles: benzimidazois, piretroides, organofosforados, organoclorados) e inorgânicos (a base de arsênico, mercúrio, cobre e chumbo); estes últimos foram largamente utilizados no passado, antes do advento dos agrotóxicos orgânicos (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Em relação ao modo de ação ou a sua finalidade são ditos acaricidas (controle de ácaros), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de ervas daninhas), inseticidas (combatem insetos), formicidas (controle de formigas), dentre outros (KARAM et al., 2015).

Os agrotóxicos podem ainda ser classificados quanto a sua toxicidade, segundo a ANVISA dependendo dos seus efeitos agudos na saúde humana. De acordo com o Ministério da Saúde tal classificação é estabelecida conforme a dose média letal ( $DL_{50}$ ) que corresponde à dose necessária a ser administrada para provocar o óbito em 50% dos animais utilizados em experimentos nas condições estabelecidas (KARAM et al., 2015).

A  $DL_{50}$  é baseada, normalmente na ingestão por via oral das formulações sólidas ou líquidas dos agrotóxicos e os seus valores são expressos em miligramas do agrotóxico por quilogramas de peso vivo do animal (KARAM et al., 2015; BARRIGOSI, 2017). Cada agrotóxico deve informar no rótulo, de acordo com a legislação brasileira, a cor alertando seus efeitos tóxicos, conforme mostrado na Tabela 3 (BRASIL, 2002; BARRIGOSI, 2017).

Tabela 3- Classificação toxicológica dos agrotóxicos, baseada na  $DL_{50}$ .

Classe	Grau de toxicidade	$DL_{50}$	Cor do rótulo
I	extremamente tóxico	$< 50 \text{ mg kg}^{-1}$	Vermelho
II	altamente tóxico	$\geq 50 \text{ a } 500 \text{ mg kg}^{-1}$	Amarelo
III	medianamente tóxico	$\geq 500 \text{ a } 5000 \text{ mg kg}^{-1}$	Azul
IV	pouco tóxico	$> 5000 \text{ mg kg}^{-1}$	Verde

Fonte: adaptada de BARRIGOSI (2017).

### 2.3.2 Agrotóxicos em estudo

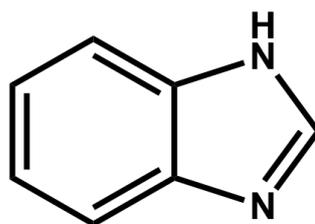
Os agrotóxicos estudados foram selecionados por estarem presentes na cultura da alface, mesmo não tendo o seu uso autorizado pela ANVISA, neste vegetal. Ainda assim, no monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos feito pela agência supracitada, no

período de 2001 a 2015, mostram um grande número de amostras de alface contaminadas por resíduos destes defensivos agrícolas, segundo a Tabela 1 (ANVISA, 2017).

### 2.3.2.1 Benzimidazol

Os fungicidas benzimidazois foram introduzidos a partir da década de 60 e são os agrotóxicos sistêmicos mais conhecidos e, provavelmente os mais utilizados por conta de sua eficácia no controle destes patógenos (COUTINHO et al, 2006). Este grupo químico é representado por fungicidas que possuem, em sua estrutura base, um anel imidazol com átomos de nitrogênio ácido e básico (Figura 1). Agem nos fungos pela inibição de proteínas específicas que impedem a divisão celular dos mesmos, causando-lhes a morte (TORRES-PADRÓN, 2010).

Figura 1- Estrutura química base dos fungicidas benzimidazois.



Fonte: elaborada pela autora.

O ingrediente ativo deste grupo, largamente utilizado é o metil benzimidazol-2-ilcarbamato (MBC), mais conhecido por carbendazim, cuja estrutura é mostrada na Tabela 4. Tem seu uso autorizado em diversas culturas no Brasil e Europa, mas banido em países, como os EUA (FDA, 2013).

O carbendazim é considerado um composto quimicamente estável, quando está em ambiente anaeróbico, o que dificulta a sua degradação. No entanto, em meio alcalino ou com alterações de temperatura sua estabilidade é comprometida, especialmente na presença de oxigênio (JIA et al, 2003). Normalmente o carbendazim, no ambiente é encontrado na forma de seus produtos de degradação, formados dependendo do meio em que se encontram (SILVA; BARROS; PAVÃO, 2014).

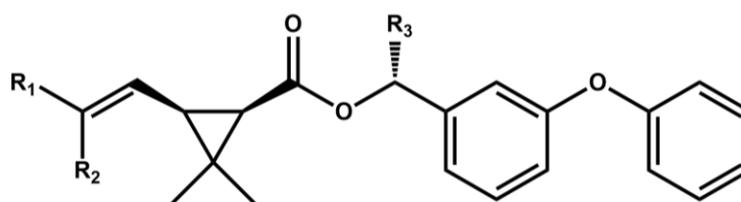
### 2.3.2.2 Piretroides

Os piretroides constituem uma classe de agrotóxicos largamente utilizados na agricultura moderna, e em várias culturas aqui no Brasil. Derivados sintéticos das piretrinas,

que são inseticidas naturais produzidos por flores do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium*, possuem vasta ação contra diversas espécies de insetos e baixa toxicidade a mamíferos (KUMAR et al 2011).

No entanto, devido a sua instabilidade à luz solar e ao ar, sua eficácia como inseticida natural ficou comprometida. Por isso, em meados dos anos 70 iniciou-se a utilização de piretroides sintéticos, com a alteração química na estrutura das piretrinas, viabilizando a solução dos problemas destas substâncias naturais, segundo mostra a figura 2 (HEUDORF; ANGERER, 2001).

Figura 2- Estrutura química dos piretroides sintéticos.



Fonte: elaborada pela autora.

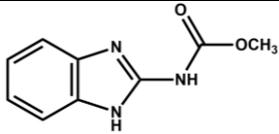
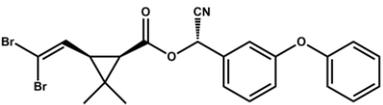
Os piretroides sintéticos são estáveis em meio ácido, entretanto em pH alcalino o éster da estrutura é hidrolisado, em decorrência disso ocorre rápida degradação destes compostos (MAUND et al, 2012). Sua ação consiste na imediata paralização do inseto e consequente morte (NARAHASHI, 2000).

Em decorrência de suas vantagens, os piretroides tornaram-se bastante utilizados na agricultura e em outros meios. Embora considerados de baixa toxicidade aos mamíferos, seu acúmulo no ambiente vem provocando um aumento da poluição a nível mundial, e novos estudos apontam que seu uso amplificado, provavelmente, causam efeitos tóxicos em humanos a longo prazo (EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Um dos piretroides comercialmente vendido é a deltametrina, cuja fórmula estrutural química está representada na Tabela 4.

A deltametrina, (*S*)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato, é um piretroide sintetizado em 1974, pela introdução do grupo  $\alpha$ -ciano, em sua estrutura, conferindo-lhe maior potencial inseticida que o piretroide inicialmente sintetizado (cipermetrina) (GALEB, 2010). Considerado o mais tóxico dentre os piretroides para animais vertebrados, seu uso é permitido em inúmeras culturas em nosso país, com aplicação foliar, em sua maioria (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; ANVISA, 2017).

Devido a ANVISA, agência reguladora do nosso país, não estabelecer valores de limite máximo de resíduos (LMR's), destes compostos em estudo, na cultura da alface, por terem seu uso não autorizado, buscou-se retratar os LMR's de outras agências reguladoras internacionais, como o “*Codex Alimentarius*” e União Europeia (EU) (ANVISA, 2016; CODEX ALIMENTARIUS, 2016; European Union, 2016).

Tabela 4- LMR's dos agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	Estrutura química	Classe	LMR's (mg kg <sup>-1</sup> )		
			ANVISA	Codex Alimentarius	União Europeia (EU)
Carbendazim		Fungicida	-	5,0	-
Deltametrina		Inseticida	-	2,0	0,5

Fonte: elaborada pela autora.

## 2.4 Remoção de agrotóxicos em alimentos

A aplicação de agrotóxicos na produção e cultivo de alimentos tem gerado a permanência de resíduos nestes produtos, mesmo após a colheita, em alimentos processados, frescos ou cozidos. Isso em razão do modo de ação dos agrotóxicos que podem ser: sistêmicos- penetram no interior do vegetal, circulando através da seiva; de contato-agem, normalmente, no exterior do vegetal; e de suas propriedades físico-químicas, tais como: solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), constante de dissociação ácida (pKa), constante de dissociação básica (pKb), constante de Henry, pressão de vapor (CABRERA et al, 2014; ANVISA, 2017). Algumas dessas propriedades físico-químicas dos agrotóxicos em estudo estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5- Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos em estudo.

Princípio ativo	<sup>1</sup> Sol. 20°C (mg L <sup>-1</sup> )	<sup>2</sup> Log $K_{ow}$	<sup>3</sup> pKa 25°C
Carbendazim	8,0	1,48	4,2
Deltametrina	0,0002	4,6	-

<sup>1</sup>Solubilidade em água a 20°C em pH 7. <sup>2</sup> Coeficiente de partição octanol-água. <sup>3</sup> Constante de dissociação ácida.

Fonte: elaborada pela autora.

Neste contexto, alguns processos de lavagem sejam industriais ou domésticos, antes do consumo dos alimentos têm sido estudados no intuito de comprovar a sua eficácia no processo de remoção ou redução dos níveis destes resíduos provenientes da sua produção ou por contaminação ambiental (LING, 2011; CABRERA et al, 2014; LÓPEZ-FERNANDEZ; RIAL-OTERO; SIMAL-GÁNDARA, 2013).

Os processos de lavagem são o primeiro passo indicado antes do consumo de qualquer fruta ou hortaliça, isto decorre, primeiramente, da necessidade de higienizar o alimento contra a proliferação de micro-organismos patogênicos presentes no exterior destes alimentos, evitando, deste modo, a interiorização de agentes patogênicos (CABRERA et al, 2014).

Nos processos de lavagem, a remoção de agrotóxicos, depende de muitos fatores, como as propriedades físico-químicas do agrotóxico, o tipo de agente utilizado na solução de lavagem, o tempo de contato do alimento com a solução, temperatura da água e até mesmo da interação do resíduo com a superfície do alimento (LIANG et al, 2012; CHEN et al, 2015).

Outro ponto relevante dos processos de remoção está atrelado ao tipo de produto gerado pelos processos de limpeza. Ocorre que durante o processo, alguns agrotóxicos degradam-se e acabam por gerar produtos mais tóxicos ou mais persistentes que os agrotóxicos de origem, deste modo colaborando com o aumento do risco alimentar (CHEN et al, 2015). Além disso, o agente sanitizante deve ser de baixa toxicidade (CENGIZ; CENTEL, 2013).

Após os processos de lavagem, seguem-se ainda, o descascamento do alimento, que promove a remoção dos agrotóxicos na sua superfície, ou ainda o seu cozimento que tem propiciado a redução dos resíduos na polpa de alguns alimentos (LING et al, 2011). No entanto, tais processos acabam por serem restritos a alimentos que possuam casca ou possam ser submetidos ao aquecimento. Ademais, tais processos influenciam na redução da disponibilidade dos nutrientes presentes no alimento (CABRERA et al, 2014; HELENO et al, 2015).

Processos térmicos, como cozimento são utilizados considerando efeitos de volatilização, degradação térmica ou ainda reações de hidrólise (BALINOVA; MLADENOVA; SHTEREVA, 2006).

A literatura reporta alguns trabalhos utilizando soluções de limpeza na remoção de agrotóxicos em alimentos, como o de Ling e colaboradores (2011) que estudaram o efeito das soluções de lavagem e o cozimento na remoção de clorpirifós em vegetais, como repolho, berinjela, tomate, pepino e couve, com soluções compostas por hipoclorito de sódio (NaClO),

detergentes e simplesmente água de torneira; Liang et al (2012) estudaram a remoção de agrotóxicos organofosforados em pepino, utilizando soluções de limpeza, contendo bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e  $\text{NaCl}$  e limpeza ultrassônica; Cengiz e Certel (2013) estudaram o efeito das soluções de lavagem, incluindo ozônio na remoção de resíduos de mancozeb em tomate; e ainda estudos realizados por López-Fernandez; Rial-Otero; Simal-Gándara, em 2013, que estudaram soluções de lavagem na remoção de mancozeb em alface. As soluções eram constituídas por hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) em diferentes temperaturas.

## **2.5 Preparo de amostra na determinação de agrotóxicos em alimentos**

A determinação de resíduos de pesticidas em amostras alimentares é bastante laboriosa, pois o nível de concentração destes analitos, geralmente, estão à níveis traços, devendo as amostras serem submetidas a etapas de extração e/ou pré-concentração dos analitos nas matrizes a serem estudadas (STOCKA; BIZIUK; NAMIESNIK, 2016; PRESTES et al, 2009), uma vez que a matriz somente pode ser submetida à análise no equipamento, após a limpeza e isolamento dos analitos para que os resultados gerados sejam confiáveis, minimizando assim os possíveis erros (NASCIMENTO et al, 2016; JARDIM, 2010).

Normalmente, este tipo de análise em matrizes alimentares é complexo devido à presença de constituintes e de suas características na própria amostra, o que dificulta a quantificação destes analitos. Neste contexto, muitas técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas, em grande parte, utilizando solventes orgânicos para a extração, gerando longo tempo no processo ou empregando instrumentos para a automação (PRESTES; ADAIME, ZANELLA, 2011).

Um método ideal de preparo de amostra deve apresentar pequeno número de etapas, ser de fácil operação, ter um custo relativamente baixo e dispender o mínimo de tempo possível na sua realização. Ademais, utilizar pequenas quantidades de solventes, com baixa toxicidade, alta sensibilidade e possibilitar altos valores de recuperação dos analitos (SKOOG et al, 2013; PRESTES; ADAIME, ZANELLA, 2011).

Muitas técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas, nos últimos anos, dentre elas, o método QuEChERS, proposto por Anastassiades et al, em 2003. Este método vem sendo empregado na determinação de pesticidas em matrizes alimentares, pois seu desenvolvimento buscou suprir as limitações de métodos multirresíduos já existentes.

### 2.5.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS, nome formado pelas iniciais dos seguintes termos em inglês, (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), é um método de preparo de amostra vantajoso por ser considerado: rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (PRESTES; et al, 2009).

Este método envolve três etapas: extração, partição e limpeza (*clean-up*). Na etapa de extração utiliza-se como solvente extrator a acetonitrila (MeCN). Na etapa de partição utiliza-se uma mistura dos sais, sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e cloreto de sódio (NaCl). E por fim a etapa da limpeza, o *clean-up*, considerada a mais importante, pois confere ao analito o isolamento dele da matriz (ANASTASSIADES et al, 2003; PRESTES et al, 2009).

Com o método QuEChERS, foi também introduzido outro método de *clean-up*, o D-SPE (*Dispersive Solid Phase Extraction*) ou extração em fase sólida dispersiva (EFSD), a qual dispensa o uso de cartuchos e utiliza um sorvente combinado com o (MgSO<sub>4</sub>) anidro (ANASTASSIADES et al, 2003; PRESTES et al, 2009).

Primeiramente, antes da aplicação do método de preparo da amostra, amostras sólidas, como alimentos, necessitam de uma pré-etapa que possibilite a homogeneização deste alimento, para uma melhor representatividade da amostra (SKOOG et al, 2013).

O método QuEChERS utiliza apenas 10 g da amostra, o que conforme a literatura torna-o ideal quando comparado com outros métodos que utilizam de 15g a 100g. Segundo este método, 10g é uma quantidade representativa para a realização da análise (ANASTASSIADES et al, 2003).

#### 2.5.1.1 Etapa de extração

Na etapa de extração a acetonitrila (MeCN) foi a escolhida como solvente extrator, por proporcionar a extração de uma faixa grande de pesticidas com polaridades diferentes, além de ser compatível com o uso das técnicas cromatográficas e extrair menores quantidades de coextrativos com características lipofílicas (ANASTASSIADES et al, 2003; PRESTES et al, 2009).

Neste método são utilizados 10 mL de MeCN para os 10 g da amostra, isto indica que a extração ocorre numa proporção de 1:1 (1mL de MeCN para 1g de amostra). Mesmo sendo consideradas pequenas quantidades, para as técnicas cromatográficas aplicadas e os agrotóxicos analisados, em sua maioria, atualmente, tais quantidades são apropriadas (PRESTES et al, 2009).

### 2.5.1.2 Etapa de partição

Para a segunda etapa, conforme o método original, são utilizados a adição de sais, como o ( $\text{MgSO}_4$ ) anidro, e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), que promovem o efeito *salting out*, isto é, promovem a liberação dos analitos polares para a fase orgânica, além de diminuir a quantidade de água no meio (ANASTASSIADES et al, 2003; PRESTES et al, 2009).

O  $\text{MgSO}_4$  anidro sofre hidratação através de uma reação exotérmica, o que promove a redução na quantidade de água no meio. Este sal também, quando comparado com outros já utilizados em outros métodos, remove grandes quantidades de água (ANASTASSIADES et al, 2003). O  $\text{NaCl}$  possibilita a liberação de analitos apolares por ligar-se mais efetivamente com a água, no meio, disponibilizando assim estes analitos para a fase orgânica.

### 2.5.1.3 Etapa de limpeza

Por fim a etapa da limpeza, o *clean-up*, considerada a mais importante, confere ao analito o isolamento dele da matriz, o sorvente utilizado é a amina primária secundária ou (PSA- *Primary Secondary Amine*) para a remoção de interferentes na amostra. O uso de PSA remove interferentes através do seu efeito quelantes pela presença dos grupos amino. Por conta disso, remove açúcares, ácidos graxos e outros compostos polares, possíveis interferentes na amostra. No entanto, não é considerado eficiente na remoção de gorduras (CABRERA et al, 2012).

O uso do  $\text{MgSO}_4$  anidro promove a remoção de água residual, enquanto a limpeza dos analitos é realizada (CABRERA et al, 2012). Este método de limpeza buscou obter um extrato da matriz com o mínimo de interferentes. Por fim, o extrato final pode ser analisado (ANASTASSIADES et al, 2003; PRESTES et al, 2009).

Algumas alterações para o método QuEChERS original foram propostas na literatura, baseadas especialmente nas propriedades de alguns pesticidas, devido alguns destes analitos apresentaram baixa recuperação ou mostraram-se instáveis em determinadas faixas de pH da própria matriz. Baseando-se nisto algumas modificações foram aplicadas a este método conforme Anastassíades et al (2003) e González-Curbelo et al (2015).

De acordo com González et al, (2015), três grandes modificações foram realizadas: a primeira utilizando um tampão de citrato e acetato, originando assim o método QuEChERS citrato e o método QuEChERS acetato, respectivamente. Estes tampões forneceram um pH em torno de 5 para estas modificações do QuEChERS (LEHOTAY;

MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005). A segunda foi na D-SPE, nas quantidades do PSA e na utilização de octadecilsilano (C18) para promover uma melhor limpeza do extrato da matriz (ANASTASSÍADES et al, 2007; LEHOTAY et al, 2010). O uso de C18 promove uma maior limpeza em matrizes que contêm lipídios (GONZÁLEZ-CURBELO et al, 2015; LEHOTAY et al, 2010).

A terceira modificação seria no uso do carbono grafitizado (GCB), ele adsorve compostos planares, como pigmentos de vegetais, que provocariam um desgaste do sistema cromatográfico ao longo das análises (GONZÁLEZ-CURBELO et al, 2015). Esta adsorção ocorre, possivelmente, por interações na superfície do GCB, que apresenta grande área planar. Interações estas do tipo pi-stacking que ocorrem entre compostos aromáticos ou compostos que tenham ligações do tipo  $\pi$ , isto pode explicar a forte interação por compostos planares (MARTINEZ; IVERSON, 2012). Além disto, a retenção de pigmentos pelo uso do GCB pode ocorrer pela presença de resíduos de grupos polares que promoveriam ligações de hidrogênio (CABRERA et al, 2016). Este vem sendo o grande problema do uso do GCB na análise de pesticidas em alimentos, pois provoca uma baixa recuperação em pesticidas com estruturas planares (LEHOTAY et al, 2010; MARTINEZ; IVERSON, 2012).

## **2.7 Validação de métodos analíticos**

Para que um método analítico gere resultados confiáveis, diversos estudos e experimentos são realizados na amostra em estudo, a este processo chamamos validação. No Brasil existem agências reguladoras e órgãos que disponibilizam guias para validação de metodologias analíticas, como a ANVISA, o MAPA e o Inmetro (ANVISA, 2003; MAPA, 2011; INMETRO, 2016).

Geralmente, na validação da metodologia analítica alguns parâmetros são utilizados como: seletividade, efeito matriz, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

### **2.7.1 Seletividade**

A seletividade de um método avalia a sua capacidade em gerar respostas para os analitos e garante que o sinal analítico seja exclusivamente do analito. Caso a seletividade não seja assegurada outros parâmetros analíticos como a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas (LEITE, 2008; INMETRO, 2016).

O estudo da seletividade está baseado na presença ou ausência na amostra do analito de interesse. Para tanto, realiza-se um estudo comparativo da resposta gerada pela

matriz isenta dos analitos, com a matriz fortificada por concentrações conhecidas dos compostos de interesse; com o propósito de verificar a presença de algum interferente na amostra que possibilite a coeluição com os compostos de interesse (INMETRO, 2016).

### 2.7.1.1 Efeito Matriz

Este parâmetro é de suma importância para resultados confiáveis na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. O efeito matriz baseia-se num aumento de sinal do analito ou supressão do mesmo por algum componente presente na matriz, ou ainda por erro na etapa de preparo de amostra. Além disso, também é considerado um estudo de seletividade (MAPA, 2011).

Este parâmetro pode ser calculado pela comparação da inclinação das curvas analíticas dos padrões puros no solvente e dos padrões acrescidos no extrato da matriz, conforme mostrado na equação 1 (PASCHOAL et al, 2008).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$x_1$  =Inclinação da curva analítica obtida pela injeção dos padrões analíticos no extrato da matriz;

$x_2$  = Inclinação da curva analítica obtida pela injeção dos padrões analíticos no solvente puro;

O efeito matriz é desconsiderado, caso a amostra não demonstre, em nenhum nível de fortificação a sua presença (MAPA, 2011). Segundo WALORCZYK (2014), valores variando entre  $\pm 20\%$ , não são significativos.

### 2.7.2 Linearidade

A linearidade expressa à capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um intervalo de concentração apropriado (LANÇAS, 2009).

A linearidade pode ser representada pela correlação entre o sinal analítico gerado pelo equipamento e as concentrações dos analitos a serem medidas. Esta correlação é expressa matematicamente por uma equação da reta, expressa na equação 2, também chamada de curva analítica, e os seus coeficientes podem ser estimados baseados na regressão linear ou método dos mínimos quadrados, que é um método matemático (LEITE, 2008; RIBANI et.al. 2004;

INMETRO, 2016).

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde:

$y$  = sinal analítico (área ou altura do pico)

$x$  = concentração do analito

$a$  = coeficiente angular (inclinação da reta)

$b$  = coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo  $x$ )

Pela regressão linear, também pode-se calcular o coeficiente de correlação  $r$  ou o coeficiente de determinação  $R^2$ . O valor de  $r$  deve ser próximo a 1,0, pois isto indica que os pontos estarão menos dispersos e menor será a incerteza dos coeficientes. Conforme a ANVISA o mínimo aceitável para o valor de  $r \geq 0,99$ , o INMETRO  $r \geq 0,90$ . (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016; RIBANI et.al. 2004).

### 2.7.3 Sensibilidade

A sensibilidade corresponde à capacidade do método em identificar concentrações próximas a do analito em um determinado nível de confiança. A sensibilidade analítica pode ser expressa pela inclinação da reta ou coeficiente angular da equação da reta (1). Quanto maior a inclinação da reta, mais sensível será o método (INMETRO, 2016). O coeficiente angular é dado pela equação 3:

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (3)$$

Onde:

$S$  = sensibilidade;

$dx$  = variação da resposta;

$dc$  = variação da concentração.

### 2.7.4 Limite de Detecção (LD)

Representa a menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Este parâmetro pode ser calculado de várias formas (RIBANI

et al, 2004; INMETRO, 2016).

Dentre as diferentes maneiras de calcular o LD, temos o método visual, que se baseia na análise de amostras dopadas com o analito em concentrações conhecidas para a definição do menor nível em que o analito possa ser detectado. Para isso, são realizadas diluições sucessivas até obter a menor concentração que seja possível diferenciar do branco analítico (INMETRO, 2016).

### 2.7.5 Limite de Quantificação (LQ)

Representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada, com precisão e exatidão, utilizando um determinado método experimental (INMETRO, 2016). Pode ser medido pelos mesmos métodos utilizados no cálculo de LD, assim o LQ pode ser estimado pelo método sinal/ruído, onde a resposta gerada corresponde a uma relação cerca de 3 vezes o valor do LD (equação 4) (RIBANI et al, 2004).

$$LQ = 3,3 \times LD \quad (4)$$

### 2.7.6 Precisão

A precisão de uma metodologia analítica corresponde à concordância das respostas obtidas para os diversos ensaios realizados em uma amostra. Para o seu cálculo leva-se em consideração o desvio padrão absoluto (s), no entanto devido ao número limitado de determinações em análise química, calcula-se na verdade uma estimativa do desvio padrão absoluto (s), expressada na equação 5 (LEITE, 2008; RIBANI et.al. 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (5)$$

$x_i$  = valor de uma medição;

$\bar{x}$  = média aritmética de um pequeno número de medições.

n = número de medições.

Outra forma de expressar a precisão é através do coeficiente de variação (CV) ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR), conforme demonstrada na equação 6 (RIBANI et.al. 2004).

$$DPR(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

Em análise de traços ou resíduos um valor de DPR até 20% é aceito, porque algumas amostras são complexas. Aumentando-se o número de replicatas, obtêm-se uma melhor precisão para o método (RIBANI et al, 2004).

#### *2.7.6.1 Repetibilidade*

Este termo, também conhecido por precisão intra-ensaio, expressa um conjunto de medições, realizados em um período curto de tempo, sendo realizados pelo mesmo operador, mesmo equipamento e no mesmo laboratório. Estas medições expressam a dispersão dos resultados ou a concordância entre eles (INMETRO, 2016).

A repetibilidade é verificada utilizando três níveis de concentração (baixa, média e alta), com variação de seis a nove replicatas, de acordo com o guia de validação utilizado. Pode ser expresso pelo coeficiente de variação (CV) ou pelo desvio padrão relativo (DPR) (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016).

#### *2.7.7 Exatidão*

A exatidão consiste na proximidade do valor obtido, individualmente, em relação a um valor de referência tido como verdadeiro (MAPA, 2011). Para avaliar a exatidão de um método, podemos fazê-lo por: comparação de métodos, o uso de materiais de referência certificada (MRC) ou ensaios de recuperação (RIBANI et al, 2004).

Através da comparação dos métodos, valores obtidos pelo método desenvolvido são comparados por valores de um método de referência. Tem por finalidade a obtenção de valores próximos aos do método de referência. No entanto, nem sempre outro método está disponível na literatura para comparação, com condições similares (RIBANI et al, 2004).

O uso de MRC, considerado o modo mais recomendado, procura assegurar que o método analítico desenvolvido não sofreu interferências em decorrência da interação entre substâncias presentes na matriz e a própria matriz ou amostras naturalmente contaminadas. Os MRC são materiais que tem a sua produção certificada por instituições confiáveis e reconhecidas, como o NIST – *National Institute of Standard and Technology*. Esta certificação é fornecida por valores precisos de concentração da substância, e outras especificações, bem como as incertezas atribuídas, todos registrados em um certificado que acompanha o material (MAPA, 2011; RIBANI et al, 2004).

Os ensaios de recuperação consistem na quantidade do analito, presente ou adicionado na amostra que venha a ser extraído e quantificado com precisão (RIBANI et al,

2004). Para estes estudos são necessários à adição da substância de interesse na matriz (branco analítico) ou numa matriz com concentração mínima deste analito. Esta adição é realizada em três níveis de fortificação (baixo, intermediário e alto), sendo feitas em nove replicatas (ANVISA, 2003). Os valores de recuperação são estimados através da equação 7:

$$Rec. (\%) = \left( \frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100\% \quad (7)$$

Onde:

$c_1$  = concentração determinada na amostra adicionada;

$c_2$  = concentração da amostra isenta do analito (branco);

$c_3$  = concentração adicionada na amostra (teórica).

## **2.8 O uso da cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos na determinação de agrotóxicos em alimentos**

Dentre as principais técnicas de análise de substâncias em materiais complexos como alimentos, estão as técnicas de cromatografia e isto é devido à eficácia e resolução das colunas cromatográficas modernas que separam os componentes contidos nas amostras (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida é adequada para compostos com instabilidade térmica ou com baixa volatilidade, podendo ser acoplada a diversos sistemas de detecção, para potencializar o seu desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009). Dentre os detectores de espectrometria por ultravioleta (UV), com maior poder de detecção estão os de arranjo de diodos que fornecem informações que possibilitam a identificação dos compostos, devido à obtenção de espectro de absorção por segundo (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Enquanto os dados de espectro são coletados para cada pico cromatográfico, os compostos são eluídos na coluna gerando informações adicionais para uma confirmação dos compostos, como a comparação com espectros de absorção no mesmo tempo de retenção. Este método permite ainda confeccionar gráficos tridimensionais com absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

Devido a sua versatilidade, resolução dos espectros e seletividade, o detector de arranjo de diodos é empregado para analisar pesticidas (RIAL-OTERO et al, 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Validar um método adaptado para a determinação de carbendazim e deltametrina em amostras de alface hidropônica, para aplicar no estudo de remoção destes resíduos utilizando água e soluções de lavagem de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,6%, tintura de iodo (2%), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 5% e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 6%.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Validar a metodologia analítica adaptada para a determinação de carbendazim e deltametrina, presentes nas amostras de alface crespa hidropônica, quanto aos parâmetros de seletividade, efeito matriz, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão;
- Verificar o uso do GCB no *clean-up* da amostra em pequenas quantidades e seu efeito sobre os agrotóxicos em estudo;
- Testar o efeito das soluções de lavagem na remoção de resíduos de carbendazim e deltametrina em amostras de alface crespa hidropônica utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,6%, tintura de iodo (2%), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 5% e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 6%;
- Estudar o modo mais eficiente de remoção destes resíduos no que concerne ao tempo de contato da alface com a solução de lavagem.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Química Ambiental (LAQA), localizado no Departamento de Química Analítica e Físico-Química (DQAFQ) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Os experimentos compreenderam a determinação de resíduos de agrotóxicos, utilizando o método de extração QuEChERS original e a análise foi realizada por meio da cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

### 4.1 Instrumentação

Utilizou-se balança analítica (Marconi-2104N), vórtex (Kasvi basic-K45-2820), sistema de purificação de água Milli-Q/Millipore (Academic), centrífuga (Eppendorf centrifuge-5430), microcentrífuga (Marconi Ma-180), ultrassom (Cristófoli), secadora de verduras (Zelar), microprocessador (Philips Walita), cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (Shimadzu), bomba de vácuo (Buchi Vacuum pump v-700).

### 4.2 Reagentes, solventes, adsorventes e vidrarias

Utilizou-se padrões sólidos de agrotóxicos: carbendazim grau de pureza (99,2%), deltametrina grau de pureza (99,7%) – (Sigma-Aldrich). Foram utilizados no preparo da amostra: sulfato de magnésio anidro P.A, cloreto de sódio P.A, ambos da Vetec, Kit Q-sep<sup>®</sup> QuEChERS D-SPE (RESTEK), carbono grafitizado (PheLab). No preparo das soluções padrão: acetonitrila (grau HPLC- Sigma-Aldrich), ácido clorídrico P.A (Dinâmica). Balões volumétricos de 5 mL e 10 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, micropipetas (Kasvi-basic) p (100 e 1000), vials, béqueres, espátulas, filtro para solvente (Millipore), microfiltro de seringa para limpeza de amostras (Allcrom). Para a limpeza das vidrarias: detergente, água da torneira, água destilada, água (Milli-Q- Millipore) e acetona P.A (Vetec), nesta sequência.

No preparo das soluções de lavagem foram utilizados: Hidrosteril<sup>®</sup> (Sagdio), tintura de iodo (2%)- (ADV), bicarbonato de sódio P.A (Synth), peróxido de hidrogênio P.A (Synth).

### 4.3 Preparo das soluções-padrões dos agrotóxicos

Foram preparadas soluções-padrão de 1000 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila. No entanto, a solução de carbendazim além da acetonitrila, foi preparada com a adição de 8% de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para solubilizar o padrão que não é completamente solúvel apenas em acetonitrila (CHIARADIA, 2009). Além disso, para controlar seu pH pelo seu valor de pKa. As soluções

foram armazenadas em refrigerador; a solução de carbendazim era estável por três meses, pois após este período verificava-se a presença da formação de cristais de precipitação. Embora o carbendazim seja estável em meio ácido, seu contato com a superfície aeróbica, possivelmente, provocou a sua degradação (JIA et al, 2003).

#### **4.3.1 Preparo das soluções estoque dos agrotóxicos**

Partindo das soluções-padrão, foi preparada uma solução mista de 100 mg L<sup>-1</sup>, contendo os dois agrotóxicos em estudo. A partir desta solução, foi preparada por diluição, uma solução de trabalho de 10 mg L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram armazenadas em refrigerador.

#### **4.4 Pré- tratamento das amostras de alface crespa hidropônica**

As amostras foram adquiridas inicialmente em supermercado, na capital de Fortaleza, e depois fornecidas por uma empresa de hidroponia, localizada do município de Horizonte, na região metropolitana de Fortaleza. Ao chegarem ao laboratório foram armazenadas na geladeira, por um período de duas horas para serem refrigeradas. Isto se deve ao fato de à temperatura ambiente, os vegetais tenderem a absorver a água durante a lavagem, possibilitando a absorção também de resíduos que estavam em sua superfície, tal fenômeno físico chama-se *uptake* (GADELHA, 2015). Retirou-se folha por folha e lavou-se cada uma individualmente, com água de torneira e depois com água destilada. Após a lavagem, as folhas foram colocadas em uma secadora de verduras, em seguida, foram dispostas sobre panos de prato por aproximadamente uma hora, para evaporação da água restante da lavagem. Em seguida, foram trituradas e homogeneizadas com um triturador e mixer. Por fim foram pesadas, acondicionadas em potes de vidro, previamente descontaminados, vedadas com tampa de alumínio e armazenadas no freezer.

#### **4.5 Preparo da amostra**

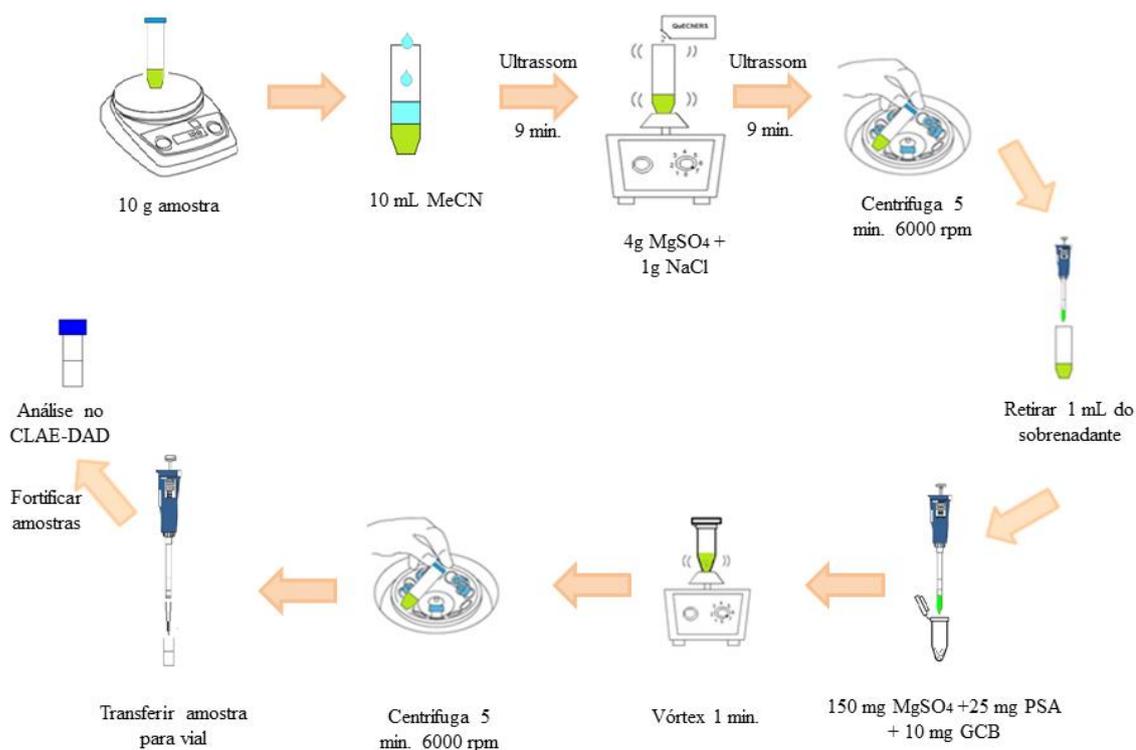
Preparou-se as amostras de alface crespa hidropônica utilizando o método QuEChERS original (ANASTASSIADES et al, 2003), mostrado na Figura 3. Foram pesados 10g da amostra de alface em um tubo de Falcon de 50mL seguida da adição de 10mL de acetonitrila (MeCN). Foram submetidas a banho ultrassônico por cerca de nove minutos, sem aquecimento. O ultrassom foi um recurso utilizado por potencializar a ação do solvente de extração, ou seja, age através do processo de cavitação. Este processo, forma cavidades para onde os gases dissolvidos migram, formando microbolhas que ao colidirem promovem a

difusão do solvente para o interior da amostra vegetal, rompendo suas células e potencializando a eficiência do solvente extrator (CARCÉL et al, 2012).

Em seguida foram adicionados, gradativamente, os sais para a etapa de partição, 4g de  $MgSO_4$  anidro e 1g de NaCl, sob agitação no Vórtex. Foram novamente submetidos ao banho ultrassônico, por nove minutos. Após este período foram submetidos à centrifugação por cinco minutos a 6000 rpm, onde em seguida 1mL do sobrenadante foi retirado e colocado nos tubos contendo PSA, C18, e  $MgSO_4$ , para promoverem a limpeza do extrato da amostra. No caso das amostras de alface, por conterem o pigmento clorofila, optou-se pelo uso de carbono grafitizado GCB, que remove pigmentos (BOES et. al. 2015).

A mistura foi agitada com o uso do Vórtex e foram novamente levados para centrifugação, nas condições supracitadas. Os extratos obtidos foram transferidos para vials, um volume de 0,5 mL e fortificados nas concentrações seguintes: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5, 1; 3; 5  $mg L^{-1}$ . Foram ainda submetidos à secagem do solvente utilizando gás nitrogênio comercial  $N_{2(g)}$ , onde posteriormente foram retomados em 0,5 mL de acetonitrila.

Figura 3- Procedimento utilizado no preparo de amostra.



Fonte: autora.

#### **4.5.1 Estudo da quantidade de GCB utilizada no clean-up**

Procurou-se utilizar o mínimo de GCB na etapa de *clean-up*, para evitar qualquer interferência nas análises das amostras de alface e verificar a viabilidade do seu uso reduzido, mas ainda eficaz na remoção do pigmento da alface, haja visto o seu custo e toxicidade (NGUYEN et al, 2008; LEHOTAY et al, 2010). Testou-se as quantidades de 7,5 mg; 10 mg e 12 mg de GCB.

#### **4.6 Condições cromatográficas**

A separação e quantificação dos agrotóxicos em estudo foram realizadas num cromatógrafo líquido, CLAE (Shimadzu), da EMBRAPA, equipado com: detector de arranjo de diodos UV-DAD (SPD-M20A), degaseificador (DGU-20A<sub>3</sub>), injetor automático (Sil-20AC), forno (CTO-20A), duas bombas (LC-20AB). Utilizando uma coluna analítica fase reversa C18, (Shim-pack), (150 mm x 4,6 mm x 5 µm). As seguintes condições foram otimizadas para a análise dos agrotóxicos em estudo: temperatura da coluna foi mantida em 40°C; fase móvel constituída por Acetonitrila/água (85:15%), em modo isocrático, o tempo de corrida foi de 21 min, incluindo o tempo de equilíbrio para a próxima injeção; fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 10 µL. Estas condições foram adaptadas de Kumar et al, (2011).

O comprimento de onda selecionado, após varredura no equipamento, variando entre 190-800 nm, foi de 200 nm para a deltametrina e de 286 nm para o carbendazim.

#### **4.7 Validação do método**

##### **4.7.1 Seletividade**

Neste método a seletividade foi estudada baseada num estudo comparativo da resposta gerada pela matriz isenta dos analitos, com a resposta do extrato da matriz adicionada dos analitos, para a verificação de algum interferente na amostra que possibilite a coeluição com os compostos de interesse (sobreposição de matriz).

##### **4.7.1.2 Efeito Matriz**

Para a avaliação do efeito matriz, construiu-se uma curva analítica com os padrões no solvente e uma curva com os padrões adicionados no extrato da matriz, por superposição de matriz, e fez-se a comparação. Conforme a literatura, valores de efeito matriz entre -20% e 20% são insignificantes, porque tem valores aproximados do DPR (WALORCZYK, 2014).

#### 4.7.2 Linearidade

No estudo da linearidade deste método, preparou-se uma curva analítica com níveis de concentrações compreendidos na faixa de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 3; e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Utilizou-se o método de superposição de matriz, que consiste na adição do analito, em várias concentrações em um extrato da matriz. Este método é utilizado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes durante a análise (RIBANI et.al. 2004).

A linearidade foi ainda avaliada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ), que embora esteja dentro dos limites estabelecidos pelos órgãos reguladores, não garantem a significância da curva analítica e de seus parâmetros, sendo necessários testes estatísticos.

##### 4.7.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

Para assegurar a linearidade e significância da curva analítica, aplicou-se o teste  $F$ , com grau de confiança de 95%. Este teste é feito baseado no cálculo da razão das médias quadráticas da regressão e dos resíduos, respectivamente, conforme a equação 8 (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001).

$$F = \frac{MQ_{reg.}}{MQ_{res.}} \quad (8)$$

Onde:

$MQ_{reg.}$  = soma dos quadrados da regressão;

$MQ_{res.}$  = soma dos quadrados do resíduo.

Comparou-se então o valor de  $F_{calculado}$  com o  $F_{tabelado}$ . Caso o valor de  $F_{calculado} \geq F_{tabelado}$  a linearidade é então considerada significativa, caso contrário deve-se obter uma nova faixa de trabalho (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001; HARRIS, 2011).

##### 4.7.2.2 Teste de significância dos parâmetros da curva de calibração

O teste de significância dos coeficientes obtidos pela equação da reta fundamenta-se no teste de hipóteses, conhecido por teste  $t$  de Student. O valor de  $t_{calculado}$  é obtido pela razão entre o parâmetro a ser considerado e seu desvio padrão, como nos mostra as equações 9 e 10. Para que os valores dos coeficientes lineares e angulares sejam considerados significativos, o valor de  $t_{calculado}$  deve ser maior que o  $t_{tabelado}$  (NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

$$t_{calc, a} = \frac{a}{s_a} \quad (9)$$

$$t_{calc, b} = \frac{b}{s_b} \quad (10)$$

Onde:

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

s<sub>a</sub> = desvio do coeficiente angular;

s<sub>b</sub> = desvio do coeficiente angular.

Trabalhando-se com um modelo linear, devemos considerar o número de graus de liberdade, GL= (N-2), onde N equivale ao número de pontos utilizados na curva analítica (LIGIERO et al 2009).

#### **4.7.3 Sensibilidade**

Para este método a sensibilidade foi realizada simultaneamente ao estudo do parâmetro de linearidade, pela inclinação da curva analítica.

#### **4.7.4 Limite de detecção (LD)**

O método escolhido para o LD foi o método visual, para tanto, foram realizadas diluições, partindo de uma solução estoque de 1 ppm, preparou-se por diluições sucessivas soluções com concentrações de 1; 0,7; 0,5; 0,25; 0,1; 0,07; 0,05; 0,025; 0,007; 0,005 mg kg<sup>-1</sup>, no extrato da matriz.

#### **4.7.5 Limite de quantificação (LQ)**

O LQ foi estimado pelo método sinal/ruído, onde o mínimo que pode ser quantificado é cerca de 3,3 vezes o valor de LD, conforme equação 4 descrita na seção 2.7.5 (RIBANI et al, 2004).

#### **4.7.6 Precisão**

O estudo da precisão foi realizado por estudos de repetibilidade ou precisão intra-ensaios, expressos pelo CV %. Foram realizadas injeções em três níveis de concentração (0,1; 1; e 5 mg kg<sup>-1</sup>) em três replicatas cada nível. Estas injeções realizaram-se nas seguintes

condições: mesmo analista, equipamento e dia (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016).

#### **4.7.7 Exatidão**

A exatidão foi estimada por ensaios de recuperação que corresponde à quantidade do analito que pode ser extraída da matriz podendo ser quantificada (RIBANI et al, 2004). Pesou-se 10 g da amostra e a partir da solução mista de trabalho (contendo os dois agrotóxicos em estudo) de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , fortificou-se estas amostras em três níveis de concentração: baixo ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), intermediário ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e alto ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Em seguida, estas amostras foram agitadas com auxílio do Vórtex e então submetidas ao método QuEChERS, para o seu preparo, conforme procedimento descrito na seção 4.5. Estas amostras foram injetadas em três replicatas, para cada nível de fortificação (ANVISA, 2003).

#### **4.8 Preparo das soluções de remoção**

As concentrações utilizadas nas soluções de remoção foram selecionadas após revisão bibliográfica, sendo escolhidas aquelas que demonstraram bons percentuais de remoção em outros alimentos e para agrotóxicos distintos (LOPÉZ-FERNÁNDEZ; RIAL-OTERO; SIMAL-GÁNDARA, 2013; LIANG et al 2012; SINGH; MAISNAM; KULSHRESTHA, 2014).

As soluções de remoção foram preparadas utilizando Hidrosteril - solução comercial contendo NaClO a (2,6%), tintura de iodo (2%), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Todas estas soluções foram preparadas com um volume de 1L de água destilada em temperatura ambiente  $25^\circ\text{C}$ .

A solução contendo hipoclorito de sódio foi preparada utilizando 20 gotas da solução de NaClO, conforme o fabricante. Para a solução de tintura de iodo adicionou-se 0,5 mL da tintura de iodo no volume supracitado de água destilada. Partindo-se de um  $\text{H}_2\text{O}_2$  P.A de concentração 30%, preparamos a solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 6%, retirando 200 mL deste reagente; e a solução de  $\text{NaHCO}_3$  a 5%, pesou-se 50 g deste reagente sólido e dissolveu-se em 1 L de água destilada.

#### **4.9 Amostras de alface contaminadas**

As amostras de alface foram cultivadas em hidroponia, numa pequena empresa do município de Horizonte, na região metropolitana de Fortaleza. Foram coletadas, primeiramente amostras de alface hidropônica com a ausência de agrotóxicos (amostra branco). As amostras contaminadas foram obtidas pela pulverização das plantas já adultas, um

dia antes da colheita, com Carbomax - fungicida de nome comercial, contendo o princípio ativo carbendazim. Do mesmo modo, no segundo dia, foram pulverizadas, em outra bancada de cultivo da alface, Decis - inseticida comercial, contendo o princípio ativo deltametrina. E no terceiro dia, pulverizaram os dois agrotóxicos em uma bancada, simultaneamente, sendo as alfaces colhidas no dia seguinte.

No mesmo dia da coleta, foram trazidas ao laboratório, separadas e lavadas com água destilada e imersas nas respectivas soluções de NaClO, tintura de iodo 2%, NaHCO<sub>3</sub> a 5%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6%, tanto as amostras isentas dos analitos, como as amostras com os analitos. As amostras foram então lavadas, conforme descrição na seção 4.4, e em seguida submetidas à imersão nas soluções por 20 minutos. Foram ainda, submetidas às mesmas soluções por tempos de 40 e 60 minutos, com exceção das soluções de NaClO devido a recomendações do fabricante.

Após as amostras terem sido submetidas às soluções de remoção, estas foram lavadas por água destilada e em seguida, colocadas em uma secadora de vegetais e então armazenadas em potes de vidro e conservadas no freezer.

Para a análise e identificação do efeito de remoção, as análises foram realizadas utilizando CLAE-DAD.

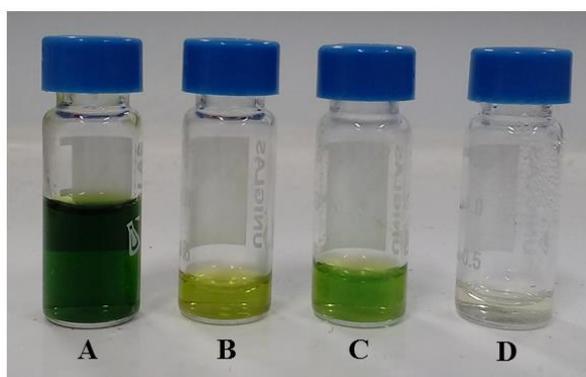
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Estudo do uso do GCB no *clean-up*

Neste trabalho, o efeito do uso do GCB mostrou-se eficiente na quantidade a partir de 10 mg (figura 4), observamos visualmente pela diferença na coloração do extrato da alface. O extrato A não submetido ao *clean-up*; no extrato B, após o *clean-up* utilizando (150 mg  $MgSO_4$ , 25mg PSA e 25mg C18); no extrato C utilizou-se no *clean-up* (150 mg  $MgSO_4$  e 25mg PSA); por fim no extrato D utilizou-se (150 mg  $MgSO_4$ , 25mg PSA, 25mg C18 e acrescentou-se 10 mg de GCB).

Testou-se primeiramente, a quantidade de 7,5 mg, não sendo completamente eficaz na remoção da clorofila. Mas, a quantidade de 10 mg mostrou-se eficiente, mesmo se tratando de um vegetal folhoso (NGUYEN et al, 2008). Verificou-se ainda o uso do GCB sem o C18 e verificou-se que o C18 não é necessário para a remoção da clorofila (figura 5).

Figura 4- Uso do GCB no *clean-up* do extrato da alface (A - sem *clean-up*; B – *clean-up* contendo 150 mg  $MgSO_4$ , 25mg PSA e 25mg C18; C – *clean-up* contendo 150 mg  $MgSO_4$  e 25mg PSA; D - *clean-up* contendo 150 mg  $MgSO_4$ , 25mg PSA, 25mg C18 e 10 mg de GCB).



Fonte: autora.

Figura 5- Clean-up contendo 150 mg  $MgSO_4$ , 25mg PSA e 10 mg de GCB.



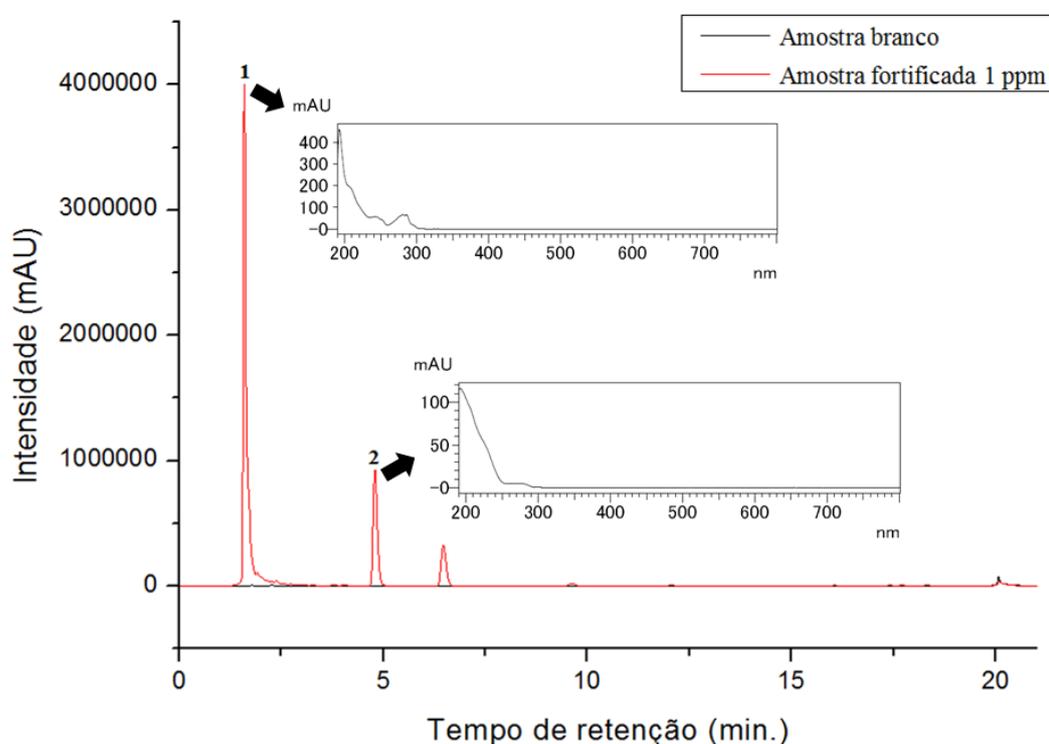
Fonte: autora.

## 5.2 Validação do método analítico

### 5.2.2 Seletividade

O estudo deste parâmetro verifica a presença de interferentes na amostra ou de possíveis coeluições dos interferentes na amostra, isto é a capacidade de algum outro composto eluir no mesmo tempo de retenção dos compostos estudados (RIBANI et al, 2004). Deste modo, fez-se a comparação entre o cromatograma da amostra isenta dos analitos (branco analítico) e da amostra dopada com os analitos na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , como mostrado na figura 6.

Figura 6. Cromatogramas da amostra branco e da amostra fortificada 1 ppm (1 – Carbendazim; 2 – Deltametrina), com seus respectivos espectros de similaridade.



Fonte: elaborada pela autora.

Observando a figura 6, verificamos que nenhum pico interferiu ou coeluiu com os analitos de interesse, em seus tempos de retenção. Para assegurar a identidade dos compostos utilizamos ainda espectros de similaridade obtidos após consulta à biblioteca de espectros elaborada no CLAE-DAD.

Na análise de compostos em alimentos, como resíduos de agrotóxicos, somente o tempo de retenção não determina a identificação do pico cromatográfico. Para tanto, a identificação dos compostos foi realizada comparando-se o cromatograma da amostra

contendo os analitos, com os cromatogramas dos padrões analíticos injetados. Avaliando-se além do mesmo tempo de retenção, o espectro de absorção no UV obtidos entre 190–800nm, a partir do banco de dados de padrões. Posto que, utilizando este conjunto de ferramentas, podemos garantir a pureza e a identidade do pico gerado na análise (LANÇAS, 2009).

O detector de arranjo de diodos (DAD) funciona baseado nas interações da luz incidida sobre a amostra, fornecendo um espectro completo dos picos eluídos que podem ser comparados com um espectro obtido pelos padrões analíticos e somando-se a isso, possibilita uma varredura na região do UV/Visível em vários comprimentos de onda para um cromatograma. Através do *software* destes equipamentos, pode-se distinguir entre dois compostos com espectros diferentes, mas com tempos de retenção similares, utilizando esta ferramenta para obtermos a similaridade do pico e sua pureza (LANÇAS, 2009).

Neste trabalho observou-se uma similaridade acima de 99% e pureza do pico acima de 97%, mostrados na Tabela 6, resultados que corroboram com a identificação dos agrotóxicos em estudo, demonstrando que o método mostrou-se seletivo.

Tabela 6- Valores para identificação dos agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	Tempo de retenção -T <sub>R</sub> (min)	Similaridade (%)	Pureza (%)
Carbendazim	1,735	99,23	97,94
Deltametrina	4,489	99,97	99,80

Fonte: elaborada pela autora.

#### 5.2.2.1 Efeito matriz

Para o estudo do efeito matriz comparou-se a inclinação da curva analítica dos padrões no solvente e dos mesmos padrões no extrato da matriz. Os valores dados na Tabela 7 demonstram que não houve efeito matriz, segundo Walorczyk (2014), pois eles se situaram na faixa compreendida entre -20% a 20%, cujos efeitos são insignificantes.

Valores obtidos pela curva de adição de padrão mostraram um significativo efeito matriz para ambos os agrotóxicos estudados. Isto decorre de uma maior interação do analito na própria amostra, antes da submissão desta à etapa de extração, tornando-a complexa. A complexidade da matriz é evidenciada pela presença de coextrativos que com diferentes tamanhos e polaridades, conferem este efeito nas análises (HAJSLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

Deste modo, para minimizar o efeito matriz, a curva de superposição de matriz foi utilizada para quantificação (SANCO, 2013).

Tabela 7- Efeito matriz dos agrotóxicos em estudo.

Agrotóxico	Efeito matriz (%)
Carbendazim	-1,076
Deltametrina	-16,990

Fonte: elaborada pela autora.

### 5.2.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada considerando o coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido a partir da regressão linear dos parâmetros da curva analítica. Para os agrotóxicos em estudo, os coeficientes de correlação obtidos, estão dentro dos parâmetros exigidos pela ANVISA, ou seja, houve uma correlação proporcional à concentração do analito injetada e o sinal analítico gerado pelo equipamento (RIBANI et al, 2004). Deste modo, uma faixa de linearidade satisfatória foi encontrada, conforme dados na Tabela 8.

Tabela 8- Valores obtidos para as curvas analíticas pelo método.

Agrotóxicos	Curva analítica no solvente	$r$	Curva analítica no extrato da matriz	$r$
Carbendazim	$y = 82204x - 52,663$	0,9980	$y = 81319x + 66409$	0,9995
Deltametrina	$y = 75590x + 233,85$	0,9982	$y = 62747x - 10087$	0,9967

Fonte: elaborada pela autora.

No entanto, a verificação estatística da linearidade e da significância dos parâmetros da curva foram considerados. Isso em razão da curva analítica construída não passar pela origem, o que seria o ideal (LIGIERO et al, 2009).

#### 5.2.3.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

Este teste também conhecido por teste de linearidade considera a comparação entre os resíduos do ajuste de linearidade com o ajuste quadrático, conforme mostrado na seção 4.7.2.1. A significância é mostrada quando a soma quadrática destes resíduos é menor que o valor proposto no teste  $F$  (LIGIERO et al, 2009).

Neste trabalho os valores de  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  obtidos, mostraram-se significativos, assim verifica-se uma relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$ . Os valores obtidos pelo teste  $F$  estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9- Teste da linearidade das curvas analíticas com limite de confiança de 95%.

Agrotóxico	$F_{\text{calculado}}$		Teste $F$
	Curva no solvente	Curva no extrato da matriz	
Carbendazim	2539,7	6572,8	$F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$
Deltametrina	2837,2	1194,1	$F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$

Fonte: elaborada pela autora.

### 5.2.3.2 Teste de significância dos parâmetros da curva de calibração

O teste t estabelece comparações entre valores de diferentes métodos em um dado intervalo de confiança (HARRIS, 2011). Através desta ferramenta, podemos estabelecer uma relação entre o valor calculado e o valor tabelado ou crítico.

Para verificação da significância dos parâmetros da curva observou-se, além dos valores dos coeficientes (angular e linear), os seus respectivos desvios também foram considerados. Os valores de  $t_{\text{calculado}}$  mostraram que os coeficientes são estatisticamente significativos, com exceção do coeficiente linear da curva da deltametrina, valores obtidos pelas equações 9 e 10 e demonstrados abaixo (Tabela 10).

Tabela 10- Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas.

Agrotóxico	$t_{\text{calc}, a}$	$t_{\text{calc}, b}$	Teste $t$		Curva da matriz corrigida
Carbendazim	81,07	28,86	$t_{\text{calc}, a} > t_{\text{tab}}$	$t_{\text{calc}, b} > t_{\text{tab}}$	$y = 81319x + 66409$
Deltametrina	34,55	2,29	$t_{\text{calc}, a} > t_{\text{tab}}$	$t_{\text{calc}, b} < t_{\text{tab}}$	$y = 62747x$

Fonte: elaborada pela autora.

O coeficiente linear da curva analítica para o agrotóxico deltametrina não apresentou significância, sendo este coeficiente descartado e a curva então corrigida.

### 5.2.4 Sensibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Podemos observar que o método se mostrou sensível para os agrotóxicos em estudo utilizando o detector DAD, no entanto, o Carbendazim demonstrou maior sensibilidade, conforme os coeficientes angulares da curva fornecida na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros obtidos pela curva analítica.

Agrotóxicos	Faixa linear (mg kg <sup>-1</sup> )	Coefficiente angular	LD (mg kg <sup>-1</sup> )	LQ (mg kg <sup>-1</sup> )
Carbendazim	0,05 – 5	81319	0,021	0,069
Deltametrina	0,1 – 5	62747	0,050	0,165

Fonte: elaborada pela autora.

A análise de agrotóxicos em alimentos requer baixos níveis de LD e LQ, porque estes compostos encontram-se normalmente presentes em quantidade traços (PRESTES et al, 2009).

O limite de detecção foi avaliado pelo método das diluições sucessivas, dos padrões e do extrato da matriz de modo a constatar o LD (INMETRO, 2016). Para o limite de quantificação, considerou-se o LQ a menor concentração que pode ser quantificada em relação ao sinal obtido pelo branco analítico (RIBANI et. al. 2004). Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 11.

Comparando-se os resultados obtidos para o LD dos agrotóxicos estudados neste trabalho, com os de outros encontrados na literatura, tabela 12, podem ser considerados satisfatórios, apesar de não ter sido encontrado pesquisas desses compostos em alface, nas condições aqui desenvolvidas. Como os agrotóxicos estudados não tem seu uso autorizado na cultura da alface, pela ANVISA, não apresentam, portanto valores de LMR's.

Tabela 12- Comparativo entre os valores de LD obtidos com outros reportados na literatura.

	Carbendazim	Deltametrina	Análise	Referência
	0,005	0,010	LC-MS/MS	Esturk, Yakar e Ayhan, 2014
LD (mg kg <sup>-1</sup> )		0,009	GC-DCE	Costa et al, 2015
	0,500		HPLC-DAD	Devi, Paramasivam, Prakasam, 2015
	0,021	0,050	HPLC-DAD	Este trabalho

Fonte: elaborada pela autora.

Considerando os valores estabelecidos por outros órgãos internacionais, como o *Codex Alimentarius* e a União Europeia (EU), com os LD e LQ mostrados na Tabela 4, conclui-se que o método é adequado para a análise do Carbendazim e a Deltametrina em amostras de alface.

### 5.2.5 Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade, e os valores foram expressos através do coeficiente de variação (CV%). Conforme o MAPA, 2011, os valores de CV (%) aceitos em termos de repetibilidade devem ser menores que 20%, para estas concentrações utilizadas. Cada nível de concentração foi injetado em três replicatas, nas condições mostradas na seção 4.7.6.

De acordo com os valores de CV (%), expressos na Tabela 13, o método mostrou-se preciso para os agrotóxicos em estudo nos três níveis de concentração analisados.

Tabela 13- Dados de precisão do método por repetibilidade.

Agrotóxicos	CV (%)		
	0,1 (mg kg <sup>-1</sup> )	1 (mg kg <sup>-1</sup> )	5 (mg kg <sup>-1</sup> )
Carbendazim	4,36	5,98	2,28
Deltametrina	8,09	1,68	2,15

Fonte: elaborada pela autora.

### 5.2.6 Exatidão

Os estudos de exatidão foram verificados pela realização de ensaios de recuperação. Assim sendo, as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração, conforme descritos na seção 4.7.7.

Os valores estimados estão atrelados aos seus respectivos desvios-padrões, conforme mostrados na Tabela 14. A estimativa destes valores deve estar dentro de um limite de aceitação porque dependendo do nível de concentração destes analitos na amostra os dados podem ou não apresentar precisão. Por isto, normalmente, para análise de elementos traços, valores de recuperação variam numa faixa entre 70% a 120%, com coeficientes de variação de  $\pm 20\%$  (MAPA, 2011). Entretanto, havendo complexidade na matriz estudada, alguns valores de recuperação, considerados baixos podem ser aceitáveis. Nestes casos uma faixa mais ampla para estes ensaios é requerida, como valores compreendidos entre 50% e 120%, com precisão de 15% (RIBANI et al, 2004).

Os valores obtidos mostram valores aceitáveis de recuperação para os agrotóxicos em estudo, tendo em vista a não interferência por efeito matriz (seção 5.2.2.1). Entretanto, no nível de concentração 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, para o carbendazim verificamos um valor próximo do estabelecido por órgãos reguladores, no entanto, com precisão < 10%.

Tabela 14- Valores das recuperações médias e seus respectivos desvios padrões.

Agrotóxico	Recuperação (%)		
	0,1 (mg kg <sup>-1</sup> )	1 (mg kg <sup>-1</sup> )	5 (mg kg <sup>-1</sup> )
Carbendazim	124 ± 2,9	98 ± 5,9	100 ± 2,2
Deltametrina	80 ± 8,9	112 ± 3,4	97 ± 2,1

Fonte: elaborada pela autora.

### 5.3 Estudos de remoção dos agrotóxicos

Geralmente, a primeira forma de processamento do alimento e a mais utilizada é a lavagem, sendo esta a primeira opção para qualquer tratamento, seja ele industrial ou comercial (KAUSHIK et al, 2009). No caso da alface recomenda-se o seu consumo *in natura*, para um melhor aproveitamento dos nutrientes (MOGHARBEL; MASSON, 2005; PÔRTO et al, 2012), deste modo à lavagem das folhas é o método mais viável para remoção de resíduos neste alimento.

A lavagem dos alimentos mostra-se eficiente na remoção de agrotóxicos ligados a superfície do alimento e que apresentam alta solubilidade em água (KEIKOTLHAILE et al, 2010). O modo de ação de cada agrotóxico, também determina a sua facilidade em ser removido, bem como as suas propriedades físico-químicas. O carbendazim é um agrotóxico que age de modo sistêmico, enquanto a deltametrina é considerado um agrotóxico de contato (COUTINHO et al, 2006; ANVISA, 2017).

Uma parte da alface não foi submetida a nenhuma solução de lavagem, foi apenas lavada com água corrente e água destilada e então, conforme seção 4.4 armazenada. Estas foram o grupo controle (sem tratamento).

Os altos valores de concentração encontrados nas amostras contaminadas (tabela 15) são atípicos devido à pulverização nas plantas um dia antes de sua colheita e consequente chegada ao laboratório para os estudos de remoção, conforme seção 4.9. Não houve tempo hábil para a diminuição destes resíduos devido ao curto período (pulverização x coleta), tornado esta situação experimental forçada para os estudos de remoção.

A remoção do agrotóxico carbendazim apenas, utilizando água, mostrou uma variação entre 16,16% - 36,66%; empregando a solução de NaClO a remoção foi de 16,8%; na utilização da tintura de iodo, houve uma redução dos níveis de resíduos entre 33,28% - 60,23%; aplicando a alface na solução de NaHCO<sub>3</sub> houve remoção variando de 67,15% - 85,19%; na utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a remoção proporcionada variou entre 25,23% - 74,72%, estas três últimas soluções com variação no tempo de imersão, segundo Tabela 15.

Tabela 15- Efeito das soluções de lavagem na remoção de agrotóxicos em alface hidropônica.

Agrotóxicos	Tratamento	Tempo					
		20 min		40 min		60 min	
		<sup>1</sup> Conc.	Remoção (%)	<sup>1</sup> Conc.	Remoção (%)	<sup>1</sup> Conc.	Remoção (%)
Carbendazim	Sem tratamento	18,63 ± 0,66					
	Água	15,62 ± 0,11	16,16	11,80 ± 0,24	36,66	9,76 ± 7,23	47,62
	NaClO	13,04 ± 7,54	30,10				
	Iodo	12,43 ± 2,51	33,28	7,41 ± 0,81	60,23	9,5 ± 0,98	49,01
	NaHCO <sub>3</sub> (5%)	6,12 ± 1,20	67,15	2,76 ± 1,95	85,19	4,44 ± 2,02	76,17
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	13,93 ± 0,70	25,23	4,71 ± 0,14	74,72	8,99 ± 1,76	51,75
	Sem tratamento	30,40 ± 1,03					
Deltametrina	Água	5,28 ± 0,19	82,63	3,08 ± 0,49	89,87	3,32 ± 0,35	89,08
	NaClO	4,33 ± 1,51	85,76				
	Iodo	5,16 ± 6,44	83,03	1,24 ± 0,71	95,92	1,11 ± 0,50	96,35
	NaHCO <sub>3</sub> (5%)	2,86 ± 3,20	90,59	0,43 ± 0,07	98,59	0,44 ± 0,69	98,55
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	4,11 ± 4,47	86,48	1,12 ± 1,06	96,32	0,94 ± 0,16	96,91
	Sem tratamento						

<sup>1</sup>Concentração expressa em (mg kg<sup>-1</sup>) ± desvio padrão.

Fonte: elaborada pela autora.

Na remoção de resíduos de deltametrina, no tempo de 20 minutos, empregando o uso de água, a porcentagem de remoção foi de 82,63% e a solução de NaClO promoveu a remoção de 85,76%; na faixa de tempo de 20 a 60 minutos, o uso da solução de tintura de iodo removeu de 83,03% - 96,35%; a remoção promovida pelo uso da solução de NaHCO<sub>3</sub> foi entre 90,59% - 98,59%; no uso da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreu remoção entre 86,48% - 96,91%, conforme tabela 15.

Verificando o tempo de exposição das alfaces contaminadas às soluções de remoção, (tabela 15) o tempo mais favorável foi de 40 min. No tempo de 60 min não houve remoção maior do que no tempo de 40 minutos. A temperatura utilizada em cada solução foi a ambiente 25°C.

O uso da solução de NaHCO<sub>3</sub> na concentração de 5% foi a melhor solução para promover a remoção de ambos os resíduos de agrotóxicos, no entanto, mesmo na exposição do menor tempo, ou seja, 20 min ocorria um escurecimento das folhas além de ficarem murchas, sendo este agente removedor tóxico a este vegetal, não sendo o seu uso apropriado.

A utilização de  $\text{NaHCO}_3$  em água promove sua decomposição, gerando entre os produtos dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (reação 1), provavelmente na solução tenha ocorrido um aumento na produção de  $\text{CO}_2$  o que pode ter gerado desordens fisiológicas no vegetal. Estas desordens são perceptíveis pelo escurecimento e rápida degradação do vegetal (ROVERSI; MASSON, 2004).



A remoção com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6%) pode ser considerado o modo mais eficiente para a remoção em um tempo de 40 min, pois não houve nenhuma interferência na coloração e na textura da folha da alface. Além disso, os valores obtidos mostram uma redução significativa dos resíduos de ambos os agrotóxicos, nas condições anteriormente citadas. Observando a reação 3, ao se decompor o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não gera produtos tóxicos ao vegetal.



López-Fernández et al, 2013, utilizando solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6%) na remoção de fungicida mancozeb, na superfície da alface, observou uma remoção de (73% - 95%), todavia, estes resultados também estão dependentes do comportamento deste agrotóxico quando submetido a altos valores de pH.

Devido o escasso estudo de remoção de agrotóxicos em alface, utilizando soluções de lavagem, e diferentes condições adotadas, é difícil a comparação com outros dados na literatura. Entretanto, observou-se que embora a solubilidade de agrotóxicos em água seja um fator a considerar dada as interações do agrotóxico com as soluções de lavagem, os resultados não mostraram isto. A remoção deu-se, em demasia, pelo modo de ação do agrotóxico, no caso a deltametrina mostrou-se mais sensível a estas soluções de remoção por ser um agrotóxico de contato, isto é, distribui-se ao longo da superfície do alimento; embora apresente baixa solubilidade em água e alto valor de  $K_{ow}$  (Tabela 5) (BONNECHÈRE et al, 2012; ANVISA, 2017).

Outro fator interessante a ser considerado é a composição da alface crua, a presença de lipídios é pequena (0,12 g) e grande parte da sua composição é água cerca de 96,1% (IBGE, 2011; UNICAMP, 2011). Pode-se aventar que a presença de água não possibilitou uma maior interação da deltametrina em sua superfície, facilitando deste modo a sua remoção, pelas soluções de lavagem utilizadas. Tal possibilidade foi relatada por Wang et

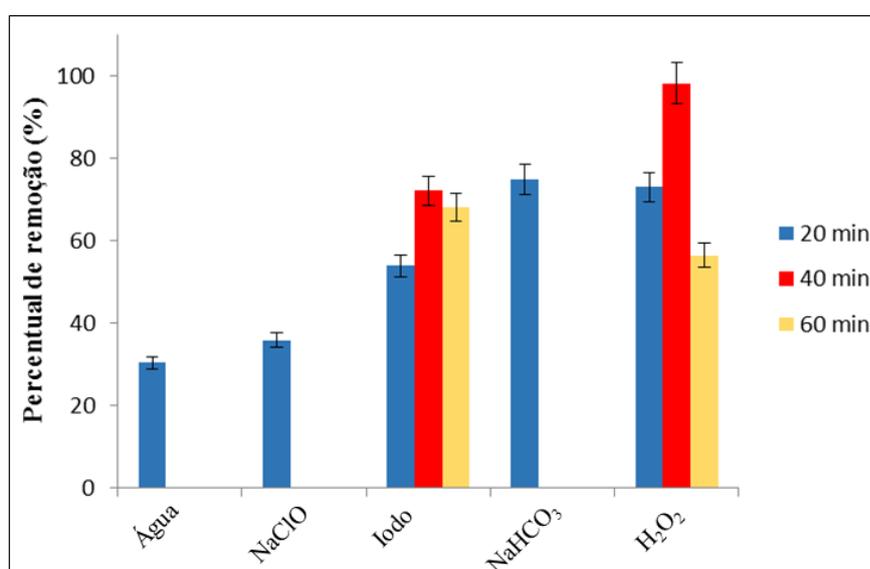
al, (2013), onde analisando agrotóxicos em tomate o clorpirifós com caráter mais lipofílico, devido ao alto valor de  $K_{ow}$ , manteve-se por mais tempo na película do fruto.

Esses resultados estão em conformidade com os encontrados por Hanafi et al, (2016), onde o agrotóxico clorfenapir insolúvel em água, obteve maior remoção que o acetamiprido com alto valor de solubilidade em água. No entanto, o acetamiprido é sistêmico e possivelmente ocorreu a sua migração para outras regiões do vegetal Okra. Wang et al, (2013), estudando a eficiência de remoção de clorotalonil e clorpirifós em tomate cereja, observou que a remoção de clorotalonil foi melhor, apesar do clorpirifós ser mais solúvel nas soluções estudadas. Assim como, Yang et al, (2012), não verificou correlação entre a solubilidade e a remoção de agrotóxicos em amostras de arroz.

A eficiência de uma solução de lavagem também ocorre devido à localização do agrotóxico no alimento, a solubilidade e a temperatura empregada na solução (BONNECHÈRE et al, 2012). Deste modo, segundo Rodrigues (2016), agrotóxicos sistêmicos que apresentam alta solubilidade, mas baixos valores de  $K_{ow}$ , não são removidos facilmente de frutas e vegetais, apenas com a lavagem.

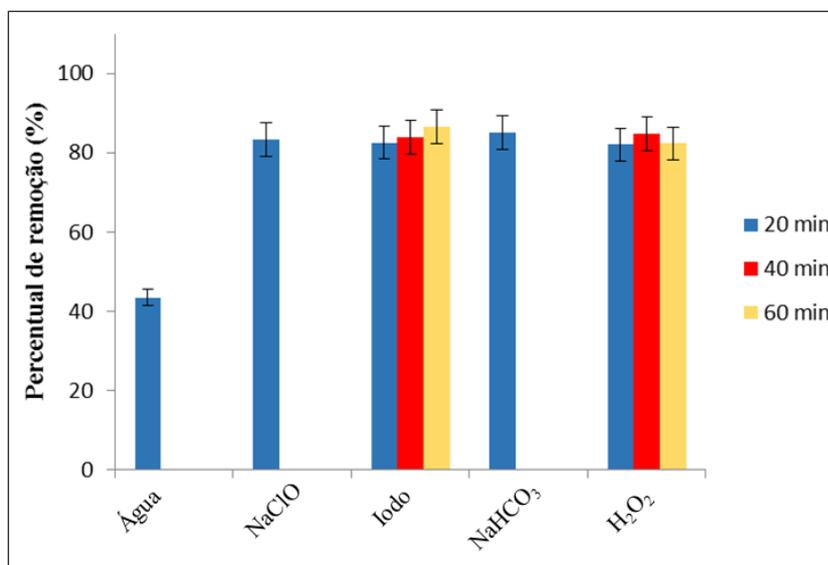
Em consonância com estes resultados, quando as alfaces foram pulverizadas com os dois princípios ativos, simultaneamente, os resultados mostraram que também o modo de ação foi o fator determinante, pois a remoção do carbendazim variou entre 30,4% - 98,09%, enquanto que a da deltametrina entre 43,53% - 86,53% conforme os Gráficos 1 e 2.

Gráfico1- Efeito das soluções de lavagem para o Carbendazim, na matriz contaminada por Carbomax 500 SC e Decis®.



Fonte: elaborada pela autora.

Gráfico 2- Efeito das soluções de lavagem para a Deltametrina, na matriz contaminada por Carbomax 500 SC e Decis®.



Fonte: elaborada pela autora.

Todos os tratamentos promoveram uma remoção nos níveis de ambos os agrotóxicos presentes nas alfaces, em comparação com as alfaces não submetidas a nenhum tratamento.

Tabela16- Comparativo entre estudos de remoção com soluções de lavagem.

Agrotóxico	Alimento	Solução de lavagem	Remoção	Referência
Mancozeb	Espinafre	Água de torneira	11 - 43%	Bonnechère et al, 2012
Organofosforados	Pepino	Água de torneira	13 - 53%	Liang et al, 2012
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2%)	20 - 73%	
		NaHCO <sub>3</sub> (5%)	40 - 98%	
Mancozeb	Alface	Água de torneira	21 - 55%	López-Fernandez et al, 2013
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	4 - 27%	
		NaClO	0 - 55%	
Multiclasses	Okra	Água de torneira	48 - 90%	Hanafi et al, 2016
Carbendazim e deltametrina	Alface	Água	16 - 82%	Este trabalho
		NaClO	30 - 85%	
		Tintura de iodo	33 - 96%	
		NaHCO <sub>3</sub> (5%)	67 - 98%	
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6%)	25 - 96%	

Fonte: elaborada pela autora.

Em nosso trabalho, trazemos um estudo levando em consideração apenas água e soluções de lavagem em diferentes tempos, não estando atrelado ao uso combinado de outros processos, como térmicos (tabela 16). Mesmo assim, os valores obtidos na remoção dos resíduos de agrotóxicos foram relevantes, conforme dados já expostos.

De acordo com a literatura estas soluções podem provocar a degradação dos compostos em estudo (MAZELLIER et al, 2003; MAZELLIER et al, 2007), no entanto fazendo uma varredura no CLAE-DAD nos comprimentos de onda entre 190-800 nm, não encontramos nenhum outro pico que indicasse a presença de produtos de degradação. Além disso, as amostras foram ainda submetidas à análise no UPLC-MS-QTOF, todavia não conseguimos identificar nenhum composto de degradação, provavelmente pelo método de preparo de amostra utilizado, pelo uso do GCB ou ainda pelo modo de ionização das moléculas em estudo.

## 6 CONCLUSÃO

O método validado mostrou-se satisfatório, com as condições cromatográficas necessárias. A utilização do GCB não demonstrou interferência nos resultados de recuperação ou de efeito matriz.

As soluções de remoção mostraram-se eficientes, especialmente com o uso do  $\text{NaHCO}_3$  (5%), entretanto, mostrou-se tóxico ao vegetal, provocando a sua degradação. Com isso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de 6%, mostrou-se o mais eficiente na remoção. Além de níveis significativos de remoção, não houve alterações na textura da alface.

O efeito destas soluções de lavagem mostrou que as características físico-químicas dos agrotóxicos estudados, como solubilidade em água e  $K_{ow}$ , conjuntamente com o seu modo de ação no vegetal, explicam os percentuais de remoção obtidos.

Estudos na literatura mostram que alguns destes agentes podem ter provocado a degradação destes agrotóxicos, no entanto isto não foi levado em conta neste trabalho. Portanto, é necessária uma melhor avaliação destes aspectos, utilizando técnicas que venham a identificar tais produtos de degradação.

## **7 TRABALHOS FUTUROS**

Uma das preocupações em torno da proposição de métodos de remoção é resultar em produtos de degradação mais tóxicos que o produto inicial. Deste modo, propõe-se verificar e identificar a presença de produtos de degradação, consultado a literatura quanto a sua toxicidade.

Além disso, buscar compreender o surgimento destes produtos através de mecanismos de reações é relevante, dado o intuito de elucidar tais resultados.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº899 de 29/05/2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografia de produtos agrotóxicos**. [On-line]. Disponível em: <<https://goo.gl/W2k1PT>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<https://goo.gl/f9g6Yb>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

ANASTASSIADES, Michelangelo; LEHOTAY Steven J; STAJNBAHER Darinka; SCHENCK Frank J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

AZEVEDO, F. A., NASCIMENTO, E. S., CHASIN, A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu; 2003.

BALINOVA, Anna M.; MLADENOVA, Rositsa I.; SHTEREVA, Deyana D. Effects of processing on pesticide residues in peaches intended for baby food. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 9, p. 895-901, 2006.

BARRIGOSI, José Alexandre Freitas. **Uso de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://goo.gl/fCCrve>>. Acesso em: 28 jun. 17.

BARROS NETO, Benício de; PIMENTEL, Maria Fernanda; ARAÚJO, Mário César Ugulino. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BOES, Evita; ROSMALINA, R. T.; RIDWAN, Y. S.; NUGRAHA, W. C.; YUSIASIH, R. Development of validated method using QuEChERS technique for organochlorine pesticide residues in vegetable. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 229-236, 2015.

BRASIL. **Decreto nº 4. 074, de 4 de janeiro de 2002**. Disponível em: <<https://goo.gl/yaznTY>>. Acesso em: 12 set. 2015.

BONNECHÈRE, Aurore et al. Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 397-406, 2012.

CARVALHO, Cleonice de; KIST, Benno Bernardo; TREICHEL, Michelle. **Anuário Brasileiro De Hortaliças**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 64 p. Disponível em: <<https://goo.gl/HHttyM>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

CÁRCEL, J.A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200-207, 2012.

CARMO, Shaiene Vieira; OLIVEIRA, Angélica Castanheira de; BASTOS, Lucia Helena Pinto; CARDOSO, Maria Helena Worlers Morelli. Otimização e validação de método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos na cultura de pimentão. 2016.

CARNEIRO, Fernando Ferreira; AUGUSTO, Lia Giraldo da Silva; RIGOTTO, Raquel Maria; FRIEDRICH, Karen; BÚRIGO, André Campos. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 2015.

CENGIZ, Mehmet Fatih; CERTEL, Muharrem. Effects of chlorine, hydrogen peroxide, and ozone on the reduction of mancozeb residues on tomatoes. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, n. 3, p. 371-376, 2014.

CHEN, Xiao-Jun; MENG, Zhi-Yuan; WANG, Ping; LU, Chun-Liang; YANG, Yi-Zhong; ZHANG, Li; LIU, Li; CHEN, Si. Evaluation of household cleaning methods for reducing chlorantraniliprole residues on cowpea fruits. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 9, p. 129, 2015.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H; JARDIM, Isabel C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

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**. 2009. 144p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

CHUI, Queenie SH; ZUCCHINI, Ricardo R.; LICHTIG, Jaim. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

CODEX Alimentarius. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>>. Acesso em: 05 out. 2016.

COSTA, Anna IG; QUEIROZ, Maria E. L. R; NEVES, Antônio A; DE SOUSA, Flaviane A; ZAMBOLIM, Laércio. Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Food chemistry**, v. 181, p. 64-71, 2015.

COUTINHO, Cláudia F.B; GALLI, Andressa; MAZO, Luiz H; MACHADO, Sérgio A.S. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006.

DA COSTA CABRERA, Liziara; MARTINS, Manuel Leonardo; PRIMEL, Ednei Gilberto; PRESTES, Osmar Damian; ADAIME, Martha Bohrer; ZANELLA, Renato. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

DA COSTA CABRERA, Liziara; MELLO, Lucas L; BADIALE-FURLONG, Eliana; PRIMEL, Ednei G; PRESTES, Osmar D; ZANELLA, Renato. Efeito do processamento

industrial e doméstico de alimentos nos níveis de resíduos de agrotóxicos. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 4, p. 43-52, 2014.

DA CABRERA, Liziara; CALDAS, Sergiane Souza; PRESTES, Osmar D; PRIMEL, Ednei; ZANELLA, Renato. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 39, n. 10, p. 1945-1954, 2016.

DA SILVA, Michele Strapasson Caillet; VISMAR DA COSTA, L. I. M. A. DOENÇAS EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS DE ALFACE NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA/PR. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 275-283, 2007.

DEVI, P. Ahila; PARAMASIVAM, M.; PRAKASAM, V. Degradation pattern and risk assessment of carbendazim and mancozeb in mango fruits. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 4142, 2015.

DG-SANCO, E. C. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **SANCO/12571**, 2013.

DO NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira; CHAVES, Fátima Itana; GUEDES, Jhonysson Arruda Carvalho; DA SILVA, Vitor Paulo; BARBOSA, Pablo Gordiano Alexandre. Relevant Aspects in the Determination of Pesticides in Foods. 2016.

DORS, Giniani C; PRIMEL, Ednei G; FAGUNDES, Carlos A. A; MARIOT, Carlos H. P; BADIALE- FURLONG, Eliana. Distribution of pesticide residues in rice grain and in its coproducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1921-1930, 2011.

DURAZZO, Alessandra et al. Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. **Food chemistry**, v. 140, n. 4, p. 666-671, 2013.

EL-SAYED, Y. S.; SAAD, T. T.; EL-BAHR, S. M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 212-217, 2007.

ESTURK, Okan; YAKAR, Yasin; AYHAN, Zehra. Pesticide residue analysis in parsley, lettuce and spinach by LC-MS/MS. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 3, p. 458-466, 2014.

EU Pesticides database. Disponível em: < <https://goo.gl/OD9wwH>>. Acesso em: 15 set. 2016.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION - FDA. < <https://goo.gl/tR9cZA>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GADELHA, V. **Uptake? É para comer?** Disponível em:< [goo.gl/EG1aEs](http://goo.gl/EG1aEs)>. Acesso em: 21 set. 2015.

GALEB, L. A. G. **Avaliação dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2010.

GUALBERTO, Ronan; OLIVEIRA, P. S. R.; GUIMARÃES, Alexandre de M. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de alface do grupo crespa em cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 007-011, 2009.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.

HANAFI, Ahmad; ELSHESHETAWY, Hemat E.; FAIED, Safaa F. Reduction of pesticides residues on okra fruits by different processing treatments. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 11, n. 4, p. 337-343, 2016.

HAJŠLOVÁ, Jana; ZROSTLIKOVÁ, Jitka. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 181-197, 2003.

HARRIS, Daniel C. 4ª ed. Explorando a química analítica. LTC. 2011.

HELENO, Fernanda F; DE QUEIROZ, Maria E. L. R; NEVES, Antônio A; FARONI, Lêda R. A; DE SOUSA, Flaviane A; DE OLIVEIRA, André F. Ozone treatment for the removal of residual chlorothalonil and effects on the quality of table grapes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 4, p. 687-694, 2015.

HENZ, Gilmar Paulo; SUINAGA, F. A. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

HEUDORF, Ursel; ANGERER, Juergen. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 3, p. 213, 2001.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. Porto Alegre. 6ª ed. Bookman, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**. Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. 2011. Disponível em : <<https://goo.gl/ac6rvm>>. Acesso em: 02 de mar. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 05, 2016.

ITOIZ, Eva Sevigné et al. Deposition and residues of azoxystrobin and imidacloprid on greenhouse lettuce with implications for human consumption. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1034-1041, 2012.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JIA, Lee; WONG, Hong; WANG, Yao. Carbendazim: disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 1, p. 161-172, 2003.

KARAM, Décio; SILVA, Wilton Tavares; RIOS, João Nelson Gonçalves; FERNANDES, Rodrigo Carvalho. Agrotóxicos. **Embrapa Milho e Sorgo-Documents (INFOTECA-E)**, 2015.

KAUSHIK, Geetanjali; SATYA, Santosh; NAIK, S. N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation—A review. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 26-40, 2009.

KEIKOTLHAILE, Boitshepo Miriam; SPANOGHE, Pieter; STEURBAUT, Walter. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: a meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 1-6, 2010.

KUMAR, Bhupander; KUMAR, Sanjay; PRAKASH, Dev; SINGH, S. K; MISHRA, Meenu; JAIN, P. K; GAUR, Richa; GOEL, Gargi; SHARMA, CS; KAMYOTRA, JS; GAUTAM, SP. Determination of Pyrethroid Insecticides by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD) with Different Types of Column. In: **Proc Indian natn Sci Acad**. 2011. p. 51-55.

LANÇAS, Fernando M. Cromatografia líquida moderna:HPLC/CLAE. Campinas: Átomo, 2009.

LEHOTAY, Steven J.; MAŠTOVSKÁ, Kateřina; LIGHTFIELD, Alan R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LEHOTAY, Steven J. et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.

LEITE, Flávio. Validação em análise química. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008.

LIANG, Y; WANG, W; SHEN, Y; LIU, Y; LIU, X.J. Effects of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 636-640, 2012.

LIGIERO, Carolina Bastos Pereira et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009.

LING, Yun; WANG, Han; YONG, Wei; ZHANG, Feng; SUN, Li; YANG, Min-Li; WU, Yong-Ning; CHU, Xiao-Gang. The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables. **Food Control**, v. 22, n. 1, p. 54-58, 2011.

LONDRES F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011.

LOPES, Carlos A.; CARRIJO, Osmar A.; MAKISHIMA, Nozomu. **Contaminação com patógenos em sistemas hidropônicos: como aparecem e como evitar**. Embrapa Hortaliças, 2005.

LOPES, Carlos Alberto; QUEZADO-DUVAL, Alice Maria; REIS, Ailton. Doenças da alface. 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/m1sqAX>>. Acesso em: 07 de fev. 2017.

LOPES, C. A.; DA SILVA, J. B. C.; GUEDES, I. M. R. Doenças em cultivos hidropônicos e medidas de controle. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2015.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Factors governing the removal of mancozeb residues from lettuces with washing solutions. **Food control**, v. 34, n. 2, p. 530-538, 2013.

MARTINEZ, Chelsea R.; IVERSON, Brent L. Rethinking the term “pi-stacking”. **Chemical Science**, v. 3, n. 7, p. 2191-2201, 2012.

MAUND, S. J; CAMPBELL, P. J; GIDDINGS, J. M; HAMER, M. J; HENRY, K; PILLING, E. D; WARINTON, J.S; WHEELER, J. R. Ecotoxicology of synthetic pyrethroids. In: **Pyrethroids**. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 137-165.

MAZELLIER, Patrick; Leroy, E; De Laat, J; Legube, B. Degradation of carbendazim by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> investigated by kinetic modelling. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 68-72, 2003.

MAZELLIER, Patrick; CÉCILE, Busset; DELMONT, Anne; DE LAAT, Joseph. A comparison of fenuron degradation by hydroxyl and carbonate radicals in aqueous solution. **Water research**, v. 41, n. 20, p. 4585-4594, 2007.

MELO, Armindo; AGUIAR, Ana; MANSILHA, Catarina; PINHO, Olívia; FERREIRA, Isabel M. P. L. V. O. Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1090-1097, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://goo.gl/EA12b8>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

MOGHARBEL, Assuan DI; MASSON, Maria Lucia. Perigos associados ao consumo da alface,(*Lactuca sativa*), in natura. **Alim. Nutr**, v. 16, n. 1, p. 83-88, 2005.

NARAHASHI, Toshio. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 1, p. 1-26, 2000.

NGUYEN, Thanh Dong; HAN, Eun Mi; SEO, Mi Suk; KIM, Sa Ra; YUN, Mi Young; LEE, Dae Miyung; LEE,Gae-Ho. A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in

rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 1, p. 67-74, 2008.

PASCHOAL, Jonas Augusto Rizzato et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, 2008.

PAULUS, Dalva et al. Crescimento, consumo hídrico e composição mineral de alface cultivada em hidroponia com águas salinas. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, 2012.

PEREIRA, M. C.; MAGALHÃES, W. F. Manual de Garantia da Qualidade Analítica–Resíduos e Contaminantes em Alimentos. 2011.

PÔRTO, Mônica LA et al. Doses de nitrogênio no acúmulo de nitrato e na produção da alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 539-543, 2012.

PRESTES, Osmar D; FRIGGI, Caroline A; ADAIME, Martha B; ZANELLA, Renato. QuEChERS–Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, Osmar Damian; ADAIME, Martha Bohrer; ZANELLA, Renato. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E. M.; MOURA, I.; CAPELO, J. L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 503-514, 2007.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H; FARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues. Eficiência de processamentos químicos e físicos na remoção de resíduos de agrotóxicos em hortaliças. 2016. 97f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016.

ROVERSI, Rosana Mendes; MASSON, Maria Lúcia. Qualidade da alface crespa minimamente processada acondicionada em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, 2004.

SALA, Fernando Cesar; COSTA, Cyro Paulino da. Retrospective and trends of Brazilian lettuce crop. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SANTOS, MAT dos; AREAS, Miguel Arcanjo; REYES, Felix Guillermo Reyes. Piretróides–uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008.

SILVA, Renato C.; BARROS, Karina A.; PAVÃO, Antonio C. Carcinogenicity of carbendazim and its metabolites. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1329-1334, 2014.

SINGH, Shashi Bala; MAISNAM, Jaya; KULSHRESTHA, Gita. Remediation of Drinking Water from Pesticides. **Pesticide Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 221-225, 2014.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. Nelson Education, 2013.

STERTZ, Sônia Cachoeira; DE FREITAS, RENATO JOÃO SOSSELA. TEOR DE DISSULFETO DE CARBONO EM AGRIÃO D'ÁGUA (Nasturtium officinale R. BE.) OBTIDO PELOS SISTEMAS DE CULTIVO ORGÂNICO, CONVENCIONAL E HIDROPÔNICO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

STOCKA, Jolanta; BIZIUK, Marek; NAMIEŚNIK, Jacek. Analysis of pesticide residue in fruits and vegetables using analytical protocol based on application of the QuEChERS technique and GC-ECD system. **International Journal of Global Environmental Issues**, v. 15, n. 1-2, p. 136-150, 2016.

**Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO**. NEPA-UNICAMP, 2011.

TORRES-PADRÓN, M<sup>a</sup> Esther; AUFARTOVÁ, Jana; SOSA-FERRERA, Zoraida; SANTANA-RODRIGUEZ, Jo'se Juan. Benzimidazole fungicides in environmental samples: extraction and determination procedures. **IN: Carisse, O. (ed). Pesticides. InTech**, p. 305-324, 2010.

WALORCZYK, Stanisław. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, v. 120, p. 106-113, 2014.

WANG, Zhiwei; HUANG, Jiexun; CHEN, Jinyuan; LI, Feili. Effectiveness of dishwashing liquids in removing chlorothalonil and chlorpyrifos residues from cherry tomatoes. **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 1022-1028, 2013.

YANG, Angel et al. Synergistic effect of washing and cooking on the removal of multi-classes of pesticides from various food samples. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2012.

**ANEXO A-CROMATOGRAMAS**

Figura A - Cromatograma do branco da matriz contaminada por Carbomax 500 SC.

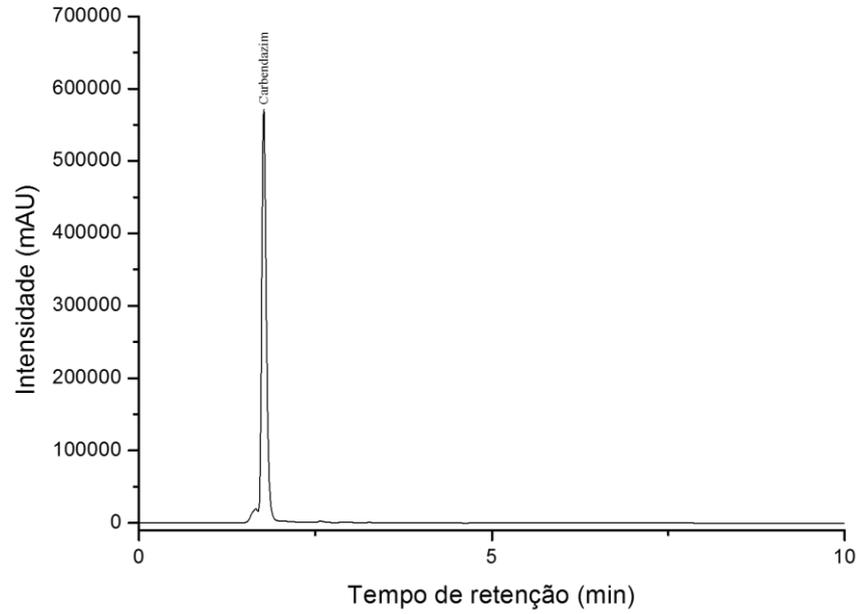
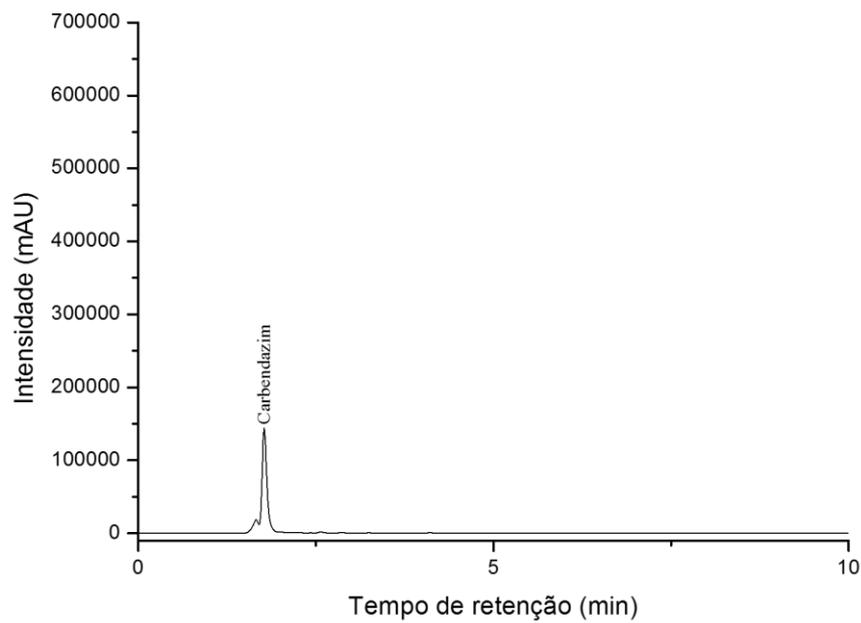
Figura B - Cromatograma do efeito da solução de NaHCO<sub>3</sub> (5%) na matriz contaminada por Carbomax 500 SC, 20 min.

Figura C - Cromatograma do efeito da solução de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) na matriz contaminada por Carbomax 500 SC, 40 min.

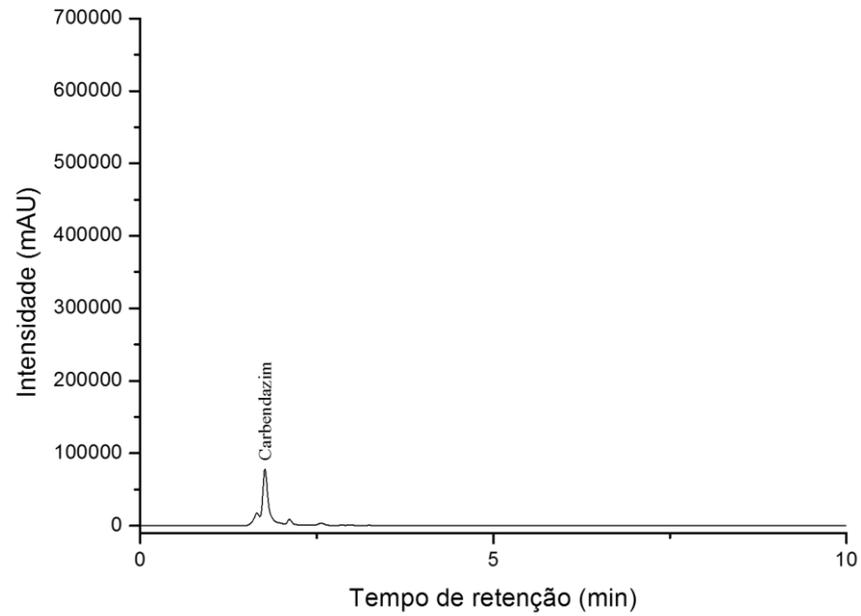


Figura D - Cromatograma do efeito da solução de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) na matriz contaminada por Carbomax 500 SC, 60 min.

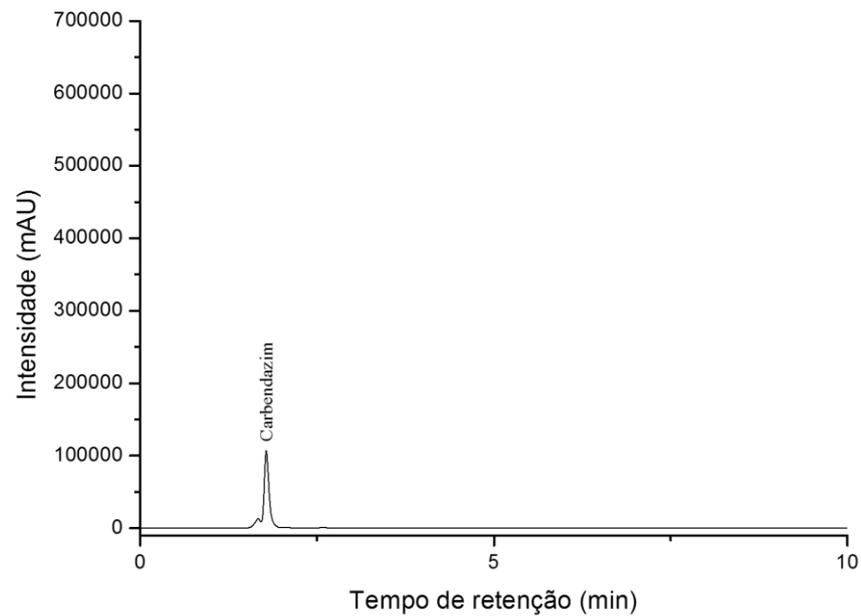


Figura E – Cromatograma do branco da matriz contaminada por Decis®.

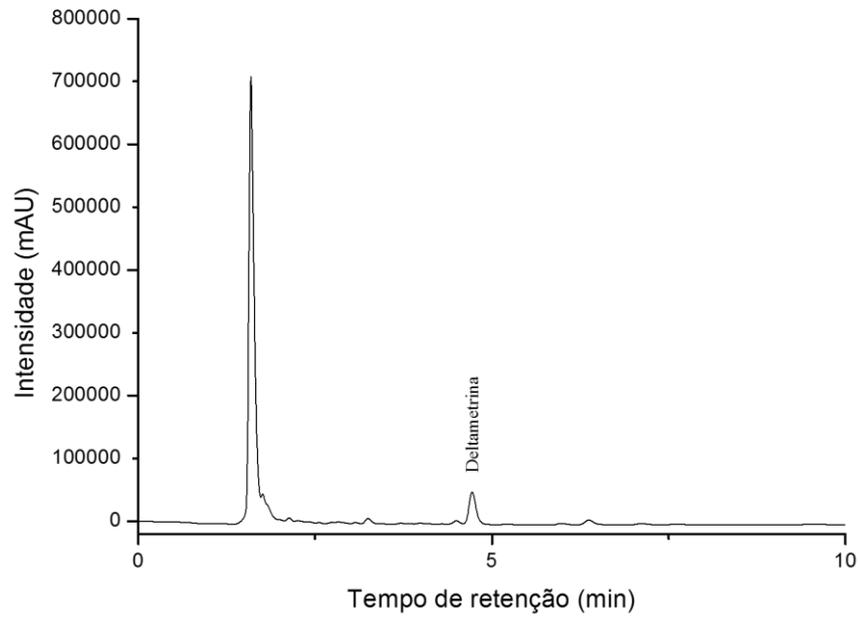
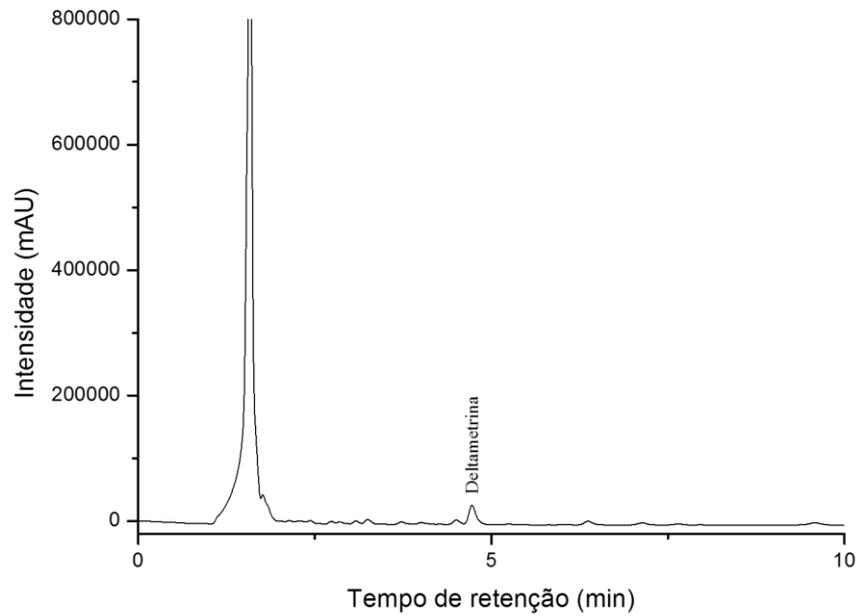
Figura F – Cromatograma do efeito da solução de NaHCO<sub>3</sub> (5%) na matriz contaminada por Decis®, 20 min.

Figura G – Cromatograma do efeito da solução de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) na matriz contaminada por Decis®,  
40 min.

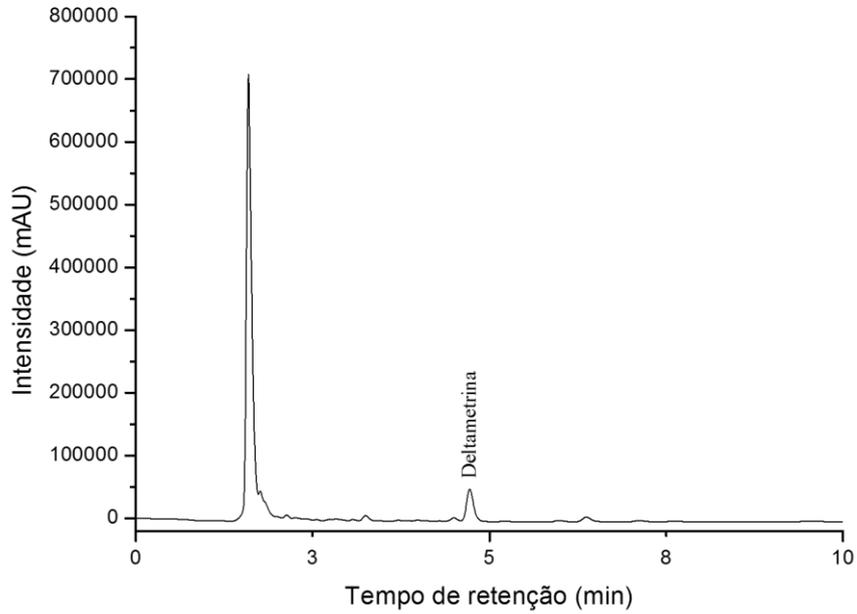


Figura H – Cromatograma do efeito da solução de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) na matriz contaminada por Decis®,  
60 min.

