



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

JHONYSON ARRUDA CARVALHO GUEDES

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO QuEChERS E CG-EM
PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM GOIABA**

FORTALEZA

2014

JHONYSON ARRUDA CARVALHO GUEDES

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO QuEChERS E CG-EM
PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM GOIABA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

G957v

Guedes, Jhonyson Arruda Carvalho.

Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multiresíduo de agrotóxico em goiaba / Jhonyson Arruda Carvalho Guedes. – 2014.

117 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Goiaba. 3. Química analítica. I. Título.

CDD 545

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Thonyson Arruda Carvalho Guedes
Thonyson Arruda Carvalho Guedes

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18/07/2014.

EXAMINADORES:



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



Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Carlos Emanuel de Carvalho Magalhães
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Aos meus pais, Tarcio e Solange.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida

Aos meus pais, Tarcio e Solange, por todo amor e dedicação para comigo, pessoas que tenho imenso orgulho de ter como pais, fundamentais para a conclusão desse trabalho, pessoas que me ensinaram os princípios da dignidade e honestidade, agradeço também por todo o esforço para me oferecer a melhor educação e por sempre acreditar e confiar no meu potencial.

Ao meu irmão e irmã, Thyêgo, Thárcia Shara. Bem como os demais membros da minha família por todo o apoio oferecido a mim.

A minha namorada Tamyris, por ter me dado amor, carinho e atenção, sabendo me compreender nas horas difíceis. Agradeço também por toda força e incentivo ao longo do Curso. Sem ela ao meu lado tudo teria sido mais difícil.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, meu orientador, pela orientação, pela oportunidade, pela disponibilidade e pelo apoio e incentivo. Por acreditar em minha capacidade e não medir esforços para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus atuais e ex-companheiros do LAT pela amizade e por todas as horas de diversão e descontração propiciadas pelos mesmos: Allen, André Henrique, Ari Clecius, Cláudio, Clêrton, Edmilson, Eliezer, Fátima, Jefferson, Jéssica, Juliene, Leila, Max, Nonato, Pablo, Rouse, Sarah, Vitor, Wagner e, em especial, aos amigos(as) André Gadelha, Carla, Diego, Gisele e Renata.

Ao Prof. Dr. Carlos Emanuel de Carvalho Magalhães, pela disponibilidade, pela contribuição com o presente trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora. Além disso, por ter me apresentado os fascínios da Química Analítica, ainda na minha Graduação na UECE.

A Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos, pela disponibilidade e por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo para melhoria do mesmo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de pesquisa.

A Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), pelo suporte e apoio na realização das atividades de pesquisa deste trabalho, em especial, aos membros do Laboratório de Análises para Certificação de Produtos do Caju (LABCAJU), Cleidiane, Érica e, em especial a Dra. Maria Aparecida Liberato Milhome, que contribuiu ativamente para a execução desse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), onde passei boa parte do tempo durante o curso, sendo a mesma como uma segunda casa, onde adquiri bastante conhecimento apesar das enormes dificuldades. Além de todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação. Sem esquecer-se dos amigos Vanda e Ivanildo.

“No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade” (Albert Einstein).

RESUMO

A goiaba é uma das frutas tropicais mais populares e de grande aceitação no Brasil e no mundo. A fruta goiaba pode ser alvejada por diversas pragas, reduzindo consideravelmente o rendimento da produção ocasionando a escassez da fruta no mercado. Visando o aumento da produtividade e conseqüentemente atender a demanda da população são empregadas elevadas quantidades de agrotóxicos com o intuito de combater as possíveis pragas que venham acarretar a deterioração da fruta. Dessa maneira, o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos é fundamental para o monitoramento da qualidade dos produtos consumidos pela população, além de possibilitar aos órgãos reguladores a obtenção de resultados mais rápidos e confiáveis. Neste trabalho, foi adaptado e validado um método para a determinação de agrotóxicos na fruta goiaba, executando-se o preparo da amostra através do método QuEChERS modificado, substituindo-se o solvente acetonitrila após a etapa de limpeza (*clean up*) por solvente ciclohexano / acetato de etila 1:1 e adição de carvão ativo para maior limpeza do extrato. Os limites de detecção (LD) variaram entre 0,002 e 0,010 mg kg⁻¹ e os limites de quantificação (LQ) variaram entre 0,005 e 0,030 mg kg⁻¹. Todas as curvas analíticas construídas usando o solvente e a matriz apresentaram significância estatística. Quando comparadas às curvas analíticas, verificou-se forte efeito matriz para o clorobenzilato, diferentemente do hexaclorobenzeno e da ametrina onde o efeito de matriz foi pouco significativo. Nas análises de amostras de goiaba comercializada na cidade de Fortaleza, foi detectado a presença de agrotóxicos em 7 amostras. Dos agrotóxicos detectados, apenas a trifloxistrobina é permitida para a cultura da goiaba, entretanto a concentração deste composto é inferior ao limite máximo de resíduo permitido para a goiaba (LMR = 0,050 mg kg⁻¹) segundo a ANVISA.

Palavras-chave: agrotóxicos, QuEChERS, goiaba

ABSTRACT

Guava is one of the most popular and widely accepted in Brazil and worldwide tropical fruits. The fruit can be targeted by various pests, reducing considerably the yield thus causing a slowdown or even a shortage of fruit on the market. Aiming the increase in productivity and ultimately the population's demand high amounts of pesticides are used in order to counter potential pests that may lead to a deterioration of the fruit. Thus, the development of analytical methods for multiresidue determination of pesticides in food is essential for the efficient monitoring of these compounds in the products consumed by the population, enabling regulators to obtain faster and more reliable results. In this work a method for the determination of pesticides in guava was developed and validated, running the sample preparation by modified QuEChERS method, replacing the acetonitrile solvent after cleaning step by cyclohexane / ethyl acetate solvent acetate 1:1 and addition of activated charcoal to extract greater cleanliness. The limits of detection (LOD) ranged between 0.002 and 0.010 mg kg⁻¹ and the limits of quantification (LOQ) ranged from 0.005 to 0.030 mg kg⁻¹. All calibration curves constructed in solvent and in matrix showed statistical significance when compared to the analytical curves and a strong matrix effect for chlorobenzilate, unlike hexachlorobenzene and ametrina where the matrix effect was negligible. In the analyzes of samples of guava sold in the city of Fortaleza, pesticides were found in 7 samples. Pesticides detected, trifloxystrobin is only allowed for the cultivation of guava, however the concentration of this compound is below the maximum residue limit allowed for guava (MRL = 0.050 mg kg⁻¹) according to ANVISA.

Keywords: pesticides, QuEChERS, guava

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Goiabeira com seus respectivos frutos.	19
Figura 2 - Estrutura química dos solventes mais empregados na extração multirresíduo de agrotóxicos: (a) acetato de etila; (b) acetona e (c) acetonitrila.	32
Figura 3 - Estrutura química do sorvente PSA (N-Propiletilenodiaminossilano).....	34
Figura 4 - Representação esquemática dos componentes do sistema cromatográfico acoplado a espectrometria de massas (CG-EM).....	39
Figura 5 - Sistema cromatográfico utilizado.	56
Figura 6 - Programação de temperatura empregada no método cromatográfico.....	57
Figura 7 - Etapa de extração com acetonitrila e adição de sais.	58
Figura 8 - Etapa de limpeza do extrato da matriz.....	59
Figura 9 - Etapa de rotaevaporação e ressuspensão do extrato.....	60
Figura 10 - Mapa das Regionais da cidade de Fortaleza-CE	66
Figura 11 - Extratos obtidos pelo método QuEChERS com a adição de carvão ativo na etapa de limpeza (à esquerda) e preparados sem adição de carvão ativo (à direita).	68
Figura 12 - cromatograma da mistura dos padrões analíticos dos agrotóxicos 0,7 mg L ⁻¹ em extrato de matriz goiaba.....	69
Figura 13 - Cromatograma e espectro de massas do agrotóxico fentiona.	72
Figura 14 - Comparação visual do percentual do efeito de matriz para os agrotóxicos utilizados no presente estudo.....	94
Figura 15 - Comparação visual entre as inclinações das curvas analíticas preparadas na matriz e no solvente.	95
Figura 16 - Fórmula estrutural do alacloro.	108
Figura 17 - Fórmula estrutural da ametrina.	108
Figura 18 - Fórmula estrutural da bifentrina.	109

Figura 19 - Fórmula estrutural dos isômeros do clordano: (a) cis-clordano e (b) trans-clordano.....	109
Figura 20 - Fórmula estrutural do clorobenzilato.....	110
Figura 21 - Fórmula estrutural do cloroneb.....	110
Figura 22 - Fórmula estrutural do clorotalonil.....	111
Figura 23 - Fórmula estrutural do clorpirifós.....	111
Figura 24 - Fórmula estrutural do DCPA.....	112
Figura 25 - Fórmula estrutural do esfenvalerato.....	112
Figura 26 - Fórmula estrutural do etridiazol.....	113
Figura 27 - Fórmula estrutural do fenarimol.....	113
Figura 28 - Fórmula estrutural da fenpropatrina.....	114
Figura 29 - Fórmula estrutural da fentiona.....	114
Figura 30 - Fórmula estrutural do Hexaclorobenzeno.....	115
Figura 31 - Fórmula estrutural da permetrina.....	115
Figura 32 - Fórmula estrutural do propacloro.....	116
Figura 33 - Fórmula estrutural da trifloxistrobina.....	116
Figura 34 - Fórmula estrutural do triflumizol.....	117
Figura 35 - Fórmula estrutural da trifluralina.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças e praga que podem causar danos na cultura da goiabeira	20
Tabela 2 - Agrotóxicos que tem uso autorizado para a cultura da goiabeira com seus respectivos LMR's, intervalo de segurança e ingestão diária aceitável.....	24
Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos em relação ao organismo alvo de ação ...	26
Tabela 4 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos causados à saúde humana.....	28
Tabela 5 - Diversas aplicações do método QuEChERS relatadas na literatura	35
Tabela 6 - Descrição dos padrões analíticos dos agrotóxicos, com suas respectivas purezas, fornecedores, classes, pK _a e K _{ow} (constante de partição octanol-água).....	52
Tabela 7 - Fragmentos dos agrotóxicos monitorados no modo SIM, com suas respectivas massas molar e tempos de retenção	70
Tabela 8 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas sem superposição de matriz.....	74
Tabela 9 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas com superposição de matriz.....	75
Tabela 10 - Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz	78
Tabela 11 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada no solvente	81
Tabela 12 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada na matriz da amostra.....	83
Tabela 13 - Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's. NA = Não autorizado	85
Tabela 14 - Precisão do método em termos de precisão intermediária e repetitividade	88

Tabela 15 - Percentuais de recuperação dos agrotóxicos em três níveis de fortificação e R_m associada aos três níveis	90
Tabela 16 - Efeito matriz (%) dos agrotóxicos estudados.	92
Tabela 17 – Resultados das análises de amostras de goiaba comercializadas na cidade de Fortaleza.....	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Cultura da goiaba	19
3.1.1 Pragas na cultura da goiaba.....	20
3.1.2 Métodos de controle de pragas na cultura da goiaba.....	23
3.2 Agrotóxicos	23
3.2.1 Classificação dos agrotóxicos.....	25
3.2.1.1 Classificação química.....	27
3.2.1.2 Classificação toxicológica.....	27
3.3 Preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos	29
3.3.1 Método QuEChERS	30
3.3.1.1 Extração com solvente	31
3.3.1.2 Adição de sais	33
3.3.1.3 Etapa de limpeza (<i>clean-up</i>) do extrato.....	33
3.3.1.4 Aplicações do método QuEChERS.....	35
3.4 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na determinação de resíduos de agrotóxicos.....	38
3.5 Validação de métodos cromatográficos.....	40
3.5.1 Seletividade	41
3.5.2 Linearidade	42
3.5.3 Limite de detecção (LD).....	43
3.5.4 Limite de quantificação (LQ)	44
3.5.5 Precisão	45

3.5.5.1 Repetitividade	46
3.5.5.2 Precisão intermediária	47
3.5.5.3 Reprodutibilidade	48
3.5.6 Exatidão	48
3.5.6.1 Recuperação (R)	48
3.5.7 Robustez	50
4 PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1 Instrumentação	51
4.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados	51
4.2.1 Agrotóxicos selecionados para o estudo	52
4.3 Limpeza dos materiais de trabalho	54
4.3.1 Procedimento para limpeza dos Vials	54
4.3.2 Procedimento para limpeza de vidrarias	55
4.4 Preparo das soluções analíticas	55
4.5 Condições cromatográficas	56
4.6 Preparo da amostra para análise e para os estudos de validação do método	57
4.6.1 Obtenção do extrato da matriz	58
4.7 Curvas analíticas	60
4.7.1 Preparo das soluções padrão para obtenção das curvas analíticas	60
4.8 Validação do método QuEChERS modificado para a determinação de agrotóxicos em goiaba	61
4.8.1 Seletividade	61
4.8.2 Linearidade	61
4.8.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)	62

4.8.2.2 Teste de Significância dos parâmetros de calibração	62
4.8.3 Limite de detecção (LD)	63
4.8.4 Limite de quantificação (LQ)	63
4.8.5 Precisão	64
4.8.5.1 Repetitividade	64
4.8.5.2 Precisão intermediária	64
4.8.6 Exatidão	64
4.9 Avaliação do Efeito Matriz	65
4.10 Análises de amostras de goiaba provenientes da cidade de Fortaleza	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1 Método QuEChERS modificado	67
5.2 Análise qualitativa dos agrotóxicos por CG-EM	69
5.3 Validação do método analítico	71
5.3.1 Seletividade	71
5.3.2 Validação das curvas analíticas e linearidade	73
5.3.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão linear)	78
5.3.2.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração	79
5.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	85
5.4 Precisão	87
5.5 Exatidão	89
5.6 Avaliação do Efeito Matriz	91
5.7 Análise das amostras de goiaba da cidade de Fortaleza	96
6 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXO A – Informações dos agrotóxicos selecionados para este estudo	108

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial implica no aumento da demanda de alimentos, que tem como consequência direta o uso de grandes quantidades de agrotóxicos nas plantações objetivando prevenir e combater pragas, ao mesmo tempo em que o uso dos mesmos visa à obtenção da ampliação da produtividade agrícola (SANCHES *et al.*, 2003).

A crescente utilização de agrotóxicos na produção de alimentos tem ocasionado uma série de transtornos e modificações no ambiente, como a contaminação de seres vivos e a acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos, dentre outros) (PERES; MOREIRA, 2003). Apesar da grande importância das atividades agrícolas, há pouco interesse no estudo de aspectos da saúde e segurança na agricultura. Por outro lado existe grande interesse em desenvolver novas tecnologias para aumento da produção na agropecuária, sem levar em consideração os impactos à saúde e à segurança do trabalhador (TAVELLA *et al.*, 2011).

No Brasil, a partir da década de 1970 tornou-se necessário à regulamentação do uso de agrotóxicos, tendo em vista o crescente uso no país (TAVELLA *et al.*, 2011). O Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo em 2009, título que ainda mantém, o país consome 20 % de todos os agrotóxicos do mundo. Essas substâncias contaminam os alimentos, a água e os trabalhadores envolvidos na sua aplicação (BRASIL DE FATO: UMA VISÃO POPULAR DO BRASIL E DO MUNDO, 2014). Visando proteger a saúde dos consumidores, agências governamentais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, limitam as quantidades de agrotóxicos em alimentos e estabelecem limites máximos de resíduos (LMR's) para as diversas *commodities*, além disso, a ANVISA estabelece quais são os agrotóxicos permitidos para as diferentes culturas (QUEIROZ *et al.*, 2011).

A goiaba é uma das frutas tropicais mais populares e de grande aceitação no Brasil e no mundo. Sendo bastante consumida e apreciada tanto fresca como processada industrialmente, em forma de doces, compotas, geleias e sucos, sendo rica em açúcares, vitamina C e sais minerais. Entretanto, a fruta pode ser alvejada

por diversas pragas, reduzindo consideravelmente o rendimento da produção ocasionando assim a diminuição ou até mesmo a escassez da fruta no mercado. Visando o aumento da produtividade e conseqüentemente atender a demanda da população, são empregadas elevadas quantidades de agrotóxicos com o intuito de combater as possíveis pragas que venham acarretar a deterioração da fruta.

Dentre os métodos disponíveis para preparação de amostra para determinação de agrotóxicos de alimentos, tem-se em destaque o método QuEChERS, tal método foi desenvolvido como alternativa para solucionar problemas relacionados aos métodos tradicionais de extração de agrotóxicos, que empregavam grandes quantidades de solventes orgânicos, ao mesmo tempo que eram morosos e trabalhosos. Uma vez que estes agrotóxicos são extraídos, empregam-se com sucesso as técnicas cromatográficas como a cromatografia em fase líquida e a cromatografia em fase gasosa.

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é uma técnica bastante utilizada para a análise qualitativa e quantitativa de agrotóxicos, tal fato é decorrente da combinação das vantagens da cromatografia (alta seletividade e separação eficiente) e da espectrometria de massas (informações estruturais e aumento na seletividade), além disso, o acoplamento dessas técnicas é altamente versátil, dado que a mesma é utilizada para analisar diferentes matrizes (MARTINS, 2010; ORSO, 2011; SOUSA *et al.*, 2013; CERQUEIRA *et al.*, 2014; RESTREPO *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de métodos que proporcionam elevada sensibilidade e seletividade, que utilizem pequenas quantidades de solventes orgânicos, que sejam rápidos e simples, são alguns dos atributos almejados para um método analítico. Tais características corroboram para exemplificar o papel fundamental da Química Analítica na questão da segurança alimentar.

Na literatura, não há relatos de métodos para a determinação de agrotóxicos em goiaba. Desse modo, este trabalho visa desenvolver uma metodologia para determinação multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes em goiaba utilizando o método QuEChERS e empregando a técnica de cromatografia gasosa (CG) associada a espectrometria de massa (EM).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo adaptar e validar uma metodologia analítica para a análise qualitativa e quantitativa de resíduos de agrotóxicos em goiaba usando o método QuEChERS e empregando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar modificações no método QuEChERS, visando adequar o método para análise dos agrotóxicos propostos;
- Validar as curvas analíticas, fazendo uso de cálculos estatísticos a fim de obter resultados confiáveis;
- Validar o método proposto, fazendo uso dos parâmetros de validação, tais como: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, reprodutibilidade e robustez;
- Avaliar a magnitude do efeito matriz causado por substâncias presentes na composição das frutas;
- Análise qualitativa e quantitativa de resíduos de agrotóxicos em goiabas comercializada na cidade de Fortaleza-CE;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cultura da goiaba

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) (Figura 1) é originária das Américas Central e do Sul e é fruta tipicamente tropical, entretanto é altamente adaptável a vários tipos de clima. Além disso, a fruta oriunda da goiabeira vem conquistando o paladar das famílias brasileiras e estrangeiras, por seu sabor exótico e incomparável. É por esta razão que se observa o crescimento das exportações nesta década (POMMER *et al.*, 2006; FREITAS, 2010). Desse modo, o Brasil se tornou um dos maiores produtores de goiaba no mundo, em 2011 a produção brasileira de goiaba foi de aproximadamente 342 mil toneladas e área plantada de quase 16 mil ha (RAMOS *et al.*, 2011; IBGE, 2011).

Figura 1 - Goiabeira com seus respectivos frutos.



Fonte: EMBRAPA (2014).

No Brasil, a goiaba é cultivada em três sistemas de produção bastante distintos: cultura de goiaba de mesa, cultura de goiaba para a indústria e cultura mista. Este último visa atender os dois mercados simultaneamente, o que é interessante para os produtores, uma vez que os frutos de melhor qualidade são destinados ao mercado de fruta *in natura*, que alcança melhores preços e o restante

é destinado ao processamento, nas diferentes formas, de acordo com o tipo de fruto (RAMOS *et al.*, 2011).

Dentre os benefícios da goiaba tem-se que a mesma é rica em fibras, vitamina B6 e carotenoides, em especial o licopeno. Outra característica da fruta é o alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), podendo haver variações de 55 a 1.044 mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa. A vitamina C presente na composição da goiaba é três vezes maior que o valor diário recomendado, desse modo, a fruta é considerada um bom antioxidante, combatendo radicais livres e prevenindo o desenvolvimento de doenças. Além disso, a fruta é rica em vitamina A e suas sementes são ricas em ômega 3 e ômega 6 (NIMISHA *et al.*, 2013; EMBRAPA, 2014).

3.1.1 Pragas na cultura da goiaba

Um dos maiores desafios que a cultura da goiabeira impõe aos produtores são os problemas fitossanitários. A grande variedade de pragas podem ocasionar danos em todas as fases de crescimento e desenvolvimento, acarretando em danos aos frutos, folhas, ramos e tronco, tornando-se impraticável colher e consumir frutos de qualidade (IDE; MARTELLETO, 2008; NASSER; MARIANO, 2013). Dentre as doenças e insetos que podem causar problemas fitossanitários a cultura da goiabeira têm-se alguns exemplos na Tabela 1 (MAPA, 2014).

Tabela 1 - Doenças e praga que podem causar danos na cultura da goiabeira. (*Continua*).

Classificação	Nome científico	Nome alternativo
Insetos	<i>Anastrepha fraterculus</i>	Mosca-das-frutas; Mosca-sul-americana
Insetos	<i>Anastrepha spp.</i>	Mosca-das-frutas
Insetos	<i>Bactrocera carambolae</i>	Mosca-da-carambola

Tabela 1 - Doenças e praga que podem causar danos na cultura da goiabeira. (*Continua*).

Classificação	Nome científico	Nome alternativo
Insetos	<i>Ceratitis capitata</i>	Mosca-das-frutas; Mosca-do-mediterrâneo
Insetos	<i>Ceroplastes floridensis</i>	Cochonilha-de-cera; Cochonilha-sem-carapaça
Insetos	<i>Ceroplastes janeirensis</i>	Cochonilha
Insetos	<i>Citheronia laocoon</i>	Lagarta-da-goiaba
Insetos	<i>Conotrachelus psidii</i>	Gorgulho-da-goiaba
Insetos	<i>Costalimaita ferruginea vulgata</i>	Besouro-amarelo; Besouro-da-goiabeira
Insetos	<i>Holymeria clavigera</i>	Percevejo-das-frutas
Insetos	<i>Leptoglossus gonagra</i>	Percevejo-escuro
Insetos	<i>Leptoglossus stigma</i>	Percevejo-das-frutas
Insetos	<i>Megalopyge lanata</i>	Lagarta-de-fogo; Taturana
Insetos	<i>Mimallo amilia</i>	Lagarta
Insetos	<i>Polyphagotarsonemus latus</i>	Ácaro-branco; Ácaro-tropical
Insetos	<i>Pyrrhopyge charybdis</i>	Diabinho; Lagarta
Insetos	<i>Selenothrips rubrocinctus</i>	Tripes-do-cacaueiro
Insetos	<i>Timocratica albella</i>	Broca-da-goiabeira; Broca-das-mirtáceas

Tabela 1 - Doenças e praga que podem causar danos na cultura da goiabeira. (Conclusão).

Classificação	Nome científico	Nome alternativo
Insetos	<i>Trachyderes thoracicus</i>	Coleobroca-dos-citros
Insetos	<i>Trizoida sp.</i>	Psilídio
Doença	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Podridão-branca; Seca-do-ramo
Doença	<i>Sphaceloma psidii</i>	Antracnose-maculata
Doença	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping-off; Tombamento
Doença	<i>Phyllosticta guajavae</i>	Mancha-de-Phyllosticta; Mancha-foliar
Doença	<i>Phytophthora spp.</i>	Gomose; Podridão-dos-frutos
Doença	<i>Puccinia psidii</i>	Ferrugem
Doença	<i>Meloidogyne incognita</i>	Meloidoginose; Nematóide-das-galhas
Doença	<i>Dothiorella dominicana</i>	Podridão-de-Dothiorella; Podridão-parda
Doença	<i>Erwinia psidii</i>	Bacteriose; Seca-dos-ponteiros
Doença	<i>Helicotylenchus dihystera</i>	Nematóide; Nematóide-espiralado
Doença	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnose

Fonte: MAPA (2014).

3.1.2 Métodos de controle de pragas na cultura da goiaba

Visando reduzir ou até mesmo eliminar prejuízos causados por pragas e/ou doenças e conseqüentemente obter uma maior produtividade agrícola, são aplicados métodos de controle culturais ou químicos. Nos métodos culturais são empregados procedimentos não prejudiciais ao meio ambiente, como exemplo: esmagamento de larvas, armadilhas com iscas atrativas, coleta de frutos caídos e ensacamento de frutos. Os métodos químicos fazem uso de agrotóxicos, dependendo de sua ação sobre o meio ambiente podem ser divididos em três grupos: produtos de baixo impacto ambiental, onde quase não prejudicam o meio ambiente; produtos que usados com cuidado não causam grandes problemas à natureza, estes constituem um grupo intermediário; e produtos de alto impacto ambiental, estes causam sérios problemas ao ambiente (IDE; MARTELLETO, 2008).

3.2 Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno. São inúmeras as denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas (PERES; MOREIRA, 2003; RIBAS, 2009). Segundo a WHO (*World Health Organization*), agrotóxicos são compostos químicos que são utilizados para reduzir ou eliminar pragas, incluindo insetos, roedores, fungos e plantas indesejáveis (ervas daninha). Por sua natureza, os agrotóxicos são potencialmente tóxicos para os seres humanos, desse modo, devem ser utilizados com segurança e descartados de forma apropriada (WHO, 2014).

As formulações dos agrotóxicos são constituídas de princípios ativos (ingrediente ativo), que são responsáveis por intervir na atividade biológica normal dos seres vivos alvos de controle. O ingrediente ativo é o agente químico, físico ou biológico que confere eficácia aos agrotóxicos. O mesmo princípio ativo pode ser vendido com diferentes formulações e distintos nomes comerciais, além disso, é possível encontrar produtos com mais de um princípio ativo (IBAMA, 2010; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A legislação brasileira estabelece que o uso de agrotóxicos no Brasil, está condicionado ao registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (IBAMA, 2009).

A ANVISA tem, entre outras competências, a de avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos, e juntamente com o MAPA, no âmbito de suas respectivas áreas de competência, de monitorar os resíduos de agrotóxicos e afins em alimentos de origem vegetal. A ANVISA também é responsável por estabelecer o Limite Máximo de Resíduos (LMR) e o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola. Dentre os agrotóxicos que tem uso autorizado para a cultura da goiabeira, têm-se alguns exemplos na Tabela 2, com seus respectivos LMR's, intervalo de segurança e ingestão diária aceitável (IDA) (ANVISA, 2011; MAPA, 2014).

Tabela 2 - Agrotóxicos que tem uso autorizado para a cultura da goiabeira com seus respectivos LMR's, intervalo de segurança e ingestão diária aceitável. (Continua).

Agrotóxico	Limite máximo de resíduo (mg kg⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)	Ingestão diária aceitável (mg kg⁻¹ peso corporal)
Azoxistrobina	0,200	2	0,020
Bromuconazol	0,050	20	-
Ciproconazol	0,050	14	0,010
Difenoconazol	0,200	2	0,600
Enxofre	-	1	-
Espinosade	-	-	-

Tabela 2 - Agrotóxicos que tem uso autorizado para a cultura da goiabeira com seus respectivos LMR's, intervalo de segurança e ingestão diária aceitável. (*Conclusão*).

Agrotóxico	Limite máximo de resíduo (mg kg⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)	Ingestão diária aceitável (mg kg⁻¹ peso corporal)
Eugenol metílico	-	-	-
Fentiona	0,050	21	0,007
Hidróxido de cobre	-	-	-
Imidacloprido	0,100	7	0,050
Metilciclopropeno	-	1	-
Oxicloreto de cobre	-	-	-
Óxido cuproso	-	-	-
Sulfato de cobre	-	-	-
Tebuconazol	0,1	20	0,030
Triclorfom	0,1	7	0,010
Trifloxistrobina	0,05	20	-
Trimedlure	-	-	-

Fonte: MAPA (2014).

3.2.1 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos englobam uma vasta gama de substâncias químicas, de modo que podem ser classificados de diferentes maneiras, podendo ser de acordo com o organismo alvo de ação (Tabela 3), de acordo com a estrutura ou grupo químico (classificação química), e de acordo com a toxicidade. Além disso, a EPA

(*Environmental Protection Agency*) classifica os agrotóxicos baseado em seu tempo de meia-vida no ambiente, onde os mesmos são classificados como: não persistente (duram menos de 30 dias), moderadamente persistente (duram de 30-100 dias) e persistente (tempo de vida superior a 100 dias) (BAIRD; CANN, 2011).

Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos em relação ao organismo alvo de ação.

Tipo de agrotóxico	Organismo alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Aves
Bactericida	Bactéria
Desinfetante	Micro-organismo
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de inseto
Moluscicida	Caracóis e lesmas
Nematicidas	Nematoides
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores
Cupicida	Cupins
Formicida	Formigas

Fonte: Baird; Cann (2011).

3.2.1.1 Classificação química

Os agrotóxicos são classificados quimicamente em compostos orgânicos (denominados assim devido à presença do átomo de carbono na estrutura) e inorgânicos (compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre). Os orgânicos constituem o grupo de maior importância, dentre as principais classes dos compostos orgânicos tem-se: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, nitropesticidas, bupiridílios, sulfoniluréias e triazinas (SANCHES *et al.*, 2003; GALLI *et al.*, 2006).

3.2.1.2 Classificação toxicológica

A classificação toxicológica é fundamentada nos resultados dos testes e estudos feitos em laboratórios, que objetivam estabelecer a dosagem letal 50 % (DL_{50}), que é a quantidade de substância necessária para matar 50 % dos animais testados nas condições experimentais utilizadas. Considerando que a capacidade de determinada substância causar morte ou algum efeito sobre os animais depende da sua concentração no corpo do indivíduo, a dose letal é expressa em miligrama da substância por quilograma da massa corporal. A toxicidade de uma substância também pode variar de acordo com o modo de administração, e os rótulos dos produtos são identificados por meio de faixas coloridas (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A avaliação e a classificação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico são baseadas em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos. Desse modo os agrotóxicos podem ser classificados em classes toxicológicas que variam de I a IV (Tabela 4): produtos altamente perigosos ao meio ambiente (extremamente tóxico) (Classe I), como a maioria dos organoclorados; produtos muito perigosos ao meio ambiente (altamente tóxico) (Classe II), como exemplo o malation; produtos perigosos ao meio ambiente (mediamente tóxico) (Classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (pouco tóxico) (Classe IV), como os derivados de óleos minerais (PERES; MOREIRA, 2003; RIBAS; MATSUMURA, 2009; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Tabela 4 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos causados à saúde humana.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL₅₀ (mg kg⁻¹)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000	Verde

Fonte: Braibante; Zappe (2012).

Esta classificação garante a interpretação do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, desse modo é possível identificar a dimensão do risco na utilização destes produtos. É importante ressaltar que dentre as substâncias da Classe I encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (MARTINS, 2010).

O risco potencial que os pesticidas oferecem ao homem através da alimentação, devido a uma exposição crônica diária, motivou a exigência de um Limite Máximo de Resíduos (LMR) que consiste na concentração máxima de agrotóxicos legalmente aceitos nos alimentos, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg⁻¹) (ANVISA, 2007). Os LMR's são estabelecidos para diferentes combinações de cultura e pesticida. Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de pesticidas, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental. No Brasil o PARA é o programa de monitoramento de resíduos de pesticidas que é coordenado pela ANVISA e tem a incumbência de estabelecer os LMR's para as diferentes *commodities* (STEPAN; TICHA; HAJŠLOVA, 2005; ANVISA, 2011).

3.3 Preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos

Na determinação de resíduos de pesticidas, os analitos apresentam geralmente baixa concentração e propriedades químicas distintas, além disso, encontram-se dispostos em matrizes complexas, desse modo, se faz necessário uma etapa prévia de preparo da amostra (PRESTES *et al.*, 2009). O preparo de amostra para análise de resíduos e contaminantes em alimentos tem por objetivo isolar os analitos de interesse e remover possíveis interferentes provenientes da matriz da amostra que por ventura possam interferir na análise.

No método de preparo de amostra estão envolvidas as etapas de extração dos compostos de interesse seguida da limpeza do extrato. Estes procedimentos consistem em transferir os analitos da matriz para outra fase, empregando simultaneamente uma etapa de limpeza para remoção de substâncias interferentes (isolamento), aumentando a concentração dos analitos (enriquecimento) a um nível acima do limite de detecção da técnica analítica. Perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises. Desta maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (PRESTES *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, ocorreu um acelerado desenvolvimento de novos métodos analíticos, visando à determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas. Entretanto, grande parte dos métodos desenvolvidos está longe do considerado ideal, apresentando características como: a morosidade de suas diversas etapas, o emprego de grandes volumes de solvente, o alto custo, pouca sensibilidade, etc (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

Um método de preparo de amostra deve, idealmente, ser de fácil manipulação, de baixo custo, envolver poucas etapas e o mínimo de tempo possível, além dessas características o método deve permitir uma recuperação quantitativa, sem perdas nem destruição dos analitos; deve produzir um meio adequado ao método analítico a ser utilizado e, finalmente, deve gerar uma solução que contenha as substâncias de interesse, numa concentração adequada à sensibilidade do sistema de detecção, sem que haja a necessidade de concentrá-la (SKOOG *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, várias técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir etapas e/ou minimizar o consumo de solventes. Entre estas novas possibilidades, o método QuEChERS está ganhando popularidade na análise de resíduos e contaminantes em alimentos. Esta grande aceitação está relacionada com os resultados satisfatórios obtidos no preparo de amostra de diferentes matrizes contendo analitos com propriedades físico-químicas distintas (CABRERA *et al.*, 2012).

3.3.1 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores reavaliaram as condições frequentemente praticadas nas análises multirresíduo de agrotóxicos, sendo assim, visando superar limitações dos métodos multirresíduo disponíveis na época, propuseram um novo procedimento de preparo de amostras denominado QuEChERS, sigla que é oriunda das palavras em inglês “**Quick**”, “**Easy**”, “**Cheap**”, “**Effective**”, “**Rugged**” e “**Safe**” (rápido, fácil, baixo custo, efetivo, robusto e seguro) que representam as particularidades do método atribuídas pelos autores do mesmo (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; SCHENCK; HOBBS, 2004; NGUYEN *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

O método QuEChERS omite ou substitui muitas etapas analíticas complicadas que são habitualmente empregadas em métodos de extração multirresíduos tradicionais. Dessa maneira, o método fornece resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas analíticas, baixo consumo de solventes orgânicos, extração de agrotóxicos de diferentes polaridades e utilização de solventes não clorados (SCHENCK; HOBBS, 2004; DÍEZ *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009). Além disso, ensaios de proficiência empregando o método QuEChERS evidenciam que o método é altamente robusto, sendo transferido com sucesso entre os laboratórios participantes (LEHOTAY *et al.*, 2007).

Os procedimentos envolvidos na aplicação do método QuEChERS são caracterizados como uma sequência das seguintes etapas: extração, partição e limpeza. Inicialmente é executada uma etapa de extração com acetonitrila, seguida de

partição provocada pela adição da mistura de sais $MgSO_4$ e $NaCl$. Posteriormente às etapas de extração com acetonitrila e partição com a mistura de sais, executa-se o *clean-up* (limpeza). Um novo método de *clean-up* denominado extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction - D-SPE*) foi sugerido juntamente com o método QuEChERS, onde é adicionado ao extrato a mistura do sorvente amina primária secundária (*Primary Secondary Amine - PSA*) e o $MgSO_4$ (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011; CABRERA *et al.*, 2012).

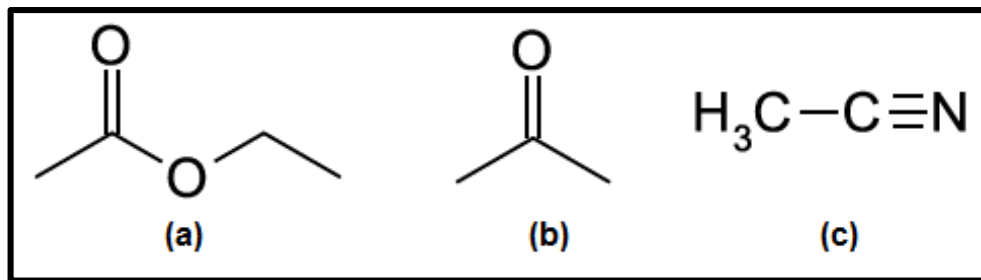
A primeira modificação proposta para o método QuEChERS foi a adição de uma etapa de tamponamento, visando melhorar os percentuais de recuperação para alguns agrotóxicos. Desse modo, foi desenvolvido o método QuEChERS acetato, onde o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) como método oficial para determinação de resíduos de pesticidas. (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; AOAC OFFICIAL METHOD 2007.01, 2007; PRESTES *et al.*, 2011). Também foi desenvolvido o método QuEChERS citrato, onde o efeito tamponante (pH 5,0 - 5,5) é ocasionado pela adição da mistura de citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado. Em 2008, o *European Committee for Standardization* (CEN) oficializou o método QuEChERS citrato como método de referência da União Europeia (PRESTES *et al.*, 2011; EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2014).

3.3.1.1 Extração com solvente

A seleção do solvente de extração é um dos pontos cruciais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Devem ser considerados alguns aspectos na escolha do solvente, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de pesticidas com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo e segurança (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; PRESTES *et al.*, 2009).

Os solventes mais utilizados na extração multirresíduo de agrotóxicos são (Figura 2): acetato de etila, acetona e acetonitrila. No desenvolvimento do método QuEChERS, o solvente que apresentou características mais apropriadas foi a acetonitrila, sendo então escolhida como solvente de extração. Dado que a utilização da acetonitrila como solvente de extração possibilita a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e a extração de menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura química dos solventes mais empregados na extração multirresíduo de agrotóxicos: (a) acetato de etila; (b) acetona e (c) acetonitrila.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na etapa de extração com acetonitrila são adicionados 10 mL do solvente em 10 g de amostra, resultando uma relação 1 g de amostra por 1 mL de solvente, sem envolver etapa de evaporação. Este valor é considerado baixo se comparado a outros métodos de extração que normalmente apresentam uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g por 1 mL no extrato final. Porém, com a instrumentação analítica disponível atualmente, esta relação é considerada adequada uma vez que valores de LD entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ são obtidos para a maioria dos pesticidas rotineiramente analisados (PRESTES *et al.*, 2009).

3.3.1.2 Adição de sais

Diversos métodos multirresíduos empregam adição de sais a fim de promover o efeito *salting out*, tal procedimento incrementa a partição dos compostos solubilizados na fase aquosa para a fase orgânica (acetonitrila). Desse modo, obtêm-se melhores percentuais de recuperação para os analitos mais polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (SCHENCK *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

No desenvolvimento do método QuEChERS foi empregada uma mistura de 1 g de cloreto de sódio (NaCl) e 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄). A escolha do MgSO₄ foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração / partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

3.3.1.3 Etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato

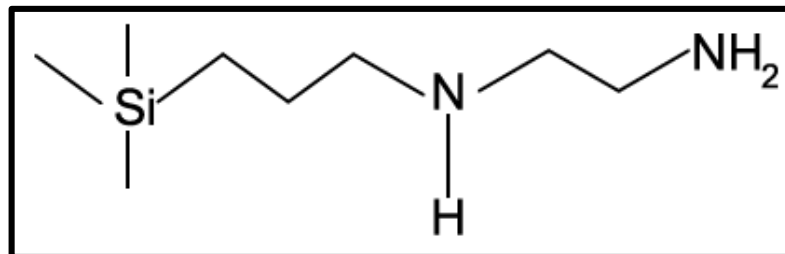
A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (PRESTES *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 2012).

A extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS, visando a

obtenção de um extrato final com menor quantidade de interferentes, aliada a um menor custo quando comparada com técnicas tradicionais. A D-SPE apresenta vantagens como: uso de menor quantidade de sorvente e solventes, refletindo em menor custo, além de não haver necessidade de trabalhar no formato de cartucho. Uma das principais vantagens da D-SPE é a versatilidade no estabelecimento de novos métodos, uma vez que permite a utilização de diferentes quantidades e/ou misturas de sorventes, dependendo do tipo de matriz e de analitos de interesse (CABRERA *et al.*, 2012).

O sorvente empregado em D-SPE é o N-Propiletlenodiaminossilano que é uma amina primária secundária (PSA), o sorvente pode interagir através de ligação de hidrogênio ou dipolo-dipolo, além disso, a estrutura bidentada do PSA (Figura 3) tem elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura (PRESTES *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura química do sorvente PSA (N-Propiletlenodiaminossilano).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O efeito quelante proveniente do PSA confere ao sorvente o poder de remover possíveis interferências presentes na matriz, tais como: ácidos orgânicos, certos pigmentos polares, ácidos graxos, açúcares. Nessa etapa de limpeza também é utilizado simultaneamente ao PSA, o $MgSO_4$, que funciona como um agente secante promovendo a remoção de água residual (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 2012).

3.3.1.4 Aplicações do método QuEChERS

Inicialmente, o desenvolvimento do método QuEChERS tinha como objetivo a extração multirresíduos de agrotóxicos em alimentos. Entretanto, desde o seu desenvolvimento o método tem sofrido diferentes modificações visando a extração de diferentes analitos em diferentes matrizes, tal fato pode ser atribuído a simplicidade nas etapas de execução do QuEChERS. Desse modo, uma ampla aplicabilidade do método vem sendo observada em inúmeras publicações para diversas matrizes e analitos (Tabela 5), tais publicações denotam a versatilidade do método no que diz respeito às suas diversas aplicações.

Tabela 5 - Diversas aplicações do método QuEChERS relatadas na literatura. (*Continua*).

Analito	Matriz	Técnica de análise	Referência
21 fármacos e 6 produtos de higiene	Resíduos de tratamento de água	UHPLC-MS/MS	CERQUEIRA <i>et al.</i> , 2014
24 agrotóxicos	Tomate, tamarillo e Golden berry	GC-MS	RESTREPO <i>et al.</i> , 2014
21 entorpecentes	Sangue humano	UHPLC-MS/MS	ANZILLOTTI; ODOARDI; STRANO-ROSSI, 2014
10 agrotóxicos	Sucos de maçã, pera, uva, pêssego, laranja, limão, kiwi e manga	GC-ECD	ZHANG; ZHANG; JIAO, 2014
30 agrotóxicos	Óleos vegetais	UHPLC-MS/MS	MORENO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2014
14 microtoxinas	Arroz	UHPLC-MS/MS	KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014

Tabela 5 - Diversas aplicações do método QuEChERS relatadas na literatura. (*Continua*).

Analito	Matriz	Técnica de análise	Referência
Ocratoxina A	Vinho	LC-MS/MS	FERNANDES; BARROS; CÂMARA, 2013
16 agrotóxicos	Cevada	GC-TOF-MS	DÍEZ, C. <i>et al.</i> , 2006
28 agrotóxicos	Óleo de soja	GC-MS	LI <i>et al.</i> , 2007
4 fármacos	Sangue e urina	LC-MS	WESTLAND; DORMAN, 2013
19 pesticidas	Leite, ovo e abacate	GC-MS	LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; YUN, 2005
14 HPA's	Partículas em suspensão	HPLC	ALBINET; TOMAZ; LESTREMAU, 2013
1 microtoxina	Pão	HPLC	PAÍGA <i>et al.</i> , 2012
36 agrotóxicos	Flor-de-lótus	GC-ECD	MIAO <i>et al.</i> , 2013
Fármacos e venenos	Sangue humano	LC-MS/MS	USUI <i>et al.</i> , 2012
13 sulfonamidas	Ração bovina	LC-MS/MS	LOPES <i>et al.</i> , 2012

Tabela 5 - Diversas aplicações do método QuEChERS relatadas na literatura. (*Conclusão*).

Analito	Matriz	Técnica de análise	Referência
7 fenóis	Cerveja, vinho e sucos (manga, pera, maçã)	HPLC-UV	VALENTE <i>et al.</i> , 2013
8 agrotóxicos	Folhas de bananeira	GC-MS/MS	GONZÁLEZ-CURBELO <i>et al.</i> , 2011
7 agrotóxicos	Licor de mel	LC-MS/MS	JOVANOVA <i>et al.</i> , 2014
35 agrotóxicos	Melão	GC-MS	SOUSA <i>et al.</i> , 2013
45 agrotóxicos	Abacaxi	GC-MS	BARBOSA, 2013
22 agrotóxicos	Caju	LC-ESI-MS/MS	SILVA, 2014
Imidacloprido e seus metabolitos	Alface	GC-ECD	KO <i>et al.</i> , 2014
8 agrotóxicos	Leite e iogurte	HPLC	LI <i>et al.</i> , 2013
5 microtoxinas	Pipoca	GC-MS	FERREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2012

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na determinação de resíduos de agrotóxicos

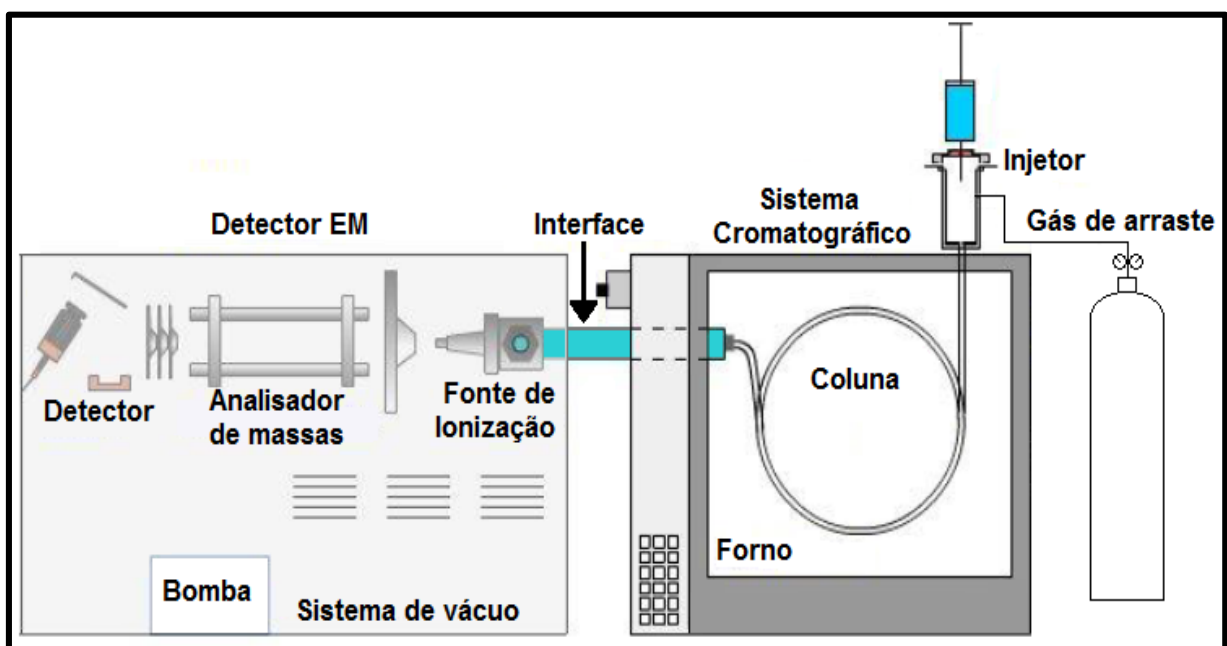
As técnicas de cromatografia em fase líquida e em fase gasosa aliadas à espectrometria de massas estão entre as mais poderosas ferramentas analíticas disponíveis para a identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014). A cromatografia em fase gasosa é uma das técnicas de análise mais utilizadas para a separação e quantificação de diversos compostos, sendo possível a determinação simultânea de uma gama de substâncias em uma única análise. A separação cromatográfica baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A separação dos compostos por CG é realizada por meio da vaporização da amostra e inserção da mesma na coluna cromatográfica, onde a eluição é executada por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sua única função é transportar os analitos através da coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG *et al.*, 2013).

A instrumentação em cromatografia gasosa evoluiu continuamente desde a introdução dos primeiros sistemas comerciais. Os componentes básicos de um sistema de cromatografia gasosa incluem gás de arraste (fase móvel), sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, forno para controle de temperatura da coluna e o sistema de detecção, a Figura 4 ilustra de forma esquemática os componentes básicos do cromatógrafo gasoso (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; MCNAIR; MILLER, 2009).

A cromatografia pode ser combinada com técnicas instrumentais de análise, tais como a espectrofotometria (UV-Vis) ou a espectrometria de massas (EM) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). Contudo, a viabilidade do acoplamento está condicionada a

necessidade de que as particularidades de cada instrumento não sejam comprometidas pela sua conexão (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas, com isso a técnica cromatográfica acoplada à espectrometria de massas foi amplamente difundida (ARDREY, 2003; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Figura 4 - Representação esquemática dos componentes do sistema cromatográfico acoplado a espectrometria de massas (CG-EM).



Fonte: CHROMacademy (2014).

O emprego da cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas mostra-se vantajoso uma vez que é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O espectrômetro de massas é o detector mais importante e versátil para análise de traços de compostos orgânicos em misturas complexas, o uso desta técnica para detectar e quantificar picos provenientes de um cromatógrafo a gás já é estabelecido com grande sucesso (LANÇAS, 2009). A espectrometria de massas é baseada na produção de fragmentos provenientes do analito, onde cada fragmento produzido tem uma razão entre sua massa e carga (m/z). O instrumento basicamente é constituído de três partes (Figura 4): fonte de ionização (muitas vezes denominada interface), analisador de massas e detector de íons com aquisição / processamento de dados (LAVAGNINI *et al.*, 2006; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Dentre os métodos de ionização mais empregados em CG-EM tem-se a ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ). A CG-EM é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas relativamente elevadas que são empregadas durante o processo de separação cromatográfica. Estes requisitos são semelhantes àqueles necessários para que os compostos sejam ionizados por meio de IE e IQ (ARDREY, 2003; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LAVAGNINI *et al.*, 2006; MCNAIR; MILLER, 2009).

3.5 Validação de métodos cromatográficos

Segundo Lanças (2009), validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa atenuar os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Desse modo, a fim de garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, faz-se necessário uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2009).

A validação de um procedimento analítico tem a finalidade de comprovar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de validação avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Visa ainda garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes

rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões. (MAPA, 2011).

A validação metodológica deve ser conduzida de maneira a evidenciar e garantir que o método é adequado ao objetivo desejado. A validação metodológica é um requisito dos órgãos de acreditação, e deve ser subsidiada e melhorada através de processos de verificação do desempenho de método. Um processo de validação definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2010). Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos, o que aumenta o custo das análises (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os parâmetros analíticos normalmente determinados na validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Estes termos são designados como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2009; EUROPEAN COMMISSION, 2010; MAPA, 2011; INMETRO, 2011).

3.5.1 Seletividade

Normalmente, a seletividade é o primeiro parâmetro de validação estudado, constituindo-se como um dos principais parâmetros que caracterizam e descrevem um método de análise principalmente em análise de traços, dado que se a mesma não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. (RIBANI *et al.*, 2004; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; INMETRO, 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Nos métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. Sendo assim, a utilização de

testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a uma só substância (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011).

3.5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de o procedimento produzir sinais analíticos diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; MAPA, 2011).

A linearidade é avaliada por meio de uma curva de calibração (curva analítica) que pode ser construída pelos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz ou adição de padrão. Recomenda-se que a curva analítica seja formada por no mínimo cinco níveis de concentração (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). A curva analítica descreve matematicamente por meio de uma equação de reta (Equação 1) a correlação entre o sinal analítico medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = sinal analítico (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica pode ser alcançada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação linear (R). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Visando avaliar se o modelo linear é adequado, podem ser executados testes estatísticos a fim de verificar a significância estatística da regressão linear e dos parâmetros a e b (DANZER; CURRIE, 1998; RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. (INMETRO, 2011).

O limite de detecção é estimado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Dentre os meios mais usuais de se estimar o LD tem-se: o método visual, o método relação sinal-ruído e o método baseado nos parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Nos métodos instrumentais, tais como os métodos cromatográficos, o LD pode ser estimado como a concentração do analito que produz um sinal igual ou superior a três vezes a razão sinal / ruído do equipamento. Outra maneira de estimar o LD para os métodos que empregam curva de calibração é por meio do método que se baseia nos parâmetros da curva analítica, onde LD é estimado por intermédio da Equação 2 (ANVISA, 2003; ABNT, 2005; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MAPA, 2011; SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

$$LD = 3. \frac{S_b}{a} \quad (2)$$

Onde:

S_b = desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

a = coeficiente angular da curva analítica;

3.5.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) ou limite de determinação é definido como o menor nível de concentração que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011).

Os mesmos critérios adotados para a estimativa do LD são empregados para estimar o LQ, utilizando a relação à relação sinal / ruído igual ou superior a dez, dessa maneira o LQ é estimado através da Equação 3 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

$$LQ = 10. \frac{S_b}{a} \quad (3)$$

Onde:

S_b = desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

a = coeficiente angular da curva analítica;

O LQ representa um compromisso entre a concentração, à precisão e a exatidão. Por conseguinte, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Para análise

em nível traço, é recomendado adotar o LQ como o nível de concentração mais baixo da curva analítica (INMETRO, 2011).

3.5.5 Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância entre resultados de testes individuais de análises repetidas de uma amostra. Ela está associada com erros aleatórios e é uma estimativa de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, ou seja, tal parâmetro representa a proximidade dos resultados obtidos em torno de um valor médio. (ANVISA, 2003; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; SWARTZ; KRULL, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A maneira mais comum de se expressar numericamente a precisão é por meio do coeficiente de variação (CV), entretanto, também é possível expressar tal parâmetro por meio do desvio padrão (s) e pelo intervalo de confiança da média. Sendo determinados respectivamente pelas Equações 4, 5 e 6 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão das medidas;

\bar{x} = concentração média;

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

Onde:

x_i = valor de cada uma das medidas individuais;

\bar{x} = valor médio das medidas individuais;

n = número de medidas;

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Onde:

\bar{x} = valor médio das medidas individuais;

t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student com n-1 graus de liberdade;

S = estimativa do desvio padrão das medidas;

n = número de medidas;

A precisão pode ser considerada e determinada por meio de três maneiras diferentes: repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade (ANVISA, 2003; MAPA, 2011; INMETRO, 2011; SWARTZ; KRULL, 2012).

3.5.5.1 Repetitividade

A repetitividade também designada de repetibilidade, precisão intra-ensaio ou precisão intracorrída refere-se à capacidade do método de gerar os mesmos resultados ao longo de um curto intervalo de tempo, em condições idênticas denominadas condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento utilizado sob as mesmas

condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011; SWARTZ; KRULL, 2012).

Não se deve confundir repetitividade com precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra (normalmente dez vezes ou mais), seguida pela média dos valores da área ou altura do pico e determinação do coeficiente de variação de todas as injeções (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo a ANVISA, a repetitividade do método deve ser examinada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 replicatas de cada (ANVISA, 2003). O INMETRO sugere que sejam realizadas 7 ou mais determinações para o cálculo da estimativa do desvio padrão (INMETRO, 2011).

3.5.5.2 *Precisão intermediária*

A precisão intermediária (precisão intercorridas) avalia a concordância entre os resultados intralaboratorial, avaliando assim as variações devido a eventos aleatórios que normalmente ocorrem durante o uso de um método, tais como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes e com analistas diferentes para a determinação da precisão intermediária. A validação deste parâmetro visa verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; SWARTZ; KRULL, 2012)

A precisão intermediária fornece uma noção mais geral da precisão em comparação com a repetitividade, dado a possibilidade de variação em um maior número de fatores (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009). Sendo assim, a precisão intermediária é apontada como mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, portanto mais aconselhável de ser adotada como parâmetro de precisão (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.5.3 Reprodutibilidade

O termo reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) define a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise realizada por diferentes analistas em diferentes laboratórios, todavia seguindo a mesma metodologia (RIBEIRO *et al.*, 2008; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos colaborativos entre laboratórios distintos, deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.6 Exatidão

A exatidão às vezes designada de veracidade é um parâmetro de validação que representa o grau de proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado como verdadeiro. É importante salientar que um valor exato ou verdadeiro é um valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Os procedimentos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. A avaliação da exatidão por intermédio da recuperação é o método mais empregado, tal fato é decorrente da dificuldade de obtenção de materiais de referência certificados (MRC), além disso, um segundo método analítico nem sempre está disponível, impossibilitando assim a comparação de métodos (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011; HARRIS, 2012).

3.5.6.1 Recuperação (R)

A recuperação (fator de recuperação) é definida como a proporção da quantidade do analito de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do

material teste, que é extraída e passível de quantificação (RIBANI *et al.*, 2004). A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua exatidão (MAPA, 2011).

Não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra. A recuperação visa corrigir possíveis erros no resultado da análise que são ocasionados por erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como, limpeza (*clean-up*), diluições ou pré-concentração derivatizações, secagens, etc. (MAPA, 2011).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. Quando a recuperação é obtida por meio de fortificações de matriz branca, a porcentagem de recuperação é calculada através da Equação 7 (ANVISA, 2003; ABNT, 2005; INMETRO, 2011; MAPA, 2011).

$$R (\%) = \left(\frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

C_f = concentração do analito medida na amostra fortificada;

C_{nf} = concentração do analito medida na amostra não fortificada (branco da amostra);

C_{ad} = concentração do analito adicionado ao branco da amostra (concentração teórica);

A limitação do procedimento de recuperação é a de que o analito adicionado, não está necessariamente na mesma forma na qual está presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente

detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011; HARRIS, 2012).

3.5.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, desse modo, um método analítico é dito robusto quando o mesmo não é susceptível a pequenas variações (ANVISA, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A estimativa da robustez depende do tipo de metodologia analítica empregada, de modo geral, a robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros tais como: concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação de temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como tempo de extração e agitação. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.*, 2004).

Em cromatografia líquida, a robustez pode ser avaliada variando parâmetros tais como: a proporção de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas modificações estiverem contidas dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis considera-se que o método é robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

4 PARTE EXPERIMENTAL

Todos os experimentos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Análises para Certificação de Produtos do Caju (LABCAJU), localizado na Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC).

4.1 Instrumentação

- Agitador de tubos tipo Vortex Marconi MA-162;
- Balança analítica Denver Instruments company APX 200;
- Bomba de vácuo FANEM® DIAPUMP® 089-CAL;
- Centrífuga FANEM® EXCELSA® II 206BL;
- Chapa aquecedora TECNAL TE-0851;
- Evaporador rotativo Marconi MA-120;
- Estufa de secagem a vácuo TECNAL TE-395;
- Cromatógrafo a gás Thermo Fisher-Scientific acoplado a um detector espectrômetro de massas (CG-EM) Thermo-Fisher-Scientific modelo DSQ II;
- Coluna cromatográfica capilar *OV-5 Bonded*, 5 % fenil 95 % polidimetilsiloxano (*Ohio Valley Specialty Chemical*) com as dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 µm de espessura de filme da fase estacionária;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (LAB MATE e Eppendorf);
- Multiprocessador de alimentos MEGA MASTER PRO WALITA;

4.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- Acetonitrila 99,9 % grau UV/HPLC/Espectroscópico (Vetec);
- Acetato de etila 99,9 % grau UV/HPLC/Espectroscópico (Vetec);
- Ciclohexano 99,5 % grau UV/HPLC/Espectroscópico (Vetec);
- Ácido fórmico 85 % P.A. (Vetec);

- Acetona 99,9 % grau UV/HPLC/Espectroscópico (Vetec);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 μm (Supelcoclean Bonded Silica Supelco);
- Carvão (Supelcoclean ENVI-CARB 120/400 Supelco);
- Citrato de sódio tribásico 99 % P.A. (Vetec);
- Cloreto de sódio 99 % P.A. (Vetec);
- Detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5) (Vetec);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 e 40 mL;
- Gás hélio 99,999 % (White Martins, Brasil);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado 99 % P.A. (SIGMA-Aldrich);
- Padrões analíticos dos agrotóxicos;
- Sulfato de magnésio anidro 98 % P.A. (Vetec);
- Tubos para centrifuga, tipo Falcon, capacidade 50 mL, fundo cônico, em plástico polipropileno;

4.2.1 Agrotóxicos selecionados para o estudo

Os agrotóxicos selecionados para os estudos, foram de diferentes classes químicas, polaridades, classes toxicológicas e fornecedores. Os mesmos foram escolhidos baseados no uso na produção agrícola (Tabela 6). No Anexo A, podem ser observadas às estruturas dos agrotóxicos estudados bem como algumas outras características relevantes.

Tabela 6 - Descrição dos padrões analíticos dos agrotóxicos, com suas respectivas purezas, fornecedores, classes, pK_a e K_{ow} (constante de partição octanol-água). (*Continua*).

Agrotóxico	Pureza (%)	Fornecedor	Classe toxicológica	pK _a	K _{ow}
Alacloro	99,2	Fluka Analytical	III	0,62	3,09

Tabela 6 - Descrição dos padrões analíticos dos agrotóxicos, com suas respectivas purezas, fornecedores, classes, pK_a e K_{ow} (constante de partição octanol-água). (Continua).

Agrotóxico	Pureza (%)	Fornecedor	Classe toxicológica	pK_a	K_{ow}
Ametrina	98,5	Fluka Analytical	III	10,07	2,63
Bifentrina	99,1	Riedel-de Haën	II	-	6,60
Cis-clordano	99,7	AccuStandard	II	-	2,78
Trans-clordano	99,3	AccuStandard	II	-	2,78
Clorobenzilato	100	AccuStandard	III	-	4,58
Cloroneb	100	AccuStandard	IV	-	3,58
Clorotalonil	98,9	AccuStandard	II	-	2,94
Clorpirifós	100	AccuStandard	II	-	4,70
Clortal-dimetílico (DCPA)	100	AccuStandard	IV	-	4,28
Esfenvalerato	97,0	Fluka Analytical	II	-	6,24
Etridiazol	98,6	AccuStandard	III	2,77	3,37
Fenarimol	99,8	Riedel-de Haën	III	-	3,69
Fenpropatrina	99,0	Dr. Ehrenstorfen GmbH	II	-	6,04
Fentiona	98,0	Riedel-de Haën	II	-	4,84
Hexaclorobenzeno	100	AccuStandard	IV	-	3,93
Parationa-metílica	99,8	Fluka Analytical	I	-	3,00

Tabela 6 - Descrição dos padrões analíticos dos agrotóxicos, com suas respectivas purezas, fornecedores, classes, pK_a e K_{ow} (constante de partição octanol-água). (*Conclusão*).

Agrotóxico	Pureza (%)	Fornecedor	Classe toxicológica	pK_a	K_{ow}
Cis-permetrina	71,7	AccuStandard	II	-	6,10
Trans-permetrina	26,4	AccuStandard	II	-	6,10
Propacloro	99,8	AccuStandard	III	-	1,60
Trifloxistrobina	99,0	Dr. Ehrenstorfen GmbH	III	-	4,50
Triflumizol	98,0	Dr. Ehrenstorfen GmbH	III	3,70	4,77
Trifluralina	98,5	AccuStandard	III	-	5,27

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Limpeza dos materiais de trabalho

Todo o material empregado nos experimentos, tais como: *vials*, balões volumétricos, pipetas, béqueres, espátulas dentre outros, foram submetidos a um procedimento de purificação, tal como descrito a seguir:

4.3.1 Procedimento para limpeza dos Vials

Os vials e as tampas foram lavados com água e detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5), em seguida, lavou-se duas vezes com água destilada. Todos os *vials* foram transferidos para um béquer de 500 mL, onde foi adicionada água deionizada purificada em um sistema Milli-Q suficiente para imergi-los. O béquer contendo os *vials* foi aquecido em chapa aquecedora até fervura (100 C°), mantendo-se por 10 minutos, essa etapa foi reproduzida por três vezes. Separou-se os frascos e as

tampas, em seguida, os vials foram levados à estufa e mantidos a 150 °C por 30 minutos.

Posteriormente, após o arrefecimento o processo de limpeza foi concluído utilizando a acetona grau cromatográfico, onde a mesma foi adicionada nos frascos e nas tampas individualmente, esse procedimento foi repetido por duas vezes.

4.3.2 Procedimento para limpeza de vidrarias

As vidrarias foram lavadas duas vezes com detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5), em seguida, duas vezes com água destilada e duas vezes com água deionizada purificada em sistema Milli-Q.

O procedimento de secagem adotado para as vidrarias volumétricas (pipetas, balões volumétricos, provetas etc.), foi à secagem lenta, onde as mesmas foram mantidas expostas ao ar. As vidrarias não volumétricas (béqueres, funis de vidro etc.) foram secas em estufa mantida a 150 °C por 30 minutos. Por fim, adicionou-se acetona grau cromatográfico nas vidrarias lavando as paredes, repetindo-se tal procedimento por duas vezes.

4.4 Preparo das soluções analíticas

Inicialmente visando à obtenção de soluções analíticas estoque dos agrotóxicos na concentração 1000 mg L⁻¹, foram preparados individualmente 10 mL de solução analítica de cada agrotóxico, considerando a pureza dos padrões sólidos (Tabela 6). A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em ciclo hexano / acetato de etila (1:1, v/v) e as soluções estoque foram armazenadas em frascos com tampa rosqueada a temperatura inferior a -4 °C.

A partir das soluções padrão 1000 mg L⁻¹ dos agrotóxicos, preparou-se por meio de diluição, uma mistura de 10 mL de solução estoque mista de todos os agrotóxicos, de modo que a concentração de cada analito em solução era 10 mg L⁻¹. De posse da solução estoque mista 10 mg L⁻¹, preparou-se uma mistura

intermediária dos agrotóxicos de concentração 1 mg L^{-1} . Essa mistura intermediária foi utilizada para a confecção das soluções de trabalho que compõem a curva de analítica.

4.5 Condições cromatográficas

Nas análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um detector espectrômetro de massas (Figura 5). Foi utilizada uma coluna cromatográfica capilar *OV-5 Bonded*, 5 % fenil 95 % polidimetilsiloxano (*Ohio Valley Specialty Chemical*) com as dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 μm de espessura de filme da fase estacionária. As injeções foram executadas injetando-se 1,0 μL da amostra, com temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$ operando no modo *splitless* (sem divisão de fluxo, válvula permaneceu fechada por um minuto), sendo utilizado gás hélio como gás de arraste (fase móvel) com vazão de 1,0 mL min^{-1} .

Figura 5 - Sistema cromatográfico utilizado.

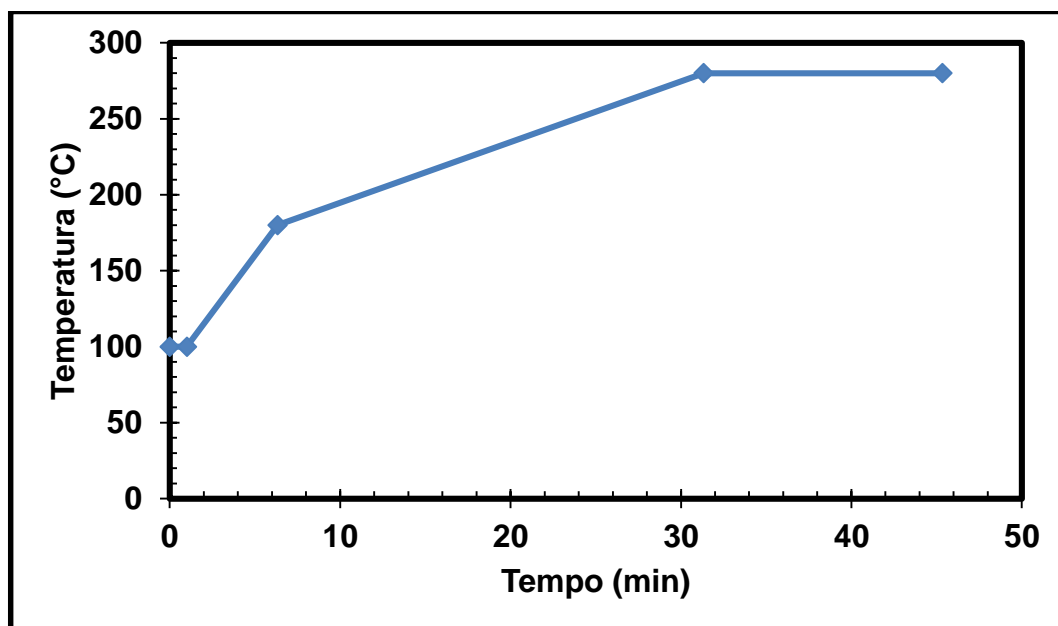


Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises cromatográficas foram executadas empregando-se o seguinte programa de temperatura: temperatura inicial de 100 $^{\circ}\text{C}$ permanecendo por 1,0 min,

seguinto com aquecimento de $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em seguida com aquecimento de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 14 min (Figura 6).

Figura 6 - Programação de temperatura empregada no método cromatográfico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectrômetro de massas foi programado para executar o monitoramento dos fragmentos dos agrotóxicos no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), monitoramento por íon selecionado com ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, utilizando quadrupolo linear como analisador de massas. A temperatura da linha de transferência foi de $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ e da fonte de íons foi de $270\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6 Preparo da amostra para análise e para os estudos de validação do método

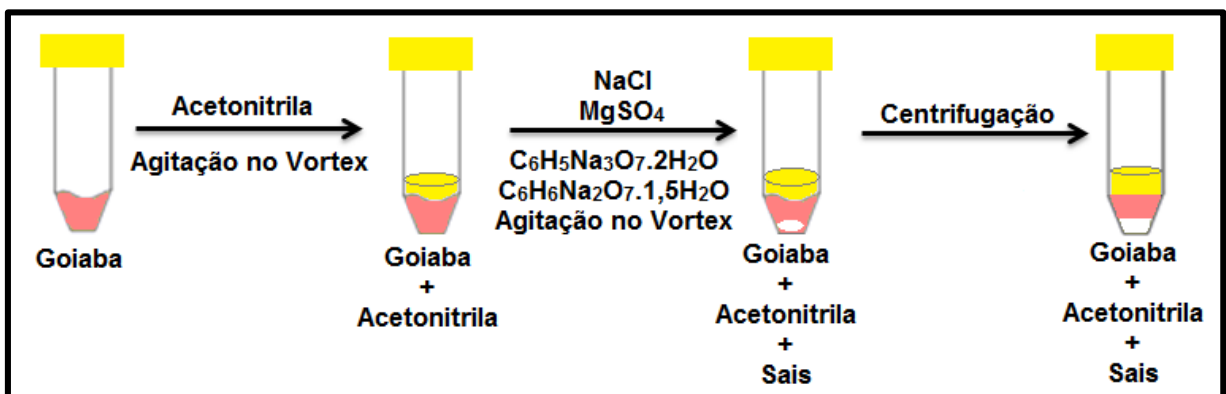
Foram adquiridas em meados de fevereiro (2013 e 2014) dez unidades de goiaba orgânica, provenientes da cidade de Tabuleiro do Norte, oriundas de plantações nas quais não se faz uso de agrotóxicos. As amostras foram conduzidas ao laboratório para execução do preparo prévio para os estudos de validação.

O fruto *in natura* foi fracionado e em seguida integralmente processado em um multiprocessador de alimentos doméstico. A amostra foi armazenada em frascos de vidro previamente limpos de acordo com a subseção 3.3.1 e mantida em freezer a temperatura de -4 °C até realização dos experimentos.

4.6.1 Obtenção do extrato da matriz

Os extratos foram obtidos por meio do método QuEChERS modificado, onde foram adicionados 10,0 g de goiaba processada em tubo Falcon e em seguida adicionados 10,0 mL de acetonitrila (grau HPLC) seguida de agitação por 1 min em agitador Vortex. Após agitação foram adicionados 4,0 g de sulfato de magnésio anidro; 1,0 g de cloreto de sódio; 1,0 g de citrato de sódio tribásico e 0,5 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado seguido de agitação manual do tubo para evitar formação de nódulos. Posteriormente a agitação manual, foi promovida agitação por 1 min em agitador do tipo Vortex seguida de centrifugação por 10 min a 3000 rpm. Na Figura 7 tem-se a ilustração da etapa inicial de extração com acetonitrila e a partição com os sais.

Figura 7 - Etapa de extração com acetonitrila e adição de sais.

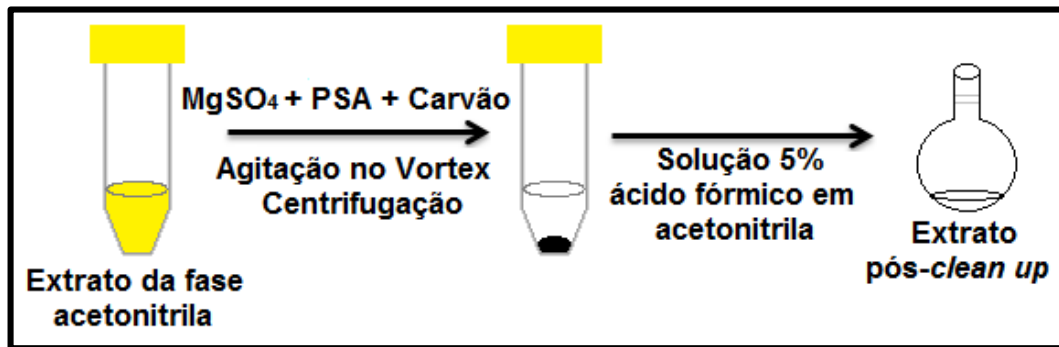


Fonte: Elaborada pelo autor.

Retirou-se uma alíquota de 4,0 mL da fase líquida de acetonitrila para a realização da etapa de limpeza. Na etapa de limpeza por extração em fase sólida

dispersiva (D-SPE), foram adicionados 600 mg de sulfato de magnésio, 100 mg do sorvente PSA, 30 mg de carvão, e em seguida executada agitação por 1 min, em agitador do tipo Vortex, seguido de centrifugação por 10 minutos. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 3,0 mL e transferida para balão esmerilhado de fundo redondo, também foi adicionado ao balão 10 μ L de solução 5 % ácido fórmico em acetonitrila. A Figura 8 ilustra o procedimento de limpeza (*Clean-up*) do extrato da matriz.

Figura 8 - Etapa de limpeza do extrato da matriz.

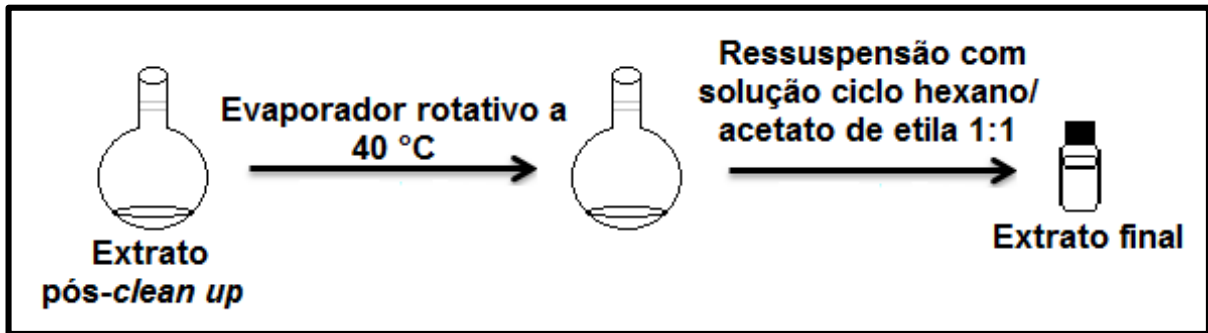


Fonte: Elaborada pelo autor.

A mistura extrato *pós-clean up* juntamente com mais 10 μ L de solução 5 % ácido fórmico em acetonitrila foi transferida ao balão esmerilhado de fundo redondo, e em seguida, levada ao evaporador rotativo a 40 °C para a eliminação da acetonitrila oriunda da extração. Posteriormente a etapa de evaporação, foi realizada a ressuspensão do extrato com 3,0 mL de solução ciclo hexano / acetato de etila (1:1, v/v). O extrato final foi armazenado em *vial* (2 mL). A Figura 9 ilustra o procedimento de evaporação e ressuspensão do extrato da matriz.

Esse procedimento foi executado seguidas vezes até a obtenção de um volume de extrato suficiente para a preparação das soluções padrão das curvas analíticas, além disso, tal procedimento também foi executado no preparo das amostras analisadas.

Figura 9 - Etapa de rotaevaporação e ressuspensão do extrato.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas por meio de padronização externa usando a mistura de solventes (ciclo hexano / acetato de etila (1:1, v/v)) e por padronização externa com superposição de matriz (goiaba) (RIBANI *et. al.*, 2004). Os níveis de concentração que compõem a curva analítica foram preparados a partir da solução mista dos agrotóxicos 1 mg L^{-1} , onde foi preparado soluções padrão nas concentrações: 0,01; 0,03; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50 e $0,70 \text{ mg L}^{-1}$. Cada solução padrão foi injetada três vezes no sistema cromatográfico sob as condições descritas na subseção 4.5.

4.7.1 Preparo das soluções padrão para obtenção das curvas analíticas

As soluções padrão para a construção das curvas analíticas no solvente por padronização externa, foram preparadas a partir da solução mista 1 mg L^{-1} dos agrotóxicos (preparada conforme descrita na subseção 4.4), de modo que retirou-se alíquotas da solução mista e adicionou-se a balões volumétricos de 5 mL aferindo-se com a mistura de solvente ciclo hexano / acetato de etila (1:1, v/v).

Para padronização externa por superposição da matriz, as soluções padrão foram preparadas de modo semelhante, porém, os balões volumétricos foram aferidos com o extrato da matriz isenta de agrotóxicos, extraído pelo método QuEChERS modificado conforme descrito na subseção 4.6.1.

4.8 Validação do método QuEChERS modificado para a determinação de agrotóxicos em goiaba

A metodologia foi validada fazendo uso das figuras de mérito tais como: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. Tais parâmetros são sugeridos para validação de métodos analíticos pelo INMETRO, ANVISA, MAPA e ABNT.

4.8.1 Seletividade

A seletividade do método para os analitos estudados foi avaliada através da análise dos cromatogramas da amostra isenta dos analitos (branco da amostra) e da amostra adicionada dos analitos, sob as mesmas condições cromatográficas. Uma vez obtido os cromatogramas referentes às soluções do branco da amostra e da própria amostra adicionada dos analitos, com o auxílio do detector espectrômetro de massas (EM), foi executada a avaliação da “pureza” dos picos cromatográficos relativos a cada um dos agrotóxicos, avaliando-se também a possível coeluição de componentes da matriz com os analitos de interesse.

4.8.2 Linearidade

A linearidade das curvas analíticas construídas no solvente e no extrato da matriz goiaba foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (R) proveniente da análise de regressão linear. Visando avaliar a qualidade e conseqüentemente a validade da equação de regressão linear, fez-se a Análise de Variância (ANOVA). Além disso, aplicou-se o teste t de Student visando avaliar a significância estatística dos coeficientes angular e linear da equação da reta obtida.

4.8.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

A fim de comprovar a significância das curvas analíticas, comparou-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (calculado mediante uso da Equação 8), com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado, no nível de confiança de 95 % (PIMENTEL; NETO, 1996; DANZER; CURRIE, 1998; CHUI *et al.*, 2001; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

$$F = \frac{MQ_{Regr}}{MQ_{Resid}} \quad (8)$$

Onde:

MQ_{Regr} = Média dos quadrados da regressão;

MQ_{Resid} = Média dos quadrados do resíduo;

A comparação é realizada baseada em duas hipóteses: $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$ e $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$.

- Se $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$, se aceita no nível de confiança estabelecido, que $a \neq 0$, sendo assim a inclinação da reta da regressão não é nula, nesse caso a regressão é significativa.
- Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, não há indicação de existência de relação linear entre as variáveis x e y , nesse caso não tem sentido utilizar a regressão.

4.8.2.2 Teste de Significância dos parâmetros de calibração

A avaliação da significância dos parâmetros estatísticos (coeficiente angular (a) e linear (b)) nas curvas analíticas foi realizada mediante uso do teste t de Student. De modo que para que o parâmetro seja estatisticamente significativo, a razão entre o valor do parâmetro e o desvio (Equações 9 e 10) deve ser maior que o

valor tabelado para o t de Student (DANZER; CURRIE, 1998; NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002; LIGIERO *et al.*, 2009).

$$t_{calculado} = \frac{a}{S_a} \quad (9)$$

$$t_{calculado} = \frac{b}{S_b} \quad (10)$$

Onde:

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

S_a = desvio do coeficiente angular;

S_b = desvio do coeficiente linear;

4.8.3 Limite de detecção (LD)

Os limites de detecção foram estimados para cada agrotóxico, através do “Método da relação sinal-ruído”, de modo que foram injetados no sistema cromatográfico soluções analíticas mistas dos agrotóxicos em concentrações decrescentes até a ocorrência da relação sinal / ruído aproximadamente igual a 3. Esta relação sinal / ruído foi calculada pelo *software* do equipamento (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ABNT, 2005).

4.8.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi estimado para cada agrotóxico, de modo análogo à estimativa do LD, distinguindo-se apenas na relação sinal / ruído. Desse

modo, a determinação de tal parâmetro ocorreu mediante a leitura da solução analítica de menor concentração que produziu a relação sinal / ruído de aproximadamente 10 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ABNT, 2005).

4.8.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e da precisão intermediária, onde foram expressas através do coeficiente de Variação (CV, %) (Equação 4). Os procedimentos empregados para a avaliação da precisão são descritos nas subseções a seguir.

4.8.5.1 Repetitividade

A precisão do método, em termos de repetitividade foi executada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Foram realizadas três extrações de cada nível de fortificação (0,05; 0,1 e 0,3 mg kg⁻¹), contemplando o intervalo linear do método, onde cada um dos extratos foi injetado uma vez no sistema cromatográfico sob as condições de repetitividade.

4.8.5.2 Precisão intermediária

Os estudos de precisão intermediária foram conduzidos de modo semelhante aos estudos de repetitividade, contudo, as análises foram conduzidas em dias diferentes e com diferentes analistas.

4.8.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em função dos ensaios de recuperação, os ensaios foram conduzidos conforme as recomendações da ANVISA e do MAPA (ANVISA, 2003; MAPA, 2011). Os ensaios de recuperação foram

conduzidos por meio de fortificação de 10 g de amostra de goiaba processada (isenta de agrotóxicos) em três níveis de fortificação (0,05; 0,1 e 0,3 mg kg⁻¹), de modo que cada nível de fortificação foi extraído em triplicata. Após o procedimento de fortificação das amostras, as mesmas foram agitadas por 1 minuto em agitador tipo Vortex, a fim de garantir a homogeneização das amostras. Posteriormente, as amostras fortificadas foram preparadas conforme o método QuEChERS, descrito na subseção 4.6.1.

4.9 Avaliação do Efeito Matriz

A avaliação da possível existência de efeito matriz causado pelo extrato de goiaba nas análises por GC-EM foi executada mediante comparações entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz. O cálculo da magnitude do efeito matriz foi executado por meio da Equação 11 (MARTINS, 2010; ORSO, 2011; SALVIA; CREN-OLIVÉ; VULLIET, 2013):

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz;

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente;

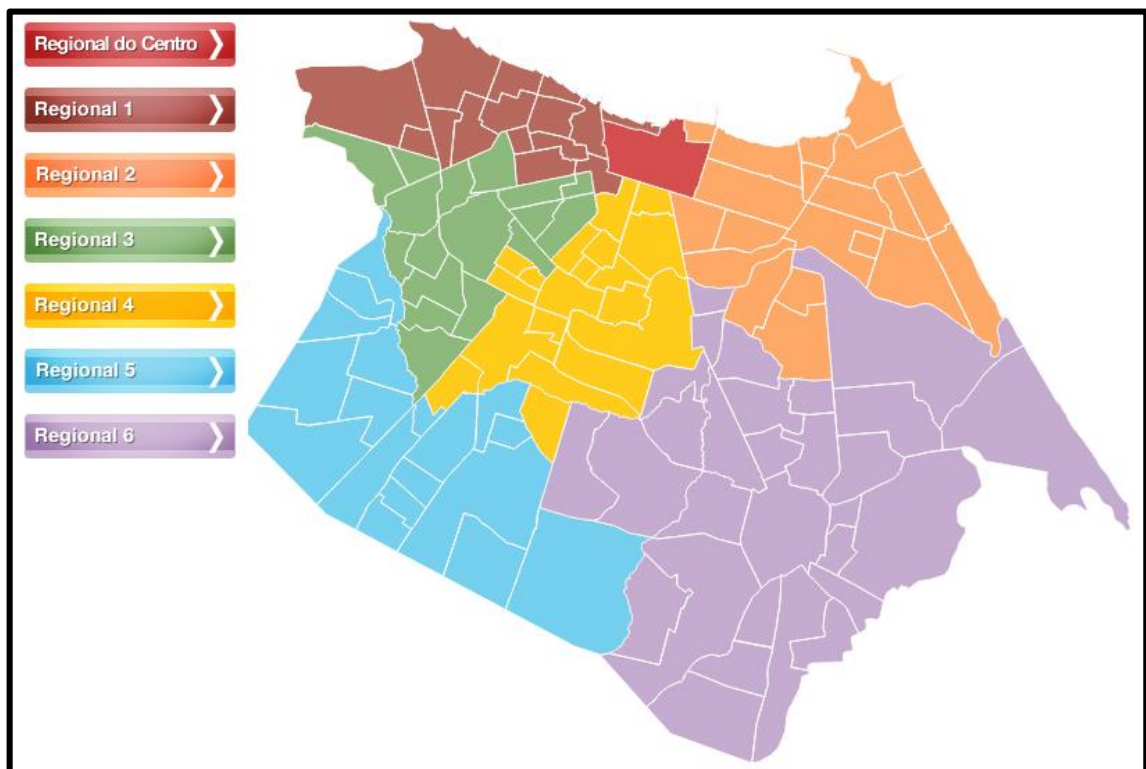
4.10 Análises de amostras de goiaba provenientes da cidade de Fortaleza

Uma vez que o método foi desenvolvido e validado, o mesmo foi aplicado para análise e determinação de resíduos de agrotóxicos em 8 amostras de goiaba

comercializadas na cidade de Fortaleza-CE. As amostras analisadas foram provenientes de 8 bairros distintos da cidade, de modo à contemplar diferentes Regionais que integram a cidade (Figura 10).

As amostras foram preparadas conforme o método QuEChERS modificado, descrito na subseção 4.6.1 e os agrotóxicos foram identificados e quantificados conforme o método cromatográfico descrito na subseção 4.5. As análises de cada amostra foram executadas em triplicata para posterior tratamento estatístico dos resultados.

Figura 10 - Mapa das Regionais da cidade de Fortaleza-CE



Fonte: Prefeitura de Fortaleza (2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

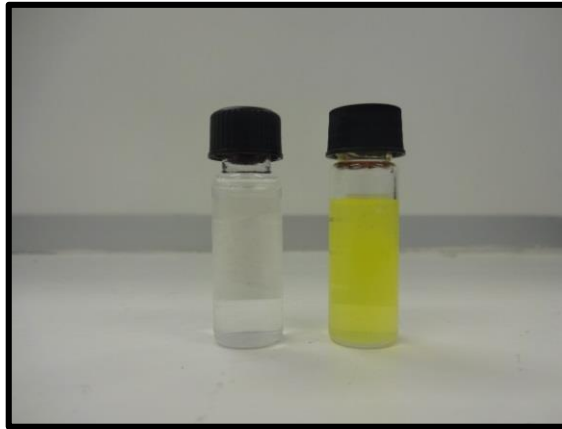
5.1 Método QuEChERS modificado

Na obtenção do extrato da amostra foi empregado acetonitrila como solvente extrator, em virtude do seu maior poder de extração de agrotóxicos de diferentes polaridades, sendo assim, não se faz necessário à adição de solventes apolares, sendo mantida a proporção amostra / solvente, ou seja, a relação é mantida em 10 g de amostra para 10 g de solvente. Além disso, o uso da acetonitrila como solvente proporciona a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos (ceras, gorduras e pigmentos) oriundos da amostra, todavia, ainda assim são extraídos co-extrativos provenientes da matriz da amostra (LEHOTAY *et al.*, 2001; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

Deste modo, a etapa de limpeza da amostra é essencial, nessa etapa o uso do PSA é muito oportuno, haja vista a sua capacidade de remoção de possíveis interferentes oriundos da matriz tais como ácidos graxos e alguns outros compostos polares. Contudo, o solvente é pouco eficiente na remoção de pigmentos. (PRESTES *et al.*, 2009), sabendo que a goiaba possui em sua composição altos teores de pigmentos que lhe conferem cor, tais como, clorofila, carotenoides, polifenóis e licopeno (KONG *et al.*, 2010; NIMISHA *et al.*, 2013).

Sendo assim, uma etapa adicional ao procedimento de limpeza foi acrescentada ao método QuEChERS, essa modificação no método é decorrente da adição de uma pequena quantidade de carvão ativo (30 mg) na etapa de limpeza, onde a adição do carvão proporciona uma remoção adicional de co-extrativos (pigmentos) presentes no extrato da goiaba (CABRERA *et al.*, 2012). Uma vez que a fruta possui altos teores de pigmentos que podem vir a interferir na resposta cromatográfica, a redução dos possíveis interferentes é evidenciada pela mudança de coloração do extrato da amostra, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Extratos obtidos pelo método QuEChERS com a adição de carvão ativo na etapa de limpeza (à esquerda) e preparados sem adição de carvão ativo (à direita).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma etapa de limpeza eficiente da amostra acarreta na redução da contaminação do sistema cromatográfico, garantindo assim uma maior vida útil do equipamento (PRESTES *et al.*, 2011). Além disso, a remoção de possíveis interferentes contidos na matriz da amostra corrobora para uma redução do provável efeito matriz causado por componentes provenientes da amostra.

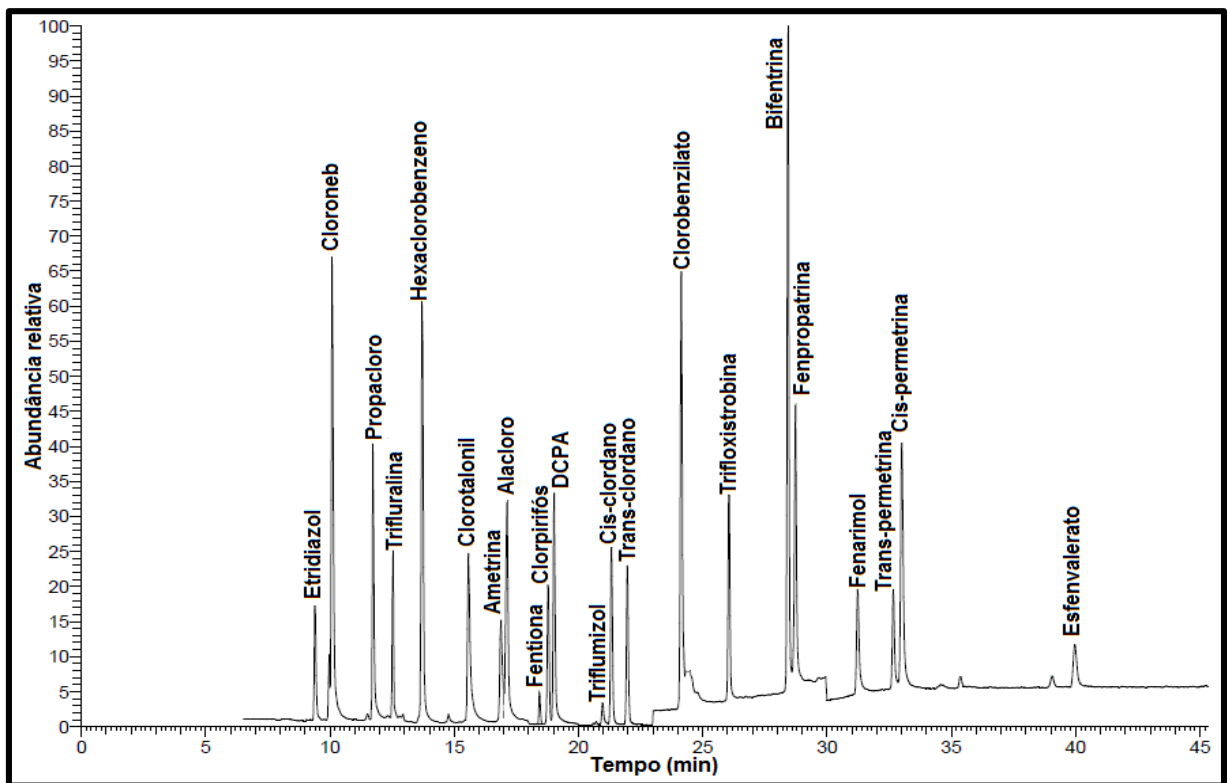
A acetonitrila é o solvente mais indicado para extração de agrotóxicos de diferentes polaridades, sendo, portanto mais adequado para métodos de extração de agrotóxicos multiclassas, entretanto, o solvente apresenta um grande volume de expansão durante o procedimento de vaporização no injetor do cromatógrafo gasoso, dessa forma é gerado uma incompatibilidade da acetonitrila com sistema de injeção do cromatógrafo. Assim sendo, foi necessária a troca de solvente, onde o extrato foi submetido à rotaevaporação seguida de ressuspensão com ciclo hexano / acetato de etila (1:1, v/v) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Segundo Barbosa (2013), a mistura de solventes ciclohexano / acetato de etila (1:1, v/v) empregada para solubilizar o extrato após rotaevaporação da acetonitrila é compatível com o sistema cromatográfico, além disso, contém polaridade adequada para solubilizar bem compostos com diferentes polaridades, devido à característica apolar do ciclohexano e da característica relativamente polar do acetato de etila (BARBOSA, 2013).

5.2 Análise qualitativa dos agrotóxicos por CG-EM

As condições de análise dos agrotóxicos na fruta se mostraram adequadas à determinação e quantificação dos agrotóxicos, uma vez que, a programação de temperatura estabelecida possibilitou a separação conveniente dos compostos em um tempo de corrida de aproximadamente 45 minutos (Figura 12).

Figura 12 - cromatograma da mistura dos padrões analíticos dos agrotóxicos 0,7 mg L⁻¹ em extrato de matriz goiaba.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A utilização do detector de espectrometria de massas operando no modo SIM, com ionização por impacto de elétrons culminou em significativa sensibilidade e seletividade para os agrotóxicos em estudo, visto que o método possibilitou a determinação e quantificação dos analitos em níveis de concentração menores que os LMR's (Limite Máximo de Resíduo) instituídos pela legislação brasileira, como pode ser visto na subseção 5.3 (ANVISA, 2013).

Na Tabela 7, são exibidos os íons monitorados de cada agrotóxico selecionado para a análise por CG-EM no modo SIM, bem como os tempos de retenção (t_R) associados aos mesmos. Os fragmentos de determinação e quantificação dos analitos foram selecionados no processamento do método SIM, onde os fragmentos com maior abundância relativa (*) foram selecionados para a quantificação dos agrotóxicos, visando obter maior sensibilidade do detector aos analitos (BARBOSA, 2013).

Tabela 7 - Fragmentos dos agrotóxicos monitorados no modo SIM, com suas respectivas massas molar e tempos de retenção. (Continua).

Agrotóxico	t_R (min)	Íons (m/z)	Massa molar (g mol⁻¹)
Etridiazol	9,39	183, 185, 211*, 213	247,53
Cloroneb	9,97	191*, 193, 206, 208	207,10
Propacloro	11,73	120*, 169, 176	211,69
Trifluralina	12,54	248, 264, 290, 306*	335,28
Hexaclorobenzeno	13,70	142, 282, 284, 286*	284,80
Clorotalonil	15,60	264, 266*, 267, 268	265,91
Ametrina	17,09	170, 185, 212, 227*	227,12
Alacloro	17,13	146, 160*, 188	269,77
Fentiona	18,75	109, 125, 169, 278*	278,33
Clorpirifós	18,79	197*, 199, 314, 316	350,89
Clortal-dimetílico (DCPA)	19,03	299, 301*, 303, 332	331,96
Triflumizol	20,98	179, 206, 278*, 287	345,75
Cis-clordano	21,34	371, 373*, 375, 377	409,78
Trans-clordano	21,97	371, 373*, 375, 377	409,78

Tabela 7 - Fragmentos dos agrotóxicos monitorados no modo SIM, com suas respectivas massas molar e tempos de retenção. (Conclusão).

Agrotóxico	t_R (min)	Íons (m/z)	Massa molar (g mol⁻¹)
Clorobenzilato	24,16	139*, 141, 251, 253	325,19
Trifloxistrobina	26,07	116*, 131, 145, 222	408,37
Bifentrina	28,44	165*, 166, 181, 182	422,88
Fenpropatrina	28,73	97*, 125, 181, 265	349,42
Fenarimol	31,25	107, 139*, 219, 251	331,20
Trans-permetrina	32,66	163, 164, 165, 183*	391,30
Cis-permetrina	33,01	163, 164, 165, 183*	391,30
Esfenvalerato	40,00	125*, 152, 167, 181	419,90

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Validação do método analítico

Uma vez que é desenvolvido um método analítico, tem-se a necessidade de validar o método, a fim de comprovar a eficácia do método proposto para uso no qual se destina. A validação do método analítico tem por objetivo comprovar que o mesmo é adequado à identificação e quantificação dos agrotóxicos em goiaba, além disso, visa garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes confiabilidade. Desse modo, torna-se indispensável à análise de parâmetros de validação amparados pela análise estatística.

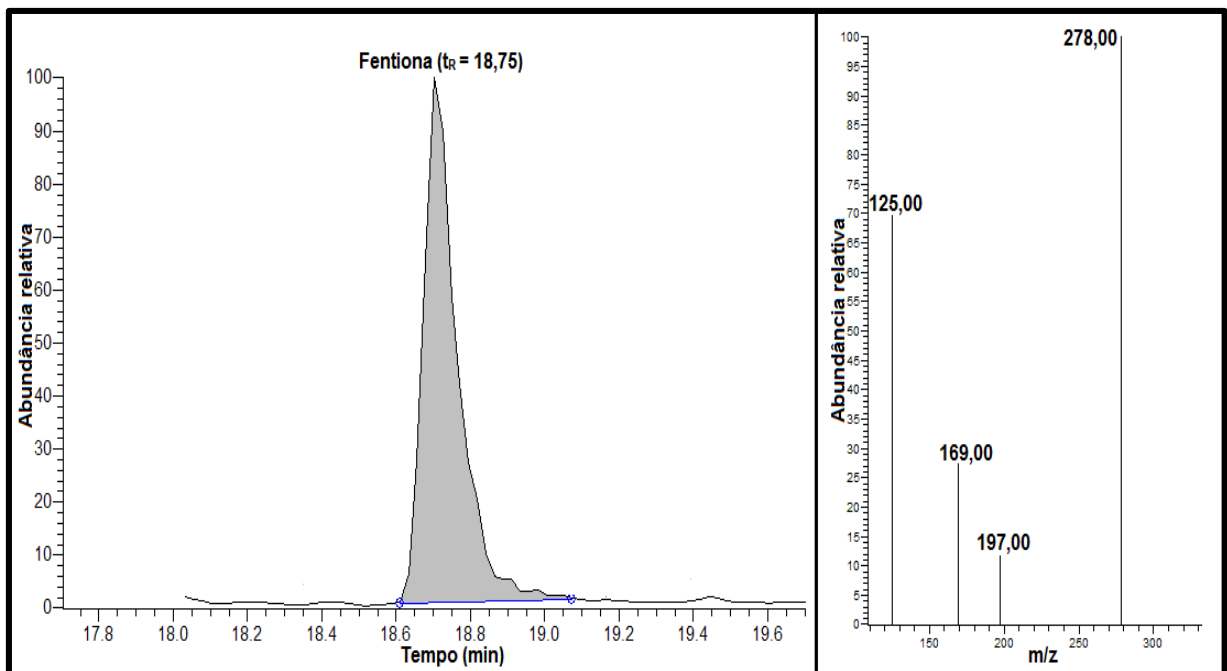
5.3.1 Seletividade

Para a determinação de vários composto em uma matriz complexa, é necessário comprovar a seletividade do método para os analitos de interesse, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição picos

cromatográficos ou coeluição de interferentes com os picos de interesse. Sabendo disso, a Figura 13 exibe o cromatograma da mistura dos padrões dos agrotóxicos na matriz goiaba, pode ser observado que as condições cromatográficas empregadas são apropriadas para a separação dos agrotóxicos, uma vez que os picos provenientes dos agrotóxicos encontram-se bem resolvidos.

A utilização do detector de espectrometria de massas, por meio do modo SIM é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só analito, onde o modo SIM monitora os fragmentos selecionados para cada composto. Dessa maneira, tem-se uma maior seletividade e sensibilidade nas análises dos agrotóxicos, onde a presença do analito na amostra é constatada pela análise do espectro de massas do mesmo. Devido a essa elevada seletividade, os efeitos de possíveis interferentes provenientes de componentes presentes são minimizados. A Figura 13 exemplifica o procedimento de análise do espectro de massa do agrotóxico associado do pico cromatográfico.

Figura 13 - Cromatograma e espectro de massas do agrotóxico fentiona.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2 Validação das curvas analíticas e linearidade

Utiliza-se a análise por regressão linear para avaliar a calibração instrumental e suas incertezas associadas, isso é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada. Os cálculos estatísticos são utilizados com o propósito de aprimorar os julgamentos relacionados à qualidade de medidas experimentais (COSTA *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2013).

De posse dos resultados obtidos neste estudo provenientes das injeções cromatográficas das soluções padrão dos analitos na matriz e no solvente, plotou-se as concentrações conhecidas (x_i), contra as respostas do sistema cromatográfico (y_i). Desse modo, construíram-se curvas de calibração que melhor representa o conjunto de pontos obtidos (x_i, y_i), onde obteve-se mediante o uso do método dos mínimos quadrados a equação que fornece a melhor linha reta entre o conjunto de pontos (x_i, y_i). Por meio do método dos mínimos quadrados, obtêm-se os valores dos parâmetros a (coeficiente angular) e b (coeficiente linear), além disso, calcula-se o coeficiente de correlação linear (R) (CHUI *et al.*, 2001; SKOOG *et al.*, 2013).

O processo de validação da curva de calibração foi iniciado com o parâmetro de linearidade acompanhado da análise estatística da curva, visando garantir a linearidade da curva de calibração. Tal parâmetro é sugerido pelo INMETRO e a ANVISA para a validação de métodos analíticos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Os valores do coeficiente de correlação (R) das curvas analíticas construídas sem superposição de matriz revelou-se adequado para os agrotóxicos estudados (Tabela 8), com exceção dos compostos cloroneb e parationa-metílica, onde não foi obtida correlação linear satisfatória.

Tabela 8 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas sem superposição de matriz. (Continua).

Agrotóxico	Equação ($y = ax + b$)	R	Intervalo linear (mg L⁻¹)
Etridiazol	$y = 241,33x - 4803,41$	0,9952	0,03-0,70
Cloroneb	-	-	-
Propacloro	$y = 1540,57x - 11603,76$	0,9995	0,01-0,70
Trifluralina	$y = 513,72x - 4785,05$	0,9992	0,01-0,70
Hexaclorobenzeno	$y = 1624,22x - 7045,35$	0,9998	0,01-0,70
Clorotalonil	$y = 885,61x - 29936,57$	0,9964	0,01-0,70
Parationa-metílica	-	-	-
Ametrina	$y = 387,28x - 8996,16$	0,9957	0,01-0,50
Alacloro	$y = 573,15x + 1811,97$	0,9960	0,01-0,70
Fentiona	$y = 1016,75x - 28483,40$	0,9959	0,01-0,70
Clorpirifós	$y = 346,87x - 4857,11$	0,9994	0,01-0,70
Clortal-dimetílico (DCPA)	$y = 968,94x - 9753,80$	0,9974	0,01-0,70
Triflumizol	$y = 24,94x + 1131,18$	0,9944	0,01-0,70
Cis-clordano	$y = 655,75x + 2042,75$	0,9988	0,01-0,70
Trans-clordano	$y = 594,57x - 4439,75$	0,9979	0,01-0,70
Clorobenzilato	$y = 532,11x - 9090,58$	0,9984	0,01-0,70
Trifloxistrobina	$y = 405,97x + 2899,56$	0,9951	0,01-0,70

Tabela 8 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas sem superposição de matriz. (*Conclusão*).

Agrotóxico	Equação ($y = ax + b$)	R	Intervalo linear (mg L⁻¹)
Bifentrina	$y = 1920,25x - 14678,45$	0,9969	0,01-0,70
Fenpropatrina	$y = 815,97x - 13330,38$	0,9976	0,01-0,70
Fenarimol	$y = 236,50x - 1681,22$	0,9962	0,01-0,70
Trans-permetrina	$y = 315,01x - 1271,36$	0,9992	0,01-0,70
Cis-permetrina	$y = 902,31x - 12495,78$	0,9982	0,01-0,70
Esfenvalerato	$y = 120,34x - 1905,52$	0,9980	0,20-0,70

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, os valores dos coeficientes de correlação (R) das curvas analíticas construídas por superposição de matriz foram adequados para a maioria dos agrotóxicos, considerando que são maiores que 0,99 (Tabela 9), estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam R igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente. Contudo, o agrotóxico parationa-metílica não apresentou correlação linear adequada, assim como ocorreu na curva construída sem superposição de matriz. Dessa forma, tem-se que o mesmo não foi quantificado.

Tabela 9 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas com superposição de matriz. (*Continua*).

Agrotóxico	Equação ($y = ax + b$)	R	Intervalo linear (mg L⁻¹)
Etridiazol	$y = 437,35x - 2388,4$	0,9991	0,01-0,70

Tabela 9 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas com superposição de matriz. (Continua).

Agrotóxico	Equação ($y = ax + b$)	R	Intervalo linear (mg L⁻¹)
Cloroneb	$y = 2125,44x + 30295,19$	0,9953	0,01-0,70
Propacloro	$y = 2346,16x - 20922$	0,9993	0,01-0,70
Trifluralina	$y = 689,31x - 2562,4$	0,9995	0,01-0,70
Hexaclorobenzeno	$y = 1585,91x - 978,86$	0,9993	0,01-0,70
Clorotalonil	$y = 1142,09x + 13414$	0,9980	0,01-0,70
Parationa-metílica	-	-	-
Ametrina	$y = 375,03x + 1481,4$	0,9988	0,01-0,70
Alacloro	$y = 821,61x + 6267,7$	0,9989	0,01-0,70
Fentiona	$y = 54,97x + 1048,5$	0,9957	0,01-0,70
Clorpirifós	$y = 457,71x + 223,87$	0,9986	0,01-0,70
Clortal-dimetílico (DCPA)	$y = 1632,46x - 4314,3$	0,9964	0,01-0,70
Triflumizol	$y = 63,12x - 500,16$	0,9990	0,01-0,70
Cis-clordano	$y = 1328,30x - 20517$	0,9981	0,01-0,70
Trans-clordano	$y = 1173,55x - 23298$	0,9981	0,01-0,70
Clorobenzilato	$y = 1810,11x - 37783$	0,9962	0,01-0,70
Trifloxistrobina	$y = 1039,69x - 26594$	0,9969	0,01-0,70
Bifentrina	$y = 3391,42x - 68280$	0,9956	0,01-0,70

Tabela 9 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos construídas com superposição de matriz. (Conclusão).

Agrotóxico	Equação ($y = ax + b$)	R	Intervalo linear (mg L⁻¹)
Fenpropratrina	$y = 1265,09x + 25395$	0,9950	0,01-0,70
Fenarimol	$y = 621,10x - 11213$	0,9973	0,01-0,70
Trans-permetrina	$y = 785,36x - 10389$	0,9986	0,01-0,70
Cis-permetrina	$y = 1892,22x - 25793$	0,9991	0,01-0,70
Esfenvalerato	$y = 348,28x - 3956$	0,9990	0,03-0,70

Fonte: Elaborada pelo autor.

No que diz respeito à faixa linear, ou seja, intervalo que melhor compreende a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, observa-se que o intervalo linear adequado para boa parte dos agrotóxicos tanto na matriz quanto no solvente está compreendido de 0,01 a 0,70 mg L⁻¹.

O conceito estatístico de R em muitas vezes é mal interpretado e utilizado como critério de aceitação da linearidade da regressão por alguns analistas, quando utilizado em análise química. Ainda que se observem os altos valores de R , ou seja, próximos de um, porém abaixo de 0,99, é possível que a curva de calibração apresente erros determinados. Um valor de R igual a 0,99 (isto é, $R^2 = 0,98$) é obviamente muito alto, porém significa apenas que 98 % da variação total em torno da média foi explicada pelo modelo, logo é possível que os 2 % restantes estejam concentrados em uma única porção da curva, e isso indicaria uma falta de ajuste do modelo. Sendo assim, devem-se verificar a significância da regressão por meio de testes estatísticos de comparação de variâncias, tais como o teste F (PIMENTEL; NETO, 1996; DANZER; CURRIE, 1998; CHUI *et al.*, 2001; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

5.3.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão linear)

Uma regressão significativa é aquela na qual a variação nos valores de y decorrentes da relação linear prevista é grande quando comparada com aquela devido ao erro (resíduos). Dessa maneira, basta comparar os valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$, onde um grande valor de $F_{\text{calculado}}$ indica que a regressão é altamente significativa (PIMENTEL; NETO, 1996; SKOOG *et al.*, 2013).

Sendo assim, a indicação da existência de relação linear entre as variáveis x e y foi altamente significativa para todos os agrotóxicos no solvente e na matriz da amostra, dado o elevado valor de $F_{\text{calculado}}$, com exceção da curva do cloroneb preparada no solvente, na qual não apresentou relação linear (Tabela 10).

Tabela 10 - Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz. (Continua).

Agrotóxico	$F_{\text{calculado}}$		Teste F
	Curva no solvente	Curva na matriz	
Etridiazol	514,45	3355,84	
Cloroneb	-	629,95	
Propacloro	6166,86	4130,50	
Trifluralina	3844,22	5634,21	
Hexaclorobenzeno	18577,90	4603,42	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$
Clorotalonil	546,78	1479,77	
Ametrina	573,44	2003,85	
Alacloro	751,72	2181,33	
Fentiona	480,45	696,25	
Clorpirifós	3970,48	1760,18	

Tabela 10 - Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz. (Conclusão).

Agrotóxico	$F_{\text{calculado}}$		Teste F
	Curva no solvente	Curva na matriz	
Clortal-dimetílico (DCPA)	1135,92	693,39	
Triflumizol	264,96	3001,61	
Cis-clordano	2542,14	1544,13	
Trans-clordano	1436,01	1578,28	
Clorobenzilato	1910,27	791,24	
Trifloxistrobina	609,76	964,53	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$
Bifentrina	968,20	675,64	
Fenpropatrina	1224,73	591,75	
Fenarimol	790,94	1087,32	
Trans-permetrina	3928,47	2104,60	
Cis-permetrina	1632,60	3489,97	
Esfenvalerato	506,39	2442,51	

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração

Idealmente as curvas de calibração deveriam passar pela origem, entretanto, tal fato não foi observado para as curvas analíticas obtidas neste estudo. Desta forma, levou-se em consideração o valor dos desvios referentes a cada parâmetro das equações das retas (coeficientes lineares e angulares) (LIGIERO *et al.*, 2009). Além disso, a importância da realização dos testes estatísticos para os parâmetros das curvas analíticas está relacionada com o fato de que se os testes forem negligenciados, serão feitas estimativas errôneas das concentrações dos

agrotóxicos, dado que os parâmetros associados às equações que representam as curvas analíticas podem não significativos estatisticamente.

Sendo assim, é recomendado realizar o teste t, onde o valor de $t_{\text{calculado}}$ para os parâmetros foi comparado com o valor de $t_{\text{crítico}}$ tabelado, para o nível de confiança de 95 % e o número de graus de liberdade (GL) é dado por $GL = N - 2$, sendo N o número de pontos das curvas. Quando $t_{\text{crítico}}$ é maior do que $t_{\text{calculado}}$ a hipótese de que o desvio é insignificante estatisticamente é aceita, sendo o parâmetro de calibração excluído da equação da curva analítica para o cálculo das concentrações dos analitos (LIGIERO *et al.*, 2009).

Os resultados da análise estatística dos parâmetros das curvas analíticas no solvente (Tabela 11) evidenciam que todos os coeficientes angulares, com exceção do cloroneb são significativos ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$), por outro lado, todos os coeficientes lineares não apresentam significância estatística ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$). Sendo assim, os coeficientes lineares de todas as curvas preparadas no solvente foram desconsiderados em todas as equações, de modo que as equações corrigidas estatisticamente estão exibidas na Tabela 11.

No caso das curvas analíticas preparadas na matriz (Tabela 12), de modo análogo as curvas preparadas no solvente, são observadas que os coeficientes lineares não apresentam significância estatística, haja vista que $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$, ou seja, os coeficientes lineares devem ser desconsiderados das equações, a fim de proporcionar resultados mais confiáveis. Todavia, assim como ocorreu nas curvas preparadas no solvente, com exceção do cloroneb, todos os coeficientes angulares apresentaram significância estatística ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$), sendo, portanto mantidos nas equações que representam as curvas analíticas.

Tabela 11 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada no solvente. (continua).

Agrotóxico	Coeficiente angular				Coeficiente linear				Curva analítica Corrigida
	a	Sa	t _{calculado}	Teste t	b	Sb	t _{calculado}	Teste t	
Etridiazol	241,33	10,64	22,68	t _{cal} > t _{crit}	-4803,41	3779,80	1,27	t _{cal} < t _{crit}	y = 241,33x
Cloroneb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propacloro	1540,57	19,62	78,53	t _{cal} > t _{crit}	-11603,76	6519,41	1,78	t _{cal} < t _{crit}	y = 1540,57x
Trifluralina	513,72	8,29	62,00	t _{cal} > t _{crit}	-4785,05	2753,46	1,74	t _{cal} < t _{crit}	y = 513,72x
Hexaclorobenzeno	1624,22	11,92	136,30	t _{cal} > t _{crit}	-7045,35	3960,09	1,78	t _{cal} < t _{crit}	y = 1624,22x
Clorotalonil	885,61	37,87	23,38	t _{cal} > t _{crit}	-29936,57	14505,36	2,06	t _{cal} < t _{crit}	y = 885,61x
Ametrina	387,28	16,17	23,95	t _{cal} > t _{crit}	-8996,16	3834,43	2,35	t _{cal} < t _{crit}	y = 387,28x
Alacloro	573,15	20,90	27,42	t _{cal} > t _{crit}	1811,97	6946,96	0,26	t _{cal} < t _{crit}	y = 573,15x
Fentiona	1016,75	46,39	21,92	t _{cal} > t _{crit}	-28483,40	11841,45	2,41	t _{cal} < t _{crit}	y = 1016,75x
Clorpirifós	346,87	5,50	63,01	t _{cal} > t _{crit}	-4857,11	1656,03	2,93	t _{cal} < t _{crit}	y = 346,87x
Clortal-dimetílico (DCPA)	968,94	28,75	33,70	t _{cal} > t _{crit}	-9753,80	9553,95	1,02	t _{cal} < t _{crit}	y = 968,94x
Triflumizol	24,94	1,53	16,28	t _{cal} > t _{crit}	1131,18	543,93	2,08	t _{cal} < t _{crit}	y = 24,94x
Cis-clordano	655,75	13,01	50,42	t _{cal} > t _{crit}	2042,75	4322,10	0,47	t _{cal} < t _{crit}	y = 655,75x

Tabela 11 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada no solvente. (conclusão).

Agrotóxico	Coeficiente angular				Coeficiente linear				Curva analítica Corrigida
	a	Sa	t _{calculado}	Teste t	b	Sb	t _{calculado}	Teste t	
Trans-clordano	594,57	15,69	37,89	t _{cal} > t _{crit}	-4439,75	5214,12	0,85	t _{cal} < t _{crit}	y = 594,57x
Clorobenzilato	532,11	12,17	43,71	t _{cal} > t _{crit}	-9090,58	4045,85	2,25	t _{cal} < t _{crit}	y = 532,11x
Trifloxistrobina	405,97	16,44	24,69	t _{cal} > t _{crit}	2899,56	5463,53	0,53	t _{cal} < t _{crit}	y = 405,97x
Bifentrina	1920,25	61,71	31,12	t _{cal} > t _{crit}	-14678,45	20508,46	0,72	t _{cal} < t _{crit}	y = 1920,25x
Fenpropatrina	815,97	23,32	35,00	t _{cal} > t _{crit}	-13330,38	7748,35	1,72	t _{cal} < t _{crit}	y = 815,97x
Fenarimol	236,50	8,41	28,12	t _{cal} > t _{crit}	-1681,22	2794,58	0,60	t _{cal} < t _{crit}	y = 236,50x
Trans-permetrina	315,01	5,03	62,68	t _{cal} > t _{crit}	-1271,36	1670,21	0,76	t _{cal} < t _{crit}	y = 315,01x
Cis-permetrina	902,31	22,33	40,41	t _{cal} > t _{crit}	-12495,78	7421,24	1,68	t _{cal} < t _{crit}	y = 902,31x
Esfenvalerato	120,34	5,35	22,50	t _{cal} > t _{crit}	-1905,52	2494,09	0,76	t _{cal} < t _{crit}	y = 120,34x

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada na matriz da amostra. (Continua).

Agrotóxico	Coeficiente angular				Coeficiente linear				Curva analítica Corrigida
	a	Sa	t _{calculado}	Teste t	b	Sb	t _{calculado}	Teste t	
Etridiazol	437,35	7,55	57,93	t _{cal} > t _{crit}	-2388,35	2508,95	0,95	t _{cal} < t _{crit}	y = 437,35x
Cloroneb	2125,44	84,68	25,10	t _{cal} > t _{crit}	30295,19	28141,93	1,08	t _{cal} < t _{crit}	y = 2125,44x
Propacloro	2346,16	36,51	64,27	t _{cal} > t _{crit}	-20921,56	12131,52	1,72	t _{cal} < t _{crit}	y = 2346,16x
Trifluralina	689,31	9,18	75,06	t _{cal} > t _{crit}	-2562,38	3051,79	0,84	t _{cal} < t _{crit}	y = 689,31x
Hexaclorobenzeno	1585,91	23,37	67,85	t _{cal} > t _{crit}	-978,86	7767,78	0,13	t _{cal} < t _{crit}	y = 1585,91x
Clorotalonil	1142,09	29,69	38,47	t _{cal} > t _{crit}	13414,46	9866,48	1,36	t _{cal} < t _{crit}	y = 1142,09x
Ametrina	375,03	8,38	44,76	t _{cal} > t _{crit}	1481,44	2908,23	0,51	t _{cal} < t _{crit}	y = 375,03x
Alacloro	821,61	17,59	46,70	t _{cal} > t _{crit}	6267,72	6106,56	1,03	t _{cal} < t _{crit}	y = 821,61x
Fentiona	54,97	2,08	26,39	t _{cal} > t _{crit}	1048,50	692,30	1,51	t _{cal} < t _{crit}	y = 54,97x
Clorpirifós	457,71	10,91	41,95	t _{cal} > t _{crit}	223,87	3787,10	0,06	t _{cal} < t _{crit}	y = 457,71x
Clortal-dimetílico (DCPA)	1632,46	61,99	26,33	t _{cal} > t _{crit}	-4314,28	20872,69	0,21	t _{cal} < t _{crit}	y = 1632,46x
Triflumizol	63,12	1,15	54,79	t _{cal} > t _{crit}	-500,16	382,85	1,31	t _{cal} < t _{crit}	y = 63,12x
Cis-clordano	1328,30	33,80	39,30	t _{cal} > t _{crit}	-20517,02	11233,47	1,83	t _{cal} < t _{crit}	y = 1328,30x

Tabela 12 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada na matriz da amostra. (Conclusão).

Agrotóxico	Coeficiente angular				Coeficiente linear				Curva analítica Corrigida
	a	Sa	t _{calculado}	Teste t	B	Sb	t _{calculado}	Teste t	
Trans-clordano	1173,55	29,54	39,73	t _{cal} > t _{crit}	-23297,52	9816,73	2,37	t _{cal} < t _{crit}	y = 1173,55x
Clorobenzilato	1810,11	64,35	28,13	t _{cal} > t _{crit}	-37783,34	21384,95	1,77	t _{cal} < t _{crit}	y = 1810,11x
Trifloxistrobina	1039,69	33,48	31,06	t _{cal} > t _{crit}	-26594,03	11125,09	2,39	t _{cal} < t _{crit}	y = 1039,69x
Bifentrina	3391,42	130,47	25,99	t _{cal} > t _{crit}	-68279,52	43359,34	1,57	t _{cal} < t _{crit}	y = 3391,42x
Fenpropatrina	1265,09	52,01	24,33	t _{cal} > t _{crit}	25395,02	17282,71	1,47	t _{cal} < t _{crit}	y = 1265,09x
Fenarimol	621,10	18,84	32,97	t _{cal} > t _{crit}	-11212,81	6259,50	1,79	t _{cal} < t _{crit}	y = 621,10x
Trans-permetrina	785,36	17,12	45,88	t _{cal} > t _{crit}	-10389,19	5689,12	1,83	t _{cal} < t _{crit}	y = 785,36x
Cis-permetrina	1892,22	32,03	59,08	t _{cal} > t _{crit}	-25793,14	10644,35	2,42	t _{cal} < t _{crit}	y = 1892,22x
Esfenvalerato	348,28	7,05	49,42	t _{cal} > t _{crit}	-3956,04	2503,46	1,58	t _{cal} < t _{crit}	y = 348,28x

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação descritos na Tabela 13 foram estimados pelo método da relação sinal / ruído. O método QuEChERS modificado alcançou baixos valores de limites de detecção (LD = 0,002; 0,003 e 0,010 mg kg⁻¹) e quantificação (LQ = 0,005; 0,010 e 0,030 mg kg⁻¹).

Dos agrotóxicos estudados, apenas a fentiona e a trifloxistrobina, possuem uso permitido para a cultura da goiaba (ANVISA, 2014), para estes compostos o método se mostra viável a quantificação de resíduos de agrotóxicos na matriz goiaba, haja vista que a estimativa dos limites de detecção e quantificação desses compostos são menores que os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para a goiaba.

Os demais agrotóxicos não possuem uso permitido para a goiaba e consequentemente não há LMR's disponíveis na literatura, dado que os mesmos não devem ser utilizados na cultura da referida fruta. Contudo, ao comparar (Tabela 13) os LD's e LQ's dos agrotóxicos não aplicados à cultura da goiaba com os LMR's dos agrotóxicos atribuídos a outras culturas, pode-se concluir que os LD's e LQ's são menores que os LMR's, assim sendo, o método pode ser empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos não permitidos para essa cultura. Além disso, o método QuEChERS modificado, pode ser avaliado e aplicado na determinação de agrotóxicos em outras culturas.

Tabela 13 - Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's. NA = Não autorizado. (Continua).

Agrotóxico	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	LMR (mg kg ⁻¹)	
			Goiaba	Outros alimentos
Etridiazol	0,002	0,005	NA	-
Cloroneb	0,003	0,010	NA	-

Tabela 13 - Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's. NA = Não autorizado. (Continua).

Agrotóxico	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	LMR (mg kg ⁻¹)	
			Goiaba	Outros alimentos
Propacloro	0,003	0,010	NA	-
Trifluralina	0,003	0,010	NA	0,020 (mandioca) 0,050 (pimentão)
Hexaclorobenzeno	0,003	0,010	NA	-
Clorotalonil	0,003	0,010	NA	8,000 (alface) 0,100 (batata)
Ametrina	0,003	0,010	NA	0,020 (abacaxi) 0,070 (banana)
Alacloro	0,003	0,010	NA	0,050 (amendoim) 0,200 (milho)
Fentiona	0,003	0,010	0,050	-
Clorpirifós	0,003	0,010	NA	0,100 (feijão) 0,010 (banana)
Clortal-dimetílico (DCPA)	0,003	0,010	NA	1,000 (cebola) 2,000 (morango)
Triflumizol	0,003	0,010	NA	0,050 (maçã) 0,100 (pepino)
Cis-clordano	0,003	0,010	NA	-
Trans-clordano	0,003	0,010	NA	-
Clorobenzilato	0,002	0,005	NA	-
Trifloxistrobina	0,003	0,010	0,050	-
Bifentrina	0,003	0,010	NA	0,020 (banana) 0,100 (manga)
Fenpropatrina	0,003	0,010	NA	0,200 (tomate) 0,400 (milho)

Tabela 13 - Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's. NA = Não autorizado. (Conclusão).

Agrotóxico	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	LMR (mg kg ⁻¹)	
			Goiaba	Outros alimentos
Fenarimol	0,003	0,010	NA	0,050 (maçã, melancia, uva e melão)
Trans-permetrina	0,003	0,010	NA	0,100 (couve-flor, repolho) 0,050 (uva)
Cis-permetrina	0,003	0,010	NA	
Esfenvalerato	0,010	0,030	NA	0,050 (tomate) 1,000 (milho)

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos da precisão Intermediária e de repetitividade, onde os resultados são expressos por meio do coeficiente de variação (CV, %). De acordo com as orientações da ABNT e da *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General*, na avaliação de métodos cromatográficos, é admitido um valor máximo de CV, %, respectivamente de 23 e 20 % (ABNT, 2005; EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014).

Dessa maneira, é observado que para todos agrotóxicos os valores correspondentes à precisão intermediária e a repetitividade (Tabela 14) estão de acordo com as recomendações propostas pela ABNT e pela *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General*, dado que os valores de CV obtidos para os agrotóxicos na precisão intermediária encontram-se no intervalo de 3,79 a 19,45 %. Na precisão em termos de repetitividade, é verificado que a precisão está dentro do limite recomendado para os três níveis de fortificação, além disso, o coeficiente de variação médio para os três níveis de fortificação (CV_m) também estão em conformidade com as orientações, onde os valores estão situados na faixa de 6,36 a 15,88 %.

Tabela 14 - Precisão do método em termos de precisão intermediária e repetitividade. (Continua).

Agrotóxico	Precisão (CV, %)				
	Precisão Intermediária	Repetitividade			CV _m
		0,05 (mg kg ⁻¹)	0,1 (mg kg ⁻¹)	0,3 (mg kg ⁻¹)	
Etridiazol	5,25	6,88	18,16	10,83	11,96
Cloroneb	10,18	6,96	18,96	5,18	10,37
Propacloro	6,23	6,27	13,33	2,26	7,29
Trifluralina	6,99	9,59	15,34	9,02	11,32
Hexaclorobenzeno	3,79	7,09	14,00	9,67	10,25
Clorotalonil	10,01	11,52	7,35	12,12	10,33
Ametrina	8,24	9,27	15,83	8,18	11,09
Alacloro	7,99	19,80	11,87	12,79	14,82
Fentiona	10,68	6,25	5,78	10,23	7,42
Clorpirifós	9,42	8,38	14,32	5,53	9,41
Clortal-dimetílico (DCPA)	11,31	6,03	15,34	2,43	7,93
Triflumizol	19,45	3,45	13,69	2,05	6,40
Cis-clordano	10,24	16,58	16,52	7,43	13,51
Trans-clordano	9,61	15,38	13,29	5,38	11,35
Clorobenzilato	12,47	11,55	19,13	9,97	13,55
Trifloxistrobina	9,78	13,40	19,41	8,94	13,92
Bifentrina	10,92	11,34	7,02	0,72	6,36
Fenpropatrina	10,95	19,31	10,31	13,07	14,23
Fenarimol	15,14	8,57	12,69	7,61	9,62
Trans-permetrina	12,28	13,61	18,54	7,40	13,18

Tabela 14 - Precisão do método em termos de precisão intermediária e repetitividade. (Conclusão).

Agrotóxico	Precisão (CV, %)				
	Precisão Intermediária	Repetitividade			CV _m
		0,05 (mg kg ⁻¹)	0,1 (mg kg ⁻¹)	0,3 (mg kg ⁻¹)	
Cis-permetrina	12,14	11,76	13,34	7,25	10,78
Esfenvalerato	12,83	17,76	19,55	10,34	15,88

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, onde foi realizada a fortificação em três níveis de concentração (0,05; 0,1 e 0,3 mg kg⁻¹), sendo um nível baixo, um intermediário e um alto. Posteriormente a fortificação, foi executado o método de extração seguida da análise por CG-EM.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados dos percentuais de recuperação dos agrotóxicos em três níveis de fortificação, além disso, pode ser observada a recuperação média (R_m) referente aos três níveis. De modo geral, é observado que o percentual de recuperação entre os níveis de fortificação variou de 73,97 a 222,46 %, quando são considerados os percentuais de recuperação média (R_m) a variação é de 82,80 a 220,81 %. Dentre os critérios estabelecidos pela ANVISA e pela *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General* para validação de métodos analíticos, a porcentagem de recuperação aceita para métodos multirresíduos é de 70 a 120 % (ANVISA, 2007; EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2014).

Desse modo, quando são considerados os percentuais de recuperação média (R_m), é observado que os percentuais para a maioria dos agrotóxicos estão dentro dos limites estabelecidos. Entretanto, para o agrotóxico fentiona (R_m = 220,81 %) o percentual de recuperação é maior que o valor recomendado, contudo, não foi

possível encontrar uma explicação plausível para este valor demasiadamente elevado.

Tabela 15 - Percentuais de recuperação dos agrotóxicos em três níveis de fortificação e R_m associada aos três níveis. (Continua).

Agrotóxico	Recuperação (%)			R_m
	Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)			
	0,05	0,1	0,3	
Etridiazol	94,27	93,06	91,78	93,04
Cloroneb	90,49	96,71	92,09	93,10
Propacloro	104,36	78,94	119,76	101,02
Trifluralina	98,21	81,13	107,37	95,57
Hexaclorobenzeno	89,00	82,30	80,56	83,95
Clorotalonil	96,40	73,97	122,67	97,68
Ametrina	110,32	90,53	89,75	96,87
Alacloro	97,18	94,13	99,38	96,90
Fentiona	221,86	218,12	222,46	220,81
Clorpirifós	93,28	100,54	115,18	103,00
Clortal-dimetílico (DCPA)	93,75	100,46	119,38	104,53
Triflumizol	78,83	102,42	89,10	90,12
Cis-clordano	86,81	81,24	116,99	95,01
Trans-clordano	87,49	123,19	93,96	101,55
Clorobenzilato	105,21	115,62	82,59	101,14
Trifloxistrobina	90,87	86,80	77,74	85,14

Tabela 15 - Percentuais de recuperação dos agrotóxicos em três níveis de fortificação e R_m associada aos três níveis. (Conclusão).

Agrotóxico	Recuperação (%)			R_m
	Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)			
	0,05	0,1	0,3	
Bifentrina	82,45	92,47	80,55	85,16
Fenpropatrina	91,14	86,12	83,99	87,08
Fenarimol	75,24	86,14	90,26	83,88
Trans-permetrina	85,71	84,20	78,50	82,80
Cis-permetrina	83,19	90,76	83,84	85,93
Esfenvalerato	79,11	91,05	87,15	85,77

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Avaliação do Efeito Matriz

Para desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração, visando comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma larga faixa de concentração do analito na matriz. Sabendo disso, foram concebidas curvas analíticas na matriz e no solvente.

Foi verificada influência significativa do efeito de matriz para a maioria dos agrotóxicos (Tabela 16), onde o efeito se pronunciou de forma positiva para boa parte dos compostos, de modo que se os analitos forem quantificados através das curvas analíticas obtidas no solvente, à concentração dos analitos na matriz seria superestimada, dado o efeito positivo da matriz. Todavia, nos agrotóxicos hexaclorobenzeno (-2,36 %), ametrina (-3,16 %) e fentiona (-94,59 %) o efeito se pronuncia de forma negativa, logo, diferentemente do efeito positivo, ocorre uma supressão do sinal analítico, de modo que a quantificação dos analitos por meio das

curvas analíticas preparadas por padronização externa no solvente apresentariam concentrações subestimadas.

Tabela 16 - Efeito matriz (%) dos agrotóxicos estudados.

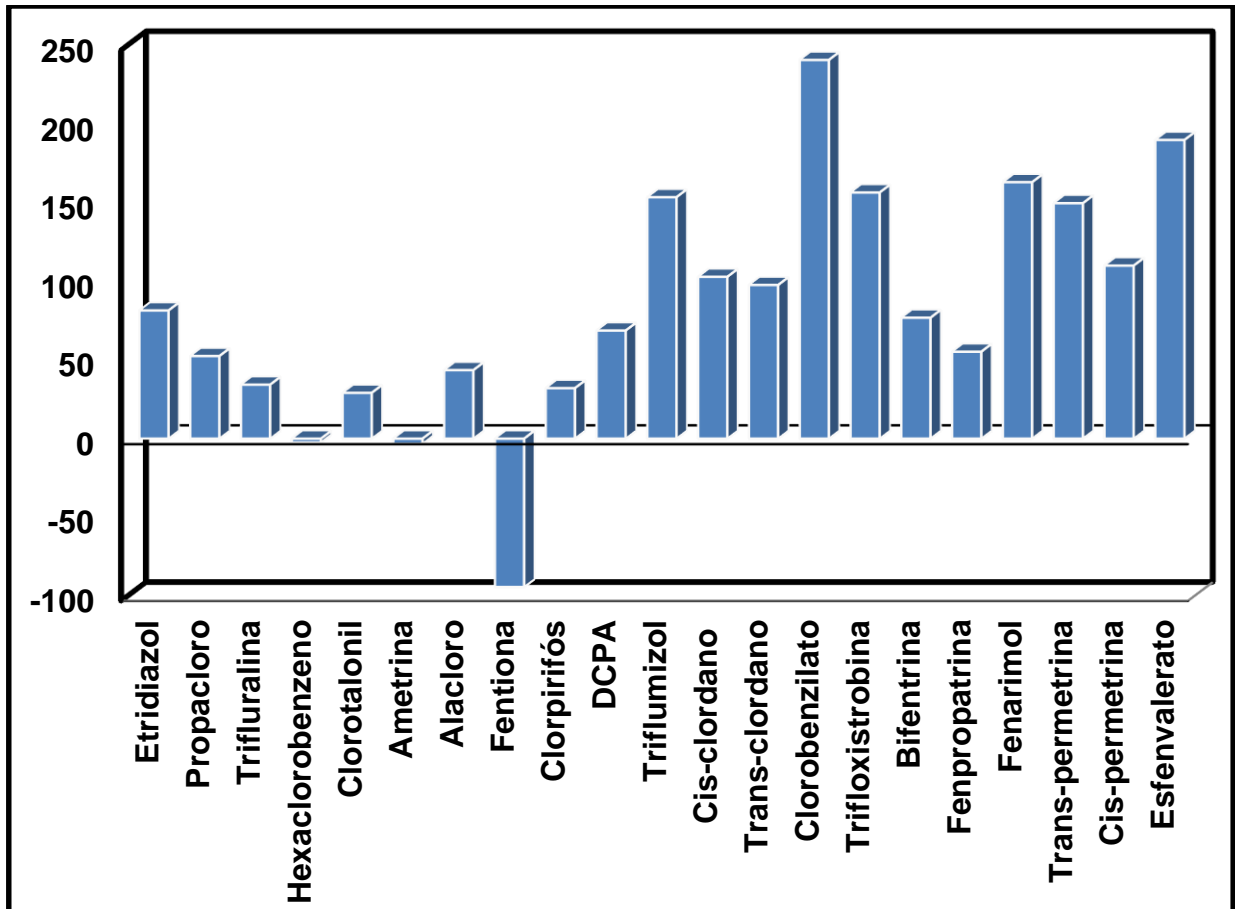
Agrotóxico	Efeito matriz (%)
Etridiazol	81,22
Cloroneb	-
Propacloro	52,29
Trifluralina	34,18
Hexaclorobenzeno	-2,36
Clorotalonil	28,96
Ametrina	-3,16
Alacloro	43,35
Fentiona	-94,59
Clorpirifós	31,95
DCPA	68,48
Triflumizol	153,09
Cis-clordano	102,56
Trans-clordano	97,38
Clorobenzilato	240,18
Trifloxistrobina	156,10
Bifentrina	76,61
Fenpropratrina	55,04
Fenarimol	162,62
Trans-permetrina	149,31
Cis-permetrina	109,71
Esfenvalerato	189,41

Fonte: Elaborada pelo autor.

Particularmente para a cromatografia gasosa, diversos agrotóxicos sofrem com o efeito de matriz. Esse caso é muito evidenciado em matrizes de alimentos, onde a intensidade do efeito de matriz para os agrotóxicos é influenciada pela natureza complexa da amostra e pelos tipos de co-extrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.) presente na amostra. Sendo assim, os componentes endógenos da matriz tem influência direta na quantificação dos agrotóxicos, de maneira que o efeito da matriz é mais significativo em amostras complexas tais como frutas, vegetais, solos, vinhos, sucos, leite, etc (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; YUN, 2005; PINHO *et al.*, 2009; FERNANDES; BARROS; CÂMARA, 2013; SOUSA *et al.*, 2013; BARBOSA, 2013; RESTREPO *et al.*, 2014; ZHANG; ZHANG; JIAO, 2014; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Além disso, co-extrativos como lipídios, alguns pigmentos (clorofila, carotenoides, etc) e outros componentes de massa molar elevada também podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após o procedimento de limpeza da amostra, promovendo assim o efeito de matriz nas análises cromatográficas (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003; PINHO *et al.*, 2009).

O efeito de matriz começa a exercer influência significativa nas análises quando o resultado é maior que 10 % (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001, *apud* ANDRADE, 2009). Logo, o efeito de matriz para os agrotóxicos hexaclorobenzeno e ametrina é considerado insignificante. Sendo assim, com a constatação da presença de efeito de matriz para os demais agrotóxicos, se faz necessária a utilização das curvas preparadas na matriz para a quantificação dos agrotóxicos, evitando assim a quantificação dos analitos de forma equivocada. A Figura 14 ilustra a comparação visual do efeito de matriz observado para os agrotóxicos estudados.

Figura 14 - Comparação visual do percentual do efeito de matriz para os agrotóxicos utilizados no presente estudo.



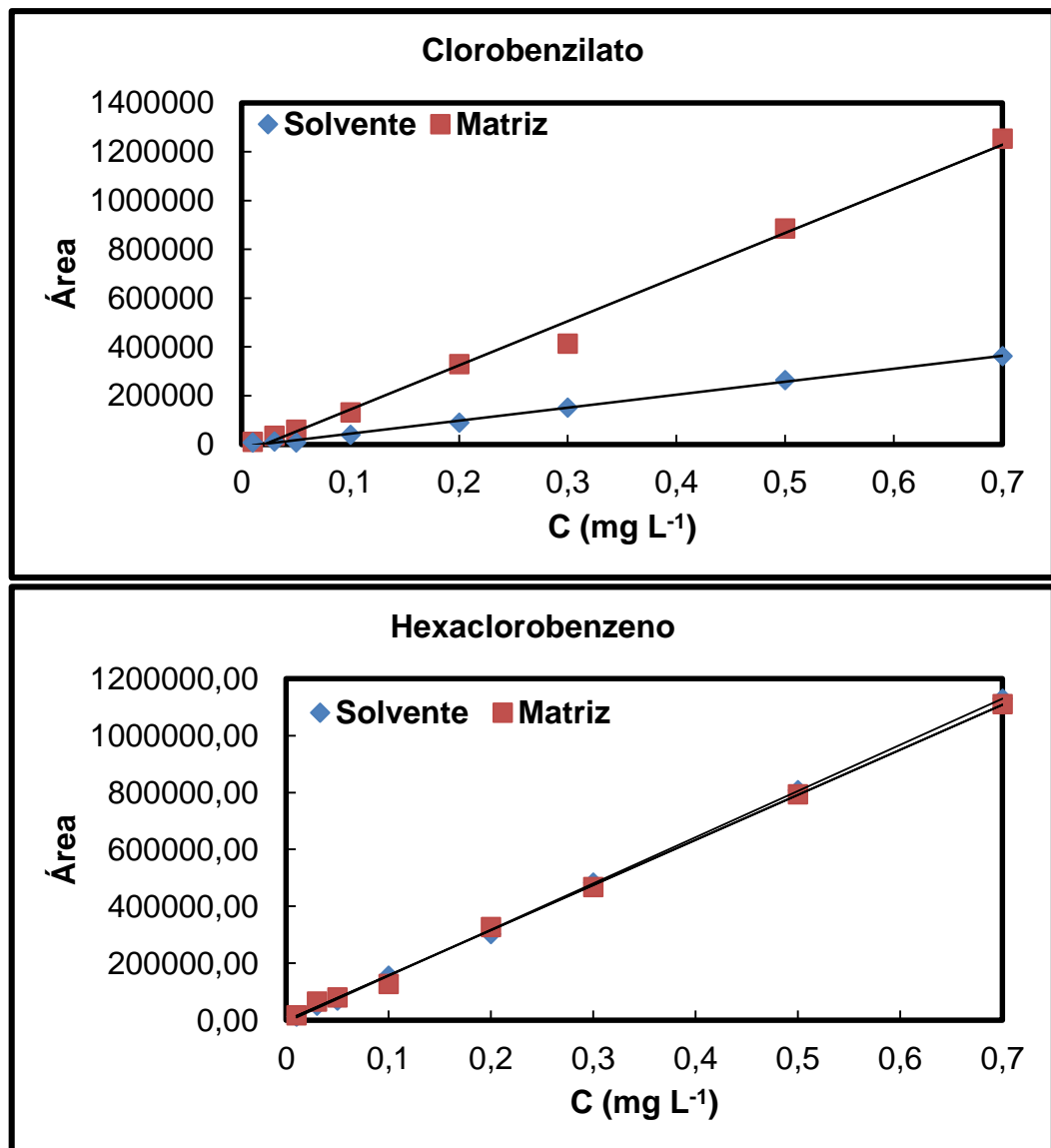
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 15 ilustra a comparação visual das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz, para os agrotóxicos clorobenzilato e hexaclorobenzeno. Esses compostos apresentaram respectivamente o maior e o menor efeito de matriz. As inclinações das curvas do hexaclorobenzeno são muito próximas, sugerindo e confirmando que este agrotóxico não sofre influência significativa da matriz, ou seja, que a presença dos componentes da matriz não interfere significativamente em sua análise cromatográfica, de modo análogo tem-se o agrotóxico ametrina (-3,16 %). Por outro lado, ao observar as inclinações das curvas analíticas do clorobenzilato, verifica-se a elevada diferença de sensibilidade das curvas analíticas, tal fato é ocasionado pelo elevado efeito de matriz sofrido pelo clorobenzilato (240,18 %).

Observando-se os coeficientes angulares “a” das equações das retas obtidas no solvente (Tabela 11) e no extrato da matriz (Tabela 12), verifica-se que

cerca de 86 % dos agrotóxicos apresenta maior sensibilidade para as curvas preparada no extrato da matriz. Tal fato, associados com os resultados do efeito de matriz, sugerem a utilização das curvas analíticas preparadas na matriz para a quantificação dos agrotóxicos.

Figura 15 - Comparação visual entre as inclinações das curvas analíticas preparadas na matriz e no solvente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 Análise das amostras de goiaba da cidade de Fortaleza

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em oito amostras de goiabas (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 e A8) comercializadas em diferentes supermercados, localizados em bairros distintos da cidade de Fortaleza-CE. Dentre as oito amostras analisadas, apenas na amostra A8 os agrotóxicos se apresentam abaixo do limite de detecção do método, ou seja, não são detectados agrotóxicos na amostra (Tabela 17).

Nas amostras A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7, foram detectados agrotóxicos, onde com exceção da trifloxistrobina, todos os agrotóxicos detectados não têm uso autorizado para a cultura da goiaba. Desse modo, não há um limite máximo de resíduo permitido estabelecido para esses agrotóxicos associados à cultura da referida fruta, além disso, a utilização de agrotóxicos não permitidos na cultura da goiaba indica o uso indiscriminado dos agrotóxicos por parte de alguns agricultores, sendo negligenciadas as normas de uso e manuseio estabelecidas pela ANVISA.

Nas amostras oriundas de sete bairros estudados, nos quais foram detectados agrotóxicos, é observada a presença de cinco agrotóxicos diferentes (propacloro, clorpirifós, clorobenzilato, trifloxistrobina e fenpropatrina), onde propacloro e fenpropatrina foram detectados em todas as amostras. Na amostra sete (A7) o agrotóxico propacloro é detectado em um nível de concentração considerável ($0,491 \pm 0,076 \text{ mg kg}^{-1}$), por outro lado, de todas as amostra analisadas, a A6 é a que apresenta a maior concentração de fenpropatrina ($0,194 \pm 0,016 \text{ mg kg}^{-1}$). Vale salientar que o propacloro e a fenpropatrina são respectivamente mediamente tóxico e altamente tóxico, indicando assim um risco no consumo da fruta goiaba.

Dos agrotóxicos detectados, a trifloxistrobina é o único composto que tem uso autorizado para a cultura da goiaba, onde o mesmo é empregado em aplicação foliar na cultura da goiaba visando combater possíveis fungos que possam prejudicar o desenvolvimento da planta (ANVISA, 2014). A trifloxistrobina foi detectada na amostra sete (A7), todavia, a concentração mensurada é inferior ao limite máximo de resíduo permitido para a goiaba ($\text{LMR} = 0,050 \text{ mg kg}^{-1}$), ou seja, a concentração do agrotóxico presente na fruta está dentro do padrão estabelecido pela ANVISA.

Tabela 17 - Resultados das análises de amostras de goiaba comercializadas na cidade de Fortaleza. (Conclusão).

Agrotóxico	LD (mg kg⁻¹)	A1 (mg kg⁻¹)	A2 (mg kg⁻¹)	A3 (mg kg⁻¹)	A4 (mg kg⁻¹)	A5 (mg kg⁻¹)	A6 (mg kg⁻¹)	A7 (mg kg⁻¹)	A8 (mg kg⁻¹)
Cis-clordano	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Trans-clordano	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Clorobenzilato	0,002	0,003 ±0,001	0,003 ±0,001	<LD	<LD	0,002 ±0,001	<LD	<LD	<LD
Trifloxistrobina	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,005 ±0,001	<LD
Bifentrina	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fenpropratrina	0,003	0,030 ±0,010	0,036 ±0,006	0,057 ±0,010	0,047 ±0,002	0,061 ±0,014	0,194 ±0,016	0,091 ±0,008	<LD
Fenarimol	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Trans-permetrina	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Cis-permetrina	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Esfenvalerato	0,010	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 CONCLUSÕES

O emprego do método QuEChERS adaptado neste estudo apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração: procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, mesmo com o acréscimo do carvão ativo na etapa de limpeza, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos. A etapa de limpeza do método de extração com adição de carvão ativo demonstrou ser adequada, dado o fato que a adição de carvão ativo proporcionou a remoção de possíveis interferentes da matriz da amostra, tais como pigmentos.

Na validação do método, a avaliação da linearidade das curvas analíticas indica que o método apresenta linearidade para os agrotóxicos estudados. Além disso, as curvas analíticas apresentam significância estatística. É verificado ainda que o método apresenta boas características de desempenho (seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e recuperação).

O efeito de matriz se pronunciou de forma significativa para a maioria dos agrotóxicos, tanto de forma positiva quanto negativa, sendo considerado insignificante para os agrotóxicos hexaclorobenzeno e ametrina, para os demais se faz necessária à utilização das curvas preparadas na matriz para a quantificação dos agrotóxicos.

De modo geral, conclui-se que o método proposto se mostra viável a determinação de agrotóxicos em goiaba, e, portanto, pode ser utilizado para a determinação de agrotóxicos na fruta, dado que as características de desempenho do método atendem aos critérios estabelecidos pelos guias de validação.

Dentre as oito amostras analisadas, apenas na A8 não foram detectados agrotóxicos (<LD), em outras sete amostras foram detectados cinco agrotóxicos diferentes. Onde apenas a trifloxistrobina tem uso autorizado para a cultura da goiaba, além disso, a concentração mensurada se apresenta inferior ao LMR permitido. Os demais agrotóxicos detectados (propacloro, clorpirifós, clorobenzilato e fenpropratrina) não têm uso autorizado para a cultura da goiaba, indicando assim o uso indiscriminado dos agrotóxicos por parte de alguns agricultores.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para o controle da qualidade para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrados do PARA**. Brasília, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): relatório de atividades de 2010**. Brasília, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução nº899, de 29 de maio de 2003**, que revoga a Resolução nº 475 e dispõe sobre validação de métodos analíticos e bioanalíticos e determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ALBINET, A.; TOMAZ, S.; LESTREMAU, F. A really quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) extraction procedure for the analysis of particle-bound PAHs in ambient air and emission samples. **Science of The Total Environment**. v.450-451, p.31-38, 2013.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticides residue in produce. **Journal of AOAC International**. v.86, p.412-431, n.2, 2003.

ANDRADE, G. C. R. M. **Análises multirresíduos de agrotóxicos em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) utilizando CG-EM e monitoramento**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ANZILLOTTI, L.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MSMS. **Forensic Science International**. v.243, p.99-106, 2014.

AOAC OFFICIAL METHOD 2007.01. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. **AOAC International**. 2007.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. Huddersfield: Analytical techniques in the sciences, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 14029: agrotóxicos e afins – validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro, 2005.

BAIRD, C; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BARBOSA, P. G. A. **Desenvolvimento de método analítico para determinação multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi utilizando as técnicas QuEChERS e CG-EM.** 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química nova na escola.** v.34, p.10-15, n.1, 2012.

BRASIL DE FATO: UMA VISÃO POPULAR DO BRASIL E DO MUNDO. **Edição especial – Agrotóxicos.** São Paulo, junho 2011. Disponível em: <<http://www.contraosagrototoxicos.org/index.php/materiais/estudo/brasil-de-fato-especial-sobre-agrotoxicos/detail>>. Acesso em: 28 mai. 2014.

CABRERA, L. C. *et al.* Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica.** v.4, p.227-240, n.3, 2012.

CERQUEIRA, M. B. R. *et al.* Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere.** v.107, p.74-82, 2014.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acopladas à espectrometria de massas na análise de alimentos. **Química Nova.** v.31, p.623-636, n.3, 2008.

CHROMACADEMY. **The CHROMacademy Essential Guide Understanding GC-MS Analysis Part 1.** Disponível em: <http://www.chromacademy.com/Essential_Guide_Webcast/Understanding_GC-MS_Analysis_Part_1/Understanding_GC-MS_Analysis_Part_1.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2014.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** São Paulo: Editora Unicamp, 2006.

COSTA, T. M. S.; OLIVEIRA, R. S.; LUNA, A. S. Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico. **Revista Analytica.** p.46-51, n.21, 2006.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry: Part 1. **Fundamentals and single component calibration. Pure & Appl. Chem.** v.70, p. 993-1014, n.4, 1998.

DÍEZ, C. *et al.* Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A.** v.1131, p. 11–23, n.1-2, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Goiaba está pronta para ser consumida.** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/marco/4a-semana/goiaba-esta-pronta-para-ser-consumida/>>. Acesso em: 01 abr. 2014.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Document n° SANCO/12571/2013, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Document n° SANCO/10684/2009, 2010.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **Extended search for standards and/or projects.** Disponível em: <<https://www.cen.eu/cen/pages/default.aspx>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

FERNANDES, P. J.; BARROS, N.; CÂMARA, J. S. A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira wines based on a modified QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Research International.** v.54, p.293-301, n.1, 2013.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control.** v.27, p.188-193, n.1, 2012.

FREITAS, G. A. Produção e área colhida de goiaba no nordeste. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste.** n.24, p.1-7, 2010.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova.** v.29, p.105-112, n.1, 2006.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A. *et al.* Insecticides extraction from banana leaves using a modified QuEChERS method. **Food Chemistry.** v.125, p.1083-1090, n.3, 2011.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A.** v.1000, p.181-197, n.1-2, 2003.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** Tradução da 8. ed. Norte-americana. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

IDE, C. D.; MARTELLETO, L. A. P. Goiaba: controle de pragas e doenças. **PESAGRO-RIO.** 16 p, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal Culturas temporárias e permanentes.** Rio de Janeiro, v.38, p.1-97, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.** Brasília, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins.** Brasília, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de analíticos.** Revisão 04, 2011.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY – IUPAC. **IUPAC Agrochemical information.** Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

JOVANOV, P. *et al.* Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC-MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food Research International.** v.55, p.11-19, 2014.

KO, A. *et al.* Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. **Food Chemistry.** v.148, p.402-409, 2014.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry.** v.153, p.44-54, 2014.

KONG, K. *et al.* Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. **Food Chemistry.** v.123, p.1142-1148, n.4, 2010.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. **Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a practical approach.** Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009.

KUSTER, M.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews.** v.25, p.900-916, 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna – HPLC/CLAE.** São Paulo: Átomo, 2009.

LAVAGNINI, I. *et al.* **Quantitative Applications of Mass Spectrometry.** Chichester: John Wiley & Sons, 2006.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.49, p.4589-4596, n.10, 2001.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. 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, p. 615-629, n.2, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of AOAC International**. v.88, p.630-638, n.2, 2005.

LEHOTAY, S.J. *et al.* Determination of pesticide residues in Foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.90, p.485-520, n.2, 2007.

LI, L. *et al.* Simplified Pesticide Multiresidue Analysis of Soybean Oil by Low-Temperature Cleanup and Dispersive Solid-Phase Extraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of AOAC international**. v.90, p.1387-1394, n.5, 2007.

LI, N. *et al.* A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**. v.105, p.219-228, n.15, 2013.

LIGIERO, C. B. P. *et al.* Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**. v.32, p.1338-1341, n.5, 2009.

LOPES, R. P. *et al.* Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC–MS/MS analysis. **Food Control**. v.28, p.192-198, n.1, 2012.

MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2010. 149 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**. v.1040, p.259-272, n.2, 2004.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

MIAO, Q. *et al.* Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC–ECD. **Chemosphere**. v.91, p.955-962, n.7, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários (AGROFIT)**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 abr. 2014.

MORENO-GONZÁLEZ, D. *et al.* Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. **Talanta**. v.128, p.299-304, 2014.

NASSER, M. D.; MARIANO, F. A. C.; Informações tecnológicas, manejo integrado de pragas adotado pelos produtores e sugestões de medidas para o controle de pragas da goiabeira (*Psidium guajava*). **Thesis**. p.63-81, n.19, 2013.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed., Porto Alegre: Bookman, 2010.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v.25, p.856-865, n.5, 2002.

NGUYEN, T. D. *et al.* A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**. v.110, p.207-213, n.1, 2008.

NIMISHA, S. *et al.* Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective. **Scientia Horticulturae**. v.164, p.578-588, 2013.

PAÍGA, P. *et al.* Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**. v.135, p.2522-2528, n.4, 2012.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**. v.19, p.268-277, n.3, 1996.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química nova**. v.32, p.987-995, n.4, 2009.

POMMER, C. V.; MURAKAMI, K. R.N.; WATLINGTON, F. Goiaba no mundo. **O Agrônomo**. v.1/2, p.22-26, n.58, 2006.

PREFEITURA DE FORTALEZA. **Regionais**. Disponível em: <<http://www.fortaleza.ce.gov.br/regionais>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

PRESTES, O. D. *et al.* 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, p.1620-1634, n.6, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v.3, p.51-64, n.1, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**. v.35, p.185-192, n.1, 2011.

RAMOS, D. P. *et al.* Épocas de poda na sazonalidade, produção e qualidade dos frutos da goiabeira 'Paluma'. **Semina: Ciências Agrárias**. v.32, p.909-918, n.3, 2011.

RESTREPO, A. R. *et al.* QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. **Food Chemistry**. v.158, p.153-161, 2014.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, p.771-780, n.5, 2004.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**. v.10, p.149-158, n.14, 2009.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova**. v.31, p.164-171, n.1, 2008.

RODRIGUES, S. A. **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química - Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

ROGATSKY, E.; STEIN, S. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**. v.16, p.1757-1759, n.11, 2005.

SALVIA, M. V.; CREN-OLIVÉ, C.; VULLIET, E. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1315, p.53-60, 2013.

SANCHES, S. M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v.3, p.53-58, 2003.

SCHENCK, F. J. *et al.* A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. **Journal of AOAC International**. v.91, p.422-438, n.2, 2008.

SCHENCK, F. J.; HOBBS, J. E. Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.73, p.24-30, n.1, 2004.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**. v.2, p.21-25, n.1, 2011.

SILVA, R. O. **Otimização e validação de métodos empregando LC-ESI-MS/MS e QuEChERS para determinação de resíduos agrotóxicos caju**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013.

SOUSA, J. S. *et al.* Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**. v.141, p.2675–2681, n.3, 2013.

STEPAN, R.; TICHA, J.; HAJŠLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**. v.22, p.1231-1242, n.12, 2005.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Handbook of Analytical Validation. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.

TAVELLA, L. B. *et al.* O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**. v.7, p.6-12, n.2, 2011.

USUI, K. *et al.* Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. **Legal Medicine**. v.14, p.286-296, n.6, 2012.

VALENTE, I. M. *et al.* New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1271, p.27-32, n.1, 2013.

WESTLAND, J. L.; DORMAN, F. L. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v.3, p.509-517, n.6, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Health topics Pesticides**. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

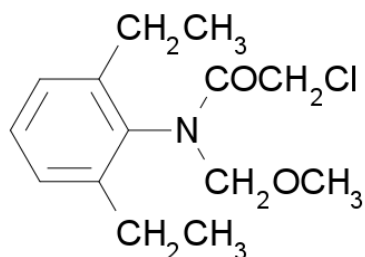
ZHANG, Y.; ZHANG, X.; JIAO, B. Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**. v.159, p.367-373, 2014.

ANEXO A – INFORMAÇÕES DOS AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

Alacloro

O alacloro (2-chloro-2',6'-diethyl-N-methoxymethylacetanilide) de fórmula química $C_{14}H_{20}ClNO_2$ (Figura16), número CAS 15972-60-8 pertence à classe toxicológica III, é empregado como herbicida, pertence ao grupo químico cloroacetanilida (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 16 - Fórmula estrutural do alacloro.

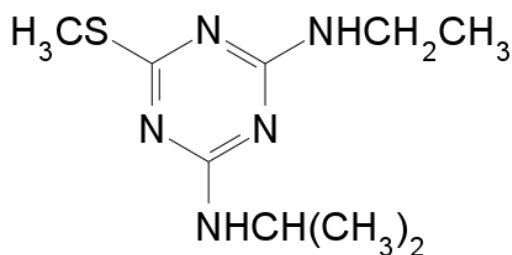


Fonte: Elaborada pelo autor.

Ametrina

A ametrina (N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine) de fórmula química $C_9H_{17}N_5S$ (Figura 17), número CAS 834-12-8 pertence à classe toxicológica III, é empregado como herbicida, pertence ao grupo químico triazina (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 17 - Fórmula estrutural da ametrina.

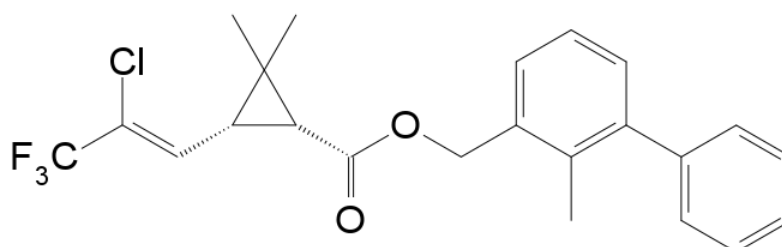


Fonte: Elaborada pelo autor.

Bifentrina

A bifentrina (2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate) de fórmula química $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$ (Figura 18), número CAS 82657-04-3 pertence à classe toxicológica II, é empregado como herbicida e acaricida, pertence ao grupo químico piretróide (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 18 - Fórmula estrutural da bifentrina.

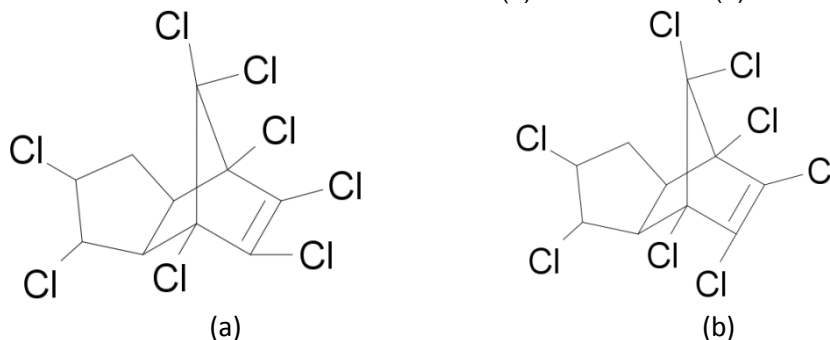


Fonte: Elaborada pelo autor.

Clordano (cis e trans)

O clordano (1,2,4,5,6,7,8,8-octachloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methanoindene) de fórmula química $C_{10}H_6Cl_8$ (Figura 19) número CAS 5103-71-9 pertence à classe toxicológica II, é empregado como inseticida, pertence ao grupo químico organoclorado (IUPAC, 2014).

Figura 19 - Fórmula estrutural dos isômeros do clordano: (a) cis-clordano e (b) trans-clordano.

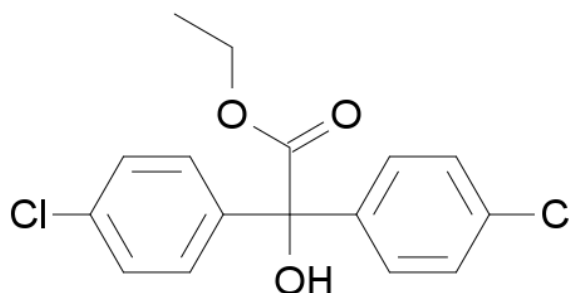


Fonte: Elaborada pelo autor.

Clorobenzilato

O clorobenzilato (tetrachloroisophthalonitrile) de fórmula química $C_{16}H_{14}Cl_2O_3$ (Figura 20) número CAS 510-15-6 pertence à classe toxicológica III, é empregado como inseticida e acaricida, pertence ao grupo químico organoclorado (IUPAC, 2014).

Figura 20 - Fórmula estrutural do clorobenzilato.

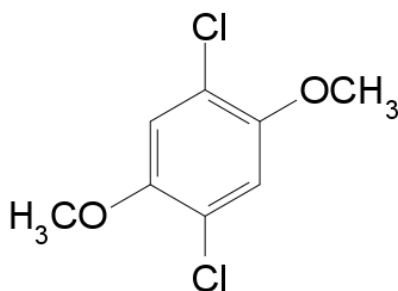


Fonte: Elaborada pelo autor.

Cloroneb

O cloroneb (1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene) de fórmula química $C_8H_8Cl_2O_2$ (Figura 21) número CAS 2675-77-6 pertence à classe toxicológica IV, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico organoclorado (IUPAC, 2014).

Figura 21 - Fórmula estrutural do cloroneb.

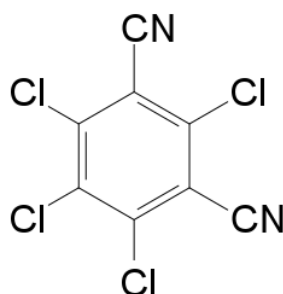


Fonte: Elaborada pelo autor.

Clorotalonil

O clorotalonil (1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene) de fórmula química $C_8Cl_4N_2$ (Figura 22) número CAS 1897-45-6 pertence à classe toxicológica II, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico cloronitrila (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 22 - Fórmula estrutural do clorotalonil.

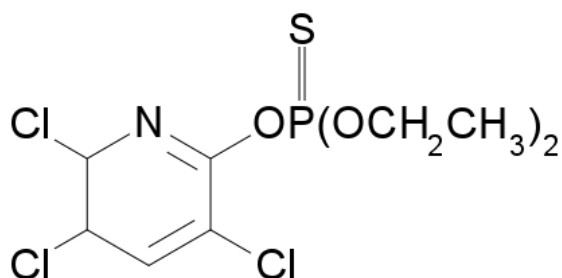


Fonte: Elaborada pelo autor.

Clorpirifós

O clorpirifós (1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene) de fórmula química $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (Figura 23) número CAS 2921-88-2 pertence à classe toxicológica II, é empregado como inseticida, formicida e acaricida, pertence ao grupo químico organofosforado (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 23 - Fórmula estrutural do clorpirifós.

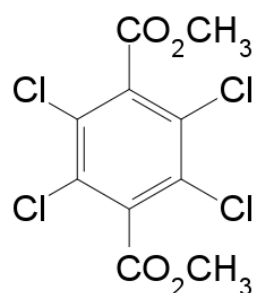


Fonte: Elaborada pelo autor.

Clortal-dimetílico (DCPA)

O DCPA (dimethyl 2,3,5,6-Tetrachloroterephthalate) de fórmula química $C_8H_6Cl_4O_4$ (Figura 24) número CAS 1861-32-1 pertence à classe toxicológica IV, é empregado como herbicida, pertence ao grupo químico Ácido benzenodicarboxílico substituído (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 24 - Fórmula estrutural do DCPA.

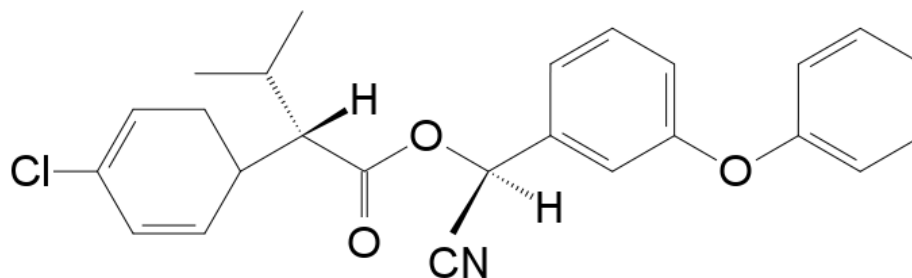


Fonte: Elaborada pelo autor.

Esfenvalerato

O esfenvalerato ((S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (S)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate) de fórmula química $C_{25}H_{22}ClNO_3$ (Figura 25) número CAS 66230-04-4 pertence à classe toxicológica II, é empregado como inseticida, pertence ao grupo químico piretróide (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 25 - Fórmula estrutural do esfenvalerato.

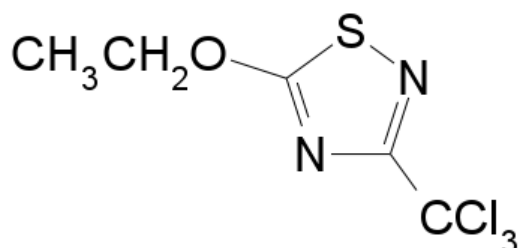


Fonte: Elaborada pelo autor.

Etridiazol

O etridiazol (ethyl 3-trichloromethyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl ether) de fórmula química $C_5H_5Cl_3N_2OS$ (Figura 26) número CAS 2593-15-9 pertence à classe toxicológica III, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico hidrocarbonetos aromático (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 26 - Fórmula estrutural do etridiazol.

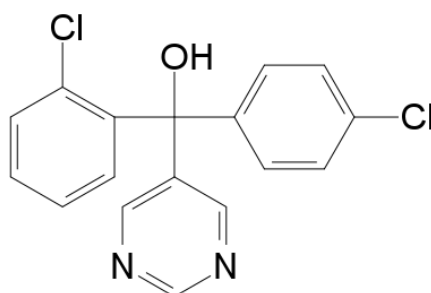


Fonte: Elaborada pelo autor.

Fenarimol

O fenarimol ((*RS*)-2,4'-dichloro-a-(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol) de fórmula química $C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$ (Figura 27) número CAS 60168-88-9 pertence à classe toxicológica III, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico pirimidinil carbinol (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 27 - Fórmula estrutural do fenarimol.

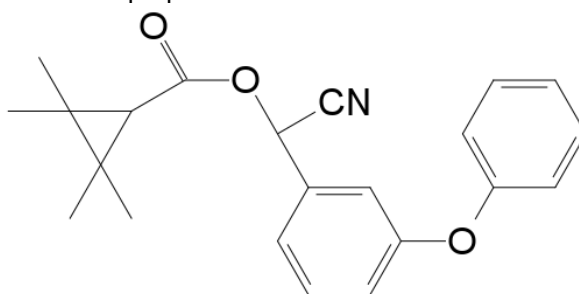


Fonte: Elaborada pelo autor.

Fenpropatrina

A fenpropatrina ((*RS*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethyl cyclopropanecarboxylate) de fórmula química $C_{22}H_{23}NO_3$ (Figura 28) número CAS 39515-41-8 pertence à classe toxicológica II, é empregado como inseticida e acaricida, pertence ao grupo químico piretróide (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 28 - Fórmula estrutural da fenpropatrina.

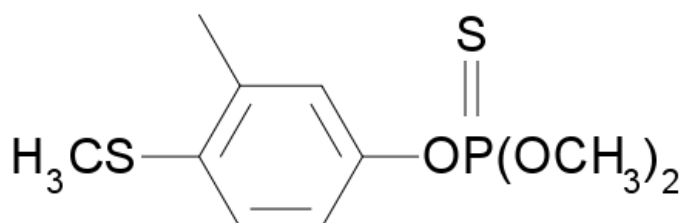


Fonte: Elaborada pelo autor.

Fentiona

A fentiona (*O,O*-dimethyl *O*-4-methylthio-*m*-tolyl phosphorothioate) de fórmula química $C_{10}H_{15}O_3PS_2$ (Figura 29) número CAS 55-38-9 pertence à classe toxicológica II, é empregado como Inseticida, formicida, acaricida e cupinicida, pertence ao grupo químico organofosforado (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 29 - Fórmula estrutural da fentiona.

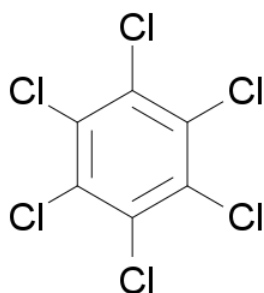


Fonte: Elaborada pelo autor.

Hexaclorobenzeno

O hexaclorobenzeno (perchlorobenzene) de fórmula química C_6Cl_6 (Figura 30) número CAS 118-74-1 pertence à classe toxicológica IV, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico organoclorado (IUPAC, 2014).

Figura 30 - Fórmula estrutural do Hexaclorobenzeno.

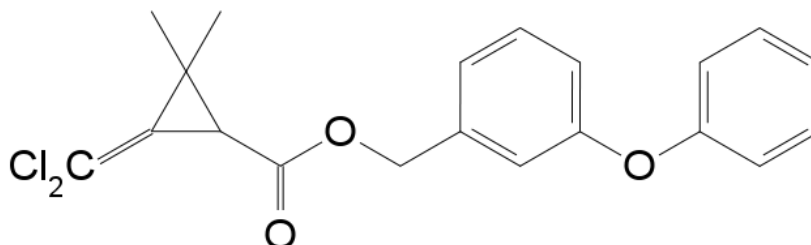


Fonte: Elaborada pelo autor.

Permetrina (cis e trans)

A permetrina (3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) de fórmula química $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ (Figura 31) número CAS 52645-53-1 pertence à classe toxicológica II, é empregado como inseticida e formicida, pertence ao grupo químico piretróide (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 31 - Fórmula estrutural da permetrina.

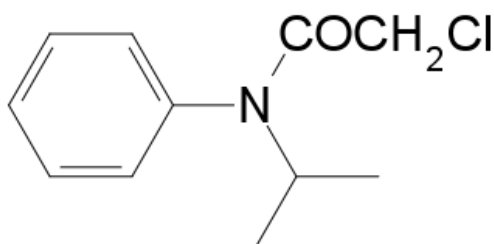


Fonte: Elaborada pelo autor.

Propacloro

O propacloro (2-chloro-*N*-isopropylacetanilide)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate) de fórmula química $C_{11}H_{14}ClNO$ (Figura 32) número CAS 1918-16-7 pertence à classe toxicológica III, é empregado como herbicida, pertence ao grupo químico cloroacetamida (IUPAC, 2014).

Figura 32 - Fórmula estrutural do propacloro.

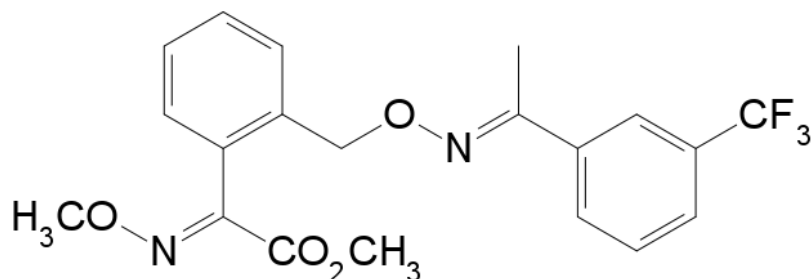


Fonte: Elaborada pelo autor.

Trifloxistrobina

A trifloxistrobina (methyl (*E*)-methoxyimino-{(*E*)- α -[1-(α,α,α -trifluoro-mtolyl) ethylideneaminoxy]-*o*-tolyl}acetate) de fórmula química $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ (Figura 33) número CAS 141517-21-7 pertence à classe toxicológica III, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico imidazol (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 33 - Fórmula estrutural da trifloxistrobina.

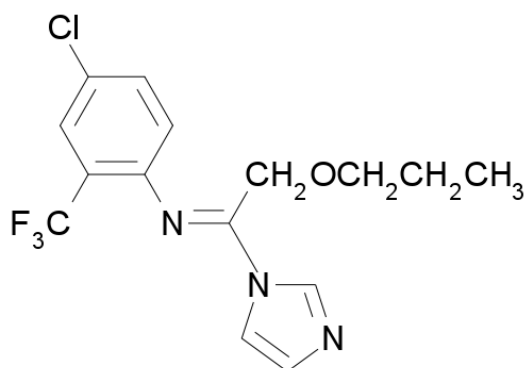


Fonte: Elaborada pelo autor.

Triflumizol

O triflumizol ((*E*)-4-chloro- α,α,α -trifluoro-*N*-(1-imidazol-1-yl-2-propoxyethylidene)-*o*-toluidine) de fórmula química $C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$ (Figura 34) número CAS 99387-89-0 pertence à classe toxicológica III, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico estrobilurina (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 34 - Fórmula estrutural do triflumizol.

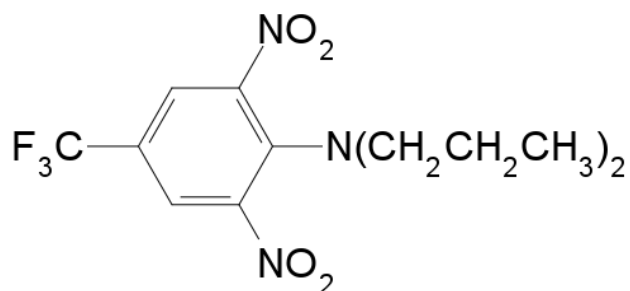


Fonte: Elaborada pelo autor.

Trifluralina

A trifluralina (α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-*N,N*-dipropyl-*p*-toluidine) de fórmula química $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ (Figura 35) número CAS 1582-09-8 pertence à classe toxicológica III, é empregado como fungicida, pertence ao grupo químico dinitroanilina (ANVISA, 2014; IUPAC, 2014).

Figura 35 - Fórmula estrutural da trifluralina.



Fonte: Elaborada pelo autor.